

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ANÁLISIS DE LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES DE LA PROGESTERONA Y LA ALOPREGNANOLONA SOBRE EL DAÑO DEL HIPOCAMPO RESULTANTE DE UN EPISODIO DE ISQUEMIA-ANOXIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

PEDRO MONTES DEL CARMEN

DIRECTORA DE TESIS: DR. CARRIELA MORALÍ DE LA BREÑA



MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2005

m. 348962



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Pedro Montes del Carmen

FECHA: octubre 11, 2005

FIRMA: [Firma]

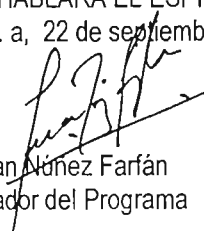
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **MONTES DEL CARMEN PEDRO** con número de cuenta **91325857** con la tesis titulada: **Análisis de los efectos neuroprotectores de la progesterona y la alopregnanolona sobre el daño del hipocampo resultante de un episodio de isquemia-anoxia cerebral global aguda en ratas**, bajo la dirección del(a) **Dra. Gabriela Morali de la Brena**.

Presidente:	Dra. Ana Clorinda Arias Alvarez
Vocal:	Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo
Secretario:	Dra. Gabriela Morali de la Brena
Suplente:	Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Suplente:	Dr. José Miguel Cervantes Alfaro

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 22 de septiembre del 2005


Dr. Juan Néñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, por las facilidades otorgadas para la realización de la presente tesis.

Al Servicio de Cirugía Experimental y Bioterio del CMN Siglo XXI, IMSS, por las facilidades otorgadas para el aprovisionamiento y mantenimiento de los animales de experimentación, así como para la realización de los procedimientos quirúrgicos.

A la Dra. Rosa María Viguera, Investigadora del Instituto Nacional de Pediatría (SSA) y a la Dra. Sandra Orozco, Investigadora de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, por las facilidades brindadas para el procesamiento histológico de los cerebros; así como a la Biol. Exp. Lucía Hernández Morales por el apoyo brindado en esta parte de la metodología.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo económico otorgado a los proyectos número FP-2003/035 y FP-2003/451, a través de la Coordinación de Investigación en Salud, que permitió la compra de algunos materiales empleados en la realización de esta tesis, así como el apoyo económico que como Becario de Investigación recibí durante mis estudios de Maestría.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado al proyecto número 31073-M, que permitió la compra de algunos materiales utilizados, así como el pago correspondiente de la beca de tesis de Maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo económico complementario otorgado durante mis estudios de Maestría.

Al comité tutorial conformado por la Dra. Gabriela Morali de la Brena, la Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo y el Dr. José Miguel Cervantes Alfaro.

De manera particular agradezco a la Dra. Gabriela Morali el apoyo brindado en las diferentes etapas de esta tesis.

Esta tesis es ahora el punto de partida para conocer una parte del Universo que seguramente me seguirá maravillando por el resto de mi vida, el funcionamiento del cerebro. Además, simboliza la culminación de una meta intermedia en la que, afortunadamente, me acompañan muchas personas y son a las que dedico este trabajo:

A mi madre “Nico” y a mi hermana Lucia por haber logrado poner en práctica una forma de pensar en la que las circunstancias adversas no son un obstáculo, sino un reto por superar.

A Guille, Leticia, Mariano, Esperanza y Pavel por mantener un ambiente emocionalmente estable que favorece una convivencia familiar sana. En particular a Hazel y Alejandro por recordarnos lo divertido que es la vida.

A Rosa por estar conmigo y complementar recíprocamente nuestras vidas.

A mis amig@s de CU: Ivonne, Irma, Erik, Manuel, Héctor, Gabriela, Saraf, Itzél, Blas y Mauricio. De AFG: Marcia, Leticia, Sergio, Fernando, Juan Jose, Rosario, Paulina y Angel. Del CMN: Lucia, Elidia y Edith. Gracias a tod@s por compartir su tiempo para intercambiar ideas, viajar, jugar, correr, etc.

ÍNDICE

	pag
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	5
<i>DEFINICIÓN DE ISQUEMIA CEREBRAL</i>	<i>5</i>
Isquemia focal versus isquemia global	5
<i>FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA</i>	<i>7</i>
Falla energética	9
Mecanismos excitotóxicos	9
Incremento intracelular de calcio y activación de enzimas calcio-dependientes	10
Formación de radicales libres y estrés oxidativo	11
Fenómenos proinflamatorios	14
Muerte neuronal por necrosis o por apoptosis.....	15
Alteraciones hemodinámicas y vasculares luego de un episodio de isquemia.....	18
<i>ESTRUCTURAS CEREBRALES SELECTIVAMENTE VULNERABLES A LA ISQUEMIA</i>	<i>20</i>
<i>ESTRUCTURA ANATÓMICA Y FUNCIÓN DEL HIPOCAMPO</i>	<i>22</i>
Conectividad sináptica del hipocampo.....	24
<i>ALTERACIONES FUNCIONALES ASOCIADAS AL DAÑO DEL HIPOCAMPO, DEBIDAS A UN EPISODIO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL</i>	<i>25</i>
Pérdida Neuronal en el hipocampo y alteraciones del aprendizaje y de la memoria.....	25
<i>AGENTES NEUROPROTECTORES UTILIZADOS PARA CONTRARRESTAR LOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA ISQUEMIA.....</i>	<i>30</i>
Recomendaciones para la evaluación de los posibles agentes neuroprotectores.....	32
<i>UTILIZACIÓN DE MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL PARA LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE NEUROPROTECCIÓN.....</i>	<i>33</i>
Modelos de isquemia cerebral global en diferentes especies.....	33

Modelo de isquemia global en ratas por oclusión de los cuatro vasos (4-VO).....	35
4. ANTECEDENTES.....	36
Neuroprotección mediada por la progesterona y la alopregnanolona.....	41
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
6. OBJETIVOS.....	45
7. HIPÓTESIS.....	46
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
<i>MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA MEDIANTE LA OCLUSIÓN</i>	
<i>DE LOS CUATRO VASOS (4-VO).....</i>	<i>48</i>
<i>EVALUACIONES CONDUCTUALES.....</i>	<i>49</i>
Aprendizaje y memoria espaciales.....	49
Memoria de referencia y memoria de trabajo.....	50
<i>EVALUACIÓN DE LA POBLACIÓN DE NEURONAS PIRAMIDALES DEL HIPOCAMPO.....</i>	<i>52</i>
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</i>	<i>53</i>
9. RESULTADOS.....	54
<i>MORTALIDAD.....</i>	<i>54</i>
<i>EVALUACIONES FUNCIONALES.....</i>	<i>54</i>
Aprendizaje espacial.....	54
Memoria espacial.....	64
Memoria de referencia y de trabajo.....	68
<i>POBLACIÓN DE NEURONAS PIRAMIDALES EN EL HIPOCAMPO.....</i>	<i>70</i>
10. DISCUSIÓN.....	78
11. CONCLUSIONES.....	88
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1. RESUMEN

La reducción del flujo sanguíneo cerebral resultante de un episodio de isquemia cerebral global da lugar a varios fenómenos fisiopatológicos como la liberación masiva de neurotransmisores excitadores, la acumulación intracelular de Na^+ , Cl^- y Ca^{++} , daño mitocondrial, producción de radicales libres, inhibición de la síntesis proteica, acidosis intracelular, activación de enzimas líticas, mecanismos de apoptosis y alteraciones en la reparación del ADN.

Estos fenómenos pueden llevar al daño celular irreversible, especialmente de aquellos grupos neuronales selectivamente vulnerables como las neuronas piramidales del hipocampo y con ello a la alteración de las funciones que ahí se integran, como el aprendizaje y la memoria. Diversos fármacos han sido utilizados con la finalidad de reducir la magnitud del daño provocado por la isquemia global: antagonistas de los canales de calcio, compuestos que incrementan la neurotransmisión GABAérgica o que reducen la neurotransmisión excitadora, agentes antioxidantes y compuestos antiapoptóticos, entre otros.

En particular, la progesterona (P4) y su metabolito activo la alopregnanolona (THP), entre sus mecanismos de acción celular, incrementan la actividad GABAérgica, contrarrestan la neurotransmisión excitadora, tienen acciones antioxidantes, disminuyen la expresión de genes apoptóticos, favorecen la expresión de genes antiapoptóticos y promueven fenómenos relacionados con los mecanismos de recuperación plástica. En este laboratorio se ha demostrado previamente el efecto neuroprotector de la progesterona en modelos de isquemia global en gatas y en ratas. Otros autores, en otros modelos de daño cerebral como la isquemia focal, el daño por crisis convulsivas y el daño traumático, también han demostrado el efecto neuroprotector de P4. El posible efecto neuroprotector del metabolito activo (THP) no había sido evaluado en isquemia global ni focal. Además, a diferencia de los estudios mencionados, en este trabajo las evaluaciones se realizaron a largo plazo y se analizó tanto la neuroprotección morfológica como funcional del hipocampo, aspectos que son actualmente requisitos para la validación de fármacos neuroprotectores con uso potencial en la clínica.

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto neuroprotector a largo plazo de la progesterona y de la THP, en ratas macho sometidas a isquemia global por el modelo de “oclusión de los 4 vasos” (cauterización permanente de las arterias vertebrales y oclusión de las carótidas comunes) por 20 minutos y tratadas con vehículo (Veh), P4 (8mg/Kg iv) o THP (8mg/Kg ip) a los 15min, 2, 6, 24, 48 y 72h post-isquemia. Se evaluaron algunos parámetros del aprendizaje y de la memoria espacial como indicadores de la función del hipocampo (en el laberinto acuático de Morris) y de la memoria de referencia y de trabajo (en el laberinto radial de Olton), además de la población de neuronas piramidales en el cuerno de Ammon del hipocampo, tres meses después del episodio de isquemia.

Los animales sometidos a isquemia y tratados con Veh presentaron una alta mortalidad (77%) y alteraciones en el aprendizaje espacial (mayores latencias de escape, mayores distancias recorridas y mayor tigmotaxis) y en la memoria espacial (mayores latencias y menor número de pases por el sitio de la plataforma en la prueba de transferencia), así como mayor número de errores de memoria de trabajo, en relación al grupo sham. Tanto el tratamiento con P4 como con THP redujo significativamente ($p < 0.05$) la mortalidad (42 y 50% respectivamente) con respecto al grupo Veh y redujo las alteraciones funcionales en forma significativa, especialmente en las pruebas de aprendizaje espacial realizadas en el laberinto acuático de Morris.

La isquemia global provocó una reducción similar y significativa de la población de neuronas piramidales de los campos CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo en las ratas de los grupos tratados con Veh (27, 37, 52 y 36%), P4 (21, 32, 59 y 35%) o THP (4, 15, 41 y 41%) en comparación con la población del grupo Sham tomada como 100%.

La mejor ejecución en las pruebas de aprendizaje y memoria de las ratas tratadas con P4 o THP, pese a la pérdida severa de neuronas piramidales en el hipocampo, sugiere que estos tratamientos fueron capaces de interferir con algunos de los mecanismos de daño que impiden a largo plazo la expresión adecuada de estas funciones en las que participa el hipocampo; o bien, promovieron la recuperación plástica de los circuitos neuronales afectados y demuestra su efecto neuroprotector parcial.

2. ABSTRACT

Reduction of cerebral blood flow resulting from an episode of global cerebral ischemia causes a series of pathophysiological phenomena including massive release of excitatory neurotransmitters, intracellular Na^+ , Cl^- and Ca^{++} accumulation, mitochondrial damage, production of free radicals, inhibition of protein synthesis, intracellular acidosis, activation of lytic enzymes, apoptotic mechanisms, and impairment of DNA repair.

These phenomena may lead to irreversible cell damage, in particular of those neuronal groups being selectively vulnerable, as the pyramidal neurons of the hippocampus and thus to impairment of the functions integrated in that structure, such as learning and memory. Diverse drugs have been evaluated with the aim to reduce the magnitude of the damage resulting from global ischemia: calcium channel antagonists, compounds increasing the GABAergic neurotransmission or decreasing the excitatory neurotransmission, antioxidant agents, and antiapoptotic compounds, and others.

In particular, progesterone (P4) and its active metabolite allopreganolone (THP), among their mechanisms of cellular action, they increase the GABAergic activity, decrease the excitatory neurotransmission, have antioxidant effects, reduce the expression of proapoptotic genes, and increase that of antiapoptotic genes, and favor the expression of phenomena related to plastic recovery. In this laboratory, the neuroprotective effect of progesterone in models of cerebral global ischemia in cats and rats has been previously shown. Diverse authors, using others models of cerebral damage such as focal ischemia, convulsive seizures, and traumatic damage, have also demonstrated the neuroprotective effect of P4. The possible neuroprotective effect of the active metabolite (THP) has not been evaluated neither in global nor focal ischemia. In addition, differing from the previous reports, long-term evaluations were done in the present study, and morphological as well as functional hippocampal neuroprotection was analyzed, aspects that at present are requisites for validating neuroprotective compounds with potential clinical use.

The aim of the present study was to analyze the long-term neuroprotective effect of progesterone and that of THP, in male rats submitted to global ischemia by the four vessels

occlusion model (permanent cauterization of the vertebral arteries and transient occlusion of the common carotid arteries) during 20 minutes and treated with vehicle (Veh), P4 (8mg/Kg iv), or THP (8mg/Kg ip) 15min, 2, 6, 24, 48 y 72h after ischemia. Three months after ischemia, some parameters of spatial learning and memory (by using the Morris water maze), and of the reference and working memory (by using the Olton radial maze), as well as the pyramidal neuron population of the *cornus Ammoni* were evaluated as indexes of both functional and morphological integrity of the hippocampus.

Ischemic animals treated with Veh showed a high mortality (77%) as well as impairments of the spatial learning (longer escape latencies and swimming distances, and more thigmotaxis) and spatial memory (longer latencies and fewer crossing through the former platform location in the trial probe), and more working memory errors as compared to the Sham group. Treatment with either P4 or THP significantly reduced ($p<0.05$) the mortality (42 and 50% respectively) in relation to the Veh group, and significantly reduced the functional impairments, specially those of spatial learning as evidenced in the Morris water maze.

Global cerebral ischemia resulted in a similar and significant loss of pyramidal neurons in the CA1, CA2, CA3 y CA4 fields of the hippocampus of the Veh- (27, 37, 52 and 36%), P4- (21, 32, 59 and 35%) or THP- (4, 15, 41 and 41%) treated rats as compared to the Sham group neuronal population taken as 100%.

The similar performance of P4- or THP- treated rats in learning and memory tests as that of the Sham group, in spite of the severe loss of hippocampal pyramidal neurons, suggests either that these treatments were able to interfere with some mechanisms of damage preventing the long-term adequate expression of these hippocampal functions; or they promoted the plastic recovery of the affected neuronal circuits.

Results demonstrate the partial neuroprotective effects of progesterone and allopregnanolone against the damage resulting from global cerebral ischemia.

