



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE
AGMATINA EN RATONES HEMBRA CON ISQUEMIA
CEREBRAL AGUDA INDUCIDA POR TROMBOSIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

STACY YARAVIT RUIZ OROPEZA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO**

**REVISOR DE TESIS:
DRA. LAURA ELISA RAMOS LANGUREN**

Ciudad Universitaria CD. MX.2023



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.

A todas las personas que lograron trascender en mi mente y en mi corazón, de quienes siempre conservo una parte. Por su amor, compañía y apoyo, ustedes son la fuerza vital que colma mi existencia.

Agradecimientos

A mi mamá, Yadira, quien me amó desde el primer día. La vida entera no me alcanza para agradecer todos los esfuerzos que has hechos en mi nombre. No sólo me criaste con amor y respeto, sino que, a través de tu tiempo, apoyo y confianza, me diste las herramientas para continuar mi camino. Gracias por estar en cada paso y abrazarme cuando lo necesitaba, por ser una inspiración para mejorar y un recordatorio de que no necesito ser perfecta. Tu amor ha sido el motor que me ha permitido crecer y alcanzar logros que parecían distantes.

A mi querida mamá, María, quiero expresar mi profundo agradecimiento por cuidarme y ofrecerme una valiosa perspectiva de la vida. Tu dulzura mejora los obstáculos del camino y saber que cuento contigo me hace sentir acompañada en todo momento.

A mi estimado papá, Armando, quiero agradecerle por enseñarme el valor de servir a los demás y por brindarme su amor y apoyo, a pesar de las diferencias en los mundos en los que habitamos.

A mis tíos, quienes realmente han sido mis hermanos, acompañándome a lo largo de la vida y enseñándome a ser fuerte. A Julio, agradezco por contribuir a mi mejora en la vida y demostrarme que el amor tiene un millón de presentaciones. A Rodrigo, por ser mi guía en la niñez y ser siempre una fuente de inspiración para explorar nuevos horizontes. A Ángel, agradezco por permitirme compartir una parte de su vida y por buscar siempre maneras de ayudarme, incluso cuando no quiero admitir que lo necesito.

A la Dra. Claudia Gómez Acevedo, no sólo por ser la primera en darme una oportunidad, abriéndome las puertas de su laboratorio, sino por impulsar cada una de mis ideas brindándome un espacio seguro para desarrollarme y complementar mis ideas. Gracias por demostrarme, que, a pesar de las adversidades, en ocasiones se ganas más con amabilidad y conocimientos que con gritos y peleas.

Al distinguido jurado conformado por la Dra. Laura Elisa Ramos Languren, la Dra. Irma Yolanda del Río Portilla, el Dr. Octavio César García González y el Dr. César Casasola

Castro, mi más sincero agradecimiento por el generoso tiempo que dedicaron para contribuir a la mejora de este proyecto y por sus invaluable aportaciones.

A Lis, tu nombre en los agradecimientos no es suficiente, pero es un inicio. Gracias por permitirme ser tu padawan, por enseñarme con paciencia y enorgullecerte ante mis logros, por desafiarme y sacar lo mejor de mí. Aprecio enormemente la confianza que depositaste en mí, las risas compartidas y cada uno de los preciosos momentos que hemos vivido juntas.

A Isaías, agradezco sinceramente por formar conmigo un equipo imparabile. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba de mis propias capacidades e impulsarme para seguir adelante. Valoro enormemente los abrazos, risas, cuidados, las conversaciones y silencios que me has brindado, ya que cada uno de estos elementos ha sido fundamental para acercarme más a la realización de mis sueños. Tu apoyo ha sido un pilar esencial en mi camino.

A la Dra. Ruth Jaimez, ofrezco mi agradecimiento por compartir generosamente su conocimiento, espacio y tiempo conmigo. Además, agradezco por mostrarme la importancia y cuidado de los animales, quienes brindan su vida como fuente de nuestro conocimiento.

A mis entrañables amigos Owen e Itzel, quiero expresar mi gratitud por demostrarme que la verdadera amistad no se ve afectada por la distancia ni el paso del tiempo. Su constante apoyo y presencia han sido un recordatorio invaluable de que la amistad perdura más allá de las circunstancias.

A Luis, mi sincero agradecimiento por ser mi primer amigo en la universidad y por compartir conmigo no solo los estudios, sino también los momentos de juego y las experiencias bajo la lluvia. Tu amistad ha sido un regalo preciado en esta etapa de mi vida.

A Dani, gracias por enseñarme que nada es evidente. Tu perspectiva y sabiduría han sido invaluable, recordándome la importancia de explorar más allá de lo obvio.

Índice General

. Lista de Abreviaturas.....	1
. Resumen	2
I. Antecedentes	3
1. Enfermedades cerebrovasculares.....	3
1.1 Epidemiología.....	3
2. Isquemia cerebral.....	5
2.1 Ataque isquémico transitorio	6
2.2 Isquemia cerebral aguda	7
3. Isquemia: diferencias con respecto al sexo	8
4. Cascada isquémica cerebral.....	9
4.1 Disminución del ATP.....	11
4.2 Despolarización alterada.....	11
4.3 Excitotoxicidad	11
4.4 Aumento de calcio intracelular	12
4.5 Formación de radicales libres	12
4.6 Liberación de factores inflamatorios.....	13
4.7 Daño a la barrera hematoencefálica	14
5. Agmatina	14
5.1 Agmatina en la excitotoxicidad.....	15
5.2 El papel de la agmatina en la formación de radicales libres.....	15
5.3 La función de la agmatina en la respuesta neuroinflamatoria	16
5.4 La agmatina y la barrera hematoencefálica	16
6. Modelos animales	17
6.1 Modelo de trombosis en la arteria carótida.....	18
II. Justificación	19
III. Pregunta de investigación.....	20
IV. Hipótesis	20
V. Objetivos.....	21
7. Objetivo general	21
8. Objetivos específicos	21

VI. Metodología.....	22
9. Animales	22
10. Evaluación conductual	23
10.1 Escala del estado de discapacidad neurológica	23
10.2 Prueba de excavación.....	24
11. Técnicas quirúrgicas	25
11.1 Ovariectomía	25
11.2 Trombosis bilateral carotídea	26
12 Administración de fármacos.....	27
13 Tinción con 2,3,5-Cloruro de Trifeniltetrazolio	28
14 Sobrevida.....	28
15 Análisis estadístico	29
16 Cronograma experimental	30
VI. Resultados.....	30
17 Sobrevida.....	30
18 Evaluación neuroconductual medida por la escala del estado de discapacidad neurológica	32
19 Evaluación conductual por medio de la prueba de excavación	35
20 Área de infarto.....	40
VII. Discusión	42
VIII. Conclusiones	49
IX. Perspectivas a futuro	50
Referencias	51

• Lista de Abreviaturas

EVC: Enfermedades Vasculares Cerebrales
FSC: Flujo sanguíneo cerebral
AIT: Ataque isquémico transitorio
ICA: Isquemia cerebral aguda
PARP: ADP-ribosa polimerasa
ATP: Adenosín trifosfato
GLU: Glutamato
SNC: Sistema Nervioso Central
NMDA: N-metil-d-aspartato
AMPA: Ácido alpha-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintasa
SOD: Superóxido dismutasa
ROS: Especies reactivas de oxígeno
MMP: Metaloproteasas de matriz
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
IL-1 β : Interleucina 1 beta
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
NF- κ B: Factor nuclear kappa B
BHE: Barrera hematoencefálica
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
HMGB1: Proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad
TLR: Receptores tipo Toll
AQP: Aquaporinas
FeCl₃: Cloruro Férrico
TBC: Trombosis bilateral carotídea
NDSS: Escala del estado de discapacidad neurológica
TTZ: 2,3,5-Cloruro de Trifeniltetrazolio

• Resumen

Las Enfermedades Vasculares Cerebrales (EVC) hacen referencia a los daños ocasionados por alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral. Alrededor del mundo, las EVC son consideradas la segunda causa de muerte y la tercera causa de discapacidad. Las EVC isquémicas se presentan con mayor frecuencia, ya que constituyen un 80-85% de los casos totales, estas son caracterizadas por una interrupción transitoria o permanente del flujo sanguíneo. De manera reciente, las mujeres han destacado como un grupo de riesgo en las EVC, donde la mortalidad, discapacidad, depresión y demencia tiene mayores tasas.

A pesar de lo anterior, no existen tratamientos eficaces ante una EVC isquémica, dicho problema se incrementa en las mujeres donde diversos aspectos fisiológicos, clínicos y sociales, retrasan las intervenciones médicas.

Es por lo que nuestro principal objetivo es proponer el uso de la agmatina exógena como tratamiento ante las EVC isquémicas, esta molécula ha demostrado tener efectos neuroprotectores al actuar sobre la cascada isquémica y reducir sus efectos. Para ello se utilizaron ratones hembra CD1 de 4 meses de edad, previamente ovariectomizadas, a las cuales, a través de la aplicación de FeCl₃ en las arterias carótidas, se les provocó un trombo, este evento se realizó dos veces separados por un periodo de 32 días. A los grupos con esta lesión se les administró agmatina (100mg/kg) o solución salina (0.9%) 15 minutos después del segundo evento. Las alteraciones observadas por la inducción de la isquemia cerebral en los ratones fueron evaluadas mediante la aplicación de una escala del estado de discapacidad neurológica y la prueba conductual de excavación.

Los resultados obtenidos muestran una tendencia a la reducción de los déficits neuroconductuales en los animales administrados con agmatina. En estos mismos grupos, también es posible observar una mejora del rendimiento en la conducta de excavación con respecto a su línea base. Nuestros resultados muestran tendencias importantes que pueden servir como base para la investigación de la neuroprotección de la agmatina en hembras.

Palabras clave: EVC, isquemia, neuroprotección, agmatina, hembras

I. Antecedentes

1. Enfermedades cerebrovasculares

Las Enfermedades Vasculares Cerebrales (EVC), también conocidas como eventos o accidentes cerebrovasculares se refieren a una serie de daños cerebrales ocasionados por alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral (Ardila y Ostrosky, 2012) las cuales, se encuentran relacionadas a la ruptura u oclusión de venas o arterias asociadas al encéfalo (Campaña, 2021). De manera general, las EVC tienen una aparición súbita, con presencia de síntomas cuya duración es mayor a 24 horas, ocasionando secuelas en los pacientes e incluso la muerte (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2019). Las EVC pueden ser clasificadas en dos tipos principales, dependiendo de su etiología en hemorrágicas, aquellas causadas por sangrado cerebral que representan del 15 al 20 % de los casos totales, y las EVC isquémicas, presentadas con mayor frecuencia, constituyendo alrededor del 80-85 % de las EVC (Campaña, 2021).

1.1 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que anualmente 15 millones de personas presentan una EVC en el mundo. Asimismo, la OMS (2020), señala a las EVC como la segunda causa de defunción más frecuente en el mundo, cobrando la vida de 5 millones de personas al año y dejando incapacitadas de manera permanente a otros 5 millones de personas. De estos casos, las mujeres presentan mayores tasas de mortalidad, discapacidad, demencia y depresión posteriores a una EVC (Gibson, 2013). Según Spychala y McCullough (2016), en los Estados Unidos, de los sobrevivientes de una EVC, las mujeres tienen un mayor riesgo de sufrir una discapacidad y vivir solas después del evento, por lo que las tasas de mujeres en hogares de ancianos son 3.5 más altas en comparación con los hombres.

De manera anual, en México las EVC tienen una incidencia 143 por cada 100,000 habitantes y una prevalencia de 78 por cada 100,000 habitantes (Ruiz et al., 2018). Además, las EVC cuentan con una tasa de hospitalización, durante la primera aparición, de 143 por

cada 100,000 en personas mayores a los 25 años (Ruiz et al., 2018). El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2023) señaló que, en 2022, las EVC representaron la séptima causa de muerte en la población mexicana general y la quinta causa de muerte en los adultos mayores de 65 años. Estos datos varían entre la población masculina y femenina, mientras que para la población masculina las EVC son consideradas como la octava causa de muerte, para las mujeres significan el cuarto motivo de defunción (INEGI, 2023).

Existen múltiples factores que elevan el riesgo de la presencia de una EVC. El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2015) define a los factores de riesgo en dos principales categorías: No modificables y modificables. La edad es uno de los factores de riesgo no modificables, a mayor número de años el riesgo de padecer una EVC se ve incrementado. De acuerdo con Gonzales y Landinez (2016) la tasa de incidencia total en personas mayores de 55 años varía, para EVC isquémicas entre 420 y 650 por cada 100 000 habitantes, por su parte para EVC hemorrágicas primarias la incidencia total es de 30 a 120 por cada 100 000 habitantes. Dado que las mujeres tienen una mayor esperanza de vida Gasbarrino et al. (2021) señalan que las mujeres mayores de 85 años presentan un riesgo elevado de padecer una EVC. Entre estos factores de riesgo, el género emerge como un elemento crucial. Antes de los 50 años, los hombres presentan una mayor propensión a sufrir una EVC. Sin embargo, según la Dirección de Prestaciones Médicas del IMSS, después de esta edad en México, las mujeres experimentan con mayor frecuencia la presencia de EVC (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2019). Este fenómeno podría atribuirse al incremento del riesgo de padecer un EVC en mujeres durante las etapas posteriores a la menopausia (Gibson, 2013).

Por su parte, en el grupo de factores de riesgo modificables, Gonzales y Landinez (2016), señalan que el 90 % del riesgo total de padecer una EVC es atribuible a factores vasculares como la hipertensión, el índice de cintura-cadera aumentado, ausencia de actividad física, dieta poco balanceada, estrés, patologías cardíacas, relación apolipoproteínas B/A1, consumo de alcohol, tabaquismo (aumenta tres veces el riesgo de padecer una EVC) y el padecimiento de diabetes Mellitus, la cual eleva el riesgo de presentar una EVC de dos a cuatro veces (Secretaría de Salud, 2018). Algunos de estos

factores afectan de manera diferenciada a la población femenina y masculina; la diabetes, la hipertensión y la obesidad tienen una mayor asociación entre las mujeres y la incidencia de EVC. De igual manera, en este grupo existen factores de riesgo específicos entre los que se encuentran el uso de píldoras anticonceptivas, la terapia hormonal de remplazo, la menopausia prematura, la menarquia temprana o tardía, así como efectos adversos del embarazo (Rexrode et al., 2022), la presencia de síndrome de ovario poliquístico, cáncer de ovario o mama y enfermedades inflamatorias (Gasbarrino et al., 2021).

2. Isquemia cerebral

En condiciones normales el flujo sanguíneo cerebral (FSC) en humanos es de 55ml/100g/min lo que provee de oxígeno y glucosa necesarios para asegurar el correcto funcionamiento del cerebro (Arauz et al., 2002). Sin embargo, dicho flujo puede verse interrumpido debido a diversas causas. Por su origen etiológico, Simon et al. (2010), señalan principalmente causas vasculares, cardíacas y hematológicas (Tabla 1). Mientras tanto Carlson (2014), señala que la obstrucción es ocasionada por émbolos o trombos. La mayoría de EVC Isquémicas son de origen trombótico, siendo la arterosclerosis la causa más común de la formación de estos (Gonzales y Landinez, 2016). Los trombos son formados en el interior del vaso sanguíneo y crecen hasta que la sangre ya no puede fluir a través del él (Carlson, 2014). Es así como pueden producirse diferentes tipos de EVC Isquémicas, estas serán clasificadas de acuerdo con el área afectada o la duración de la obstrucción.

Causas vasculares	Causas cardiacas	Causas hematológicas
<p>Enfermedad arterial</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aterosclerosis • Disección de arteria cervical • Vasculopatía <ul style="list-style-type: none"> ○ Inducida por radiación ○ Hereditaria ○ Vasculitis • Vasoespasmo <p>Enfermedad venosa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trombosis del seno venoso • Trombosis de vena cortical 	<p>Fuentes cardiacas de embolia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fibrilación auricular • Insuficiencia del ventrículo izquierdo • Infarto de miocardio • Endocarditis <ul style="list-style-type: none"> ○ Infecciosa ○ Inflamatoria ○ Trombótica • Tumor cardiaco <p>Otras causas cardiacas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Paro cardiaco • Agujero oval permeable 	<ul style="list-style-type: none"> • Estado hipercoagulante • Anemia de células falciformes • Hiperviscosidad • Linfoma intravascular

Tabla 1: Causas de la EVC isquémica tomado y modificado de Simon, Greenberg y Aminoff, 2010.

2.1 Ataque isquémico transitorio

Vacca (2015), define el ataque isquémico transitorio (AIT) como una disfunción neurológica, la cual es ocasionada por un cuadro de isquemia focal que afecta el encéfalo. A diferencia de la isquemia cerebral aguda, en los estudios de imagen, el AIT no presenta infarto tisular cerebral. Su comienzo, al igual que otras EVC es súbito, llegando a durar desde unos minutos hasta una hora. La importancia clínica de reconocer estos eventos radica en que un tercio de los pacientes que han presentado un AIT en el transcurso de cinco años, presentarán un evento isquémico cerebral agudo. Huan et al. (2018) indican que, de los casos totales de pacientes que experimentaron un AIT aproximadamente el 5% desarrollará una isquemia cerebral agudo (ICA) en las siguientes 24 horas, otro 5% en las 48 horas subsiguientes, un 10% en una semana, un 9% en un mes, y entre el 10% y el 20% en el transcurso de tres meses. Simón et al. (2010), proponen el uso ABCD2, una puntuación clínica de pronóstico que permite estimar el riesgo de presentar una EVC tras la presencia de una AIT, en esta escala los investigadores toman en cuenta: La edad, presión arterial, síntomas clínicos, si padece o no diabetes y la duración de la AIT.

2.2 Isquemia cerebral aguda

La isquemia cerebral aguda (ICA) o infarto cerebral hace referencia a la presencia de lesión isquémica que provoca un déficit con una duración mayor a 24 horas (Gonzales y Landinez, 2016). Esta puede subdividirse en isquemia global, focal o multifocal. En la isquemia global se puede observar una reducción de la función en la mayor parte o en todo el cerebro. Por otro lado, en la isquemia focal la reducción del FSC se da en un área específica del cerebro. En la isquemia multifocal existen varias áreas afectadas por la reducción del FSC (Traystman, 2003). Además, la ICA puede clasificarse dependiendo de su distribución topográfica como infartos del vertebro-basilar (posterior) y del territorio carotideo (anterior), (Gonzales y Landinez, 2016). La arteria carótida interna suministra sangre a aproximadamente el 70 % del encéfalo, por lo que las oclusiones en esta arteria resultan en un daño cerebral extenso (Paciaroni et al., 2012). La arteria carótida común tiene dos ramificaciones; la parte externa que se encuentra a nivel del cuello y la parte interna que da origen a las ramas cerebrales anterior, media y a la arteria oftálmica (Simon et al., 2010).

La oclusión de la arteria carótida representa aproximadamente una quinta parte de los casos de ICA y su gravedad varía dependiendo de FSC restante, ya que cuando esta arteria se encuentra obstruida se generan mecanismos de compensación. Debido a que en la ICA se ve afectado el flujo sanguíneo de una parte específica del cerebro, los signos y síntomas presentados dependerán de las funciones neurológicas que realice el área afectada (Simon et al., 2010). En el caso de la obstrucción de la arteria carótida interna, la compensación de FSC puede ocasionar que el infarto sea asintomático, sin embargo, en caso de hacerse presentes los síntomas se puede desarrollar hemiplejía contralateral, déficit hemisensorial y hemianopsia homónima. Si la obstrucción se presenta en el hemisferio dominante pueden presentarse algunos tipos de afasia. En aproximadamente el 15 % de los casos, previo a la obstrucción de la arteria fueron presentados AIT o ceguera monocular transitoria (Simon et al., 2010).

3. Isquemia: diferencias con respecto al sexo

Dentro de los datos epidemiológicos de las EVC isquémicas, se han encontrado diferencias entre la población masculina y femenina. Dichas diferencias pueden estar basadas en diversos factores, que abarcan desde aspectos clínicos, fisiológicos y sociales. Gracias a los comportamientos de búsqueda de atención médica y obtención de información sobre salud, asociado principalmente con las mujeres, estas son capaces de reconocer de manera rápida, los signos de EVC lo que podría conducir a un tratamiento temprano y por lo tanto a una mejor recuperación. Sin embargo, el reconocimiento de los signos tradicionales no es suficiente para la intervención eficaz en las pacientes del sexo femenino. Durante el ingreso hospitalario los hombres, en su mayoría, presentan "síntomas clásicos" como alteración repentina de la visión en uno o ambos ojos, presencia repentina de entumecimiento o debilidad en un brazo, pierna o ambos, dificultades para producir o entender el habla, pérdida del equilibrio o la coordinación, mareos y aparición de dolor de cabeza intenso (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2015). Por el contrario, en las mujeres se hacen presentes "síntomas no clásicos" los cuales incluyen cambios en el estado mental, migraña, dolor torácico, náuseas, debilidad no facial, palpitaciones y dificultad para respirar. Establecer protocolos hospitalarios que permitan discriminar los síntomas según el sexo podría contribuir a las intervenciones eficaces ante una EVC isquémica; sin embargo, Gibson y Attwood (2016) señalan que aún faltan estudios que respalden la distorsión en los síntomas presentados, además, señala que una de las posibles causas de dicha diferenciación es que ante la sospecha de una EVC las mujeres tardan hasta tres veces más en buscar un tratamiento. Esta demora podría atribuirse a las influencias sociales, como el papel de género (Gasbarrino et al., 2021).

Por otra parte, investigadores como Spychala et al. (2016), han centrado sus estudios en la aparente diferencia sexual que existe en la muerte celular, las respuestas inmunitarias y la inflamación presentadas ante un EVC isquémico. La menopausia es definida como la ausencia de menstruación en un período de 12 meses, si esta se hace presente de manera natural antes de los 42 años, el riesgo de padecer una EVC isquémica se incrementa al doble en comparación a las mujeres que presentan la menopausia después de esa edad. Esto se debe a que durante la etapa reproductiva, las mujeres son capaces de

secretar altos niveles de hormonas sexuales, las cuales tienen un efecto protector en el sistema vascular tanto cardiaco como cerebral (Fan, 2017). Dentro de dichas hormonas se encuentra la progesterona, la cual ha demostrado tener un efecto neuroprotector ante diversos eventos como las EVC isquémicas, en las que se ha podido observar una disminución del volumen de la lesión y un aumento en las funciones neurológicas en modelos de ratas y ratones (Zhu et al., 2019). Otra hormona que ha sido utilizada ante los EVC isquémicos ha sido el estrógeno, el cual si es administrado en cualquier momento de la vida de un macho tiene efectos beneficiosos ante las EVC, por el contrario, si los estrógenos son administrados en hembras después de un período prolongado de senescencia gonadal se puede incrementar el daño producido por el EVC (Spychala et al., 2016).

Existen otros mecanismos no hormonales, de los cuales depende la diferenciación sexual en la isquemia presentada. La muerte neuronal mediada por caspasas es uno de los ejemplos más claros, esta vía de señalización predomina en las mujeres, mientras que los hombres, la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) juega un papel fundamental como vía de señalización apoptótica independiente de caspasas. Spychala et al. (2016) señalan que estos mismos mecanismos son observados en crías hembras de ratón, además, son independientes de estrógeno lo que proporciona información acerca de la existencia de diferencias organizativas o epigenéticas en las vías de las caspasas entre hembras y machos. A pesar de que se conocen algunas diferencias entre ambos sexos, aún no existen estudios suficientes que nos permitan entender las variaciones sexuales en los mecanismos involucrados en la isquemia. Sin embargo, Gibson y Attwood (2016) señalan que, si se activan vías diferenciadas para ambos sexos después de un evento isquémico, el sexo debe ser tomado en cuenta para el desarrollo de tratamientos potenciales para las EVC isquémicas.

4. Cascada isquémica cerebral

Una vez que los niveles de FSC están disminuidos (10 ml/100 g/min), ni las neuronas ni la glía cuentan con los elementos necesarios para su supervivencia por lo que comienzan una serie de mecanismos moleculares que provocan la muerte neuronal inmediata en las áreas que dependen directamente de la arteria o vaso afectado (Alonso, 2007). Esta área es conocida como núcleo del infarto o zona de infarto, en ella la

deficiencia de glucosa y oxígeno conducen la pérdida de la función de la membrana y de la homeostasis iónica, lo que provoca la muerte neuronal. El área que rodea al núcleo del +xz infarto es conocida como el área de penumbra (Lakhan et al., 2009), un área que conserva un flujo sanguíneo de 20ml/100g/min lo que la convierte en un blanco farmacológico, pues recuperar dicha área implicaría que los pacientes podrían tener una menor lesión isquémica (Lizano et al., 2020).

Minutos después o incluso segundos después de que el FSC es disminuido, comienzan una serie de eventos bioquímicos conocidos como cascada isquémica (Figura 1), la cual tiene como resultado la muerte neuronal en el núcleo isquémico (Lakhan et al., 2009). De manera general, la hipoperfusión focal marca el inicio de la EVC isquémica, a este evento lo siguen una serie de mecanismos moleculares no lineales que en conjunto ocasionan un daño irreversible en el cerebro (Lakhan et al., 2009) (Figura 1).

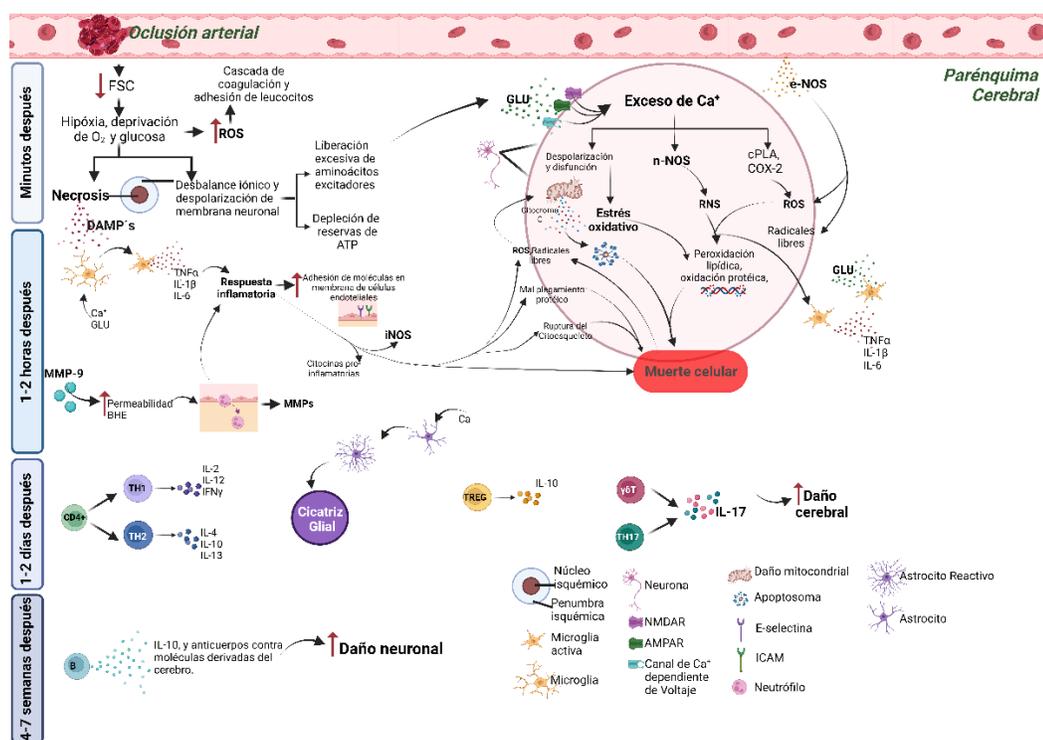


Figura 1: Representación gráfica de los mecanismos moleculares involucrados en la cascada isquémica (Miranda et al., 2023)

4.1 Disminución del ATP

A pesar de que el núcleo es privado del flujo sanguíneo, en esta área continua el consumo de ATP, principalmente por parte de las células gliales, sin embargo, como consecuencia de la privación de oxígeno y glucosa, la síntesis de esta molécula comienza a decaer provocando que los niveles de ATP se vean reducidos (Xing et al., 2012). El ATP es la principal molécula energética del cuerpo, por lo que su depleción provoca que la célula presente fallas en sus funciones esenciales (Sotomayor et al., 2019), tal es el caso de la bomba Na^+/K^+ , la cual, ante la deficiencia de ATP, aumenta los niveles de K^+ (Jarvis et al. 2001). Sotomayor et al., 2019 señala que existe una disfunción en la bomba Na^+/K^+ ATPasa, por lo que se produce una alteración del potencial de membrana en reposo y un aumento de Na^+ lo que a su vez provoca el edema citotóxico y la despolarización anóxica.

4.2 Despolarización alterada

Una vez que se produjeron fallos en los potenciales de membrana, se originan despolarizaciones inadecuadas de las células afectadas. Dentro de las deficiencias en la despolarización, se puede encontrar a despolarización anóxica, la cual hace referencia a una despolarización súbita, originalmente descrita como un silencio eléctrico, que se propaga por las neuronas después de una interrupción del FSC, se da de manera profunda hasta que las neuronas dejan de responder (Jarvis et al., 2001). Esta despolarización es propagada hacia la zona de penumbra (Sotomayor et al., 2019).

4.3 Excitotoxicidad

El glutamato (GLU) es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC), dicho neurotransmisor interactúa con dos tipos de receptores: los receptores metabotrópicos (mGluRs), los cuales activan segundos mensajeros a través de las proteínas G, y los receptores ionotrópicos, dentro de los que destacan el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores kainato. Los iones de Ca^{2+} tienen una alta afinidad para los receptores ionotrópicos glutamatérgicos, sin embargo, durante el reposo estos receptores se encuentran bloqueados por el ion magnesio, la afinidad hacia este ion se disminuye cuando se produce

la despolarización de la membrana, de esta manera se elimina el bloqueo y es permitida la entrada de calcio (Lizano et al., 2020). Durante la ICA, a nivel presináptico, el GLU es liberado de manera continua por las neuronas presinápticas, aunado a la incapacidad de los astrocitos para reciclar este neurotransmisor, se provoca una acumulación de GLU en el espacio intersináptico. Esta acumulación, promueve el incremento de Ca^{2+} en las neuronas, lo que ocasiona que se desencadene un proceso de excitotoxicidad, el cual es definido como una sobre-activación de los receptores glutamatérgicos que provocan la muerte apoptótica celular. El GLU no sólo favorece la entrada de Ca^{2+} , sino también la de otros iones como el Na^+ el cual permite el paso de líquido a través de la membrana, provocando un edema citotóxico, así como un mayor volumen celular, lo que a su vez induce que en el núcleo isquémico exista muerte celular por necrosis (Lizano et al., 2020). Además, en las células postsinápticas, AMPA y NMDA son activados de manera continua lo que favorece la liberación de Ca^{2+} intracelular y por lo tanto el aumento de su concentración (Lizano et al., 2020).

4.4 Aumento de calcio intracelular

El aumento de Ca^{2+} provoca la activación de proteasas y fosfolipasas, las cuales degradan las membranas y proteínas de las células (Xing et al., 2012). Este aumento de las concentraciones de calcio incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial favorece la proliferación de radicales libres y activa a las caspasas; finalmente todos estos fenómenos propician la apoptosis, también conocida como la muerte celular programada. La acumulación de calcio dentro de la célula, además, facilita la lipoperoxidación, producida por la formación de óxido nítrico (NO) y los radicales libres derivados del NO. Tanto el NO como los radicales de superóxido generan peroxinitritos y 4-hidroxi-nonenal que alteran la actividad de los transportadores de membrana, además de otros organelos celulares como la membrana citoplasmática, el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Lizano et al., 2020).

4.5 Formación de radicales libres

Como se mencionó anteriormente existe un aumento de calcio en el citosol neuronal, el cual inicia procesos catabólicos gracias a la activación de proteasas, lipasas y

nucleasas. Estas enzimas participan en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como la sintasa del óxido nítrico (NOS; Lizano et al., 2020). En las mitocondrias, las ROS inhiben los sistemas de transporte de electrones lo que a su vez inducirá la producción excesiva de superóxido (Selakovic et al., 2019). En condiciones normales existen péptidos cerebrales como el glutatión o la enzima superóxido dismutasa (SOD) que capturan a las ROS y regulan el estrés oxidativo y de este modo disminuyen la lesión inducida por este; sin embargo, durante la isquemia estos mecanismos resultan insuficientes para mitigar la lesión producida por la hipoxia (Selakovic et al., 2019). Adicionalmente, el óxido nítrico (NO) puede aumentar la excitotoxicidad, porque actúa como segundo mensajero y promueve la liberación de glutamato a nivel presináptico (Lizano et al., 2020). Selakovic y cols. (2019) señalan que cuando existe un alto grado de estrés oxidativo, es posible que se genere peroxinitrito el cual es un agente citotóxico que daña los compartimientos celulares. La formación de peroxinitrito se debe a que el NO reacciona con los aniones de superóxido.