3. INTRODUCCIÓN

DEFINICIÓN DE ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia cerebral es una alteración cerebrovascular que se origina por la reducción del flujo sanguíneo cerebral por abajo de 10 ml/min/100 g de tejido y con ello, la interrupción del aporte de oxígeno y glucosa al cerebro. Aún cuando la isquemia cerebral ocurra de manera transitoria, su permanencia durante varios minutos, puede causar daño irreversible a diversos grupos neuronales de regiones cerebrales específicas, cuya magnitud variará de acuerdo a la vulnerabilidad selectiva de estos grupos neuronales, a la severidad y a la duración de la isquemia. En estas condiciones, la severidad del daño puede ser modificada mediante procedimientos farmacológicos o no farmacológicos eficaces contra los mecanismos celulares del daño neuronal (Nakano y cols, 1990; Cottrell, 1995; Siesjö y cols, 1995; Roine, 1997; Sarraf-Yazdi, 1999; Gwag y cols, 2002). Actualmente, los desórdenes cerebrovasculares (tanto focales como globales) constituyen uno de los problemas más importantes de la Neurología y son causa de invalidez y/o muerte de un gran número de individuos en muchos países del mundo.

Isquemia global versus isquemia focal

La supresión o la reducción del aporte sanguíneo cerebral puede limitarse a una parte del cerebro (isquemia focal) o afectar a este órgano en su totalidad (isquemia global) (Fig. 1). En los seres humanos, la isquemia focal ocurre por la oclusión, durante periodos prolongados, de una arteria distante al círculo de Willis, de modo que en este tipo de isquemia se localiza una zona central restringida llamada núcleo, carente de irrigación sanguínea, en la que el daño neuronal es muy severo y una zona periférica más extensa denominada penumbra isquémica, donde persiste un mínimo de irrigación sanguínea a través de flujo sanguíneo colateral. En esta zona de penumbra los tejidos cerebrales presentan diferentes grados de hipoperfusión y por lo tanto, de daño neuronal (Sarraf-Yazdi, 1999). Dependiendo de la duración de la isquemia focal, se denomina accidente isquémico transitorio si éste revierte antes de las 24 horas o infarto cerebral si la duración de este episodio es superior a las 24 horas (Diez-Tejedor y cols, 2001).



FIGURA 1. Representación esquemática de las zonas afectadas por una isquemia global vs isquemia focal. A) En la isquemia global todo el cerebro se halla en hipoperfusión sanguínea. B) En la isquemia focal sólo el área específica del territorio de la arteria afectada se halla sin flujo.

La isquemia cerebral global aguda compatible con la supervivencia debe ser necesariamente transitoria y la reducción del flujo sanguíneo puede ser completa o incompleta (hipoperfusión severa). Por ello, la isquemia cerebral global transitoria y la reperfusión subsecuente, como sucede cuando a un individuo se le reanima de un paro cardíaco, son clínicamente muy importantes, en tanto que la isquemia global permanente es sinónimo de muerte (Roine, 1997). Existen otros desórdenes que pueden dar lugar a isquemia cerebral global tales como la hipotensión arterial severa, la estrangulación y el ahogamiento, o a una falta de oxigenación cerebral como la hipoxia y el envenenamiento con cianuro o con monóxido de carbono (Roine, 1997). En un episodio de isquemia global todo el cerebro se encuentra expuesto a la supresión o reducción del flujo sanguíneo y, por lo tanto, a los mecanismos fisiopatológicos de daño. Sin embargo existen estructuras cerebrales particularmente vulnerables a la isquemia: a) las neuronas piramidales del cuerno de Ammon (CA) en el hipocampo, en particular las regiones CA1 y CA4, b) las neuronas piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral, c) las neuronas espinosas de pequeño y mediano tamaño del núcleo caudado y del putamen y d) las células de Purkinje del cerebelo (Wieloch, 1985; Roine, 1997). A su vez, el daño de estas estructuras se manifiesta como alteraciones neurológicas, alteraciones conductuales, deficiencias del aprendizaje y la memoria, etc., en los individuos que han sufrido un episodio de isquemia cerebral global aguda severo (Roine, 1997; Block, 1999; O'Reilly, 2003). Existen

varios modelos de isquemia cerebral global en animales de experimentación (Bleyaert y cols, 1978; Pulsinelli y Brierley, 1979; González-Vidal y cols, 1998) que han permitido abordar experimentalmente diversos aspectos relacionados con la fisiopatología de la isquemia, los mecanismos de daño neuronal y las consecuencias sobre las distintas funciones integradas por las estructuras cerebrales más vulnerables.

FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA

El cerebro es un órgano complejo cuya integridad funcional y morfológica no es compatible con un evento isquémico, debido a sus reservas limitadas de glucosa y a su alto requerimiento de este compuesto para el aporte de energía necesaria para mantener sus funciones y su metabolismo (Wagner y Lanier, 1994). En el caso del cerebro humano por ejemplo, aunque el cerebro representa sólo el 2% de la masa corporal, emplea aproximadamente el 20% del oxígeno suministrado al cuerpo y requiere cerca del 15% de flujo sanguíneo respecto al total del gasto cardiaco, para mantener los gradientes iónicos de aproximadamente 100 billones de neuronas (Nestler y cols, 2001).

La fisiopatología de la isquemia incluye fenómenos tempranos, algunos de ellos coexisten y pueden dar lugar a su vez a fenómenos subsecuentes tardíos, por una activación en secuencia o en cascada (Sarraf-Yazdi, 1999; Gwag y cols, 2002). Los mecanismos de daño pueden ser analizados en diversos niveles de organización cerebral (sistémico, celular/molecular, etc). Entre los mecanismos celulares/moleculares inmediatos desencadenados por la isquemia están la falta de energía, la despolarización anóxica, la liberación masiva de neurotransmisores excitadores como el glutamato, la apertura de canales iónicos que perturban la homeostasis celular, y la acidosis intracelular resultante de la producción de ácido láctico por el metabolismo anaerobio de las neuronas ante la falta de oxígeno (Fig. 2). Como consecuencia de lo anterior ocurre un incremento en la concentración de calcio intracelular y con ello la activación de lipasas y numerosas proteasas como las caspasas, calpaínas y endonucleasas. Fenómenos subsecuentes comprenden la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, la inhibición de la síntesis proteica, acidosis intracelular, despolarizaciones

espontáneas repetitivas, mecanismos inflamatorios y alteraciones en la reparación del ADN (Hara y cols, 1993; Siesjö, 1995; Sarraf-Yazdi, 1999; Gwag y cols, 2002). Algunos de estos fenómenos son transitorios en tanto que otros pueden persistir tiempos más prolongados. Los mecanismos de daño molecular ocasionan, a su vez, alteraciones neuronales como el edema celular citotóxico, la disfunción mitocondrial, el daño a los microtúbulos que conforman el citoesqueleto y alteraciones estructurales de los cromosomas (Lipton, 1999; Gwag y cols, 2002). Tanto los mecanismos moleculares como las alteraciones celulares ocasionan, cuando el episodio de isquemia es severo, muerte neuronal por necrosis y/o por apoptosis.

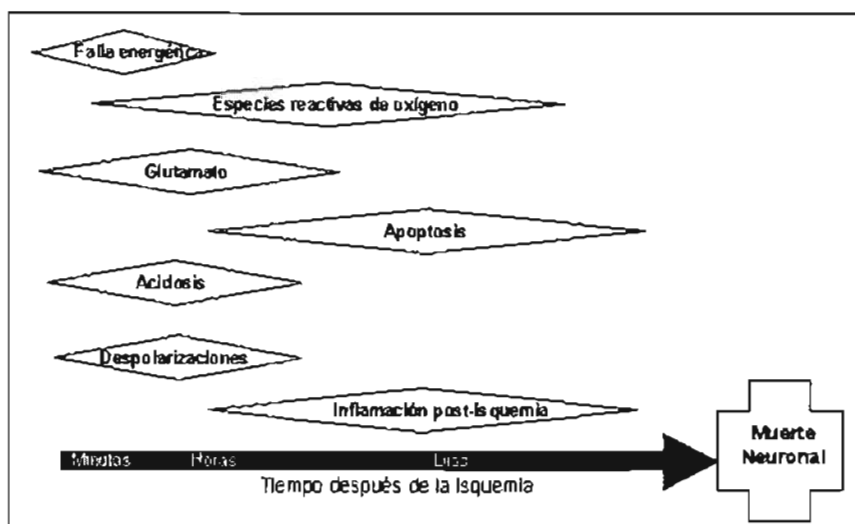


FIGURA 2. Curso temporal de los principales fenómenos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia cerebral, que pueden llevar a la muerte neuronal. Modificada a partir de Iadecola y cols. (1999)

Los mecanismos fisiopatológicos de daño que se manifiestan de inmediato dan origen a la muerte neuronal temprana (necrosis) que ocurre en las primeras 5 horas post-isquemia mientras que los que se hacen evidentes al cabo de horas o días posteriores a la isquemia participan en la muerte neuronal por maduración (de 5 a 24 horas post-isquemia) y en la muerte neuronal retardada (de 1 a 7 días post-isquemia), principalmente por apoptosis (Pulsinelli y cols, 1982; Susuki y cols, 1985; Kogure y cols, 1988; Murakami y cols, 1997; Lipton 1999; Gwag y cols, 2002). Las células gliales, en particular los astrocitos también pueden dañarse por la isquemia; pero resisten períodos de isquemia considerablemente más prolongados que las neuronas (Lipton, 1999). El funcionamiento de las células endoteliales, principalmente de la microvasculatura, también es afectada y contribuye a la presentación de fenómenos

hemodinámicos (hiperemia-hipoperfusión y no-reflujo). Las alteraciones de las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica ocasionan cambios en la permeabilidad de ésta (Lipton, 1999).

A la par de los mecanismos fisiopatológicos de daño neuronal que se desencadenan durante y después de la isquemia, se activan mecanismos tempranos que inducen la expresión de genes que codifican para la síntesis de proteínas involucradas en la posible sobrevivencia de las neuronas (proteínas antiapoptóticas, proteínas que conforman receptores para factores neurotróficos y proteínas de choque térmico) (Lipton, 1999; Leker y Shohami, 2002) y mecanismos plásticos tardíos que favorecen la recuperación funcional de los animales sometidos a isquemia como la neurogénesis (Kokaia y Lindvall, 2003) y la modificación de los circuitos sinápticos neuronales de las regiones afectadas (Johansson y Belichenko, 2002).

Falla energética

La consecuencia inicial de la falta de energía originada por la interrupción del suministro de oxígeno y glucosa al cerebro, es el ingreso de cationes al interior de las células nerviosas con la consiguiente despolarización membranal (despolarización anóxica) debida a la supresión de los diversos mecanismos dependientes de energía, como intercambiadores de iones a través de la membrana (Hansen y Lundbaek, 1989; Wagner y Lanier, 1994; Hara y cols, 1993). Así, en situaciones de isquemia ingresan sodio y calcio en forma masiva al interior de la célula, a través de canales dependientes de voltaje. Adicionalmente, el ingreso masivo de sodio atrae cloro al interior de la neurona con lo que aumenta la osmolaridad y se origina la entrada de agua (edema celular), la distensión o hinchamiento celular y eventualmente la ruptura de la membrana celular (Mitani y cols, 1994).

Mecanismos excitotóxicos

El neurotransmisor glutamato media la transmisión sináptica excitadora a través de la activación de receptores ionotrópicos sensibles a NMDA (N-metil-D-aspartato), a AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) o a kainato. En condiciones fisiológicas, esta neurotransmisión excitadora es un componente fundamental del funcionamiento de circuitos y redes neuronales que intervienen en la integración y la regulación de diversas funciones

cerebrales, como es el caso del procesamiento de información en el aprendizaje. Sin embargo, la activación anormal, excesiva y sostenida de los receptores de glutamato puede ocasionar muerte neuronal. A este fenómeno se le conoce como neurotoxicidad por glutamato o excitotoxicidad (Olney, 1969)

La despolarización anóxica provoca la liberación de neurotransmisores incluyendo a los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato por un mecanismo dependiente de calcio o a través del funcionamiento inverso de sus transportadores (Hansen y Lundbaek, 1989; Haddad y Jiang, 1993; Mitani y cols, 1994). Estos neurotransmisores actúan sobre receptores específicos de alta afinidad como los receptores ionotrópicos NMDA y AMPA/kainato, así como sobre los receptores metabotrópicos (mGluR). La interacción de los aminoácidos excitadores con los receptores NMDA provoca principalmente el ingreso de Ca^{2+} , aunque también son permeables a Na^+ y K^+ . Los receptores NMDA inicialmente también son activados durante la falla energética debido a que la despolarización membranar ocasiona que el ion Mg^{2+} se desprenda y por lo tanto, el receptor se desbloquea y permite la entrada de Ca^{2+} . La interacción con los receptores AMPA resulta en un ingreso masivo de Na^+ y K^+ , a través de canales iónicos asociados a estos receptores. El influjo de Ca^{2+} masivo a través de los receptores NMDA ocasiona la acumulación excesiva de este ion en el interior celular y el rápido desencadenamiento de los mecanismos de daño calcio-dependientes. En condiciones de isquemia, el influjo de Na^+ a través de los receptores NMDA y AMPA contribuye adicionalmente al hinchamiento neuronal que a su vez puede iniciar la ruptura de membranas y la muerte de la neurona por necrosis (Gwag y cols, 2002).

Incremento intracelular de calcio y activación de enzimas calcio-dependientes

En condiciones normales coexisten mecanismos que ocasionan un incremento de Ca^{2+} intracelular (necesario para el funcionamiento neuronal) con mecanismos de regulación de la concentración de calcio intracelular que mantienen ésta dentro de límites normales. Los mecanismos que contribuyen al incremento del Ca^{2+} intracelular incluyen: 1) la entrada a través de canales de calcio operados por voltaje o a través de canales operados por receptor (NMDA, AMPA, etc.), 2) la liberación del ion a partir de organelos intracelulares como el retículo

endoplásmico a través de la estimulación de los receptores al IP_3 y de la mitocondria a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . A la par, los mecanismos que contribuyen a la disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular son: A) la extrusión del Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} o de la Ca^{2+} -ATPasa o que se encuentran en la membrana plasmática, B) la interacción del Ca^{2+} con las proteínas a las cuales activa, y C) el secuestro de Ca^{2+} al interior del retículo endoplásmico a través de la Ca^{2+} -ATPasa o al interior mitocondrial por un mecanismo electroforético (uniporter).