4.6 Liberación de factores inflamatorios

Las células microgliales forman parte de la inmunoprotección del SNC. De manera general, estas células se encuentran en reposo, identificando posibles amenazas al sistema. Una vez activadas, después de un evento isquémico cerebral, la microglía sufre cambios morfológicos y fenotípicos lo que le permite actuar de manera similar a un macrófago, con la capacidad de eliminar organismos y desechos celulares, además de producir metaloproteasas de matriz (MMP), comprometiendo la barrera hematoencefálica. Asimismo, durante eventos neuroinflamatorios, la activación de la microglía implica una inducción de la producción de genes proinflamatorios, que posteriormente derivaran en la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , así como la elevación de NO y ROS (Milosevic et al., 2022). Aunque la ROS producida por la microglía puede dirigirse hacia diversos patógenos, durante la isquemia, estos funcionan como segundos mensajeros los cuales contribuyen a la iniciación e incremento de la actividad microglial. Asimismo, la microglía reactiva activa factores de transcripción como el NF- κ B, que a su vez promueve la activación de iNOS ocasionando la producción prolongada de NO. A pesar de que la neuroinflamación contribuye al deterioro en enfermedades

neurodegenerativas debido a que se presenta por periodos prolongados o intensos, la activación microglial es un proceso que contribuye a la neuroprotección (Milosevic et al., 2022). Por otra parte, se puede observar una proliferación de astrocitos lo que promueve la expresión de factores inflamatorios como la IL-1 β . De igual manera, en tejidos post-mortem de pacientes fallecidos por isquemia cerebral se encontró en dichas células gliales, una elevación de la interleucina inflamatoria IL-15 (Jayaraj et al., 2019).

4.7 Daño a la barrera hematoencefálica

De manera general, la barrera hematoencefálica (BHE) es importante para mantener la homeostasis cerebral, pues regula la entrada y salida de las sustancias en el cerebro, además de proteger la integridad vascular. Durante y después de la isquemia la integridad de la BHE se ve afectada, debido a la expresión de MMP-2 y MMP-9, las cuales ocasionan alteraciones en la estructura de la BHE. Estas alteraciones, entre otras cosas, contribuyen a la formación del edema cerebral. (Xu et al., 2018).

5. Agmatina

La agmatina o (4-aminobutil)guanidina, es un péptido primario endógeno que se ha podido observar en la corteza y tronco cerebral, así como en la columna vertebral (Kosonen et al., 2021). Para la síntesis y almacenamiento de la agmatina, los astrocitos juegan un papel fundamental, debido a que la L-Arginina es abundante dentro de estas células gliales. Una vez que la L-Arginina es liberada por los astrocitos, entra a la célula presináptica donde es descarboxilada por la arginina descarboxilasa mitocondrial para producir agmatina (Figura 2). Además de esta vía de síntesis, la agmatina también se ha podido identificar vesiculada en las neuronas (Kosonen et al., 2021). Selakovic et al. (2019), señala que la agmatina es un precursor de las poliaminas, por lo cual el uso de esta molécula en diversas patologías puede resultar beneficioso. Asimismo, existe evidencia experimental que ha demostrado que la agmatina tiene un efecto neuroprotector debido a que es capaz de inhibir el estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, los estados

inflamatorios e incluso los procesos apoptóticos inducidos por isquemia en animales de laboratorio (Selakovic et al., 2019).

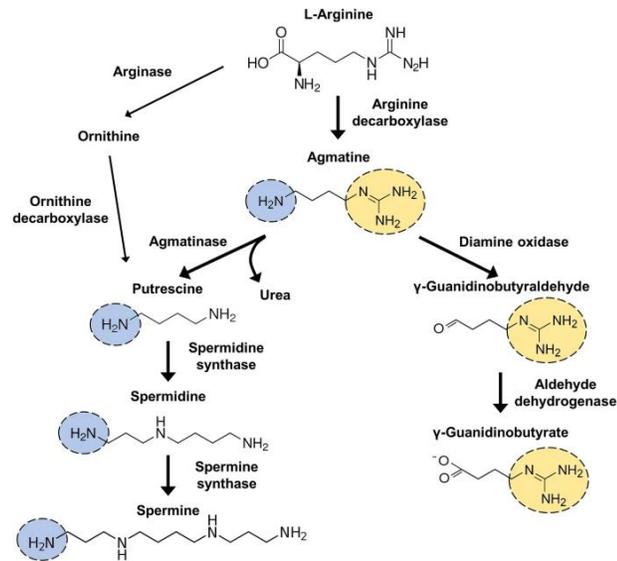


Figura 2: Ilustración del mecanismo de síntesis de agmatina (Kosonen et al., 2021)

5.1 Agmatina en la excitotoxicidad

La evidencia experimental señala que existen varios mecanismos implicados en el efecto neuroprotector de la agmatina. En este sentido estudios como los de Barua, y colaboradores (2019), demuestran que en modelos con roedores, la administración de agmatina reduce la pérdida de neuronas por excitotoxicidad, por lo que el tamaño del área de infarto es menor. Esto se debe a que la agmatina tiene un efecto antagonista de los receptores NMDA y por lo tanto es capaz de inhibirlos, provocando que los niveles de calcio intracelular no aumenten.

5.2 El papel de la agmatina en la formación de radicales libres

Al inhibir los receptores NMDA, la agmatina puede inhibir la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) encargada de la producción de NO, reduciendo la muerte neuronal (Gilad y Gilad, 2000). Estudios en ratas también señalan la agmatina cerebral reduce la NOS endotelial (eNOS) (Barua et al., 2019).

5.3 La función de la agmatina en la respuesta neuroinflamatoria

La agmatina ha mostrado tener efectos sobre la respuesta inflamatoria, al inhibir vías proinflamatorias y activar vías antiinflamatorias. Por un lado, debido a la capacidad de esta amina para bloquear los receptores NMDA, posee un efecto inhibitorio sobre la producción de NO, lo que a su vez produce un efecto sobre los macrófagos y células astrogiales disminuyendo la actividad de NOS-2. Asimismo, Kim et al. (2016) señalan que la agmatina es capaz de inhibir la producción de iNOS. Además, la agmatina reduce las concentraciones de HMGB1, una proteína nuclear liberada por células inflamatorias y necróticas. Durante etapas tempranas de la isquemia, esta proteína es liberada hacia el espacio extracelular donde se une a los receptores tipo Toll TLR2 y TLR4. Posterior a esta unión, son activadas las vías de señalización de NF κ -B y TNF- α , lo que promueve desde respuestas inflamatorias hasta la muerte de células neuronales a través de TNF α , IL-1 β e IL-6. El papel de la agmatina podría ser la de impedir la traslocación citosólica de HMGB1 y de este modo frenar las vías de señalización NF κ -B y TNF- α . Así como la agmatina es capaz de inhibir citocinas inflamatorias como TNF α , IL-1 β e IL-6, Xu et al. (2018), señalan la posible influencia de la agmatina sobre la producción y liberación de las citocinas IL-4 e IL-10, consideradas como antiinflamatorias. Miranda (2016) además señala que la agmatina es capaz de reducir la microglía reactiva, cuando esta está presente en altas concentraciones. Esta reducción está asociada con una menor expresión de iNOS, así como la disminución de TNF- α e IL-1 β (Ahn et al., 2011)

5.4 La agmatina y la barrera hematoencefálica

Autores como Jung et al. (2010) y Yang et al (2007) demostraron que la administración exógena de agmatina, en modelos in vitro, al reducir la eNOS puede inhibir la expresión de las metaloproteasas de matriz (MMP-2 y MMP-9), las cuales aumentan la permeabilidad de la BHE. De igual manera, estos autores utilizando retrovirus para incrementar la agmatina endógena, señalaron que no solamente se redujeron la MMP-2 y MMP-9 por la regulación de eNOS, sino que se activó el factor de transcripción 3 (ATF3). En modelos de ratón se encontró que la agmatina era capaz de regular la expresión de acuaporina (AQP-1), localizada en las células endoteliales, reduciendo así el edema cerebral (Kim et al., 2009). En este sentido, Xu et al. (2018), señala que la administración

de agmatina incrementa la expresión de AQP-4 y AQP-9. Modelos en ratas mostraron que la agmatina además contribuye a la reducción de la apoptosis neuronal y la astrogliosis cerebral además señalan que la agmatina juega un papel importante en la neuroinflamación disminuyendo expresión de factores inflamatorios como la kappa B (NF κ B) (Barua et al. (2019).

6. Modelos animales

Los modelos animales son un método de investigación comúnmente usado para obtener información relativa a un proceso específico. En el caso de la ICA, los modelos animales buscan replicar los mecanismos que se manifiestan en los humanos, a través de la reducción de oxígeno y glucosa en el tejido cerebral. A pesar de que estos modelos no reflejan a la perfección los eventos que ocurren en el humano tras un EVC, el uso de estos métodos de investigación es esencial para estudiar el efecto y valor de intervenciones terapéuticas, por lo que resulta de suma importancia la selección apropiada del modelo de estudio (Traystman, 2003). Dentro de los modelos a través de los cuales se puede abordar la isquemia cerebral, se encuentran los modelos *in vitro* e *in vivo*. Los modelos *in vitro* son utilizados para observar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en condiciones similares a la isquemia, como lo son las deficiencias energéticas (Sommer, 2017). Por otra parte, podemos encontrar una gran variedad de modelos *in vivo* para la isquemia cerebral. Comúnmente dentro de este tipo de modelos los ratones y ratas son seleccionados para las investigaciones, esto se debe a que la adquisición y mantenimiento de estos animales tiene un bajo costo. Además, para el monitoreo y procesamiento de tejido de estos animales, se usan técnicas sencillas. Las consideraciones éticas también son un factor importante para la selección de roedores como sujetos de investigación (Sommer, 2017). Como ya se mencionó anteriormente, la trombosis arterial es la principal causa de ECV, por lo que comprender cómo se sucede la formación del trombo y los mecanismos patológicos que estos activan en el SNC, son necesarios los estudios *in vivo* (Rodriguez et al., 2003). Estos grupos de modelos son divididos en dos subgrupos: modelos de isquemia cerebral focal y global. En los primeros la isquemia se realiza mediante la oclusión

mecánica de la arteria cerebral media proximal (Bacigaluppi et al., 2010). En los modelos de isquemia cerebral global se observa una reducción crítica del flujo sanguíneo cerebral en todo el cerebro. Estos métodos de investigación son utilizados para estudiar los mecanismos involucrados en la hipoperfusión y la reperfusión consiguiente, y generalmente involucran la oclusión de la arteria carótida común (Bacigaluppi et al., 2010).

6.1 Modelo de trombosis en la arteria carótida

Se han desarrollado varios modelos de trombosis, entre los que destacan la lesión vascular que es producida por Cloruro Férrico (FeCl_3). Cuando el FeCl_3 es expuesto sobre los vasos sanguíneos, ocasiona daño oxidativo celular en especial en las células endoteliales. Estas células pierden su condición de protección frente a las células plaquetarias, así como los componentes de coagulación, lo que ocasiona un trombo (Zhang y Chen, 2012). Este modelo es ampliamente utilizado debido a que proporciona información acerca del tiempo requerido para el desarrollo de un trombo, así como evidencia cuantitativa acerca de la lesión vascular y brinda información acerca de la activación plaquetaria. Además, es útil en la búsqueda de moléculas con potencial efecto neuroprotector (Zhang y Chen, 2012).

II. Justificación

Como se ha mencionado, las EVC son un problema de salud pública que afecta la vida de miles de personas en el mundo. Para la economía de los países, además, representa una carga socioeconómica debido a las secuelas que dicho padecimiento deja tras su manifestación (Kleinschnitz, Fluri y Schuhmann, 2015). Después de una EVC isquémica, el daño neuronal se hace presente ocasionando secuelas como déficits sensoriales, motores y cognitivos (Bouet et al., 2007; Selakovic et al., 2019) que reducen la calidad de vida de quienes lo padecen y aumentan los gastos hospitalarios. El único tratamiento aprobado para las EVC de tipo isquémico es la trombólisis intravenosa con activador tisular del plasminógeno recombinante (rtPA); sin embargo, su administración únicamente puede realizarse entre 4 a 5 horas después del inicio de la EVC, por lo que sólo el 5 % de los pacientes pueden ser tratado con dicho fármaco (Kleinschnitz et al., 2015). Este porcentaje es aún menor en mujeres, las cuales tienen un 30 % menos de probabilidades de recibir dicho tratamiento, lo cual puede atribuirse a un arribo tardío al hospital. Carlson (2014) señala, además, que el rtPA únicamente debe ser administrado en casos leves donde el medicamento se pueda mantener en el sistema vascular, sin atravesar la BHE, ya que de no ser así la rtPA podría ingresar al SNC aumentando la excitotoxicidad. De igual manera, los pacientes que reciben este fármaco tienen un riesgo 5 veces mayor de presentar una hemorragia intracerebral, debido al aumento en la permeabilidad de la BHE, por ello Medcalf (2011) señala que el rtPA tiene un efecto tóxico neurovascular. Por lo tanto, resulta evidente la urgencia de contar con nuevas opciones farmacológicas que funcionen como alternativa para el tratamiento de las EVC isquémicas. El uso de agmatina exógena podría reducir los daños ocasionados por la cascada isquémica y por lo tanto funcionar como un agente protector de las neuronas (Gilad y H, 2000). Con base en lo anterior y, considerando que en el desarrollo de terapias efectivas es importante comprender las diferencias biológicas que pueden ocurrir entre organismos de diferente género, esta tesis buscó identificar y caracterizar el posible efecto neuroprotector de agmatina en un modelo de isquemia cerebral aguda inducida por trombosis en ratones hembra adultos.

III. Pregunta de investigación

¿La administración de agmatina exógena tiene un efecto neuroprotector en un modelo de trombosis bilateral carotídea (TBC) en ratones hembra?

IV. Hipótesis

El grupo de ratones hembra con isquemia cerebral aguda inducida por trombosis bilateral carotídea que reciban la administración de agmatina exógena (100mg/Kg, i.p.), tendrán un mayor porcentaje de sobrevivida.

El grupo de ratones hembra con isquemia cerebral aguda inducida por trombosis bilateral carotídea que reciban la dosis de agmatina (100 mg/kg, i.p.), tendrán un menor puntaje en la Escala del Estado de Discapacidad Neurológica, en comparación de aquellos a los que no les fue administrado el fármaco

El grupo de ratones hembra con isquemia cerebral aguda inducida por trombosis bilateral carotídea que reciban la administración de agmatina exógena (100mg/Kg, i.p.), tendrán un mayor puntaje en la prueba de excavación.

El grupo de ratones hembra con isquemia cerebral aguda inducida por trombosis bilateral carotídea mostrarán una menor área de infarto, si se les administra una dosis de agmatina (100mg/Kg, i.p.).

V. Objetivos

7. Objetivo general

Evaluar el efecto neuroprotector de agmatina en un modelo de trombosis bilateral carotídea en ratones hembra

8. Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la administración aguda de agmatina en el porcentaje de supervivencia de un grupo de ratones hembra (n=10) con isquemia cerebral aguda inducida por TBC.

Evaluar el efecto de la administración aguda de agmatina en las alteraciones conductuales, medidas a través de la prueba de excavación, presentadas en un grupo (n=10) de ratones hembra con isquemia cerebral aguda inducida por TBC.

Evaluar el efecto de la administración aguda de agmatina sobre las alteraciones neuroconductuales, medidas a través de la escala del estado de discapacidad neurológica, en un grupo (n=10) de ratones hembra con isquemia cerebral aguda inducida por TBC.

Evaluar el efecto de la administración aguda de agmatina en el tamaño del área de infarto de los ratones pertenecientes al grupo con isquemia cerebral aguda inducida por TBC

VI. Metodología

9. Animales

En este proyecto se utilizaron ratones hembra, de la cepa CD1 de 3 meses de edad, obtenidos de la Unidad Académica de Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales fueron alojados en una sala de experimentación con ambiente controlado (temperatura, humedad, iluminación y ventilación) y colocados en cajas de acrílico (27x37x15 con 6mm de espesor) en grupos de tres. Se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Los ratones tuvieron un periodo de adaptación a estas condiciones ambientales durante una semana previa al inicio de los experimentos. Posteriormente, los animales fueron divididos en 6 grupos, cada grupo con una n de 10, dependiendo las condiciones experimentales a las que iban a ser sometidos (Figura 3). Todos los procedimientos fueron realizados según lo establecido en la NOM062-ZOO-1999, y la Ley de protección a los animales en la Ciudad de México (LA ASAMBLEA LEGISLATIVA Y LEGISLATURA, s.f.). Además, este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética (FM/DI/067/2018) y por el CICUAL (014-CIC-2018) de la Facultad de Medicina, UNAM.

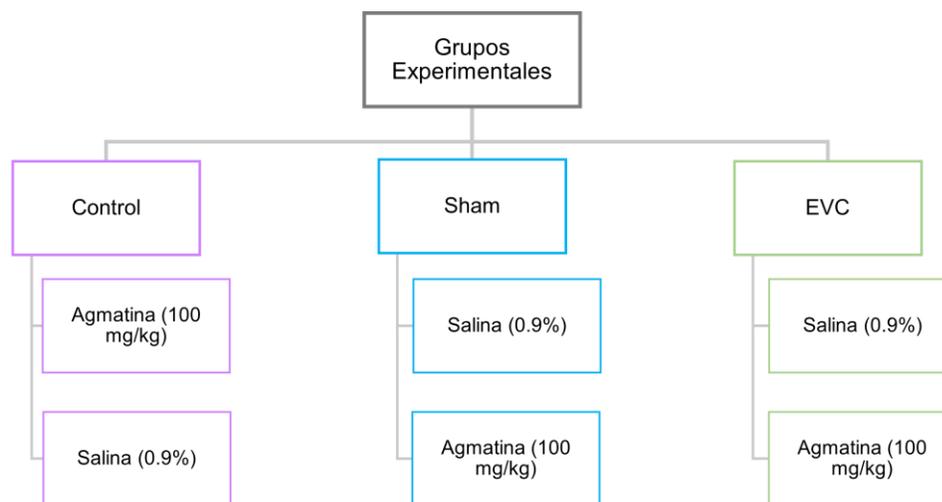


Figura 3: Distribución de los animales

10.Evaluación conductual

10.1 Escala del estado de discapacidad neurológica

La evaluación de déficits neuroconductuales se llevó a cabo utilizando una versión adaptada al modelo de Trombosis Bilateral Carotídea de la Escala del Estado de Discapacidad neurológica (NDSS por sus siglas en inglés) descrita por Rodríguez et al. (2005). La NDSS evalúa las alteraciones neuroconductuales más representativas del modelo. En esta escala las alteraciones se estructuran en distintos grados de déficit, cada uno caracterizado por manifestaciones específicas. En el nivel 0, no se observan alteraciones notables, por lo que representa un estado considerado “normal”. A medida que se avanza en la escala, se evidencian signos considerados de mayor gravedad. Es por ello que en el nivel 10, se alcanza el desenlace más grave, asociado con la muerte provocada por la isquemia. Esta escala proporciona una clasificación detallada de las alteraciones neuroconductuales, facilitando la evaluación precisa del estado de los sujetos bajo estudio.

La primera evaluación se llevó a cabo antes de la cirugía, para establecer una línea basal. Las siguientes evaluaciones se llevaron a cabo a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la cirugía, con el propósito de observar la evolución de los déficits neuroconductuales. Todas las evaluaciones se realizaron en un tiempo promedio de 3 minutos. A continuación, se describen cómo se distribuyeron las alteraciones neuroconductuales con respecto al grado de déficit presentado (Figura 4).

Grado del déficit	Alteraciones neuroconductuales
0	Nada
2	Hipoalgesia Hipomovilidad leve Piloerección Ptosis
4	Decremento de fuerza muscular Decremento de tono muscular Espalda Encorvada Hipomovilidad moderada Hiperalgesia Hiperreactividad Pasividad Poliuria
6	Agresividad Circling/ Rotación corporal Flexión de las extremidades anteriores/posteriores Hemorragia (nasal y/o ocular) Pérdida de equilibrio Postura Lateralizada Temblores/ sacudimientos/ convulsiones
8	Hipomovilidad (Severa) Respiración dolorosa Postura aplanada
10	Muerte

Figura 4: Escala del estado de discapacidad neurológica adaptada para el modelo de Trombosis Bilateral Carotídea en ratones hembra.

10.2 Prueba de excavación

La construcción de madrigueras (denominada en inglés *Burrowing*) es una conducta ampliamente estudiada en los pequeños roedores. Autores como Deacon (2006), han utilizado esta técnica que al no ser invasiva y ser aparentemente gratificante para los animales, funciona para monitorear a largo plazo la conducta del animal en el proceso de salud a la enfermedad. Deacon (2009), menciona que la técnica de *Burrowing* ha demostrado ser sensible a procesos inflamatorios, lesiones cerebrales y administración farmacológica tanto en ratones como en ratas. Utilizando la técnica propuesta por Deacon (2006) previo a prueba de *Burrowing*, se inició una fase de facilitación social que tuvo una duración de un día, donde los ratones fueron colocados de manera conjunta en cajas con un tubo gris de 20 cm de largo y 6.8 cm de diámetro. Por la parte frontal el tubo contaba con una elevación de 3 cm, sostenido por dos tornillos de 5 cm con una separación de menos de un cuadrante del tubo. La parte posterior del tubo se encontraba cerrada. Dentro de los tubos fueron colocados 200 g de pellets. Para crear una línea base, los ratones fueron

colocados de manera individual, en cajas con un tubo gris, con las características anteriormente descritas, y permanecieron en esta fase durante el transcurso de un día. Una vez concluida la línea base y con la intención de observar las diferencias individuales de vigorosidad por parte de los ratones, se colocó durante dos horas en la misma caja con los tubos grises que contenían 200 g de pellets. Transcurrido el tiempo, se realizó el pesaje de los pellets que el ratón expulsó del tubo. Se recolocaron los 200 g de pellets dentro del tubo y el ratón fue conservado en la caja durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el conteo de pellets expulsados. Este mismo procedimiento se realizó durante 4 noches (Deacon, 2006).

11. Técnicas quirúrgicas

11.1 Ovariectomía

La Ovariectomía es la técnica quirúrgica, mediante la cual los ovarios son extraídos del organismo que se desea estudiar. Esta técnica es un modelo que imita a la menopausia y nos permite obtener información acerca de los eventos asociados a esta etapa, como la osteoporosis, eventos cardiovasculares y enfermedades inflamatorias (Souza et al., 2018). Los animales recibieron como anestésico una mezcla de ketamina (80mg/kg) y xilacina (10mg/kg), vía intraperitoneal previo a la ovariectomía. Posteriormente al ratón se le realizó el rasurado, lavado quirúrgico y desinfección del área dorsal. Se realizó una incisión en el músculo oblicuo abdominal, para poder tener acceso a la cavidad abdominal y ubicar el ovario derecho, el cual fue sustraído y colocado sobre el campo quirúrgico. Asimismo, fue colocada una ligadura en el paquete vascular del ovario. Este procedimiento fue repetido para la extracción del ovario izquierdo. Una vez que ambos ovarios se encontraban fuera del organismo, se realizó una sutura en la incisión creada, la cual también fue desinfectada. Posterior a la cirugía, los ratones fueron administrados, vía subcutánea, con flunixin meglumine (6mg/kg) para evitar la presencia de dolor postoperatorio (Lizano Salas et al., 2020).

11.2 Trombosis bilateral carotídea

La isquemia cerebral aguda fue inducida con el modelo de Modelo de Trombosis Bilateral Carotídea (TBC). Este nuevo modelo fue diseñado para replicar con mayor precisión la isquemia observada en humanos. Para esta adaptación se combinaron dos modelos: El modelo de Trombosis en la Arteria Carotídea descrito por Li, Nieman y Gupta (2016) y del modelo de Seccionamiento Secuencial de la Arteria Carotídea Común (SCAS) (Rodriguez et al., 2000). Bajo las técnicas propuestas por el modelo de Li et al. (2016) los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con 60mg/kg de Pentobarbital Sódico (6.3 %) (Pisabentall). Una vez confirmado el plano anestésico el animal fue colocado y fijado sobre una tabla operatoria en posición supina para extender sus extremidades, asimismo, los incisivos fueron sujetos. Posteriormente se realizó una incisión en la línea media de la zona anterior del cuello, esta incisión permitió la localización de la arteria carotídea izquierda y su separación del nervio vago. Una vez que la carotídea se encontraba en condiciones óptimas, se colocó un papel filtro impregnado con FeCl_3 al 7.5 % durante 3 minutos (excepto a los ratones del grupo Sham, a los cuales se le colocó papel filtro sin residuos FeCl_3), con el fin de crear un trombo (Figura 5). Concluido este tiempo, se retiró el papel y se cerró la incisión con hilo quirúrgico. Asimismo, considerando las investigaciones de Rodriguez et al. (2000), donde se establece que las EVC tienen un componente crónico de reducción del FSC, se realizó el mismo procedimiento en la arteria carotídea derecha 32 días después de la primera cirugía.

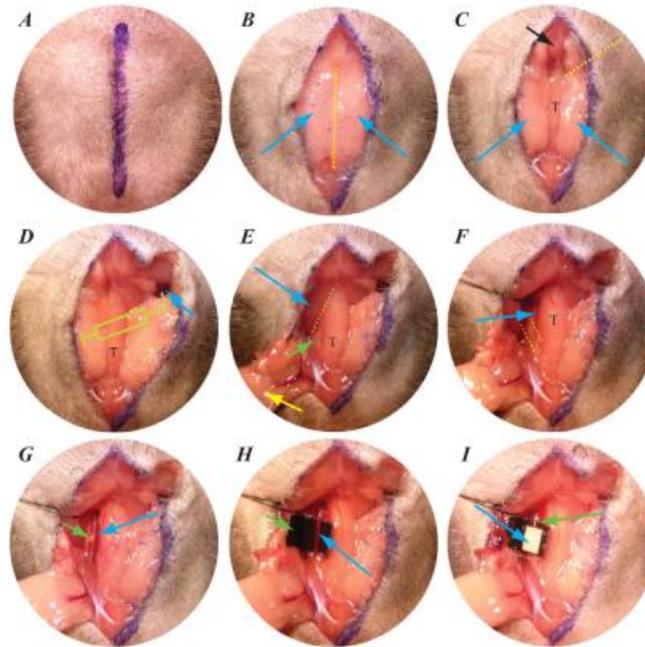


Figura 5: Procedimiento realizado en el Modelo de Trombosis en la Arteria Carótida (Li, Nieman y Gupta, 2016)

12 Administración de fármacos

Para determinar el efecto neuroprotector de la agmatina, en la segunda cirugía los grupos experimentales fueron divididos en dos. De esta manera se crearon 6 grupos, con tres distintos tipos de manipulación quirúrgica y dos condiciones de administración. Los grupos “Control Salina”, “Sham Salina” y “EVC Salina” fueron administrados de manera intraperitoneal con solución salina 100mg/kg 15 minutos después de la segunda cirugía, tal como está establecido el protocolo de Rodriguez et al. (2003). La agmatina (100 mg/kg), previamente disuelta en solución salina, fue administrada vía intraperitoneal dentro de la ventana de tiempo de 15 minutos posterior a la segunda cirugía. Este fármaco fue administrado a los sujetos pertenecientes a los grupos “Control Agmatina”, “Sham Agmatina” y “EVC Agmatina” en una dosis de 100mg/kg (Kim et al., 2009)

13 Tinción con 2,3,5-Cloruro de Trifeniltetrazolio

El 2,3,5-Cloruro de Trifeniltetrazolio mejor conocido como TTZ, es una sal de Tetrazolio soluble en agua (Zhang y Chen, 2012). Dentro de las células en tejidos viables, el TTZ es capaz de reducirse a formazán, un compuesto liposoluble y fotosensible que es capaz de conferir un tinte rojo a los tejidos (Bederson et al., 1986). Autores como Zhang y Chen (2012), han utilizado la TTZ para delimitar el área cerebral infartada. Para la aplicación de esta técnica, los ratones fueron administrados de manera intraperitoneal con una dosis letal de Pentobarbital (150 mg/Kg) para inducir eutanasia, posteriormente fueron decapitados. El cerebro fue extraído del cráneo y fue rápidamente colocado en refrigeración, con el propósito de facilitar su manipulación. Una vez transcurridos 10 minutos, los encéfalos fueron colocados en la matriz de cortes coronales para obtener muestras de 1 mm, las cuales se extendían desde el bulbo olfatorio hasta el cerebelo. Más adelante, las muestras fueron colocadas en una caja de petri con solución de TTZ al 2 %, donde permanecieron durante 30 minutos. Al terminar se observaron los tejidos y fueron considerados dañados, aquellos que permanecieron sin teñir. Las muestras fueron transferidas a una caja de Petri con solución salina para ser fotografiadas con ayuda de una cámara digital para microscopio estereoscópico Olympus SZ61, en un cuarto oscuro. Las imágenes fueron procesadas con el software FIJI/ImageJ con el objetivo de calcular los píxeles totales correspondientes a la imagen por cada corte realizado, considerando tanto las áreas teñidas como no teñidas y determinando así el área total del tejido. Además, se calcularon los píxeles correspondientes al área de infarto, tomando en cuenta las áreas no teñidas. Este enfoque de análisis permitió una medición integral que abarcó la totalidad del tejido examinado. Con base en estas mediciones, se determinó el porcentaje de daño en el área examinada.

14 Sobrevida

La sobrevivencia de los sujetos experimentales fue registrada durante la primera y segunda cirugía en los periodos de observación de 24, 48, 72 y 96 horas, así como en el periodo entre cirugías.

15 Análisis estadístico

Para determinar el porcentaje de sobrevida en los periodos de 2, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la segunda cirugía, se hizo uso del método Kaplan Meier, este método aporta la ventaja de estimar las probabilidades de supervivencia, posteriormente se empleó la prueba de rangos logarítmicos con el propósito de comprar los datos. La evaluación de los déficits neuroconductuales presentados posterior a la trombosis bilateral, se llevó a cabo gracias a la adaptación de la escala NDSS (Rodriguez et al., 2005). La información resultante en dicha escala fue analizada mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilk y de acuerdo con los resultados obtenidos, se determinó utilizar la prueba estadística de Kruskal Wallis y la prueba PosHoc Dunn para determinar si existían diferencias significativas de las medias de los grupos experimentales y en donde se encontraban dichas diferencias. El análisis conductual se llevó a cabo mediante la prueba de excavación, los datos obtenidos fueron analizados a través de la prueba Kruskal Wallis y Dunn como PosHoc, la cual permitió comparar las medias en los grupos experimentales. Finalmente, a través de la prueba histológica TTZ se contabilizó el área total, es decir, los píxeles totales correspondientes a la imagen por cada corte realizado. Asimismo, se calcularon los píxeles correspondientes al área de infarto, tomando en cuenta las áreas no teñidas por cada corte. Se consideró el 100% como el total de píxeles comprendidos en todas las rebanadas. Posteriormente, se calculó la proporción de daño para cada grupo. En el análisis de los datos histológicos, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía junto con la prueba post hoc de Tukey para discernir las diferencias entre las medias de los grupos experimentales. La elección de estas pruebas se basó en la normalidad de los datos, confirmada mediante el análisis de Kolmogorov-Smirnov.

Las pruebas estadísticas se realizaron a través del programa GraphPad Prism versión 5.0 de Windows, considerando como valores estadísticamente significativos $P < 0.05$

16 Cronograma experimental

El periodo de experimentación tuvo una duración de 73 días (Figura 6) por cada grupo. Este periodo comprende desde la obtención de los animales hasta el sacrificio de estos.

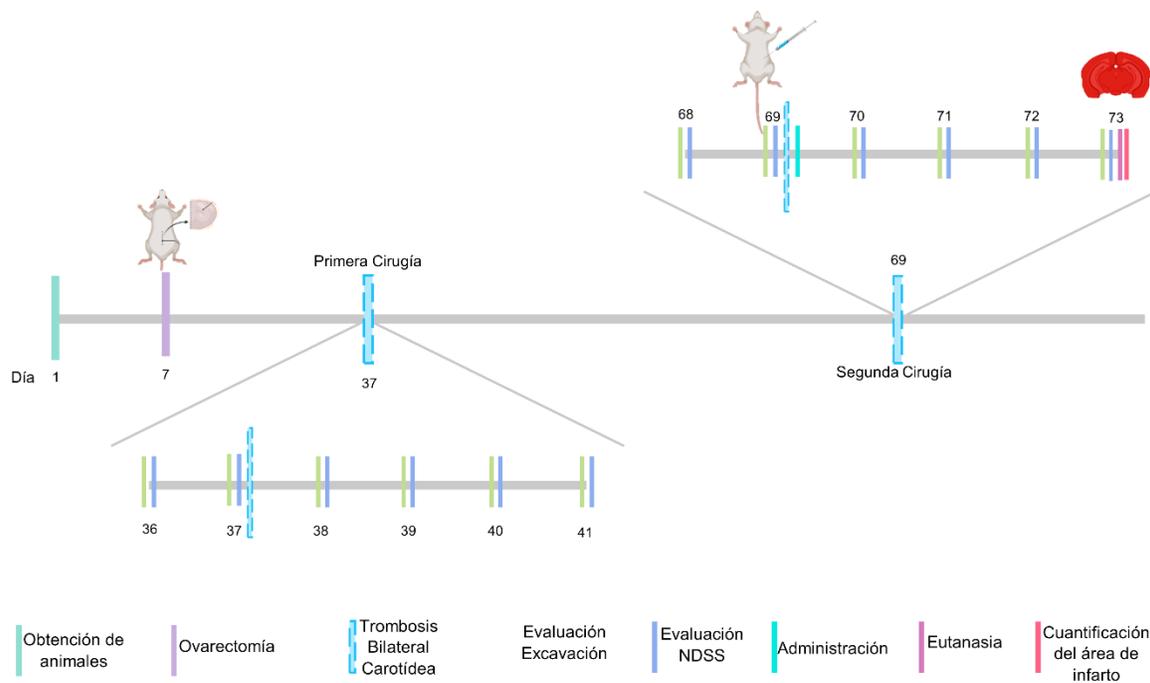


Figura 6: Representación gráfica del tren experimental dentro del diseño propuesto por este trabajo.