Luego de un episodio de isquemia, la excesiva acumulación de Ca^{2+} intracelular se debe principalmente a la activación de los receptores NMDA; no obstante, la falla energética ocasiona también la liberación del Ca^{2+} de los organelos intracelulares (mitocondria y retículo endoplásmico) (Gwag y cols, 2002) y provoca la alteración tanto de la extrusión como del secuestro de Ca^{2+} debido a la dependencia de ATP de ambos mecanismos. La elevación prolongada de Ca^{2+} intracelular a concentraciones de $10^{-7}M$ o mayores puede desencadenar varios fenómenos de daño al activar diversas enzimas: fosfolipasa A2 (PLA2) que hidroliza a los fosfolípidos que forman parte de la membrana celular incrementando la cantidad de ácidos grasos libres como el ácido araquidónico, proteasas como las calpaínas y de manera indirecta a las caspasas (activadas luego de la disfunción mitocondrial) que destruyen proteínas estructurales y funcionales, la sintasa del óxido nítrico con lo que se inician algunos mecanismos de daño por radicales libres de oxígeno al ocurrir la reperfusión, y endonucleasas que dañan las cadenas de los ácidos nucleicos, fenómenos que en su mayoría determinan la muerte celular por necrosis (Siesjö, 1995; Sarraf-Yazdi, 1999). Adicionalmente, se induce la expresión de genes específicos que dan lugar a la síntesis de proteínas que pueden actuar como factores de transcripción para la síntesis de RNA's y proteínas aparentemente relacionadas con procesos de reparación o bien con fenómenos de muerte neuronal tardía o de apoptosis (Sarraf-Yazdi, 1999).

Formación de radicales libres y estrés oxidativo.

Tanto durante el episodio de isquemia cerebral como en la reperfusión se pierde la homeostasis en cuanto al balance entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes. La mayor

concentración de pro-oxidantes que de antioxidantes ocasiona que se desencadenen mecanismos de daño por estrés oxidativo que, a su vez, ocasionan lipoperoxidación membranal, oxidación del ADN y de proteínas, alteración del metabolismo oxidativo mitocondrial, desbalance iónico y actividad enzimática descontrolada (Chan, 1996; Leker y Shohami, 2002).

La activación de enzimas debida a la acumulación de Ca^{2+} intracelular como las fosfolipasas, la sintasa del oxido nítrico y la xantina oxidasa, además de la pérdida del potencial mitocondrial, ocasiona que se activen varios de los mecanismos de producción de especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno (Figura 3).

El exceso de Ca^{2+} en el interior de la mitocondria ocasiona que se interrumpa la cadena de transporte de electrones y el colapso del potencial de membrana mitocondrial (disfunción mitocondrial); de manera que, los electrones libres acumulados en la mitocondria reaccionan con el oxígeno (O_2) y causan la producción del anión superóxido (O_2^-). La xantina oxidasa, activada por calpaínas, cataliza la oxidación de xantina e hipoxantina hacia ácido úrico; esta reacción también tiene como resultado la producción del radical superóxido (Mattson y Culmsee, 2001). En condiciones normales este radical es neutralizado al ser transformado a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (MnSOD) y subsecuentemente a agua en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. Debido a que un episodio de isquemia ocasiona un desajuste en los sistemas de eliminación de pro-oxidantes, el radical superóxido se constituye como un agente altamente oxidante además de participar en la producción de otras moléculas oxidantes. El peróxido de hidrógeno generado a partir del radical superóxido, a través de la reacción de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$), produce el radical hidroxilo (OH^-); el hierro (Fe^{2+}) es liberado de proteínas luego de un episodio de isquemia global (Kondo y cols, 1995). El superóxido también puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) generándose así un agente oxidante más, el peroxinitrito (ONNO^-) (Piantadosi y Zhang, 1996; Mattson y Culmsee, 2001); este radical de nitrógeno puede producir otros agentes oxidantes como el radical hidroxilo y el dióxido de nitrógeno (NO_2). Además del hierro, otro metal que participa en la generación de agentes oxidantes es el zinc (Zn^{2+}); este metal de transición es almacenado en las vesículas presinápticas de neuronas glutamatérgicas, es liberado con el glutamato de manera dependiente

de la actividad y se ha descrito que se transloca en neuronas en proceso de muerte después de un episodio de isquemia (Koh y cols, 1996; Gwag y cols, 2002). La acumulación de zinc en el interior neuronal participa en la producción de especies reactivas de oxígeno posiblemente a través de la activación de la ciclooxigenasa (Sensi y cols, 1999). Una de las enzimas activadas por la acumulación de calcio en el interior celular es la fosfolipasa A_2 (PLA $_2$); la acción de esta enzima en los fosfolípidos de la membrana celular tiene como resultado la liberación de ácido araquidónico el cual al ser convertido a eicosanoides por ciclooxigenasas o lipooxigenasas, es también una fuente de producción del radical superóxido (Gwag y cols, 2002).

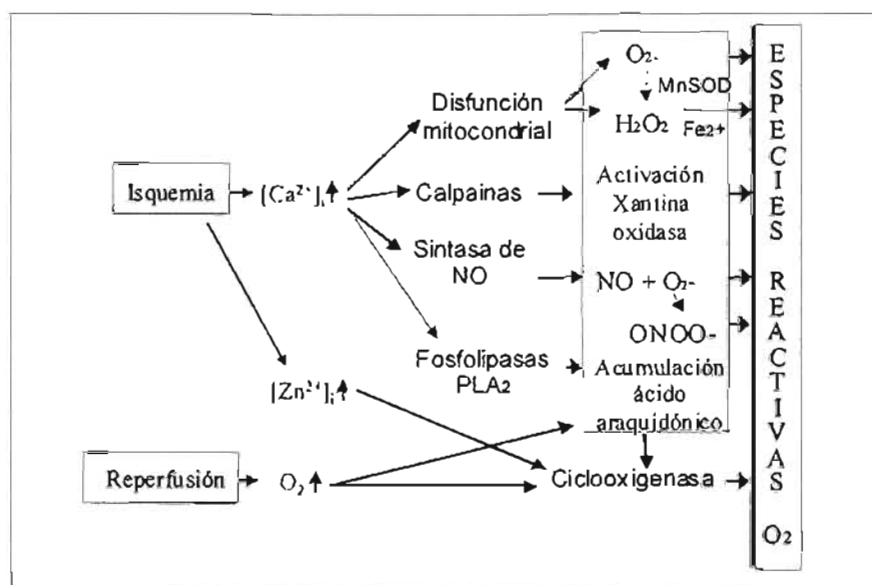


FIGURA 3. Producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno durante el periodo de isquemia y durante la reperfusión. Tomada de Gwag y cols, (2002)

En roedores sometidos a isquemia global o a isquemia focal, se han observado niveles de daño oxidativo significativo en proteínas, lípidos y ADN de las poblaciones neuronales selectivamente vulnerables a la isquemia (Chan, 1996; Hayashi y cols, 1999). El daño inmediato a estas biomoléculas sugeriría que la acumulación de especies reactivas de oxígeno sólo participa en la muerte neuronal por necrosis; no obstante, existen evidencias de que estas especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno participan en la muerte neuronal por apoptosis (Kruman y cols, 1997; Gwag y cols, 2002). Uno de los principales mecanismos de daño que ocurren por estrés oxidativo es la lipoperoxidación de la membrana plasmática; en este

proceso de daño se encuentra involucrada, como resultado de dicha lipoperoxidación, la producción de un aldehído tóxico llamado 4-hidroxinonal. Este compuesto se une de manera covalente al intercambiador iónico Na^+/K^+ -ATPasa, al transportador de glucosa y al transportador de glutamato; como consecuencia altera la función de estas proteínas membranales. Además, se le ha relacionado con la activación de muerte neuronal por apoptosis (Kruman y cols, 1997; Mattson y Culmsee, 2001).

Fenómenos proinflamatorios

No obstante que la mayor parte de la información sobre los fenómenos inflamatorios se ha obtenido de estudios hechos en modelos de isquemia focal, existen evidencias de que estos fenómenos son también importantes luego de un episodio de isquemia global. Se ha demostrado que el factor nuclear κB (NF- κB) es activado por un periodo de isquemia global y que actúa como factor de transcripción induciendo la expresión de genes que codifican moléculas de adhesión celular, receptores de superficie celular y citocinas inflamatorias (Clemens y cols, 1997). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1β (IL- 1β) incrementan su expresión 72 horas después del episodio de isquemia global (Clemens y cols, 1997). Estas citocinas inflamatorias tienen capacidades quimiotáctiles para los leucocitos lo que facilita a su vez el paso de dichos leucocitos a través de la barrera hematoencefálica. Se ha observado acumulación de leucocitos 3 horas después de la isquemia global (Lipton, 1999). La presencia excesiva de estas células inflamatorias puede ocasionar por una parte la oclusión de la microvasculatura local después de la reperfusión (Bramlett y Dietrich, 2004) y, por otra parte, puede desencadenar mecanismos de daño neuronal como la activación de la NADH oxidasa con la subsecuente producción de radicales libres, la producción de ácido hipocloroso que provoca daño membranal y la activación de proteasas (Matsuo y cols, 1995).

Por otra parte, se ha reportado que existe una proliferación de microglia en las regiones dañadas un día después de un periodo de isquemia global (Jorgensen y cols, 1993). Se ha descrito que la microglia activada puede destruir microorganismos invasores, remover restos celulares y promover la reparación tisular a través de la secreción de factores de crecimiento (Kreutzberg, 1996). Sin embargo, el hecho de que la microglia contribuya a la producción de

NOS e interleucina 1 (IL-1), indica que estas células pueden ser importantes también en los mecanismos de daño neuronal (Lipton, 1999).

Muerte neuronal por necrosis y por apoptosis

La magnitud de los mecanismos fisiopatológicos de daño inducidos por la isquemia, así como la interacción de varios de ellos, pueden provocar en las horas siguientes al episodio isquémico, muerte neuronal por necrosis. La necrosis es una forma de muerte neuronal incontrolada y no regulada. Este tipo de muerte se caracteriza morfológicamente por: 1) hinchamiento celular y de los organelos; 2) disrupción subsecuente de los organelos nucleares y de la membrana plasmática; 3) desintegración de la estructura nuclear y de los organelos citoplásmicos; y 4) desintegración y extrusión del contenido celular hacia el espacio extracelular (Wang, 2002). Este último fenómeno tiene como consecuencia que la muerte de una célula afecte a células vecinas debido a la liberación de enzimas líticas como las proteasas lisosomales. Bioquímicamente, la muerte neuronal por necrosis se caracteriza por la acción al azar de proteasas y endonucleasas que rompen el ADN en múltiples fragmentos irregulares, hecho que se manifiesta como un patrón en mancha al realizar la electroforesis sobre gel de agarosa del ADN aislado (Buja y cols, 1993).

Por su parte, con el término de apoptosis se distingue una forma de muerte celular caracterizada morfológicamente por la condensación temprana y extrema de la cromatina y por consiguiente la formación de cuerpos apoptóticos, bioquímicamente por el efecto de endonucleasas que produce una fragmentación internucleosomal del ADN que se manifiesta como un patrón en bandas múltiples de 180-200 pares de bases en técnicas de electroforesis sobre gel de agarosa (Buja y cols, 1993; Wang, 2002)

La muerte neuronal por apoptosis es dependiente de energía, por lo que es un proceso que se desencadena después de la isquemia, durante la reperfusión. En la activación de este mecanismo de muerte neuronal están involucrados varios de los eventos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia como el incremento de Ca^{2+} intracelular y la subsiguiente excitotoxicidad por el glutamato, la disfunción del retículo endoplásmico y de la mitocondria, el

incremento de estrés oxidativo, el daño al ADN, la alteración en la expresión de genes pro- y antiapoptóticos, y la activación de proteasas de cisteína (caspasas) y endonucleasas que guían a la degradación final del genoma (Schaller y Graf, 2004).

La expresión de genes ante un episodio de isquemia comienza con la expresión de los genes de respuesta inmediata, entre los que destacan *c-jun*, relacionado con la supervivencia de las neuronas de CA1, y *c-fos*, relacionado con su degeneración (Jorgensen y cols, 1989; Barone y cols, 1998), conjuntamente con la familia *bax* relacionada con la muerte por apoptosis. Las proteínas resultantes de esa expresión, c-fos o c-jun, forman un heterodímero llamado AP-1, que constituye un factor de transcripción capaz de unirse al ADN nuclear e inducir la transcripción de determinados genes y de unirse también a otras proteínas (An y cols, 1993). AP-1 se ha relacionado con mecanismos de resistencia a la isquemia (Kapinya y cols, 2000). Por su parte, los protooncogenes *bcl-2* y *bax* que se han relacionado con fenómenos antiapoptóticos (Kitagawa y cols, 1998) y proapoptóticos (Chen y cols, 1996) respectivamente, se expresan en las regiones vulnerables del hipocampo. Otro ejemplo es la expresión génica de las llamadas proteínas de estrés, entre las que destaca la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), la cual se traduce a partir del ARN mensajero en las regiones que sobreviven a la isquemia, pero no en las regiones que degeneran (Hata y cols, 1998).

En la apoptosis participan señales intra y extracelulares (Fig. 4). Las señales intracelulares que desencadenan la apoptosis son generadas como consecuencia de la disfunción mitocondrial, en cambio, las señales extracelulares involucran la activación de una superfamilia de receptores membranales que activan dominios de muerte; ambas vías reclutan a proteasas de cisteína que se caracterizan por romper proteínas en los sitios donde hay residuos de ácido aspártico (caspasas). Además de las caspasas, las proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) y Bax (proapoptótica) tienen un papel fundamental en la regulación de los mecanismos de apoptosis (Hockenberry y cols, 1990; Olivai y cols, 1993). En el mecanismo intracelular, el estímulo apoptótico ocasiona la translocación de la proteína Bax a la membrana externa mitocondrial, forma un dímero con Bcl-2 lo que provoca la liberación del citocromo c de la mitocondria hacia el citosol. El citocromo c forma un complejo llamado apoptosoma al interactuar con el factor

activador de proteasas apoptóticas 1, APAF-1 (Rami, 2003). El apoptosoma activa a la caspasa 9, esta caspasa iniciadora desencadena la activación de caspasas efectoras como la 3, 6 y 7. En el mecanismo extracelular, la activación de receptores de muerte como el factor de necrosis tumoral α R-1 (TNF- α R-1) o Fas origina el reclutamiento de proteínas adaptadoras que contienen dominios de muerte como es el caso de FADD (Proteína asociada a Fas con dominio de muerte); FADD puede activar a las caspasas 8 o 10 y de manera semejante a la caspasa 9, estas activan a la caspasa 3 (Wang, 2002). Los substratos celulares de las caspasas efectoras activadas incluyen proteínas del citoesqueleto, enzimas de transducción de señales, proteínas del ciclo celular y diversos substratos nucleares.