VI. Resultados

17 Sobrevida

Antes de la primera cirugía los animales fueron divididos en tres grupos: grupo Control (n =24), grupo Sham (n= 38) y grupo con EVC (n = 35). Después de la primera cirugía se registró la muerte de un ratón con EVC y durante las 72 horas posteriores al procedimiento quirúrgico se registró la muerte de un ratón perteneciente al grupo sham. En el periodo entre operaciones, es decir, durante los siguientes 32 días se registró la muerte de un ratón perteneciente al grupo control y uno perteneciente al grupo EVC. Después de la segunda cirugía los grupos fueron divididos de manera aleatoria para la administración del fármaco; sin embargo, 6 animales murieron antes de dicha administración. De esta manera, se obtuvieron 6 grupos experimentales: grupo control administrado con solución salina (n=12), grupo control administrado con agmatina (n = 11), grupo sham que recibió solución salina (n =18), grupo sham administrado con agmatina (n = 16), grupo EVC que recibió solución salina (n = 17) y grupo EVC administrado con agmatina (n= 15). Se evaluó la tasa de sobrevida de los grupos experimentales, en los periodos de 2, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la segunda cirugía (Figura 7), dicha información fue analizada utilizando la prueba de Kaplan Meier de rangos logarítmicos, donde las n asignadas en la segunda cirugía se consideraron como el 100 %. Se consideró como n inicial la obtenida tras la administración del fármaco posterior a la segunda cirugía.

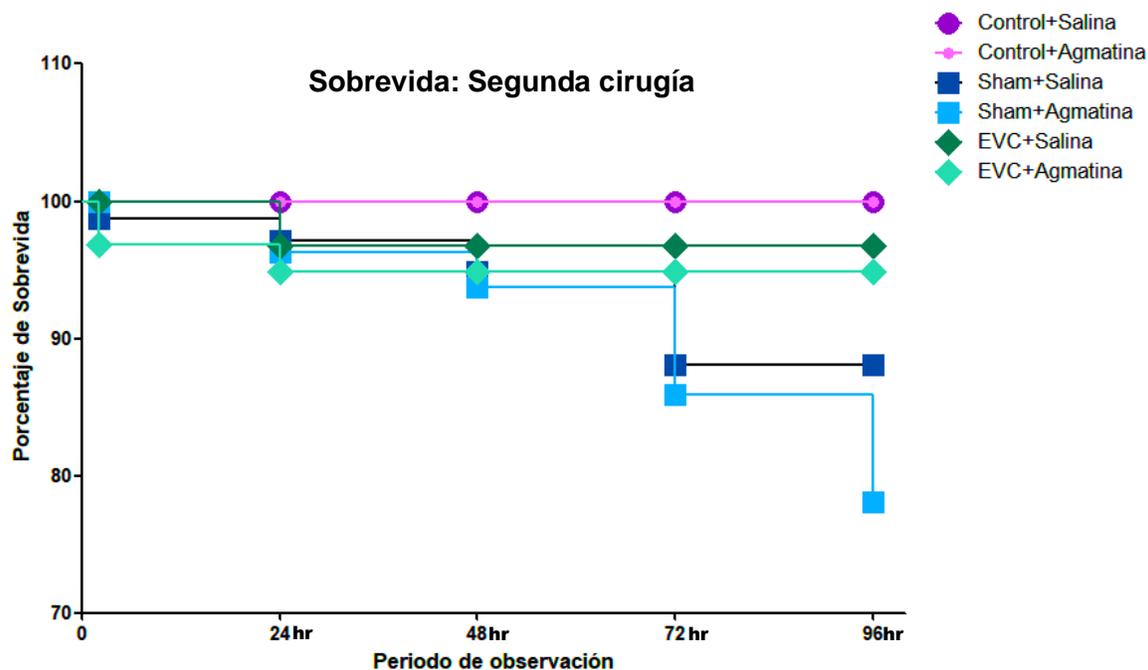


Figura 7: Porcentaje de sobrevida en periodos de evaluación cada 24 horas (eje x) después de la segunda cirugía (Kaplan Meier de rangos logarítmicos, $p < 0.05$). Los símbolos representan los grupos experimentales: Control salina (n=12), Control agmatina (n=11), Sham salina (n=18), Sham agmatina (n=16), EVC salina (n=17) y EVC agmatina (n=15).

Como se observa en la figura 7, después de la segunda cirugía, los grupos control que recibieron solución salina y agmatina, presentaron porcentajes de 100% de sobrevida y se mantuvieron estables a través de todo el tiempo de observación. En los grupos de animales isquémicos que recibieron solución salina y agmatina se presentó la muerte de un individuo en cada grupo únicamente en las primeras 24 horas posteriores a la manipulación quirúrgica. Posteriormente se mantuvieron los porcentajes de sobrevida para los grupos EVC que recibieron salina (96.7 %) y EVC a los que se les administró agmatina (96.4%). En contraste, los grupos Sham sufrieron una disminución progresiva en la sobrevida, la cual alcanzó el pico máximo a las 72 horas, pero después de este periodo no se presentó ninguna muerte en el grupo Sham que recibió salina manteniendo así su porcentaje de sobrevida en 88.1 %. Por otra parte, el grupo Sham al que se le administró agmatina presentó una muerte más a las 96 horas, siendo así el grupo con menor porcentaje de sobrevida con un 78.1 %. A pesar de que no se encontró significancia estadística en la sobrevida de los animales se puede observar una clara tendencia a la baja en la sobrevida de los datos de ambos grupos Sham.

18 Evaluación neuroconductual medida por la escala del estado de discapacidad neurológica

Para determinar los posibles déficits neuroconductuales inducidos por la isquemia en los animales se empleó una adaptación de la escala NDSS en la cual se incluyeron por análisis de frecuencias acumuladas, los signos neurológicos característicos del modelo utilizado en esta investigación. En esta adaptación, se incluyeron únicamente aquellos déficits presentes en los animales posterior a la inducción del trombo.

Esta evaluación neuroconductual se realizó en condiciones basales y en los periodos de 2, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a ambas cirugías. Como se puede observar en la Figura 8, los resultados obtenidos después de la primera cirugía muestran que no existe diferencia entre los puntajes obtenidos por ambos grupos control (control salina y control agmatina) a lo largo de todo el experimento. En contraste, los grupos manipulados quirúrgicamente tuvieron un comportamiento diferente desde las 2 horas posteriores a la primera cirugía. Tanto los animales de los grupos Sham como los isquémicos (EVC) mostraron déficits neuroconductuales después de la manipulación quirúrgica, los cuales se mantuvieron a lo largo de los 5 periodos de evaluación.

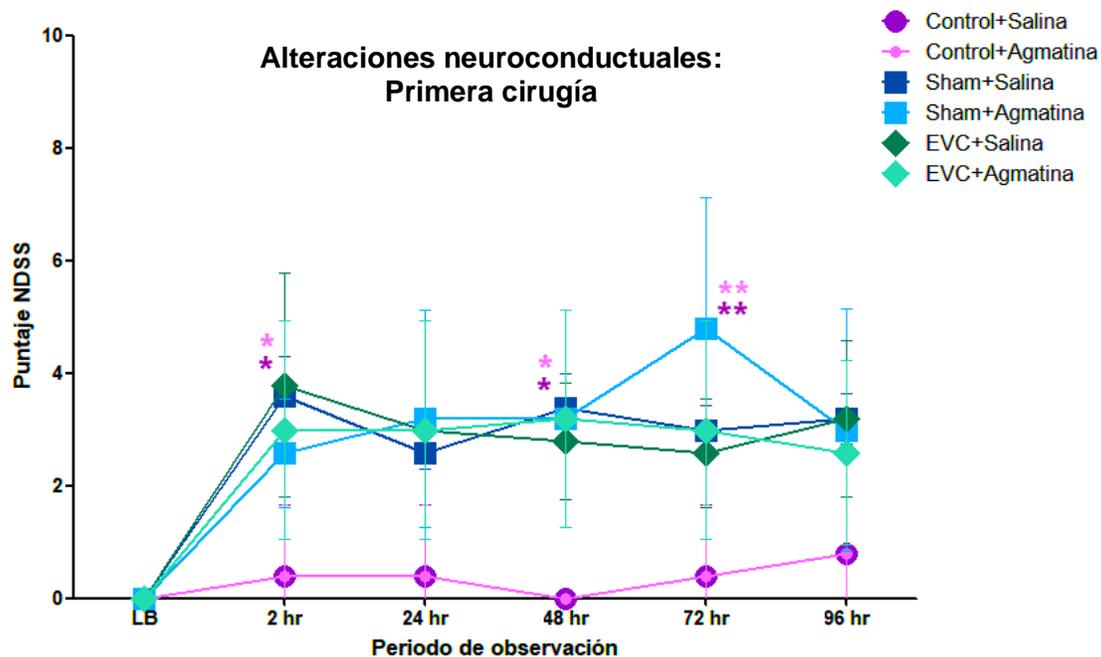


Figura 8: Evolución temporal de las medias y desviación estándar de la calificación obtenida en la evaluación neuroconductual en los periodos posteriores a la primera cirugía. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ Kruskal Wallis y Dunn. Los símbolos representan los grupos experimentales (n=10 en todos los grupos)

La figura 9 muestra las evaluaciones posteriores a la segunda cirugía, se observa que todos los grupos experimentales muestran una disminución de los déficits neurológicos en la evaluación previa (línea basal) a la segunda cirugía en comparación a las calificaciones obtenidas en la escala NDSS en el último periodo de evaluación después de la primera cirugía. Los grupos controles presentan un comportamiento similar desde la línea base de la segunda cirugía hasta las 24 horas posteriores a la administración del fármaco. A partir del periodo de 48 horas, los animales del grupo control que recibieron agmatina presentaron un leve aumento en los déficits neurológicos que se mantuvo hasta las 96 horas. Por otro lado, los animales pertenecientes al grupo control administrado con salina, no presentaron déficits neurológicos durante ninguno de los periodos de observación manteniendo valores de cero en la escala NDSS. Después de la administración del fármaco, los grupos que fueron manipulados quirúrgicamente presentaron un aumento en las calificaciones obtenidas en la escala NDSS. Con respecto a los grupos isquémicos (EVC), los animales administrados con agmatina presentaron una tendencia a la disminución de los déficits neuroconductuales, a partir de las 48 horas que se mantiene hasta el último periodo de evaluación. En cambio, el grupo EVC administrado con salina, presenta una disminución de los déficits hasta el periodo de 96 horas ($\bar{x}=2.88$), estos valores son similares a los observados en los animales isquémicos que recibieron agmatina ($\bar{x}=3$). Por último, los grupos Sham presentan un comportamiento antagónico; mientras que los animales administrados con agmatina presentan una tendencia a la disminución de los déficits neuroconductuales, los animales del grupo Sham que recibieron solución salina muestra una tendencia al aumento de los déficits que se mantiene hasta las 96 horas.

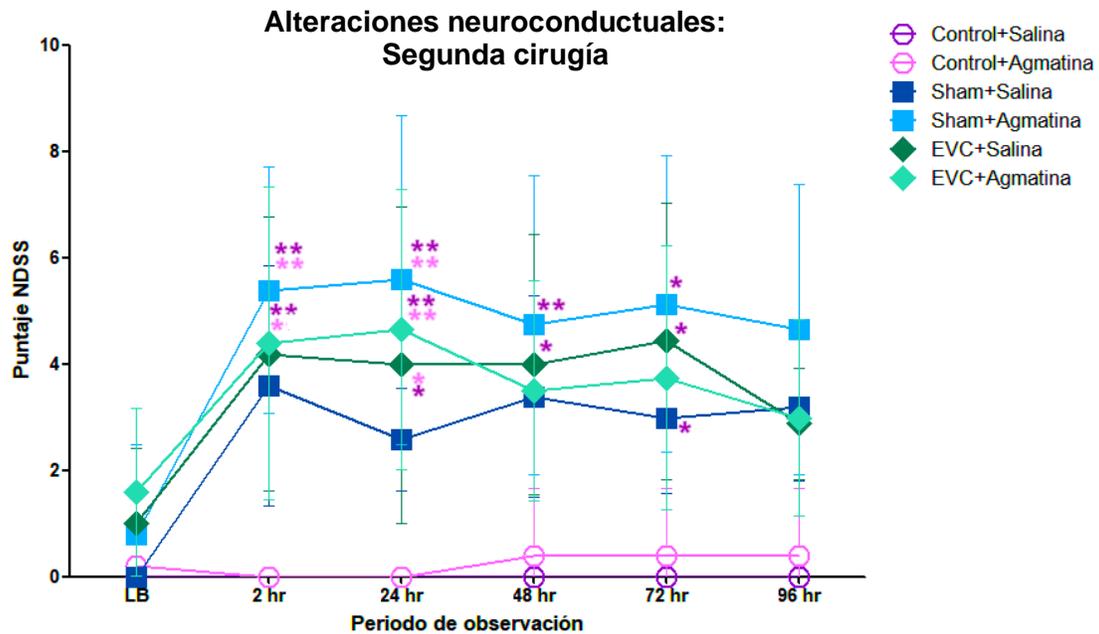
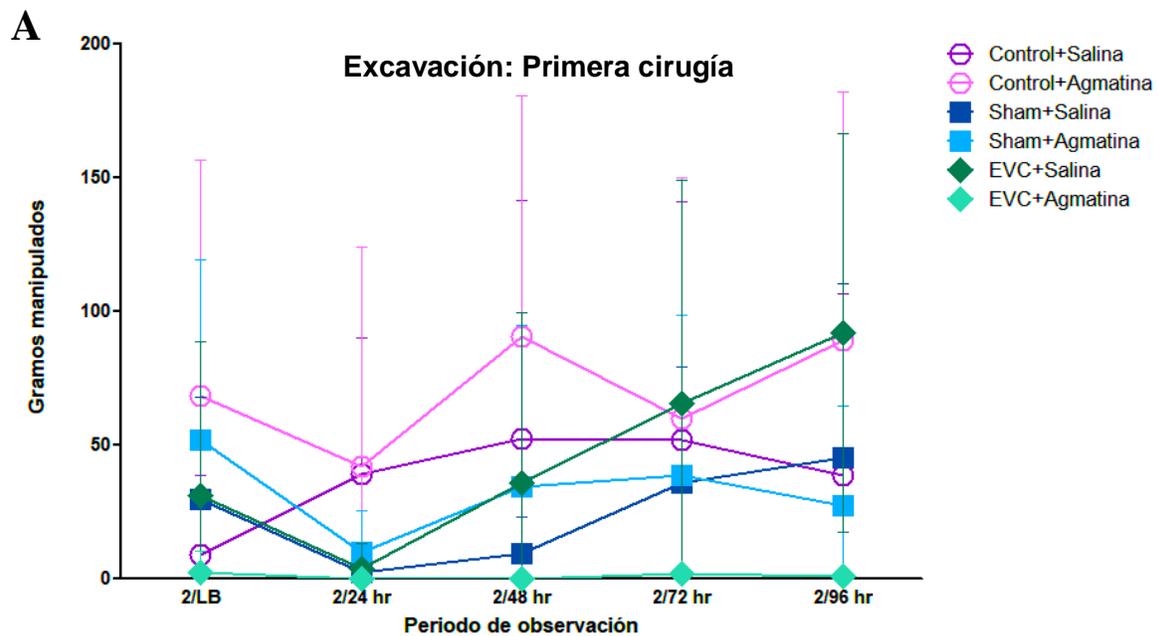


Figura 9: Evolución temporal de las medias y desviación estándar de la calificación obtenida en la evaluación neuroconductorales en los periodos posteriores a la segunda cirugía.
 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ Kruskal Wallis, Dunn. $n = 10$ en todos los grupos.

19 Evaluación conductual por medio de la prueba de excavación

La prueba de excavación (Burrowing, en inglés) fue utilizada para evaluar el efecto de la isquemia cerebral en una conducta innata relacionada con la actividad hipocampal (Deacon, 2006). Se pesó el gramaje contenido en los tubos dispensadores manipulado por los animales. Debido a la naturaleza de la prueba, los datos fueron agrupados en dos distintos cortes de tiempo. Por un lado, los datos recabados en los periodos de dos horas de actividad (2/LB, 2/24, 2/48, 2/72 y 2/96 horas) y por otro, los datos que se recolectaron cuando los sujetos realizaron la conducta durante toda la noche (LB, 24, 48, 72 y 96 horas).

Como se observa en la figura 10, Panel A, en todos los grupos experimentales - excepto el grupo control salina- se observa una disminución en la cantidad de material movilizado en el primer periodo de observación después de la primera cirugía. Por una parte, los grupos control tienen una actividad de 2 horas de excavación similar en las mediciones realizadas a las 24 y 72 horas, variando principalmente a las 96 horas, donde el grupo control salina mostró una media inferior ($\bar{x}=38.45$) a la del grupo control agmatina ($\bar{x}=88.85$). De igual manera, los animales de los grupos Sham mostraron una actividad de 2 horas de excavación similar en las mediciones realizadas a las 24, 72 y 96 horas. Con respecto a los animales de los grupos isquémicos (EVC) la actividad realizada durante las 2 horas fue igual en la medición de las 24 horas post primera cirugía, pero difirió a partir de la medición de las 48 horas hasta alcanzar diferencias significativas ($p<0.01$) en la medición correspondiente a las 96 horas después de la primera cirugía. Es importante destacar que el grupo EVC agmatina mostró muy poca actividad de excavación en las 2 horas evaluadas a lo largo de todo el experimento.



B

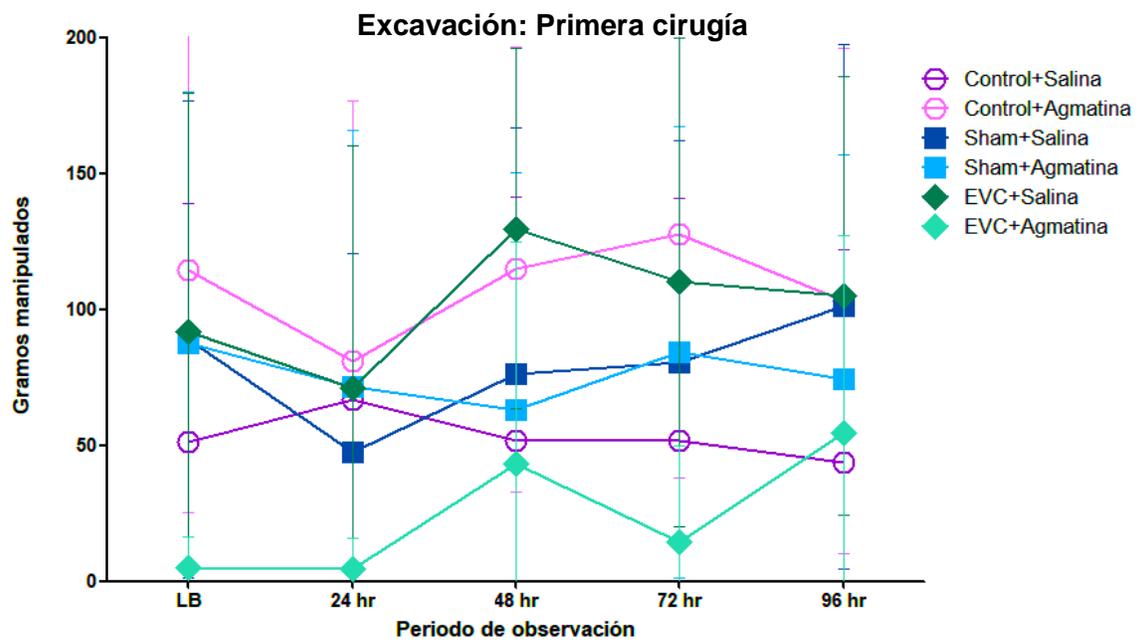


Figura 10: Evolución temporal de las medias del material de excavación manipulado, así como desviación estándar, en periodos de 2 horas (Panel A) y durante toda la noche (Panel B) posteriores a la primera, Kruskal Wallis, Dunn. Los símbolos representan los grupos experimentales, n=10 en todos los grupos

Con respecto a la actividad de excavación realizada durante toda la noche después de la primera cirugía, los resultados obtenidos (Fig. 10, panel B) muestran que los grupos control tuvieron una actividad diferente a lo largo de los 5 días de observación. En contraste, ambos grupos sham presentaron un comportamiento similar durante todo el experimento. Los animales del grupo control agmatina aumentaron su actividad de excavación (más de 100 gramos de material manipulado) alcanzando diferencia significativa ($p < 0.05$) en la medición realizada a las 72 horas post cirugía en comparación con el grupo EVC agmatina. Por otro lado, los animales control salina se mantuvieron en valores cercanos a 50 gramos de material manipulado durante todo el experimento. Con respecto a los grupos isquémicos, el grupo EVC agmatina mostró un nivel de actividad de excavación bajo (valores por debajo de 50 gramos de material manipulado) mientras que los animales isquémicos salina (EVC salina) mostraron un nivel alto de actividad con valores de más de 100 gramos de material movilizado durante la noche en las mediciones realizadas a las 48, 72 y 96 horas. A pesar de que los grupos de EVC manipulan volúmenes distintos de material, el comportamiento de los datos en los periodos de 24, 48 y 72 horas es similar en ambos grupos, ya que observamos que la conducta observada después de la cirugía supera la registrada previamente (línea basal) a la inducción de la isquemia.

En la Figura 11 se presentan los resultados después de la segunda cirugía. En el Panel A podemos observar la cantidad de material manipulado en periodos de 2 horas por los diferentes grupos experimentales. Observamos que en todos los grupos experimentales - excepto el grupo control salina - hubo una disminución de la conducta de excavación en el periodo de observación posterior a la administración del fármaco. Además, con excepción de los grupos sham, todos los grupos experimentales muestran comportamientos distintos dependiendo del fármaco que les fue administrado. En los grupos control, no se presentaron diferencias en la línea base, sin embargo, es posible observar que, mientras que el grupo control administrado con salina exhibe un aumento paulatino en la cantidad de material manipulado (valores cercanos a 70 g), en los animales del grupo control administrados con agmatina el aumento se da de manera rápida en el periodo de 48 horas ($\bar{x}=143.94$) después de la administración del fármaco ($p < 0.05$, entre ambos grupos control). Por su parte, los grupos sham mostraron actividad de 2 horas similar en las mediciones realizadas en los periodos de 24, 48 y 72 horas, con valores de material manipulado por debajo de 50 gramos

que no logran superar los valores alcanzados durante la medición previa a la segunda cirugía (línea basal). En los grupos EVC se presenta una tendencia a la recuperación de la conducta de excavación. Los animales isquémicos administrados con solución salina presentaron dicha tendencia a partir del intervalo de 48 horas, en contraste, los animales isquémicos que recibieron agmatina presentaron esta tendencia hasta las 72 horas. Cabe destacar que a pesar de que los animales del grupo EVC que recibió agmatina manipulan cantidades pequeñas de material durante la prueba son el único grupo que superó los valores obtenidos antes de la intervención quirúrgica. En cuanto a la actividad de excavación realizada durante la noche (Figura 11, panel B), se observó que los animales control mantuvieron una conducta de excavación estable a lo largo de todo el experimento, sin embargo, es importante señalar que los animales control que recibieron solución salina manipularon un promedio de 73 gramos en contraste con los 160 gramos que fueron desplazados por los animales control que recibieron agmatina. Con respecto a los grupos sham, podemos observar que ambos grupos disminuyeron su actividad de excavación en la medición de 24 horas post segunda cirugía, comparada con la línea basal. Además, los animales sham que recibieron agmatina mostraron un incremento de su actividad de excavación logrando, en la medición de las 96 horas, valores por arriba de los obtenidos durante la medición previa a la segunda cirugía. Aun cuando el grupo sham que fue administrado con solución salina también mostró una tendencia a la recuperación, ésta fue modesta, se presentó hasta la medición de las 72 horas y no fue superior a la medición obtenida antes de la segunda cirugía. En lo que concierne a los grupos EVC, si bien en ambos se presenta una disminución en la cantidad de material manipulado dentro de las 24 horas posteriores a la segunda cirugía, es posible observar que en los animales tratados con salina esta disminución se presenta de manera más abrupta. En ambos grupos existe una tendencia al aumento de la conducta de la excavación, sin embargo, esta tendencia se hace presente primero en los animales administrados con salina (en el periodo de 48 horas), en tanto los animales que recibieron agmatina presentan el aumento de la actividad hasta las 72 horas posteriores a la intervención quirúrgica. Aun cuando, los animales pertenecientes al grupo EVC tratados con agmatina exhiben niveles bajos de actividad (menor a 50 gramos de material manipulado), en este grupo es posible observar que la recuperación logra superar a los valores obtenidos antes de la intervención quirúrgica.

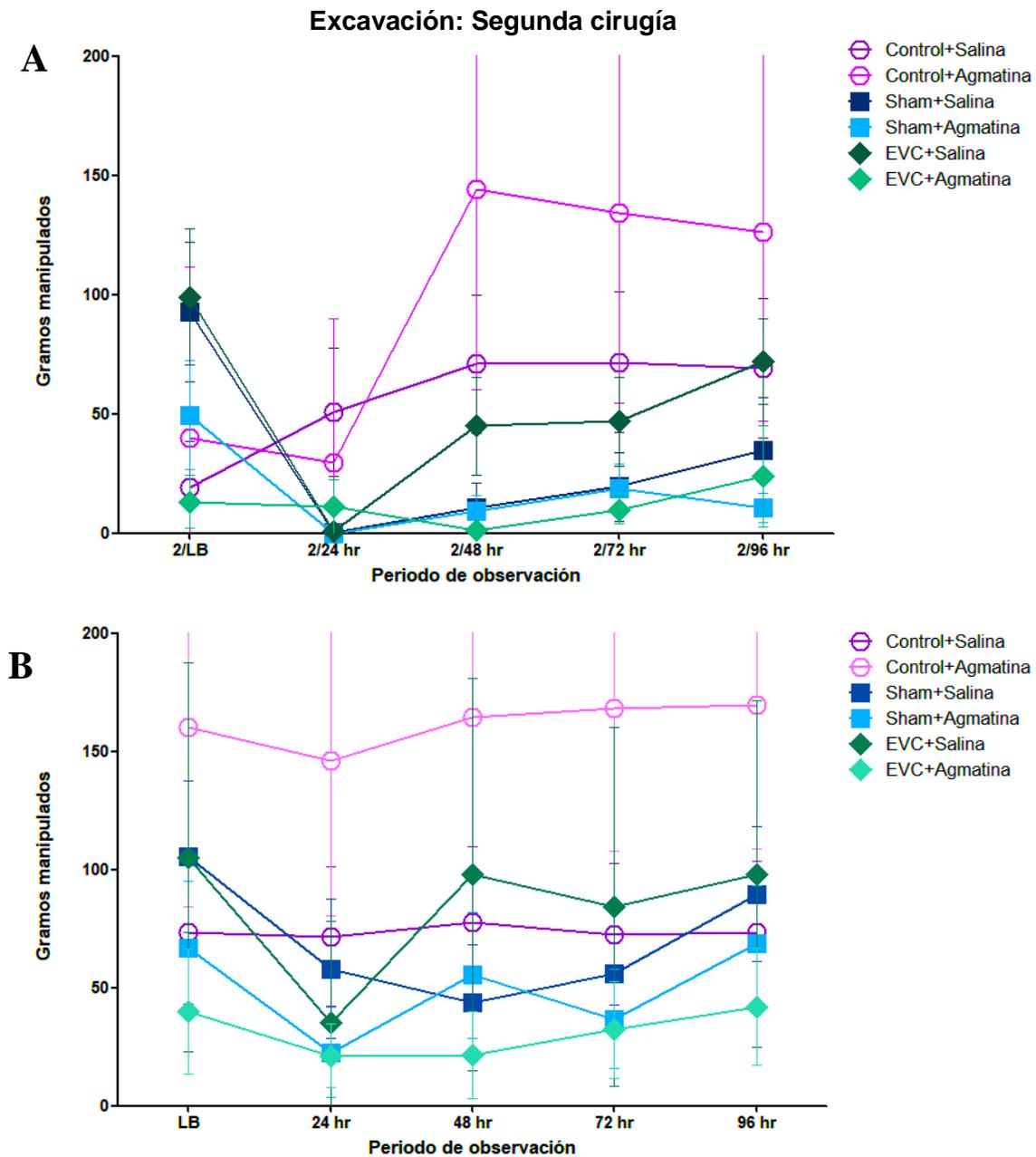


Figura 11: Evolución temporal de las medias y desviación estandar del material de excavación manipulado después de la segunda cirugía, en intervalos de 2 horas (Panel A) y durante toda la noche (Panel B). Kruskal Wallis, Dunn. Los símbolos representan los grupos experimentales, n=10 en todos los grupos

20 Área de infarto

Con el fin de obtener el porcentaje de área de infarto se empleó la técnica histológica de TTZ, mediante la cual se pudo diferenciar las zonas metabólicamente activas (zonas rojas) de las zonas que no contaban con dicha actividad (zonas blancas). Los datos recabados mediante esta técnica fueron procesados y analizados a través de la prueba ANOVA de una vía. Como se observa en la Figura 12, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. Además, es posible observar que el porcentaje de daño es semejante entre los grupos control. Con respecto al grupo Sham, es posible observar que la manipulación quirúrgica provocó un aumento en el porcentaje de daño en el grupo Sham administrado con salina en comparación con el grupo Sham que recibió agmatina. En cuanto a los grupos isquémicos, se observó un porcentaje de daño de aproximadamente 5% en el grupo EVC que recibió solución salina. En contraste, los animales que recibieron agmatina después de la intervención quirúrgica presentaron los valores más altos de daño cerebral ($\bar{x}=9.49\%$).

A**B**

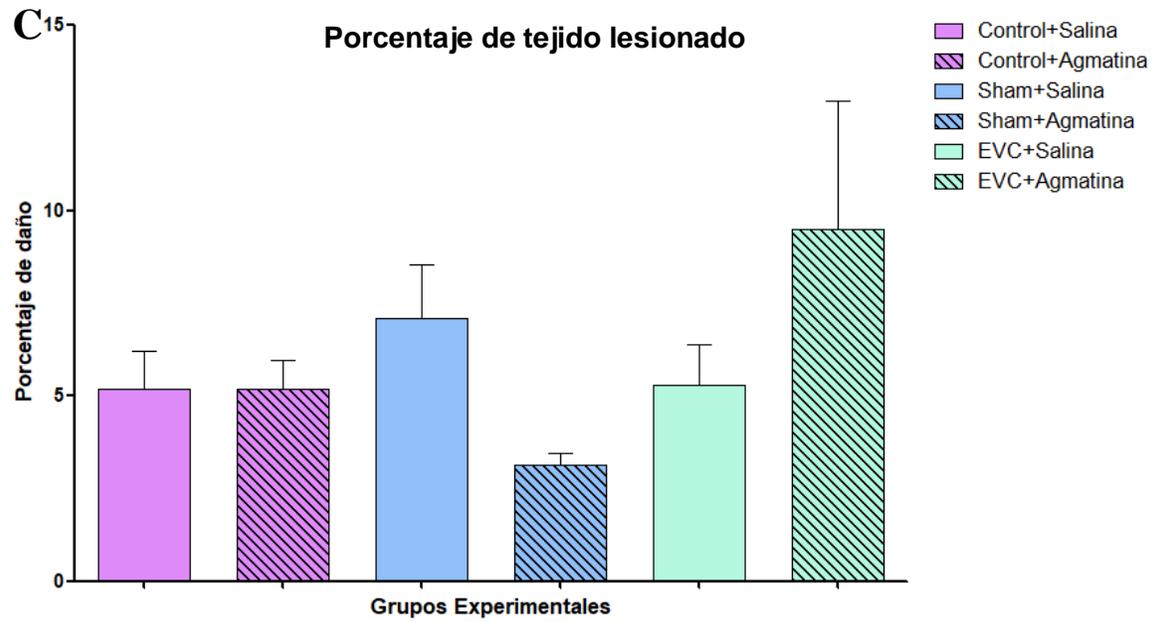


Figura 12: Comparación de tejido dañado por trombosis. **A** Imagen de tejido perteneciente al grupo control. **B** Fotografía de tejido obtenido del grupo EVC. **C** Representación gráfica del porcentaje de tejido lesionado por trombosis, las columnas representan cada una de las condiciones experimentales, n= 9-10.