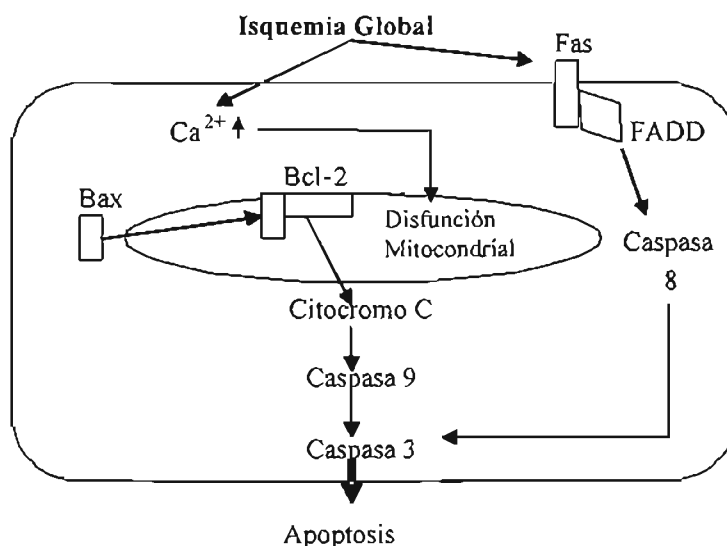


FIGURA 4. Mecanismos apoptóticos asociados a un episodio de isquemia cerebral global.

En resumen, la cascada de activación de caspasas parece ser esencial para muchos cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren durante la apoptosis. Sin embargo, se requieren niveles suficientes de ATP para la activación de estas caspasas. El destino de las células hacia necrosis o apoptosis puede depender de la intensidad de la señal de muerte, del nivel de expresión de las moléculas de señalización, y/o del balance entre las señales necróticas y apoptóticas. Por lo tanto la capacidad de la mitocondria para recuperar los almacenes de energía después de un estímulo de muerte puede determinar si las neuronas mueren por apoptosis o por necrosis (Rami, 2003).

Los estudios ultraestructurales han provisto información de que el principal tipo de muerte que ocurre luego de isquemia global es de tipo necrótico. Por ejemplo, Colbourne y cols. (1999) demostraron que las neuronas que mueren tardíamente en la región CA1 del hipocampo presentan morfología necrótica y no apoptótica como es la característica para la muerte tardía. En contraste a las conclusiones de los estudios ultraestructurales, existe evidencia (genética y farmacológica) de que el principal tipo de muerte en la isquemia global, es de tipo apoptótico (MacManus y Linnik, 1997). Por otra parte, se ha descrito que la morfología de las células muertas después de un episodio de isquemia global no es la típica de apoptosis y que el aspecto de dichas células difiere de la necrosis o apoptosis clásicas (Ferrer y cols, 1994). Hasta la fecha todavía existe controversia del tipo de muerte (necrosis o apoptosis) que se origina por los mecanismos bioquímicos y moleculares de daño desencadenados por la isquemia global

.Alteraciones hemodinámicas y vasculares luego de un episodio de isquemia.

Al concluir el periodo de isquemia se presentan alteraciones vasculares que originan cambios en el flujo sanguíneo cerebral. La hiperemia es una fase breve de aumento del flujo sanguíneo que se presenta al eliminarse el bloqueo vascular. Esta es seguida por un largo periodo de hipoperfusión post-isquemia y un fenómeno de no-reflujo que pueden ocurrir aún cuando se hayan restaurado las condiciones adecuadas para la reperfusión y oxigenación cerebral (Fig. 5). La hipoperfusión resulta de una depresión metabólica cerebral que ocurre después de la isquemia y que se acompaña de falta de reactividad vascular para llevar al cabo los ajustes vasomotores compensatorios, así como de una obstrucción microvascular. El fenómeno de no-reflujo se refiere a la reperfusión incompleta del tejido cerebral al terminar el periodo de isquemia. Este fenómeno se debe a varios factores: aumento de la viscosidad de la sangre, compresión microcirculatoria por el edema perivascular de las células gliales, formación de microvellosidades endoteliales, incremento de la presión intracraneal, hipotensión arterial post-isquemia y coagulopatía vascular diseminada. El fenómeno de no-reflujo incrementa su duración al prolongarse el periodo de isquemia (Hossmann, 1990; Davies y Hagen, 1993).

El edema cerebral tiene importantes implicaciones clínicas cuyas consecuencias dependen de la magnitud y extensión del fenómeno. Las secuelas más importantes del edema

ocurren debido a la restringida capacidad de expansión que impone el cráneo, lo cual da márgenes limitados ante los cambios en el volumen intracraneal. A medida que la presión aumenta, hay compresión y rompimiento de los vasos, lo que genera una isquemia adicional y mayor muerte neuronal. En casos extremos el desplazamiento caudal del cerebro y con ello la compresión del tallo cerebral lleva a la muerte por paro cardiorrespiratorio (Rosenberg, 1999). Bajo otras condiciones que son acompañadas de edema, se ha reportado que un incremento por arriba del 5% del volumen cerebral ocasiona un alto grado de morbilidad y mortalidad (Tratchman, 1992).

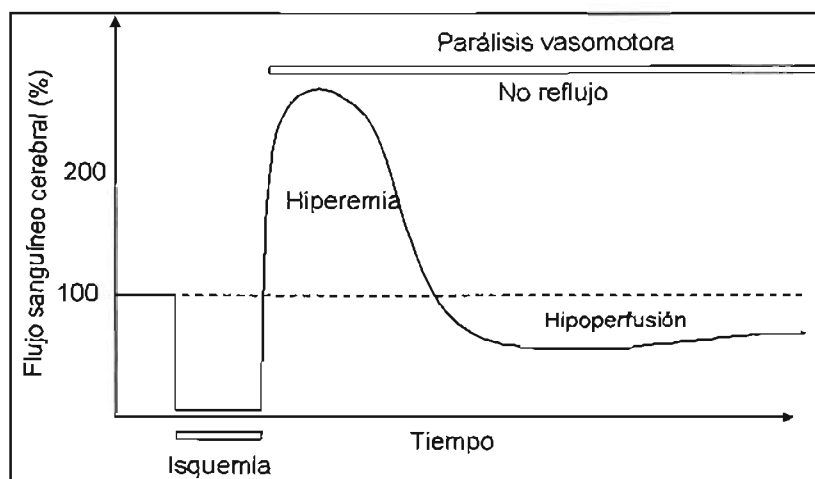


FIGURA 5. Fenómenos hemodinámicos asociados a un periodo de isquemia. Tomado de Iadecola (1999).

De manera inmediata al inicio de un episodio de isquemia, el individuo puede perder la conciencia. En los primeros segundos después de haberse iniciado el episodio de isquemia se observa la dilatación de la pupila, la pérdida del reflejo corneal y los registros electroencefalográficos llegan a ser isoeletrícos dentro de los primeros 40 segundos (Lipton, 1999). La pérdida de la conciencia se manifiesta directamente por la reducción de los valores de flujo sanguíneo por debajo del 10% de lo normal durante el episodio de isquemia. Sin embargo, no hay simultaneidad en la recuperación de la conciencia con la recuperación de la irrigación. Una vez que el episodio termina e inicia la recirculación sanguínea, se manifiestan los fenómenos antes mencionados que se deben a disturbios hemodinámicos del sistema: el fenómeno de hiperemia-hipoperfusión y el fenómeno de no-reflujo (Todd y cols, 1986; Lipton, 1999). Como consecuencia de estas alteraciones hemodinámicas, pero fundamentalmente por la

persistencia de las alteraciones celulares funcionales que impiden la recuperación de la excitabilidad neuronal en las diferentes estructuras cerebrales, se prolonga la pérdida de la conciencia por periodos que guardan relación con la severidad del episodio de isquemia.

ESTRUCTURAS CEREBRALES SELECTIVAMENTE VULNERABLES A LA ISQUEMIA

Con periodos de isquemia de diferente duración, queda de manifiesto la distinta vulnerabilidad de grupos celulares ubicados en estructuras cerebrales específicas. Algunas de ellas presentan daño neuronal irreversible con sólo 5 minutos de isquemia, en cambio se requieren periodos mucho más largos para producir daño neuronal irreversible en las estructuras menos vulnerables (Wieloch, 1985; Kogure y cols, 1988).

Entre las neuronas más vulnerables a la isquemia cerebral se encuentran las neuronas piramidales del Cuerno de Ammon del hipocampo (CA), en particular las regiones CA1 y CA4, las neuronas espinosas de tamaño mediano de la porción dorso lateral del cuerpo estriado, las neuronas de la *pars reticulata* de la sustancia nigra, las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral y las células de Purkinje del cerebelo (Wieloch, 1985; Roine, 1997), en tanto que las neuronas de los diferentes núcleos del hipotálamo y de la formación reticular mesencefálica son menos vulnerables a la isquemia. En el hipocampo de la rata se ha observado una mayor vulnerabilidad en el hipocampo dorsal que en el ventral y diferencias en el sentido anteroposterior (Pulsinelli, 1985). Por otra parte, las neuronas granulares del giro dentado así como las neuronas piramidales de la región CA3, son más resistentes que las de CA1 y CA4.

En el estudio de las estructuras selectivamente vulnerables a la isquemia se ha encontrado que además de la activación de mecanismos de daño, se activan mecanismos endógenos de protección neuronal. De manera general, se ha observado que los mecanismos protectores se activan principalmente en las células menos vulnerables a la isquemia y no son activados en las células más vulnerables (Lipton, 1999).

En particular, se ha propuesto que la vulnerabilidad selectiva de las diferentes estructuras cerebrales está relacionada con la abundante inervación excitadora que reciben las

neuronas, con la abundancia de metales de transición (Fe y Zn) y con la expresión diferencial de genes pro- o anti-apoptóticos así como con la producción o no, de factores de transcripción y receptores a factores neurotróficos que promueven la sobrevivencia neuronal.

En efecto, en estas regiones vulnerables se ha descrito la presencia de una mayor cantidad de receptores NMDA, AMPA/kainato y quisqualato con respecto a las zonas de menor vulnerabilidad (Wieloch, 1985; Wang y cols, 2002) y se ha observado que después de un episodio de isquemia global, la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) aumenta en la región CA1 del hipocampo; esta cinasa fosforila la subunidad 2A de los receptores NMDA ocasionando un incremento en la actividad del receptor (Wang y cols, 2003) y por lo tanto le confiere una mayor vulnerabilidad a dicha región.

En cuanto a la expresión de genes y presencia de proteínas, AP-1, producto de la expresión de los genes *c-jun* y *c-fos*, se encuentra de manera transitoria en CA1 antes de su degeneración, y en forma permanente cuando no degenera, así como en regiones resistentes a la isquemia (Kapinya y cols, 2000). Por su parte, el protooncogen *bcl-2* que se ha relacionado con la protección de la muerte por apoptosis se expresa en CA1 cuando sobrevive (Kitagawa y cols, 1998), en tanto que la expresión del gen proapoptótico *bax* se incrementa luego de isquemia global en las regiones vulnerables del hipocampo (Chen y cols, 1996), así como la caspasa 3 (Chen y cols, 1998). Otro ejemplo es la expresión génica de las llamadas proteínas de estrés, entre las que destaca la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70); el ARN mensajero de esta molécula permanece sin traducirse en las regiones que degeneran y se traduce a proteína en las regiones que sobreviven (Hata y cols, 1998).

La isquemia global transitoria de 2 a 10 minutos en la rata es seguida de una inducción del ARNm de BDNF en el giro dentado a las 2 horas, y de un aumento de la expresión de la proteína BDNF en ese sitio a las 6 horas y en la región CA3 del hipocampo una semana más tarde; mientras que la expresión de BDNF se reduce en la corteza cerebral y en la región CA1 del hipocampo (Kokaia y cols, 1996). Estos datos indican una reducción en la expresión de BDNF en las regiones que pueden sufrir muerte celular por isquemia y un aumento en la expresión de BDNF en las regiones que sobreviven a un accidente isquémico. Los mecanismos

que regulan este efecto protector probablemente se relacionan con la interacción de BDNF con su receptor específico tirosin cinasa B (TrkB); de hecho, se ha mostrado en gerbos que ante un episodio de isquemia global las neuronas que colocalizan BDNF y TrkB en la región CA1 del hipocampo son las que sobreviven. Esto sugiere un sistema autocrino BDNF/TrkB de supervivencia neuronal en este modelo (Ferrer y cols, 1997).

De esta manera, la posible supervivencia de las neuronas vulnerables a la isquemia depende entre otras cosas, de que se logren sintetizar allí las proteínas de los genes de respuesta inmediata, los factores de transcripción, los mecanismos antioxidantes, las proteínas antiapoptóticas y los factores neurotróficos que promueven la supervivencia neuronal.

Las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia son en general estructuras con una citoarquitectura compleja, como el hipocampo, la corteza cerebral y la cerebelosa. El daño al hipocampo, en particular, da como resultado alteraciones de funciones cognoscitivas que son integradas ahí, como el aprendizaje y la memoria espaciales y la memoria de trabajo. El daño neuronal y las alteraciones de estas funciones cognoscitivas representan algunos de los aspectos de mayor interés en la actualidad en los estudios relacionados con isquemia cerebral y neuroprotección.

ESTRUCTURA ANATÓMICA Y FUNCIÓN DEL HIPOCAMPO

La formación hipocámpica forma parte del arquipalio que corresponde a la corteza filogenéticamente más primitiva. La formación del hipocampo comprende el hipocampo propiamente dicho (cuerno de Ammon), el giro dentado y el subículo; sin embargo, el cuerno de Ammon y el giro dentado suelen denominarse como hipocampo (Teyler y Discenna, 1984; Kandel y cols, 2001). Las formaciones hipocámpicas de ambos hemisferios se relacionan por medio de fibras que pasan por la lámina terminal y forman parte de la comisura anterior; se establecen conexiones interhemisféricas masivas a través de esta comisura anterior y especialmente por el cuerpo caloso que constituye la comisura neopalial más importante (López Antúnez, 2000). La formación hipocámpica se encuentra situada en el piso y pared medial de la

prolongación temporal del ventrículo lateral. En los roedores, el hipocampo se distribuye dorso-ventralmente en un eje denominado septo-temporal. En ambos extremos, consiste en un “enrollamiento” de sí mismo en el que se distinguen 2 regiones: el cuerno de Ammon y el giro dentado. De acuerdo a características arquitectónicas y de conectividad, Lorente de Nó subdividió el cuerno de Ammon en 4 regiones: CA1, CA2, CA3 y CA4 (López-Antúnez, 2000) (Fig. 6). La estructura del hipocampo se dispone en capas o estratos de manera que, en las regiones CA1 a CA3 se encuentran filas de neuronas piramidales glutamatérgicas (estrato piramidal) cuyas dendritas basales se localizan en una zona llamada estrato oriens; a su vez, las dendritas apicales de estas neuronas se ramifican en el estrato radiado. Enseguida de esta capa se halla el estrato más profundo llamado lacunoso-molecular; en este estrato se encuentran ramificaciones terminales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Las neuronas piramidales de las regiones CA1 a CA3 difieren en cuanto a su morfología y a sus patrones de conectividad y distribución sináptica, de manera que las neuronas de CA2 tienen el soma más grande que las de CA1; a su vez, el soma de las neuronas de CA3 es más grande que las de CA1 y CA2. Estas neuronas de CA3, por su arborización dendrítica, se clasifican en neuronas de tallo corto y de tallo largo. En la zona dendrítica del estrato radiado más proximal al soma de estas neuronas se encuentran una variedad de espinas dendríticas llamadas excrescencias espinosas; estas excrescencias son más abundantes en las neuronas de tallo corto. En las 3 regiones descritas se han identificado interneuronas denominadas células “en canasta” entre el estrato piramidal y el estrato oriens; por otra parte, en la interfase del estrato oriens y el alveus se localiza otro grupo de interneuronas denominadas “oriens-alveus”; un tercer grupo de interneuronas llamadas “lacunoso-moleculares”, se localiza en el borde de los estratos radiado y lacunoso-molecular. Los tres grupos celulares muestran inmunoreactividad positiva a GABA (Teyler y Discenna, 1984).

El giro dentado o fascia dentada también presenta una estructura laminar; está formado por un estrato curvado de células granulares que utilizan glutamato como neurotransmisor y se dividen topográficamente en dos bordes: el borde suprapiramidal y el borde infrapiramidal; a la región intermedia que separa ambos bordes se le denomina cresta y a la región entre ambos

bordes se le denomina región hilar. Las dendritas de dichas células granulares se hallan en la siguiente capa que conforma el giro dentado, la capa molecular. En la región hilar se hallan neuronas piramidales polimórficas que se dispersan en el interior del giro dentado a partir del área terminal de CA3. Estas neuronas también ejercen neurotransmisión glutamatérgica (Kandel y cols, 2001). Debido a que son células que están contiguas a las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo, se les conoce como neuronas piramidales polimórficas de la región CA4 del mismo; no obstante, por estar dentro del giro dentado suele denominárseles como células del hilus dentado. En esta tesis se referirán como células de la región CA4 del hipocampo.

Conectividad sináptica del hipocampo

Los principales circuitos que conforman la red sináptica del hipocampo son los siguientes: la vía perforante, predominantemente glutamatérgica (aunque también se ha observado la presencia escasa de fibras GABAérgicas) y que constituye el medio de entrada de información al hipocampo procedente de la corteza entorrinal; la vía de las fibras musgosas, constituida por los axones de las células granulares del giro dentado que envían información glutamatérgica a las neuronas piramidales de CA3; la vía de las colaterales de Schaffer, proyecciones axónicas excitadoras (glutamatérgicas) de las neuronas piramidales de CA3 hacia las neuronas de CA1; conexiones comisurales; conexiones recurrentes entre las neuronas piramidales de CA1 y entre las neuronas piramidales de CA3 y finalmente; el circuito inhibitorio (GABAérgico).

Las conexiones al interior del hipocampo conforman un circuito cerrado de 3 sinapsis (circuito trisináptico). La primera está formada por las fibras que provienen de la corteza entorrinal, estas fibras constituyen la vía perforante y hacen sinapsis con las células granulares del giro dentado. Estas células, a su vez, proyectan sus axones (vía de las fibras musgosas) a la región CA3 y hacen sinapsis con neuronas piramidales y con interneuronas. Las neuronas piramidales de CA3 proyectan sus axones (vía de las colaterales de Schaffer) a las neuronas piramidales de la región CA1; finalmente, las células de CA1 proyectan nuevamente a la corteza

entorrinal y cierran el circuito trisináptico (Fig 6). Las 3 sinapsis que conforman este circuito utilizan glutamato como neurotransmisor (Kandel y cols, 2001).

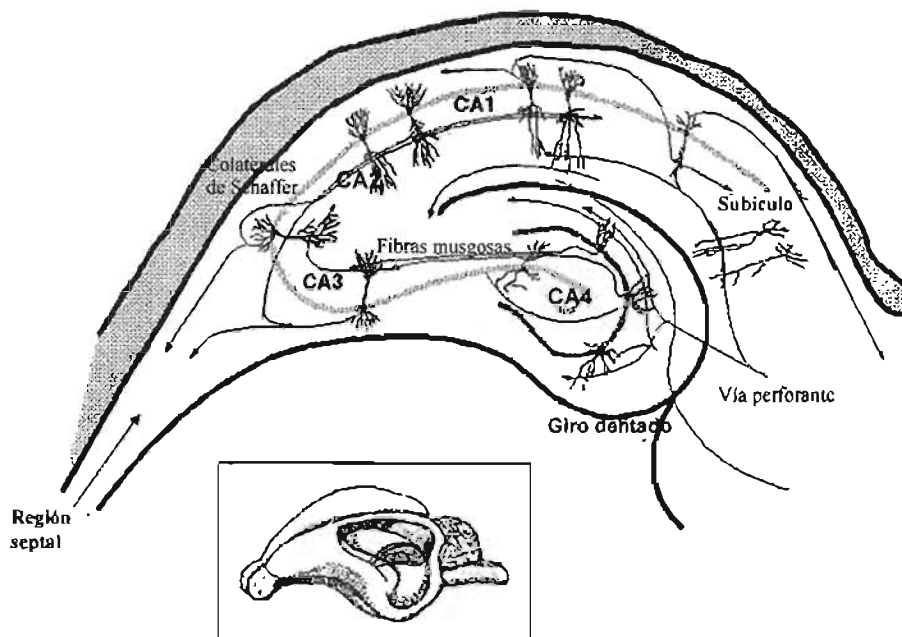


FIGURA 6. Estructura anatómica y circuito trisináptico del hipocampo de la rata.

El hipocampo recibe información procedente de varias regiones cerebrales. Recibe fibras colinérgicas de la región septal, aferencias noradrenérgicas del locus coeruleus, información serotoninérgica del núcleo del raqué medial y una vía histaminérgica proveniente de la región supramamilar (Teyler y Discenna, 1984; Kandel y cols, 2001).

ALTERACIONES FUNCIONALES ASOCIADAS AL DAÑO DEL HIPOCAMPO, DEBIDAS A UN EPISODIO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL

Pérdida Neuronal en el hipocampo y alteraciones del aprendizaje y de la memoria.

El hipocampo ha sido implicado en el aprendizaje y la memoria de muchos mamíferos. Entre los primeros datos al respecto se encuentran las observaciones clínicas en pacientes que sufren una amnesia anterógrada severa luego del daño traumático o de la resección quirúrgica del lóbulo temporal (como revisión, ver Kandel, 2001). No es obvio que su función sea exactamente la misma en todas las especies, pero las similitudes que existen hacen posible que los estudios en roedores y primates por ejemplo, aporten información para comprender la

naturaleza de la memoria humana. En diversos estudios en ratas se ha observado que las lesiones en el hipocampo o en la región parahipocámpica, provocan deficiencias en tareas que incluyen un componente espacial considerable, como el aprendizaje de laberintos. Morris y cols. (1982), demostraron que la lesión al hipocampo ocasiona alteraciones del aprendizaje y de la memoria espaciales en ratas, que se manifiestan como un aumento en el tiempo requerido para encontrar la plataforma oculta en el laberinto acuático diseñado por los mismos autores (laberinto acuático de Morris) en comparación con ratas no lesionadas, y una incapacidad para recordar en la prueba de transferencia realizada luego de varios días de aprendizaje, el sitio en el que se encontraba esta plataforma, cuando ésta se remueve del laberinto. Este aumento en la latencia de escape está dado por un aumento en la distancia recorrida para llegar a la plataforma, guiándose de claves visuales. En el laberinto radial de 8 brazos diseñado por Olton y Samuelson (1976), se demostró que estas lesiones también provocaban alteraciones de la memoria de trabajo (consistentes en no recordar qué brazos del laberinto ya habían sido visitados) y de la memoria de referencia (no recordar qué sitios debe visitar en el laberinto, para recibir alimento como recompensa).

El daño neuronal al hipocampo, ocasionado por un periodo de isquemia global en ratas, también se asocia con alteraciones del aprendizaje y de la memoria tanto en el laberinto acuático de Morris como en el laberinto radial de Olton (Block, 1999). Alteraciones funcionales similares han sido reportadas en primates, incluyendo al humano, luego de un episodio de isquemia global con daño al hipocampo (Zola-Morgan y cols, 1986).

En las ratas, un periodo de isquemia global ocasiona alteraciones de la memoria de trabajo y de la memoria de referencia en el laberinto radial de Olton (Davis y cols, 1986; Kiyota y cols, 1991; Hartman y cols, 2005). Sin embargo, después de más de 65 ensayos (uno por día) ya no hay diferencias en el caso de la memoria de referencia, entre el grupo sham y el sometido a isquemia, en tanto que la memoria de trabajo permanece alterada (Volpe y cols, 1984; Davis y cols, 1986; Kiyota y cols, 1991). Por otra parte, cuando los animales son sometidos a una serie de ensayos antes del periodo de isquemia, se reducen las alteraciones tanto de la memoria de trabajo como de la memoria de referencia en las evaluaciones post-isquemia (Volpe y cols,

1989; Gionet y cols, 1991), lo que indica que una vez consolidado el aprendizaje durante el preentrenamiento, los animales presentan una ejecución adecuada pese al daño del hipocampo por la isquemia. Hay evidencias de que la información adquirida durante el preentrenamiento se consolida en la corteza cerebral como memoria a largo plazo (Redish y Tourestzky, 1998).

En general, los animales sometidos a isquemia global tienen latencias de escape más largas que los animales sham en el laberinto de Morris (Nunn y cols, 1994; Olsen y cols, 1994; Hartman y cols, 2005) y presentan dificultades para recordar, en la prueba de transferencia, el sitio que ocupaba la plataforma (Nelson y cols, 1997; Block y Schwarz, 1998). Sin embargo, en otros estudios no se observan alteraciones del aprendizaje espacial después de la isquemia (Kiyota y cols, 1991; Block, 1999). La magnitud de las alteraciones del aprendizaje y de la memoria se ha correlacionado con la despoblación de la región CA1 del hipocampo que ocurre como resultado de la isquemia. Algunos autores han demostrado esta correlación (Auer y cols, 1989; Volpe y cols, 1992); otros han encontrado una correlación inconsistente (Olsen y cols, 1994; Hodges y cols, 1997) y algunos más, no han encontrado correlación alguna (Gionet y cols, 1991). Algunas de las razones por las que existen discrepancias entre los diferentes estudios son por un lado, la diferente duración del periodo de isquemia global y por otro lado, el tiempo post-isquemia en el cual los diferentes grupos realizan las evaluaciones histológicas y funcionales.

De hecho, entre los diferentes autores la pérdida neuronal que describen en la región CA1 del hipocampo varía desde el 10% hasta el 100%; estas variaciones se deben al empleo de diferentes modelos de isquemia global y diferente duración de la isquemia (Block, 1999). En el caso del modelo de isquemia global en ratas por “oclusión de los cuatro vasos” (4-VO), el incremento en la duración del periodo de isquemia ocasiona una mayor despoblación de CA1 en el hipocampo dorsal y la despoblación alcanza niveles máximos cuando el periodo de oclusión es mayor a 15 minutos (Hodges y cols, 1997). Nunn y cols. (1994), demostraron una relación lineal de la despoblación de CA1 del hipocampo dorsal desde el 10% hasta el 100% conforme se incrementaba la duración del periodo de isquemia (5, 10, 15 y 30 min) y analizándolo en una curva cuadrática, notaron que la magnitud de la pérdida neuronal en CA1 alcanzaba niveles

asintóticos a los 15 minutos. Además de la región CA1 del hipocampo, las neuronas polimórficas de CA4 (o hilus dentado) son también vulnerables a periodos de 15 minutos o más de isquemia (Schmidt- Kastner y Freund, 1991; Matsuyama y cols, 1993), condición bajo la que puede ocurrir despoblación en otras regiones del hipocampo como CA2 y CA3 y el daño se puede extender a la corteza cerebral y al estriado dorsolateral (Pulsinelli y Brierley, 1979; Schmidt- Kastner y Freund, 1991). Cuando existe una despoblación severa de la región CA1 del hipocampo superior al 70% y el daño se extiende a otras regiones del mismo, los déficits de aprendizaje y memoria se evidencian claramente tanto en el laberinto acuático de Morris como en el laberinto radial de Olton (Hodges y cols, 1997; Block, 1999). En una variante del laberinto radial (laberinto acuático radial), los errores de memoria de trabajo correlacionan con la pérdida neuronal de la región CA1, pero la asociación es más real en los animales que, además de la despoblación severa de CA1, tienen daño considerable en la región CA3 (Hodges y cols, 1997; Nelson y cols, 1997).

Es importante considerar que si los periodos de isquemia mayores a 15 minutos son los que se relacionan más claramente con una despoblación severa del hipocampo y con las subsecuentes alteraciones del aprendizaje y de la memoria, es conveniente entonces, evaluar a un posible neuroprotector bajo estas condiciones de severidad, en animales sometidos a un episodio de isquemia mayor a 15 minutos.

En cuanto al tiempo de inicio de las pruebas funcionales, existe una alta probabilidad de que se manifiesten alteraciones funcionales en el laberinto de Morris, aún sin pérdida neuronal en CA1, cuando las pruebas se inician una semana después de la isquemia. En este sentido, Jasper y cols. (1990), demostraron que si bien, luego de un episodio de isquemia por 4-VO ocurría despoblación en CA1 y alteraciones en el aprendizaje en el laberinto de Morris, después de un periodo de oclusión de las carótidas (2-VO), a pesar de no haber encontrado pérdida neuronal en ninguna región del hipocampo, también se manifestaban alteraciones del aprendizaje. Por otra parte, cuando las evaluaciones son realizadas después de varias semanas, puede no haber alteraciones del aprendizaje espacial, probablemente debido a la recuperación funcional a través de mecanismos de reparación plástica (Gionet y cols, 1991). Por ejemplo, en

gerbos sometidos a 24 horas de hipotermia post-isquemia se preserva alrededor del 90% de las neuronas piramidales de CA1, 30 días después de la isquemia (Colbourne y Corbett, 1994); sin embargo, las evaluaciones funcionales en campo abierto mostraron alteraciones significativas que no coincidían con la preservación tan exitosa de CA1. En un experimento similar, los autores encontraron que a 6 meses post-isquemia la preservación de las neuronas de CA1 se había reducido al 70% con respecto al 90% observado a los 30 días. Sin embargo, a los 6 meses, el 70% de neuronas preservadas correlacionaba mejor con las alteraciones funcionales persistentes (Colbourne y Corbett, 1995).

Estos estudios constituyen un claro ejemplo de la desventaja de realizar estudios a corto plazo, sobre todo cuando se evalúan agentes neuroprotectores potenciales. Se ha sugerido que las neuronas preservadas por algunos fármacos a los 7 días post-isquemia pudieron haber muerto 3 semanas después (Corbett y Nurse, 1998). De hecho, existen varios estudios en los que el tratamiento con fármacos y otro tipo de estrategias, parecen solamente posponer la muerte de las neuronas (Valtysson y cols, 1994; Corbett y Nurse, 1998). Se tiene evidencia entonces de que la preservación neuronal que se observa en cortes histológicos, no necesariamente corresponde a una preservación funcional (Corbett y Nurse, 1998).