VII. Discusión

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el efecto neuroprotector de la agmatina en un modelo de trombosis bilateral carotídea en ratones hembra. La agmatina es un péptido primario endógeno presente en el organismo de los mamíferos que, al ser precursor de poliaminas, tiene la capacidad de modular diversas funciones cerebrales, aunque también se le ha asociado en algunas patologías (Selakovic, 2019). Durante los últimos años se han demostrado los efectos de la agmatina sobre algunos de los eventos presentes en la cascada isquémica, especialmente sobre la respuesta inflamatoria, en modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* (Kim et al., 2016; Xu et al., 2018; Miranda. 2016; Ahn et al., 2011). Las enfermedades cerebrovasculares isquémicas se caracterizan por la interrupción del flujo sanguíneo cerebral ocasionando una serie de eventos bioquímicos que producen daño en los tejidos e incluso la muerte en el área de infarto. Alrededor de esta área de infarto se localiza la zona de penumbra, que aún conserva flujo sanguíneo reducido, por lo cual es considerada una ventana de oportunidad para disminuir el daño ocasionado por la isquemia, y por lo tanto, la reducir la severidad de los déficits neurológicos causados por la hipoxia. Actualmente la única molécula aprobada para el tratamiento de las EVC isquémicas es el rtPA (Activador tisular del plasminógeno recombinante), sin embargo, este medicamento tiene restricciones para su uso por lo que no satisface las necesidades de la intervención médica, además de ser potencialmente tóxico; es por esto por lo que, la búsqueda de moléculas con potencial efecto neuroprotector es muy importante.

En el presente trabajo se evaluaron la conducta de excavación, los déficits neuroconductuales y el área de infarto, como parámetros para determinar el daño neurológico después de la isquemia y su posible recuperación posterior a la administración de agmatina. En este sentido, Livingston y Tasker (2013), señalan la importancia de la evaluación de la función neurológica, la cual no sólo permite identificar los déficits presentados en los periodos post-isquemia, sino que además permite detectar posibles tratamientos terapéuticos en modelos animales que, de manera factible, puedan trasladarse a la clínica.

El modelo de isquemia por trombosis utilizado en este trabajo es sensible a los cambios presentados a través del tiempo, lo que nos permitió evaluar el comportamiento y función neurológica de los animales antes y después de dos manipulaciones quirúrgicas y un periodo de reperfusión. Los estudios acerca de los efectos de fármacos en el proceso isquémico han sido, en su mayoría, realizados en roedores macho por lo que consideramos especialmente importante este trabajo en donde hemos utilizado ratones hembra en adultez tardía. En este sentido existe evidencia de que la EVC tiene un perfil diferente cuando lo padece un hombre que cuando se presenta en una mujer y se especula que existen diferencias biológicas que influyen en los mecanismos de lesión después de un accidente cerebrovascular isquémico (Gibson, 2013).

Para evaluar el probable efecto neuroprotector de agmatina utilizamos un modelo de trombosis inducida por la aplicación de FeCl_3 en dos momentos; en la primera cirugía la formación del trombo provocó una disminución en el flujo sanguíneo cerebral de tal manera que el infarto provocado en la segunda cirugía (32 días después de la primera) sucedió en un cerebro en estado de hipoperfusión. Como consecuencia de estos eventos los animales sufrieron infarto.

Desde el punto de vista conductual, observamos que después de la primera cirugía hubo un aumento de los déficits neuroconductuales, medidos a través de la escala NDSS (Figura 8), en los grupos Sham y EVC en comparación con los grupos control. Estas diferencias pueden ser atribuidas tanto a la manipulación de la arteria carótida como a la formación de trombos en el grupo EVC. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que nuestro modelo de isquemia es efectivo para provocar daños neurológicos similares a los observados en el escenario clínico. Por otra parte, la reducción en las calificaciones de la evaluación neurológica que presentan los grupos experimentales en la evaluación previa a la segunda cirugía (Figura 9, línea basal) en contraste con los datos obtenidos durante el último período de evaluación de la primera cirugía, sugieren la presencia de mecanismos compensatorios que conducen a una mejoría de la función neurológica de los animales. Estos resultados son consistentes con los reportados por Rodriguez et al. (2000) quienes señalan que a partir de la oclusión de la arteria carótida se producen mecanismos compensatorios como el aumento del flujo sanguíneo en el lado opuesto y la expansión del

diámetro de la arteria contralateral, lo que conduce a una reducción en los signos neurológicos. Estos resultados fundamentan la realización de una segunda cirugía, a través de la cual se produjo un evento agudo.

Por otra parte, en la prueba excavación existe una disminución en los gramos del material manipulado en el periodo de observación posterior a la primera cirugía, esta disminución se observa en todos los grupos experimentales -excepto en control salina- (Figura 10). Los resultados obtenidos sugieren la eficacia de nuestro modelo para inducir lesiones hipóxicas en el hipocampo y la vulnerabilidad de los animales a sufrir daño incluso con la manipulación arterial. Estas lesiones fueron evidenciadas a través de la conducta de excavación, la cual ha demostrado ser sensible a modificación por lesiones hipocampales. Asimismo, en todos los grupos experimentales es posible observar la recuperación de la conducta en el último periodo de evaluación. No se observaron diferencias entre la evaluación previa a la segunda cirugía y la evaluación a las 96 horas de la primera cirugía, lo cual sugiere que la reperfusión no tiene un impacto significativo en la conducta de excavación. Aun cuando pueden existir otros procesos a corto plazo que favorecen la recuperación de la conducta de excavación es posible que el evento trombótico ocasionado en la primera cirugía sea un evento transitorio, y que los mecanismos compensatorios sean capaces de revertir sus efectos. Esta característica del modelo de trombosis es muy importante porque recrea lo observado en los pacientes isquémicos en los que se existe la presencia de eventos transitorios recurrentes antes de presentar un infarto (Simon et al., 2010).

Con respecto a los resultados obtenidos después de la segunda cirugía, observamos que la administración de agmatina (100 mg/kg) 15 minutos después de la segunda cirugía, es capaz de reducir los déficits neuroconductuales medidos a través de la escala NDSS en los grupos de animales Sham agmatina y EVC agmatina (Figura 9). Aunque la media de los puntajes en el grupo Sham agmatina era más alta en la línea base de la segunda cirugía en comparación con su contraparte que recibió el vehículo, los animales tratados con agmatina muestran una tendencia a la disminución de los déficits neuroconductuales a partir de las 48 horas, persistiendo esta mejora hasta el último período de observación. En cambio, el grupo Sham salina, después del periodo de 48 horas, exhibe un aumento sostenido de los déficits

neuroconductuales. En el caso de los grupos isquémicos (EVC), los animales tratados con agmatina presentaron una disminución de los déficits neuroconductuales que se inició a las 48 horas y se mantuvo hasta el último periodo de evaluación. En contraste, el grupo EVC salina mostró una reducción de los déficits hasta el periodo de 96 horas, siendo esta disminución más temprana en el grupo EVC agmatina, donde ya a las 48 horas se evidenció una tendencia a la mejora de los déficits presentados. Además, tanto el grupo Sham agmatina y EVC agmatina, mostraron una tendencia a la recuperación de la conducta de excavación (Figura 11) que superó la media obtenida antes de la manipulación quirúrgica, lo que sugiere que la presencia del fármaco limitó el tamaño de la lesión inducida por isquemia en el área hipocampal (Robert M J Deacon, 2006). Este efecto neuroprotector de agmatina es consistente con reportes previos en los cuales se sugiere que, aunque el mecanismo preciso de neuroprotección de la agmatina no se conoce a detalle, destacan su capacidad de modular la excitotoxicidad, su papel en la inhibición de la generación de radicales libres, el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y la liberación de factores inflamatorios. (Selakovic, 2019).

La respuesta inflamatoria producida por la isquemia cerebral es “estéril” ya que la respuesta inmunitaria se produce en ausencia de patógenos, en su lugar, la microglía y los patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés) son activados a través de la liberación de diversas moléculas producidas en las células dañadas. Esta respuesta juega un papel fundamental dentro de la isquemia ya que se desencadena un proceso de inflamación aguda transitoria que acentúa los daños ocasionados en el tejido cerebral y lesiona al área de penumbra, y se refleja a través de diversos déficits neurológicos. En contraparte, esta misma respuesta promueve la reparación de los tejidos a través de interacciones neuroinmunes beneficiosas para el organismo (Shichita, Ooboshi y Yoshimura, 2023). Después de analizar los resultados obtenidos en la evaluación neuroconductual observamos que en los grupos que recibieron agmatina, existe una disminución de las calificaciones obtenidas en la escala NDSS lo cual puede interpretarse como una mejoría de la funcionalidad neurológica en la medición realizada a las 48 horas posteriores a la inducción de isquemia. Una posible explicación es que la agmatina tiene efecto sobre la respuesta de inflamación aguda, debido a su capacidad para inhibir los mecanismos involucrados en dicho proceso entre los que se destacan: la inhibición de la

producción de NO, la influencia sobre macrófagos y células astrogliales para disminuir NOs-2 (Kim et al., 2016), así como el efecto inhibitorio sobre la microglía reactiva y las vías de señalización NF κ -B y TNF- α . Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la agmatina disminuye las alteraciones neuroconductuales y promueve la recuperación funcional del tejido, efectos que podrían estar relacionados con su capacidad para enlentecer o detener la respuesta inflamatoria aguda. Asimismo, es importante destacar que la respuesta inflamatoria posterior a la isquemia cerebral ha demostrado diferencias significativas entre hombres y mujeres. Este fenómeno se atribuye en parte a la concentración variable de microglía, la cual se presenta en función de la región cerebral analizada y la edad de los participantes. (Tariq, Lee y McCullough, 2022). Es posible, que las diferencias presentadas en nuestros resultados, en comparación con reportes previos del uso de agmatina en población masculina, pueda ser atribuida a la dismorfia existen en los mecanismos de neuroinflamación.

Con respecto a la evaluación de la sobrevida, nuestros datos sugieren que la administración de agmatina aumenta la sobrevida de los animales a los que se les produjo una trombosis, (Figura 8) en comparación a los animales sham. Resultados similares fueron encontrados en las pruebas neuroconductual medida a través de la escala NDSS y en la conducta de excavación, donde el grupo EVC que recibió agmatina presentó una tendencia a la recuperación mayor al grupo sham agmatina. En un trabajo publicado por Olmos et al. (1999) acerca de estudios *in vitro* con células granulares del cerebelo, los autores señalan que, en los modelos de muerte inducida por apoptosis en los que existe una baja exposición a K⁺ y los receptores de NMDA no se encuentran involucrados, la agmatina no es capaz de ofrecer protección a las células debido a que no puede prevenir la neurotoxicidad producida por GLU. En este sentido, nuestros resultados podrían sugerir que la muerte neuronal producida en los animales del grupo sham y en los del grupo EVC es inducida de manera diferente lo cual explicaría que la agmatina no sea capaz de evitar la muerte neuronal en los animales del grupo sham. Esta hipótesis es respaldada por los datos obtenidos a través de la evaluación NDSS y la prueba de excavación, donde los animales del grupo sham que recibieron agmatina, presenta mayores déficits neurológicos y una menor recuperación de la conducta de excavación en comparación con el grupo isquémico que recibió agmatina (EVC agmatina). De la misma manera, estos argumentos pueden ser

presentados como justificación ante la presencia de los déficits neuroconductuales observados 48 horas después de la administración de agmatina en el grupo control agmatina.

Estas diferencias entre las vías de muerte neuronal entre los animales de los grupos sham agmatina y EVC agmatina podrían también contribuir a explicar las diferencias detectadas en el tamaño del área de infarto en cada grupo. Es plausible que los animales del grupo sham presentara mecanismos de lesión poco susceptibles a la tinción realizada (tinción con TTZ). Del mismo modo, existe la posibilidad de que, a pesar de que el área del infarto es mayor en los animales del grupo EVC agmatina, ésta no impactara directamente en el hipocampo u otras áreas de interés, lo cual se tradujo en un mejor desempeño en las evaluaciones neuroconductuales y de excavación en comparación con los animales del grupo sham que recibieron agmatina.

Las hembras presentan rasgos fisiológicos que las distinguen de los machos, entre los que se encuentran el peso corporal, la cantidad de masa y grasa, así como factores neuroendócrinos, inmunológicos y conductuales (Allegra, Chiara, Daniela, Gaspari y De Francia, 2023). Por un lado, se ha comprobado que los microARN derivados del cromosoma X desempeñan un papel fundamental como reguladores de los genes relacionados con los efectos provocados por la isquemia cerebral, particularmente en los mecanismos que involucran el aumento del calcio intracelular, el estrés oxidativo y la apoptosis. En el último de estos mecanismos, los microARN tienen la capacidad de regular la expresión de caspasas 3 y 8. Es importante destacar que la expresión génica de los microARN puede tener efectos opuestos, promoviendo la neuroprotección o contribuyendo a la lesión por isquemia, dependiendo del tipo de célula observada. Por otro lado, está plenamente documentado que existen diferencias moleculares que influyen en los procesos hormonales y en las enzimas y transportadores encargados de metabolizar los fármacos (Fadiran y Zhang, 2014). Estos factores producen respuestas farmacodinámicas y farmacocinéticas diferenciadas entre hombres y mujeres, especialmente en los procesos de absorción, distribución, metabolización y eliminación de los fármacos (Soldin y Mattison, 2009). Con base en los trabajos previamente realizados en nuestro laboratorio es posible señalar que existen diferencias en la respuesta al efecto de agmatina entre ratones macho y

hembra las cuales pueden ser atribuidas a las diferencias a los mecanismos subyacentes a la lesión isquémica o a los mecanismos farmacocinéticos y farmacodinámicos presentados de manera diferencial tras la administración de agmatina. Estas observaciones sugieren que es necesario evaluar otras dosis de agmatina en los sujetos hembra.

Finalmente, en un trabajo del grupo del Dr. Gilad publicado en 1995, los autores, señalan que en cultivos *in vitro* de células cerebelosas, se observó un efecto tóxico de agmatina cuando la concentración de dicho fármaco alcanzaba los 700 μM . Sin embargo, en los grupos celulares donde la concentración era menor, se podía observar un efecto neuroprotector. Contrastando esto con nuestros resultados, y las diferencias observadas entre los grupos experimentales administrados con agmatina, podemos sugerir que el efecto de la agmatina se presenta con base en las exigencias sistémicas; es decir, a menor compromiso celular mayor efecto tóxico y en contraste a mayor compromiso celular produce un mayor efecto neuroprotector. Resultados similares fueron obtenidos por Miranda Mosqueda (2016) en los cuales observó que la administración de agmatina disminuye la presencia de microglía reactiva y este efecto se correlaciona directamente con la gravedad de la lesión inducida en la zona CA1 de hipocampo.

La isquemia cerebral no sólo se limita a un daño celular, sino que trae consigo diversos cambios tanto motores, como cognitivos y emocionales, por lo que son necesarias intervenciones eficaces dentro de las diversas áreas de la Psicología, las cuales, requieren una base sólida que respalde los conocimientos utilizados. Nuestro proyecto pretende contribuir a la generación de esta base con el propósito no solo de ampliar la comprensión que la Psicología tiene sobre la isquemia cerebral, sino también de contribuir al entendimiento de los mecanismos específicos que se presentan en las mujeres. Esto nos permite disminuir la brecha de conocimiento existente entre los procesos presentados por hombres y mujeres, y así ofrecer una atención personalizada que se adapte a las necesidades individuales, de esta manera asegurar la recuperación de los pacientes, garantizando la mejor calidad de vida posible.

VIII. Conclusiones

La administración aguda de agmatina en ratones hembra mostró una tendencia a la recuperación dentro de la evaluación de las alteraciones conductuales evaluadas mediante la escala NDSS. A pesar de que, tras la administración del fármaco, los grupos quirúrgicos experimentan un aumento en las calificaciones de la escala NDSS. En el caso de los grupos con isquemia cerebral (EVC), los animales tratados con agmatina muestran una tendencia a la disminución de los déficits a partir de las 48 horas, que se mantiene hasta el último periodo de evaluación. Estos hallazgos sugieren que la agmatina puede tener efectos beneficiosos en la reducción de los déficits neurológicos, especialmente en los animales que con daños inducidos tras la trombosis.

Por otra parte, dentro de la conducta de excavación los grupos experimentales mostraron una disminución en la conducta después de la segunda cirugía. Sin embargo en los grupos administrados con agmatina se muestra una tendencia a la recuperación más notable, superando los valores previos a la cirugía. La administración de agmatina parece tener un impacto en la actividad de excavación con efectos notables en el grupo isquémico, lo que podría representar un menor daño hipocampal.

Los hallazgos encontrados tras el análisis de las pruebas conductuales pueden señalar los efectos neuroprotectores de la agmatina, los cuales podrían estar condicionados a las exigencias sistémicas del organismo.

IX. Perspectivas a futuro

En la actualidad, varios estudios han destacado diferencias notables en las vías de muerte celular y los procesos de neuroinflamación entre ambos sexos. Sin embargo, el conocimiento generado en este campo todavía es limitado. Por lo tanto, es fundamental que futuras investigaciones se centren en profundizar en los mecanismos subyacentes de la lesión ocasionada por isquemia y en cómo estos mecanismos se manifiestan de manera distinta en hembras y machos. Este enfoque tiene como objetivo sentar las bases necesarias para el desarrollo de intervenciones eficaces adaptadas a las necesidades específicas de cada organismo.

Considerando también las variaciones existentes entre machos y hembras, es factible analizar animales que presenten diversos perfiles hormonales. Los que permitirá simular de manera más precisa las condiciones clínicas que se encuentran en la población femenina. Ejemplos de ello incluyen el síndrome de ovario poliquístico, la terapia de reemplazo hormonal y el uso de anticonceptivos hormonales, donde los factores hormonales desempeñan un papel crucial ante la presencia de isquemia cerebral.

Además, considerando las notables variaciones, principalmente de naturaleza farmacocinética, que se presentan de manera dismórfica, es esencial en futuras investigaciones emplear una variedad de dosis. Esto no solo servirá para encontrar una dosis adecuada que permita potenciar el efecto del fármaco en el grupo de interés, sino también para explorar la viabilidad de dosis adicionales que mantengan dicho efecto a lo largo del tiempo

En estudios futuros relacionados con el uso de la agmatina, es fundamental comprender en detalle los mecanismos farmacocinéticos y farmacodinámicos de esta molécula. Además, resulta crucial considerar la concentración del fármaco en individuos pertenecientes a distintos grupos, así como su relación con lesión isquémica y los déficits conductuales provocados por esta, con el propósito de verificar la hipótesis que sugiere una posible relación entre el efecto neuroprotector de la agmatina y las demandas específicas del organismo.

Referencias

Ahn, S. K., Hong, S., Park, Y. M., Lee, W. T., Park, K. A. y Lee, J. E. (2011). Effects of agmatine on hypoxic microglia and activity of nitric oxide synthase. *Brain Research*, 1373, 48-54. doi:10.1016/j.brainres.2010.12.002

Allegra, S., Chiara, F., Di Grazia, D., Gaspari, M., & De Francia, S. (2023). Evaluation of Sex Differences in Preclinical Pharmacology Research: How Far Is Left to Go?. *Pharmaceuticals*, 16(6), 786.

Alonso, M. (2007). Fisiopatología de la Isquemia Cerebral. Asociación Colombiana de Neurología.

Arauz, A., Murillo, L. M. y Bonnin, E. (2002). Neuroprotección en isquemia cerebral aguda. Estado actual e importancia clínica de la cascada isquémica. En revista ecuatoriana de neurología

Ardila, A. y Ostrosky, F. (2012). Accidentes cerebrovasculares. En Ardila, A. y Ostrosky, F. Guía para el diagnóstico Neuropsicológico (pp- 39-54).

Bacigaluppi, M., Comi, G. y Hermann, D. M. (2010). Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *The open neurology journal*, 4, 34.

Barua, S., Youl, J. K., Young, J. K., Kim, J. H. y Lee, J. E. (2019). Therapeutic Effect of Agmatine on Neurological Disease: Focus on Ion Channels and Receptors. *Neurochemical Research*, 44 (4), 735-750. doi:10.1007/s11064-018-02712-1

Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. y Bartkowski, H. M. (1986). Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*, 17 (6), 1304-1308.

Campaña, D. G. (2021). Morbilidad y mortalidad por accidentes cerebrovasculares en una unidad de cuidados intensivos pediátricos. *Revista Cubana de Neurología y Neurocirugía*, 11 (2).

Carlson, N. (2014). Trastornos Neurológicos. En Carlson, N. Fisiología de la conducta (pp 552-590). Editorial Pearson.

Deacon, R. (2009). Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behavioural brain research*, 200 (1), 128-133.

Deacon, R. M. J. (2006). Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nature Protocols*, 1 (1), 118-121. doi:10.1038/nprot.2006.19

Fadiran, E. O. y Zhang, L. (2014). Effects of Sex Differences in the Pharmacokinetics of Drugs and Their Impact on the Safety of Medicines in Women. En *Medicines For Women* (pp. 41-68). doi:10.1007/978-3-319-12406-3_2

Fan, F. (2017). Menopause and Ischemic Stroke: A Brief Review. *MOJ Toxicology*, 3 (4). doi:10.15406/mojt.2017.03.00059

Gasbarrino, K., Di Iorio, D. y Daskalopoulou, S. S. (2021). Importance of sex and gender in ischaemic stroke and carotid atherosclerotic disease. *European Heart Journal*, 43 (6), 460-473. doi:10.1093/eurheartj/ehab756

Gibson, C. (2013). Cerebral Ischemic Stroke: is Gender Important? *Journal of Cerebral Blood Flow y Metabolism*, 33 (9), 1355-1361. doi:10.1038/jcbfm.2013.102

Gibson, C. L. y Attwood, L. (2016). The impact of gender on stroke pathology and treatment. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 67, 119-124. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.08.020

Gilad, G. M. y Gilad V H. (2000). Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. *Neuroscience Letters*, 296 (2-3), 97-100. doi:10.1016/s0304-3940(00)01625-6

Gilad, G. M., Salame, K., Rabey, J. M. y Gilad, V. H. (1995). Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models. *Life Sciences*, 58 (2), PL41-PL46. doi:10.1016/0024-3205(95)02274-0

Gonzales Piña, R. y Landinez Martinez, D. A. (2016). Epidemiología, etiología y clasificación de la enfermedad vascular cerebral. Archivos de Medicina (Manizales), 16 (2), 495-507. doi:10.30554/archmed.16.2.1726.2016

Huan Y, Chaoyang Z, Kai D, Chunhua S, Xin Z, Yue Z. Predictive Value of Head-Neck CTA Combined with ABCD2 Scale Score for Patients with Cerebral Infarction of Vertebrobasilar Transient Ischemic Attack (TIA). Med Sci Monit. 2018 Dec 12;24:9001-9006. doi: 10.12659/MSM.909470.

Instituto Mexicano del Seguro Social. (2015). Enfermedad Vascular Cerebral. Consultado desde <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/enfermedad-vascular-cerebral>

Instituto Mexicano del Seguro Social. (2019). Enfermedad Vascular Cerebral (EVC), entre las primeras causas de muerte. Consultado desde <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201910/455>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2023). Estadísticas de Defunciones Registradas (EDR) 2022 (Preliminar). Comunicado de Prensa. Consultado desde <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=8319#:~:text=Las%20cinco%20principales%20causas%20de,enfermedades%20del%20h%C3%ADgado%20y%20accidentes.>

Jarvis, C. R., Anderson, T. R. y Andrew, R. D. (2001). Anoxic depolarization mediates acute damage independent of glutamate in neocortical brain slices. Cerebral Cortex, 11 (3), 249-259.

Jayaraj, R. L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F. Y. y Rosenberg, G. A. (2019). Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. Journal of Neuroinflammation, 16 (1). doi:10.1186/s12974-019-1516-2

Jung, H. J., Yang, M. Z., Kwon, K. H., Yenari, M. A., Choi, Y. J., Lee, W. T., . . . Lee, J. E. (2010). Endogenous Agmatine Inhibits Cerebral Vascular Matrix Metalloproteinases Expression by Regulating Activating Transcription Factor 3 and

Endothelial Nitric Oxide Synthesis. *Current Neurovascular Research*, 7 (3), 201 - 212. doi:10.2174/156720210792231804

Kim, J. H., Lee, Y. W., Park, K. A., Lee, W. T. y Lee, J. E. (2009). Agmatine Attenuates Brain Edema through Reducing the Expression of Aquaporin-1 after Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow y Metabolism*, 30 (5), 943-949. doi:10.1038/jcbfm.2009.260

Kim, J. M., Lee, J. E., Cheon, S. Y., Lee, J. H., Kim, S. Y., Kam, E. H. y Koo, B.-N. (2016). The Anti-inflammatory Effects of Agmatine on Transient Focal Cerebral Ischemia in Diabetic Rats. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, 28 (3), 203-213. doi:10.1097/ana.0000000000000195

Kleinschnitz, C., Fluri, F. y Schuhmann, M. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy*, 3445. doi:10.2147/dddt.s56071

Kosonen, R., Barua, S., Kim, J. Y. y Lee, J. E. (2021). Role of agmatine in the application of neural progenitor cell in central nervous system diseases: therapeutic potentials and effects. *Anatomy y Cell Biology*, 54 (2), 143-151. doi:10.5115/acb.21.089

LA ASAMBLEA LEGISLATIVA, D. D. F. y LEGISLATURA, I. (s.f.). LEY DE PROTECCIÓN A LOS ANIMALES DEL DISTRITO FEDERAL.

Lakhan, S. E., Kirchgessner, A. y Hofer, M. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*, 7 (1). doi:10.1186/1479-5876-7-97

Li, W., Nieman, M. y Gupta, A. S. (2016). Ferric Chloride-induced Murine Thrombosis Models. *Journal of Visualized Experiments*, (115). doi:10.3791/54479

Lizano Salas, M., Mc Donald Molina, C. y Tully Sancho, S. (2020). Fisiopatología de la cascada isquémica y su influencia en la isquemia cerebral. *Revista Medica Sinergia*, 5 (8), e555. doi:10.31434/rms.v5i8.555

Medcalf, R. L. (2011). Plasminogen Activation-Based Thrombolysis for Ischaemic Stroke: The Diversity of Targets may Demand New Approaches. *Current Drug Targets*, 12 (12), 1772-1781. doi:10.2174/138945011797635885

Milosevic, K., Stevanovic, I., Bozic, I. D., Milosevic, A., Janjic, M. M., Laketa, D., . . . Savic, D. (2022). Agmatine Mitigates Inflammation-Related Oxidative Stress in BV-2 Cells by Inducing a Pre-Adaptive Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (3), 3561. doi:10.3390/ijms23073561

Mosqueda, M. L. (2016). Efectos de la Agmatina como neuroprotector farmacológico y su papel en las alteraciones de concentración microglial en CA1 tras la inducción de Isquemia Cerebral (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

Miranda-Mosqueda, M. L., Flores-Fernández, K. L., Méndez-Cuesta, L. A., RuízOropeza, S. Y., Ventura-Martínez, R., González-Barrios, J. A., & Gómez-Acevedo, C. (2023). Actuales moléculas neuroprotectoras propuestas para el tratamiento de Evento Vascular Cerebral Isquémico. *Farmacología*, 2(2), pp. 15-45.

National Heart Lung y blood institute. (2023). Stroke. Consultado desde <https://www.nhlbi.nih.gov/health/stroke>

Olmos, G., De Gregorio Rocasolano, N., Regalado, M. P., Gasull, T., Boronat, M. A., Trullas, R., . . . A García Sevilla, J. (1999). Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *British Journal of Pharmacology*, 127 (6), 1317-1326. doi:10.1038/sj.bjp.0702679

Paciaroni, M., Balucani, C., Agnelli, G., Caso, V., Silvestrelli, G., Grotta, J. C., . . . Leys, D. et al. (2012). Systemic thrombolysis in patients with acute ischemic stroke and Internal Carotid ARtery Occlusion: the ICARO study. *Stroke*, 43 (1), 125-130.

Rexrode, K. M., Madsen, T. E., Yu, A. Y., Carcel, C., Lichtman, J. H. y Miller, E. C. (2022). The impact of sex and gender on stroke. *Circulation research*, 130 (4), 512-528.

Rodriguez, R., Rodriguez Boscan, I., Lugo Sira, D., Vidrio, H., Hong, E., Medina, M. y Herrera, I. (2000). Bilateral sequential common carotid artery sectioning in mice as a new model for testing neuroprotective drugs. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 9 (1), 45-53. doi:10.1053/jscd.2000.0090045

Rodriguez, R., Santiago Mejia, J., Fuentes Vargas, M. y San-Juan, E. R. (2003). Outstanding neuroprotective efficacy of dexrazoxane in mice subjected to sequential common carotid artery sectioning. *Drug Development Research*, 60 (4), 294-302. doi:10.1002/ ddr.10330

Rodriguez, R., Santiago Mejia, J., Gómez, C. y San Juan, E. R. (2005). A simplified procedure for the quantitative measurement of neurological deficits after forebrain ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 147 (1), 22-28. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.02.013

Ruiz Sandoval, J. L., Briseño Godínez, M. E., Chiquete Anaya, E., Arauz Góngora, A., Troyo Sanromán, R., Parada Garza, J. D., . . . Cantú, B. C. (2018). Public and Private Hospital Care Disparities of Ischemic Stroke in Mexico: Results from the Primer Registro Mexicano de Isquemia Cerebral (PREMIER) Study. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27 (2), 445-453. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09. 025

Secretaria de Salud. (2018). En México se registran alrededor de 170 mil infartos cerebrales. Prensa. Consultado desde <https://www.gob.mx/salud/prensa/415-en-mexico-seregistran-alrededor-de-170-mil-infartos-cerebrales>

Selakovic, V., Arsenijevic, L., Jovanovic, M., Sivcev, S., Jovanovic, N., Leontijevic, M., . . . Radenovic, L. (2019). Functional and pharmacological analysis of agmatine administration in different cerebral ischemia animal models. *Brain Research Bulletin*, 146, 201-212. doi:10.1016/j.brainresbull.2019.01.005

Shichita, T., Ooboshi, H. y Yoshimura, A. (2023). Neuroimmune mechanisms and therapies mediating post-ischaemic brain injury and repair. *Nature Reviews Neuroscience*, 24 (5), 299-312. doi:10.1038/s41583-023-00690-0

Simon, R., Greenberg, D. y Aminoff, M. (2010). Accidente cerebrovascular. McGraw Hil. Consultado desde [https://accessmedicina -mhmedical - com.pbidi.unam.mx:2443/content.aspx?bookid=1505§ionid=97685233](https://accessmedicina-mhmedical-com.pbidi.unam.mx:2443/content.aspx?bookid=1505§ionid=97685233)

Soldin, O. P. y Mattison, D. R. (2009). Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clinical Pharmacokinetics*, 48 (3), 143-157. doi:10.2165/00003088-200948030-00001

Sommer, C. J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133 (2), 245-261. doi:10.1007/s00401-017-1667-0

Sotomayor Sobrino, M. A., Ochoa Aguilar, A., Méndez Cuesta, L. A. y Gómez Acevedo, C. (2019). Interacciones neuroinmunológicas en el ictus. *Neurología*, 34 (5), 326-335. doi:10.1016/j.nrl.2016.08.003

Souza, V. R., Mendes, E., Casaro, M., Antiorio, A. T. F. B., Oliveira, F. A. y Ferreira, C. M. (2018). Description of Ovariectomy Protocol in Mice. En *Methods in Molecular Biology* (pp. 303-309). doi:10.1007/978-1-4939-8994-2_29

Spychala, M. S., Honarpisheh, P. y McCullough, L. D. (2016). Sex differences in neuroinflammation and neuroprotection in ischemic stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 95 (1-2), 462-471. doi:10.1002/jnr.23962

Tariq, M. B., Lee, J., y McCullough, L. D. (2022). Sex differences in the inflammatory response to stroke. *Seminars in Immunopathology*, 45(3), 295–313. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00969-x>

Traystman, R. J. (2003). Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR Journal*, 44 (2), 85-95. doi:10.1093/ilar.44.2.85

Vacca, V. (2015). Accidente isquémico transitorio: la importancia de seguir los consejos. *Nursing (Ed. española)*, 32 (1), 38-43. doi:10.1016/j.nursi.2015.02.010

Xing, C., Arai, K., Lo, E. y Hommel, M. (2012). Pathophysiologic Cascades in Ischemic Stroke. *International Journal of Stroke*, 7 (5), 378-385. doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00839.x

Xu, W., Gao, L., Li, T., Shao, A. y Zhang, J. (2018). Neuroprotective Role of Agmatine in Neurological Diseases. *Current Neuropharmacology*, 16 (9), 1296-1305. doi:10.2174/1570159x15666170808120633

Yang, M. Z., Mun, C. H., Choi, Y. J., Baik, J. H., Park, K. A., Lee, W. T. y Lee, J. E. (2007). Agmatine inhibits matrix metalloproteinase-9 via endothelial nitric oxide synthase in cerebral endothelial cells. *Neurological Research*, 29 (7), 749- 754. doi:10.1179/016164107x208103

Zhang, F. y Chen, J. (2012). Infarct measurement in focal cerebral ischemia: TTC staining. En *Animal Models of Acute Neurological Injuries II* (pp. 93-98). Springer.

Zhu, X., Fréchou, M., Schumacher, M. y Guennoun, R. (2019). Cerebroprotection by progesterone following ischemic stroke: Multiple effects and role of the neural progesterone receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 185, 90-102. doi:10.1016/j.jsbmb.2018.07.014