Una de las razones por las que el número de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo, no siempre coincide con el estado funcional evaluado en pruebas de aprendizaje y memoria, es que existen alteraciones neuroquímicas y electrofisiológicas que no son reveladas en las evaluaciones histológicas.

Se ha demostrado, por ejemplo, que 24 horas después de la isquemia global las neuronas se observan normales, tienen su potencial de membrana normal, sin embargo, no generan potenciales de acción asociados a fenómenos de potenciación a largo plazo (LTP) (Hori y Carpenter 1994; Tsubokawa y cols, 1994). También se ha descrito un nuevo potencial despolarizante en las neuronas piramidales de CA1 después de la isquemia y se cree que puede ser excitador (Gao y Xu, 1996). De hecho, se ha descrito que las corrientes del receptor NMDA son incrementadas con estímulos de baja frecuencia luego de un periodo de isquemia debido al desbloqueo del receptor por el ión Mg^{2+} (Hori y Carpenter, 1994), fenómeno que contribuye a

la excitotoxicidad secundaria. En estudios realizados con daño traumático (Miyazaky y cols, 1992) y en un modelo de 6 meses de hipoperfusión (Sekhon y cols, 1994), se encontró que no se podía inducir LTP en las neuronas de CA1 a pesar de tener una morfología sana. Se ha observado que la pérdida de LTP coincide con alteraciones en las proyecciones dendríticas en las neuronas de CA1 por varios días, aún cuando el soma neuronal desde el punto de vista histológico este morfológicamente íntegro (Hori y Carpenter 1994; Corbett y Nurse, 1998). La proteína 2 asociada a microtubúlos (MAP-2), encontrada principalmente en las dendritas neuronales, disminuye en las primeras horas luego de un periodo de isquemia global (Matesic y Lin, 1994). En un estudio en el que se sometió a los animales a hipoperfusión crónica (8 semanas), se encontró una disminución de MAP-2 y alteraciones de la memoria, no obstante de que no se encontraran evidencias de pérdida neuronal ni en CA1 ni en otras regiones del hipocampo (Kudo y cols, 1990).

Se considera entonces que en las evaluaciones realizadas a un tiempo menor a los 30 días, la posibilidad de que persistan estas alteraciones electrofisiológicas y neuroquímicas en las neuronas que fueron “preservadas”, es más alta y tiene como consecuencia que no se pueda revelar el grado real de la posible neuroprotección (Corbett y Nurse, 1998). En estudios a largo plazo se pueden revelar las alteraciones finales y/o la recuperación plástica de los circuitos nerviosos, por la isquemia y/o por efecto del posible agente neuroprotector, tanto en las evaluaciones histológicas como en las pruebas de aprendizaje y memoria.

AGENTES NEUROPROTECTORES PARA CONTRARRESTAR LOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA ISQUEMIA

En el caso de la isquemia cerebral, el término neuroprotección se ha aplicado a la disminución de las alteraciones anatomopatológicas y/o funcionales del sistema nervioso, que se presentan como resultado de la isquemia, por la aplicación oportuna de algún procedimiento farmacológico o no-farmacológico que contrarreste uno o varios mecanismos de daño. En el curso temporal de los mecanismos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia global que originan daño neuronal, existe una “ventana de oportunidad terapéutica” en la que se pueden

contrarrestar dichos mecanismos de daño, de manera que se pueda impedir la muerte neuronal de las estructuras selectivamente vulnerables a la isquemia. El periodo que comprende la “ventana de oportunidad terapéutica”, luego de un episodio de isquemia focal o global, es de unos cuantos minutos o de pocas horas, respectivamente (Finklestein, 1999). A pesar de ser breve este periodo, su existencia es de particular importancia en los estudios de neuroprotección.

Durante muchos años, los estudios han tenido como objetivo dilucidar los mecanismos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia causantes del daño irreversible. El conocimiento de dichos mecanismos dio origen a uno de los conceptos ampliamente utilizados en los estudios de neuroprotección. Este enfoque se basa en una relación de oposición entre uno o varios de los mecanismos de daño neuronal y los mecanismos de acción del posible fármaco neuroprotector o de los procedimientos neuroprotectores no farmacológicos.

De este modo, la aplicación previa o inmediata (dentro de los primeros 60 minutos a partir del episodio de isquemia) de fármacos o de maniobras no farmacológicas que disminuyan o contrarresten uno o varios de los mecanismos fisiopatológicos dependientes de la isquemia puede reducir el daño neuronal. Con este objetivo se han utilizado agentes anestésicos generales que reducen la tasa metabólica y el consumo de oxígeno, bloqueadores de los canales de calcio, anticonvulsivos, fármacos que reducen la liberación de neurotransmisores excitadores, antagonistas de los receptores de glutamato, agonistas del receptor GABA_A, incluyendo esteroides sintéticos y naturales, antagonistas de receptores de opioides, agentes antioxidantes y fármacos antiapoptóticos (Hallmayer y cols, 1985; Shapiro, 1985; Cervantes y cols, 1989; Cervantes y cols, 1995; Johansen y Diemer, 1991; Kenneth, 1994; Shuaib y cols, 1995; Cottrell, 1995; Jiang y cols, 1996; González-Vidal y cols, 1998; Letechipfa-Vallejo y cols, 2001; Cervantes y cols, 2002). Entre las estrategias de neuroprotección no farmacológica, una de las más conocidas es la hipotermia. Así, se ha demostrado que la hipotermia reduce el daño provocado por la isquemia (Busto y cols, 1987; Clifton y cols, 1989; Moller y cols, 1989; Minamisawa y cols, 1990) al reducir la liberación de aminoácidos excitadores, y puede ser substancialmente más efectiva y más consistente que algunos agentes farmacológicos (Clifton y

cols, 1989). Por lo tanto, para que los modelos de isquemia en gerbos y en ratas puedan ser empleados en la evaluación de fármacos, la temperatura cerebral y corporal necesita ser registrada y mantenida cuidadosamente dentro de valores normales, especialmente durante el periodo de isquemia (Busto y cols, 1987; Busto y cols, 1989).

En años más recientes, además del conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que originan daño neuronal, se ha puesto en evidencia que la isquemia global, la isquemia focal y el daño traumático promueven mecanismos de protección endógena que se oponen a los mecanismos de daño (Leker y Shohami, 2002) y mecanismos de reparación plástica de los circuitos alterados. Se ha demostrado por ejemplo, un incremento de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en las neuronas piramidales de la región CA1 que sobreviven a la isquemia (Kitagawa y cols, 1998), un incremento de la proteína de choque térmico, HSP70 (Kawagoe y cols, 1992) y un incremento en la producción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF). Desafortunadamente, en episodios de isquemia muy severos, los mecanismos endógenos de protección neuronal no pueden contrarrestar a los mecanismos fisiopatológicos que promueven la muerte de las células nerviosas. Sin embargo, la identificación de estos mecanismos, ha permitido desarrollar nuevas estrategias de neuroprotección que se basan en la potenciación de dichos mecanismos endógenos que ocurren en respuesta a la isquemia. Además, se han identificado compuestos originalmente endógenos con efectos neuroprotectores; tal es el caso de algunas hormonas como los estrógenos, la progesterona y la melatonina (Gonzalez-Vidal y cols, 1998; Letechipía y cols, 2001; Cervantes y cols, 2002; Leker y Shohami, 2002). Una ventaja de este tipo de estrategia terapéutica es la reducción de efectos secundarios no deseados, así como la diversidad de acciones celulares/moleculares de estas hormonas, que puede modular diferentes fenómenos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia.

Recomendaciones para la evaluación de los posibles agentes neuroprotectores

Debido a que no existe ningún neuroprotector que haya sido suficientemente exitoso en humanos pese a sus resultados en estudios preclínicos eran muy prometedores, se han propuesto algunas recomendaciones en el diseño de los estudios de neuroprotección que permitan superar

esta discrepancia (Finklestein y cols, 1999). Por ejemplo, se ha propuesto que el agente neuroprotector a estudiar tenga la capacidad de contrarrestar a varios de los mecanismos desencadenados por la isquemia o que se utilice una combinación de varios compuestos activos para los diferentes mecanismos de daño; que el tratamiento sea administrado posteriormente al episodio de isquemia y dentro de la “ventana de oportunidad terapéutica”; que los estudios incluyan evaluaciones funcionales además de las evaluaciones morfológicas, debido a que la preservación neuronal no necesariamente garantiza la integridad funcional de la estructura lesionada; y que la evaluación del tratamiento neuroprotector se realice a largo plazo, de modo de descartar la posibilidad de que el neuroprotector sólo este retrasando el daño final (Finklestein y cols, 1999; Leker y Shohami, 2002). Además, se considera que la reorganización del SNC a partir del episodio de isquemia y del daño neuronal producido por éste, tarda en adoptar su forma definitiva períodos superiores a los 30 días y que las alteraciones del SNC que persisten a largo plazo corresponden al daño que no pudo ser compensado mediante fenómenos plásticos. En este sentido, el efecto neuroprotector de un fármaco debería manifestarse como una reducción de las alteraciones morfo-funcionales provocadas por la isquemia, que no pudieron ser revertidas por la sola reorganización del sistema nervioso (Corbett y Nurse, 1998).

UTILIZACIÓN DE MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL PARA LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE NEUROPROTECCIÓN.

Modelos de isquemia cerebral global en diferentes especies

Se han desarrollado una diversidad de modelos experimentales de isquemia cerebral global aguda en la búsqueda de aquél que reproduzca de manera más adecuada las condiciones que se presentan espontáneamente cuando un individuo sufre una isquemia global por paro cardíaco, por arritmias o por una hipotensión severa, de modo que permita estudiar la fisiopatología de esta condición y las alternativas de reducir el daño. Por otra parte, se busca que el modelo sea altamente reproducible, accesible metodológicamente, económico y que permita realizar diversas evaluaciones funcionales y morfológicas del daño como para permitir una

evaluación precisa de su magnitud así como de la posible acción neuroprotectora de un procedimiento terapéutico o de un fármaco.

Se han desarrollado modelos de isquemia cerebral global en algunas especies de primates, mediante la aplicación de torniquetes pediátricos colocados alrededor del cuello en los que se aplica una presión de 1,500 torr (1,500 mm Hg) para provocar isquemia por compresión de las principales arterias que llevan flujo sanguíneo al cerebro (Bleyaert y cols, 1978; Gisvold y cols, 1984). Este tipo de modelo experimental ha sido poco utilizado por motivos éticos y económicos.

Se han utilizado modelos de paro cardíaco por compresión de los principales vasos de acceso al corazón en ratas (Ito y cols, 1975), así como paro cardiorrespiratorio por fibrilación ventricular en gatos (Todd, 1982; Cervantes y cols, 1989). Sin embargo, estos procedimientos requieren una instrumentación precisa durante la realización de los experimentos, consistente en la aplicación de ventilación mecánica controlada y en el registro continuo de la presión arterial y del EEG para la validación del paro cardíaco y de su recuperación, así como el registro periódico de los gases (O_2 y CO_2) en sangre para la corrección oportuna de la acidosis luego de los procedimientos de reanimación. Esta instrumentación no es siempre accesible y además requiere de la participación de más de tres personas en el momento del experimento. Por otra parte, los estudios en gatos y en perros, además de que son más costosos que los estudios en roedores y de avance más lento por la imposibilidad de trabajar simultáneamente con grupos de varios animales, se han visto limitados recientemente por las normas éticas de utilización de animales de laboratorio.

Entre los modelos de isquemia global en roedores, el de uso más común en las pasadas décadas ha sido el de la ligadura de las arterias carótidas en el gerbo por uno o varios periodos de 3 a 5 minutos (Kirino, 1982; Kirino y cols, 1985; Shuaib y cols, 1992). La exposición de los gerbos a episodios repetidos de isquemia a intervalos de una hora incrementa el daño neuronal en comparación con el provocado por un episodio único (Kato y cols, 1989; Tomida y cols, 1987). Este roedor, en un porcentaje importante de los individuos, no presenta comunicación arterial entre ambos hemisferios cerebrales al carecer del polígono de Willis por ausencia de las

arterias comunicantes posteriores. De este modo, se le utilizó inicialmente con la intención de provocar isquemia global en un hemisferio dejando al otro hemisferio como testigo. Sin embargo, dado que esta falta de circulación interhemisférica sólo se presenta en un 60 a 70% de los individuos, se dejó de utilizar este modelo para provocar isquemia hemisférica. Por otra parte, dada la limitada posibilidad de realizar pruebas funcionales y conductuales en esta especie en comparación con la rata y dada la frecuencia con la que se presentan crisis convulsivas, que inducen a su vez un daño neuronal adicional al provocado por la isquemia, el empleo del gerbo como modelo de isquemia cerebral global se ha visto reducido en los años recientes (Hunter y cols, 1998).

Modelo de isquemia global en ratas por oclusión de los cuatro vasos (4-VO)

El modelo de isquemia cerebral global en roedores que parece ofrecer las mayores ventajas en cuanto a su manejo, a la accesibilidad del procedimiento quirúrgico y a la posibilidad de experimentar simultáneamente con varios animales, además de ofrecer la posibilidad de realizar una serie de evaluaciones funcionales en los individuos, es el llamado “modelo de oclusión de los cuatro vasos” (4-VO) en ratas. Éste tiene adicionalmente la ventaja de que, cuando se provoca el episodio de isquemia en el animal sin anestesia, permite verificar de manera no invasiva, a través de la pérdida de la conciencia, la severidad de la isquemia (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y cols, 1982; Capdeville, 1984).

Sin embargo, este modelo, en los diferentes laboratorios que describen su empleo para estudios de neuroprotección, ha sido modificado (Kameyama y cols, 1985; Pulsinelli y Buchan, 1988; Nakano y cols, 1989; Schmidt-Kastner y cols, 1997; Herguido y cols, 1999) para permitir su realización dentro de las condiciones más adecuadas que den como resultado efectos consistentes y reproducibles y para reducir la mortalidad de los sujetos.

Por ejemplo, el grupo de Pulsinelli, luego de describir resultados exitosos con su modelo original (Pulsinelli y Brierley, 1979), propuso una modificación consistente en la compresión de la musculatura paravertebral y cervical durante el periodo de oclusión de las carótidas (Pulsinelli y Buchan, 1988) con la finalidad de limitar el flujo sanguíneo al cerebro a

través de circulación colateral localizada entre esos músculos y lograr una isquemia más severa. Algunos autores sugieren el empleo de anestesia durante el episodio de isquemia para reducir la incidencia subsecuente de crisis convulsivas generalizadas (Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Schmidt-Kastner y cols, 1997) y para contrarrestar el aumento de la presión arterial que ocurre ante la oclusión de las carótidas y que permite un aporte suficiente de flujo sanguíneo al cerebro a través de la circulación colateral, impidiendo el daño neuronal. Otros grupos de investigación utilizan un modelo de oclusión de dos vasos (carótidas) o de cuatro (vertebrales y carótidas) en condiciones de hipotensión por el retiramiento de un volumen de sangre durante el periodo de oclusión de las carótidas y su restitución posterior (Beck y cols, 1993; Mcbean y Kelly, 1998). Otros autores exponen los animales a episodios cortos, no letales de isquemia repetida por tres o más veces a intervalos de una hora (Nakano y cols, 1989), en un modelo similar al que se utiliza en gerbos (Kato y cols, 1989).

Estos modelos, además de proporcionar información precisa acerca de la fisiopatología de la isquemia, permiten definir condiciones controladas del episodio de isquemia cerebral que provoquen un daño predecible que se pueda utilizar como punto de comparación para la evaluación de agentes neuroprotectores.

4. ANTECEDENTES

Durante muchos años se consideró que las acciones de las hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos) en el cerebro se circunscribían principalmente a las regiones involucradas en la regulación neuroendócrina de la reproducción y en el control del comportamiento reproductivo. Ahora se sabe que durante el desarrollo estas hormonas, esteroides derivados del colesterol, actúan sobre las neuronas y las células gliales, y regulan la supervivencia, diferenciación y conectividad de grupos neuronales específicos, tanto en el cerebro como en la médula espinal. También en la etapa adulta las hormonas sexuales influyen sobre la morfología y la función neuronal, promoviendo el crecimiento de sus proyecciones, la

sinaptogénesis, regulan la transmisión sináptica, la síntesis de neurotransmisores y la expresión de receptores para neurotransmisores. Además, cada vez resulta más claro que en el cerebro existen enzimas esteroidogénicas funcionales que permiten la síntesis *de novo* de estas moléculas a partir de colesterol (neuroesteroides) y la biotransformación de esteroides periféricos que llegan al SN por el torrente sanguíneo (Jung-Testas y cols, 1989; Rupprecht, 2003).

En particular, la progesterona puede ser sintetizada en varias estructuras cerebrales incluyendo al hipocampo. Además de los oligodendrocitos y los astrocitos, las neuronas presentan capacidad esteroidogénica (Fig. 7); de hecho, la síntesis de progesterona puede ocurrir en los tres tipos de células debido a que el citocromo P450scc, responsable de la formación de pregnenolona a partir de colesterol y la 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), responsable de la producción de progesterona y androstenediona, se expresan en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Schumacher y cols, 2000; Mellon y cols, 2001).

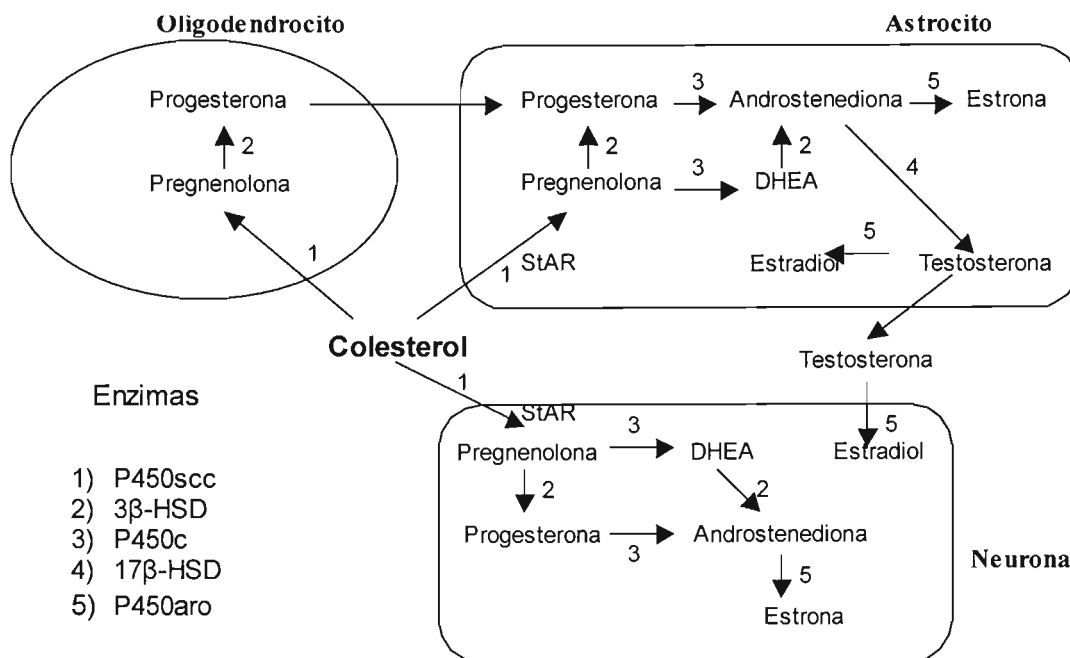


FIGURA 7. Síntesis de esteroides (incluyendo la progesterona) en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas en el cerebro de rata. Tomado de Veiga y cols. (2004).

La progesterona sintetizada en el cerebro (incluyendo el hipocampo) o que llega a él vía torrente sanguíneo, es biotransformada a sus metabolitos reducidos 5α - y 5β -dihidroprogesterona (DHP o pregnandiona) por la acción de la 5α - o de la 5β -reductasa respectivamente, y a los cuatro tetrahydroderivados correspondientes: $3\alpha,5\alpha$ -, $3\beta,5\alpha$ -, $3\alpha,5\beta$ - y $3\beta,5\beta$ -tetrahydroprogesterona (THP o pregnanolonas) por la 3α - o la 3β -hidroxiesteroide oxidoreductasa respectivamente.

Aunque algunos metabolitos de la progesterona reducidos en la posición 5β pueden también ejercer acciones sobre la actividad neuronal (Kubli y cols, 1976), en esta tesis se presentará solamente la información corresponsiente a las acciones de la $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroprogesterona (THP o alopregnanolona) por ser el principal producto de la biotransformación de la progesterona (Fig. 8) y con mayores efectos en el SNC (Schumacher y cols, 2000).

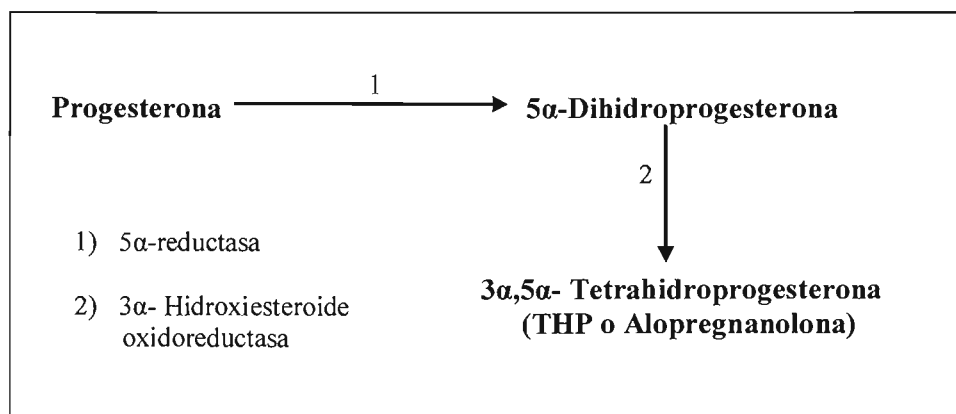


FIGURA 8. Biotransformación de la progesterona a alopregnanolona (THP).

El mecanismo clásico de acción de los esteroides en el SNC es a través de la interacción con sus receptores intracelulares puesto que, por su estructura lipofílica, pueden atravesar la membrana celular. En el caso de la progesterona se conocen dos isoformas, PR-A y PR-B (Camacho-Arroyo y cols, 1998). Estos receptores son factores nucleares de transcripción, se unen al ADN y regulan la transcripción de genes específicos. En el caso de la alopregnanolona, también se ha demostrado que puede afectar la expresión genética a través de la interacción con

los receptores intracelulares de la progesterona. De esta manera, tanto la progesterona como la alopregnanolona, pueden aumentar o disminuir la síntesis de determinadas proteínas (mecanismo genómico) (Rupprecht, 2003). Se ha descrito la presencia de un sitio de unión en la membrana celular de células nerviosas para la progesterona y para otros esteroides como la testosterona, la dehidroepiandrosterona (DHEA) y los estrógenos (Ramírez y Zheng, 1996; Rupprecht, 2003). A los efectos que desencadenan a través de estos receptores membranales se les llama “no transcripcionales o no genómicos”, ya que la unión del esteroide con su receptor no provoca una modificación directa en la expresión génica, sino que provoca una respuesta celular más rápida y parece involucrar la intervención de otros receptores de membrana y/o vías de señalización intracelular. Otro mecanismo de la progesterona y de la alopregnanolona muy importante en el SNC es la modulación alostérica de receptores ionotrópicos y de transportadores de neurotransmisores. La modulación alostérica, al igual que la interacción del esteroide con su receptores de membrana específico, genera inicialmente respuestas independientes de la síntesis de ARN o de proteínas, por lo que sus efectos entrarían también en la categoría de “no genómicos. Uno de los primeros efectos rápidos observados de los esteroides en el SN fue la regulación de corrientes iónicas a través de la membrana celular. Este fenómeno ocurre por la interacción de los esteroides con receptores para neurotransmisores. Por ejemplo, la THP (metabolito de la progesterona) es un modulador positivo de los receptores GABAA, ya que aumenta el flujo de Cl⁻ al producir un incremento en la frecuencia y/o duración de apertura de dicho canal iónico (Majewska y cols, 1986). También se ha descrito la modulación por la progesterona de otros receptores para neurotransmisores ionotrópicos, como son los de serotonina 5-Hidroxitriptamina-3 5-HT₃, NMDA, AMPA, kaínato, glicina y los nicotínicos de acetilcolina (Rupprecht, 2003) así como al receptor sigma 1 (σ 1) (Bergeron y cols, 1996). La modulación alostérica de los receptores para neurotransmisores genera respuestas que van desde milisegundos a segundos, por lo que éste constituye un mecanismo de acción muy rápido de los esteroides. No obstante, también puede existir regulación génica a través de la modulación de canales iónicos operados por ligando o a través de receptores acoplados a proteínas G, debido a que la interacción de los esteroides como la progesterona y la alopregnanolona puede alterar la

actividad intracelular de cinasas que consecuentemente afectan la expresión de genes a través de segundos mensajeros como el AMPc (Rupprecht, 2003).

Los esteroides también pueden ejercer sus efectos en las células nerviosas sin interaccionar con receptores. Por ejemplo, algunos esteroides poseen efectos antioxidantes que son independientes de receptores. La presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo A o de un anillo bencénico con un átomo de hidrógeno libre permite neutralizar a moléculas con electrones desapareados, como es el caso de los radicales libres. El metabolito de la progesterona, la alopregnanolona, presentan un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A y es, por lo tanto, un antioxidante potencial (Veiga y cols, 2004).

En resumen, existen varios mecanismos a través de los cuales la progesterona y la alopregnanona pueden modificar la función nerviosa y sus efectos pueden, en algunos casos, implicar a varias vías simultáneamente.

La existencia de diferencias de género en la recuperación ante el daño cerebral debido a traumatismo o accidentes cerebrovasculares dio lugar a suponer que los niveles de las hormonas sexuales femeninas participaban en estos efectos. Estas diferencias se atribuyeron en un principio a diferencias sexuales en la conectividad y tamaño de los centros nerviosos. Sin embargo, la presencia de determinados esteroides como el estradiol o la progesterona, tenían un papel fundamental en el sitio y en el momento del daño cerebral (Stein, 2001). Este fenómeno se ha descrito en ratas hembra, donde la vulnerabilidad de las neuronas del hilus del hipocampo a estímulos neurodegenerativos varía en función de la fase del ciclo estral (Azcoitia y cols, 1999). Por otra parte, algunos estudios clínicos han confirmado que las variaciones en los niveles plasmáticos de hormonas sexuales influyen en el riesgo a padecer un infarto cerebral; de esta manera, las mujeres premenopáusicas presentan una menor incidencia de infarto cerebral que los hombres de la misma edad. Esta protección se pierde cuando las mujeres entran en la menopausia y el riesgo de padecer un infarto cerebral se iguala al de los hombres (McCullough y Hurn, 2003). Existe una amplia evidencia experimental de que la administración terapéutica de estas hormonas sexuales de naturaleza endógena, tiene efectos neuroprotectores. Se tiene

evidencias también de que a diferencia de estrógenos, la progesterona tiene el potencial de ser eficaz tanto en mujeres como en hombres (Stein, 2001)

Neuroprotección mediada por la hormona progesterona o alopregnanolona

Se ha demostrado en varios estudios que la progesterona ejerce efectos neuroprotectores en los animales (machos o hembras) sometidos a isquemia focal, reduciendo la magnitud del volumen del infarto cerebral y las deficiencias neurológicas de los sujetos (Jiang y cols, 1996; Chen y cols, 1999; Alkayed y cols, 2000; Kumon y cols, 2000; Murphy y cols, 2002; Gibson y Murphy, 2004). En daño traumático a la corteza cerebral, el tratamiento con progesterona reduce el edema cerebral (Roof y cols, 1996; Wright y cols, 2001) así como el volumen de la cavidad necrótica y las alteraciones del aprendizaje y de la memoria (Roof y cols, 1994; Goss y cols, 2003; Djebaili y cols, 2004). También se ha descrito que el tratamiento con alopregnanolona reduce tanto las alteraciones histopatológicas como funcionales originadas por el daño traumático (Djebaili y cols, 2004). En animales sometidos a daño traumático de la médula espinal, el tratamiento con progesterona reduce el tamaño de la lesión y facilita la recuperación motriz de los individuos (Thomas y cols, 1999; González y cols, 2004). En modelos de epilepsia por hiperexcitación del hipocampo, la progesterona y la alopregnanolona han mostrado tener efectos anticonvulsivos y reducir el daño subsecuente originado por las crisis epilépticas (Frye y Scalise, 2000; Hoffman y cols, 2003). En el SNP, se ha demostrado que la progesterona y la alopregnanolona reducen la magnitud del daño en lesiones realizadas a nervios periféricos como el nervio ciático (Koenig y cols, 1995; Azcoitia y cols, 2003).

Estos efectos neuroprotectores de la progesterona *per se* y/o de la alopregnanolona se han atribuido a la modulación positiva del receptor GABA_A cuya activación provoca fenómenos de hiperpolarización a través del incremento en la conductancia del cloro en la membrana neuronal (Mahesh y cols, 1996; Frye y Scalise, 2000) y a la modulación negativa de los receptores NMDA (Smith, 1991; Lockhart y cols, 2002); además, en el caso de la progesterona, se ha reportado que la modulación negativa de estos receptores en el hipocampo puede ejercerse a través del efecto antagónico de los receptores sigma 1, σ_1 (Bergeron y cols, 1996; Schumacher y cols, 2000). En cuanto a los efectos antioxidantes, se ha reportado que la

progesterona disminuye el daño por lipoperoxidación luego de daño traumático (Roof y cols, 1997) y la lipoperoxidación inducida por FeSO₄ así como la toxicidad inducida por el péptido β amiloide en cultivos primarios de neuronas de hipocampo (Goodman y cols, 1996). También aumenta la actividad de la superóxido dismutasa (MnSOD) en el cerebro de ratas hembra ovariectomizadas (Pajovic y cols, 1996) y aumenta la actividad de la catalasa en el cerebro de ratas macho gonadectomizadas (Pajovic y cols, 2003). La alopregnanolona presenta un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A lo que le confiere potencialidad para neutralizar radicales libres (Veiga y cols, 2004). Se ha reportado también que el tratamiento con progesterona de células en cultivo de hipocampo sometidas a daño excitotóxico por glutamato, incrementa la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Nilsen y Brinton, 2002). Por otra parte, tanto progesterona como alopregnanolona disminuyen la actividad de la caspasa 3 en animales sometidos a daño traumático (Djebaili y cols, 2004). En cuanto a los mecanismos anti-inflamatorios, la progesterona ha mostrado su efecto conservando la integridad de la barrera hematoencefálica luego de contusión a la corteza frontal (Duvdevani y cols, 1995) y reducir la expresión del RNAm de la interleucina 1β (IL- 1β), del factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) y de la NOS-2 luego de isquemia focal (Gibson y cols, 2005). Ambos mecanismos de acción de la progesterona se relacionan con la capacidad para reducir el edema cerebral. Además, tanto la progesterona como la alopregnanolona reducen en ratas el edema neurogénico en las meninges (Limmroth y cols, 1996) y reducen tanto el RNAm como la proteína de las citocinas IL- 1β y TNF- α (factor de necrosis tumoral) en ratas sometidas a daño traumático (He y cols, 2004). Por otra parte, se ha reportado que la administración de progesterona se asocia con una disminución de la gliosis reactiva y de la proliferación de astrositos, disminuyendo así el grado de daño, luego de trauma cerebral, (García-Estrada y cols, 1993).

Los mecanismos de neuroprotección de la progesterona y de la alopregnanolona, además de los descritos que se oponen a los mecanismos fisiopatológicos de daño, incluyen efectos que se relacionan con la recuperación funcional de las células y circuitos alterados por dicho daño. Se sabe que la progesterona, así como el estradiol, promueve el incremento de la sinaptogénesis y de la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo de ratas hembra

(Woolley y McEwen, 1993) y en el de primates hembra *Macaca mulatta* (Choi y cols, 2003); efectos similares de la progesterona se han descrito en cultivos de células de Purkinje de ratas macho en desarrollo (Sakamoto y cols, 2001; Sakamoto y cols, 2002). Actualmente se reconoce que los factores neurotróficos como el BDNF, participan en la sobrevivencia, diferenciación y plasticidad neuronal en el SNP y en el SNC, tanto en el desarrollo como en el adulto (Lu y Figuero, 1997); en particular, la progesterona promueve cambios citoarquitectónicos en las neuronas del hipocampo mediados por un incremento del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y se sugiere que estos efectos del BDNF pueden favorecer, a su vez, los procesos de aprendizaje y memoria en individuos sanos y la recuperación de los déficits funcionales asociados con el envejecimiento y con las enfermedades neurodegenerativas (Gibbs, 1999). Igualmente, se ha reportado que el efecto neuroprotector de la progesterona ante el daño traumático a la médula espinal esta relacionado a un incremento del BDNF en las motoneuronas lesionadas (González y cols, 2004; González y cols, 2005); además, el tratamiento con BDNF disminuye la muerte neuronal de la región CA1 del hipocampo y la reacción glial después de un episodio de isquemia global en ratas (Kiprianova y cols, 1999).

La progesterona y la alopregnanolona son secretados de manera autocrina por la célula de Schwann y estimulan el proceso de mielinización. De hecho, las células de Schwann del SNP (Koenig y cols, 1995) y los oligodendrocitos del SNC (Gago y cols, 2001) son capaces de sintetizar progesterona y ésta estimula la formación de vainas de mielina de células en cultivo. Por otra parte, la administración de progesterona a los cultivos adelanta el momento de inicio de la mielinización y duplica la tasa de formación de mielina (Chan y cols, 1998). Además de aumentar la incorporación de lípidos a la membrana de las células productoras de mielina, la progesterona y la alopregnanolona incrementan la expresión génica para la síntesis de las proteínas P0 y PMP22 de la mielina (Veiga y cols, 2004). El papel de la progesterona en la mielinización no se restringe a tejidos sanos, sino que la progesterona y la alopregnanolona promueven la síntesis de mielina después de daño a nervios periféricos como el ciático (Koenig y cols, 1995; Azcoitia y cols 2003) y en neuronas dañadas del SNC (Ghoumari y cols, 2003; Ibañez y cols, 2004). Estos datos señalan a la progesterona y a la alopregnanolona como

compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de situaciones en las que haya una pérdida y/o una alteración de la mielina, como sucede en el daño neuronal después de un periodo de isquemia cerebral global.

En nuestro grupo de trabajo ha sido de interés evaluar el efecto neuroprotector de hormonas de naturaleza endógena. En relación al efecto neuroprotector de la progesterona, en un primer estudio realizado en gatas a las que se les provocó un periodo de isquemia global por paro cardiorrespiratorio y se les administró progesterona 7 días pre- y post-isquemia, se observó una preservación significativa de la población de neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo y de las neuronas pequeñas del núcleo caudado, así como una disminución de las alteraciones neurológicas subsecuentes en los 14 días post-isquemia (Gonzalez-Vidal y cols, 1998; Cervantes y cols, 2002). Este esquema de administración demostró ser exitoso, pero tiene la desventaja de que sólo es aplicable en ciertas situaciones clínicas (como medida profiláctica en pacientes que son sometidos a cirugías que implican una hipoperfusión cerebral). Para explorar el efecto neuroprotector de la progesterona administrada sólo en el periodo post-isquemia (15min, 2, 6 y 24h) se realizó otro estudio en ratas macho sometidas a un episodio de isquemia global por oclusión de los 4 vasos, observándose la preservación significativa de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA2 del hipocampo evaluadas a 21 días post-isquemia (Moralí y cols, 2005).

No obstante a las recomendaciones existentes para el estudio de sustancias neuroprotectoras, la mayoría de los estudios se han realizado a corto plazo (no más de 30 días). En particular, en los estudios en los que se ha evaluado la progesterona y la alopregnanolona en modelos de isquemia focal, daño traumático y daño a la médula espinal, no existe ningún estudio en el cual se hayan hecho evaluaciones morfo-funcionales en un tiempo mayor a los 30 días.

De ahí que el objetivo de este trabajo fue evaluar a largo plazo (3 meses post-isquemia) el efecto neuroprotector de la Progesterona y de la Alopregnanolona sobre la disminución de la población de neuronas piramidales en el hipocampo y sobre las alteraciones de algunas manifestaciones funcionales de esta estructura cerebral, provocadas por una isquemia severa.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La administración post-isquemia de progesterona o de su metabolito activo $5\alpha,3\alpha$ -alopregnanolona (Tetrahidroprogesterona, THP) tendrá efectos neuroprotectores a largo plazo, preservando la población neuronal del hipocampo y las funciones cognitivas (aprendizaje y memoria) en los que participa esta estructura luego de un episodio de isquemia cerebral global?

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar a largo plazo el efecto neuroprotector de la administración inmediata post-isquemia de progesterona o de su metabolito activo THP, 90 días después de un episodio de isquemia cerebral global inducido en ratas mediante el modelo de oclusión de los cuatro vasos (4-VO), a través de indicadores de la integridad funcional (aprendizaje, memoria) y morfológica (población neuronal del cuerno de Ammón) del hipocampo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar a largo plazo las alteraciones inducidas por un periodo de 20 minutos de isquemia cerebral global mediante el modelo de oclusión de los cuatro vasos en ratas, a través de indicadores de la integridad funcional (aprendizaje, memoria) y morfológica (población de neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4) del hipocampo.

2. Evaluar a largo plazo el efecto neuroprotector de la administración inmediata de progesterona post-isquemia, 90 días después de un episodio de isquemia cerebral global inducido en ratas mediante el modelo de oclusión de los cuatro vasos, a través de indicadores de la integridad funcional (aprendizaje, memoria) y morfológica (población de neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4) del hipocampo.

3. Evaluar a largo plazo el efecto neuroprotector de la administración inmediata de THP post-isquemia, 90 días después de un episodio de isquemia cerebral global inducido en ratas mediante el modelo de oclusión de los cuatro vasos, a través de indicadores de la integridad funcional

(aprendizaje, memoria) y morfológica (población de neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4) del hipocampo.

7. HIPÓTESIS

La administración inmediata post-isquemia de progesterona o de su metabolito activo $5\alpha,3\alpha$ -alopregnanolona (Tetrahidroprogesterona, THP) tendrá efectos neuroprotectores a largo plazo, preservando la población neuronal del hipocampo y las funciones cognitivas (aprendizaje y memoria) en los que participa esta estructura luego de un episodio de isquemia cerebral global

HIPÓTESIS PARTICULARES

1. Un periodo de 20 min de isquemia cerebral global inducida por 4-VO, provocará alteraciones funcionales (aprendizaje y memoria) y morfológicas (despoblación neuronal del cuerno de Ammón del hipocampo), evaluadas 90 días después del episodio de isquemia.

2. La administración inmediata post-isquemia de progesterona reducirá las alteraciones funcionales (memoria, aprendizaje) y morfológicas (despoblación neuronal del cuerno de Ammón) del hipocampo, inducidas por un episodio de 20 min de isquemia cerebral global, evaluadas 90 días después del episodio de isquemia.

3. La administración inmediata post-isquemia de THP reducirá las alteraciones funcionales (memoria, aprendizaje) y morfológicas (despoblación neuronal del cuerno de Ammón) del hipocampo, inducidas por un episodio de 20 min de isquemia cerebral global, evaluadas 90 días después del episodio de isquemia.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 72 ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley, con un peso corporal entre 350 y 500 g (edad, promedio \pm DE: 4.6 ± 1.1 meses) al inicio del experimento, que fueron alojadas en un cuarto con ciclos controlados de 12 h de luz y 12 de oscuridad (luz de 6:00 a 18:00 h) en cajas de policarbonato con tapa de metal y cama de aserrín. En ellas tuvieron acceso al alimento (Purina) y al agua, a voluntad. Antes de los experimentos se alojaron en cajas colectivas de 5 ratas cada una; una vez iniciados los procedimientos experimentales se les alojó en cajas individuales hasta el final del experimento.

Las ratas fueron asignadas al azar a uno de los siguientes grupos y sometidas a una de las siguientes condiciones experimentales:

I. Sanos: (n=8) Animales que no fueron sometidos a ninguna manipulación anestésico-quirúrgica.

II. Sham-s/V: (n=5) Animales sometidos a las maniobras quirúrgicas simuladas correspondientes al modelo de isquemia cerebral global aguda en ratas por “oclusión de los cuatro vasos” (4-VO) (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988), sin interrumpir en ninguna forma el flujo sanguíneo cerebral.

III. Sham-V: (n=5) Animales a los que se ocluyeron en forma permanente las arterias vertebrales y en los que sólo se realizaron las maniobras anestésico-quirúrgicas de la segunda etapa del modelo 4-VO, sin ocluir las arterias carótidas.

IV. Isq + Veh: (n=30) Animales sometidos a isquemia por 4-VO (oclusión permanente de las arterias vertebrales y oclusión transitoria de las carótidas comunes durante 20 minutos) (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988; ver descripción más adelante) y administración del vehículo de la progesterona (0.5ml de β -ciclodextrina, Sigma Chemical Co., St Louis MO, EEUU, al 20% en agua, iv), a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h después del episodio de isquemia.

V. Isq + P4: (n=12) Animales sometidos a isquemia por 4-VO y administración de progesterona soluble en agua (complejo de progesterona y β -ciclodextrina, Sigma Chemical Co., St Louis MO, EEUU), 8 mg/kg en 0.5 ml de agua, iv, a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h después del episodio de isquemia. Esquemas de tratamiento similares han mostrado tener efectos neuroprotectores

en isquemia focal (Chen y cols, 1999; Gibson y Murphy, 2004) y en isquemia global en un estudio previo, en nuestro laboratorio (Moralí y cols, 2005).

VI. Isq + THP: (n=12) Animales sometidos a isquemia por 4-VO y administración de THP (3 α ,5 α -alopregnanolona, Sigma Chemical Co., St Louis MO, EEUU), 8 mg/kg en 0.5 ml de dimetilsulfóxido, ip, a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h después del episodio de isquemia.

MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA MEDIANTE LA OCLUSIÓN DE LOS CUATRO VASOS

El episodio de ICGA fue provocado siguiendo el procedimiento descrito previamente por otros autores (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988) e implementado por nosotros en el laboratorio. Bajo anestesia con xilacina (10 mg/kg im) y ketamina (90 mg/kg im) se practicó una incisión en la piel de la nuca y se separaron los músculos en la línea media, por disección, hasta lograr el acceso a la primera vértebra cervical (atlas). Se localizó a cada lado, en el foramen alar del atlas, la arteria vertebral y se cauterizó de modo de quedar ocluida permanentemente. A través de un acceso en la parte ventral del cuello, se localizaron las arterias carótidas comunes, se disecaron y se dejaron referidas mediante hilos de seda calibre 3-0 para su acceso 48 h después. Se introdujo un hilo de seda quirúrgica gruesa (calibre cero) por detrás de la tráquea, esófago, carótidas y nervios vagos, pero por delante de la musculatura cervical y paravertebral y sus cabos se pasaron por debajo de la piel hasta salir por la incisión de la nuca y se anudaron para evitar su retracción. Se canuló la vena yugular interna del lado derecho con un catéter de polietileno de 10cm de largo (Clay Adams, PE-50) lleno con solución salina heparinizada (100 UI/ml) que se hizo emerger por la incisión de la nuca. Se suturaron las heridas, se administró solución salina fisiológica (2 ml/100 g de peso corporal, sc) para evitar la deshidratación y se permitió la recuperación total del animal. Dos días después, bajo anestesia con halotano, se retrajeron y torcieron los cabos de la seda gruesa a fin de comprimir la musculatura cervical y paravertebral y limitar en lo posible el flujo sanguíneo al cerebro por la circulación colateral; se abrió la incisión ventral para tener acceso a las carótidas, se separaron éstas del tejido adyacente y se suspendió la administración de halotano para permitir que el animal se recuperara de la anestesia. Cuando la rata comenzó a despertar, se ocluyeron ambas carótidas en forma simultánea

utilizando clips microvasculares y se mantuvo la oclusión durante 15 a 20 min. Al terminar este periodo se retiraron los clips y se suspendió la compresión de la musculatura paravertebral. Tanto la interrupción del flujo sanguíneo como la reperfusión a través de las carótidas, fueron verificadas bajo microscopio. Se registró en forma continua la temperatura corporal durante todo el procedimiento y se mantuvo entre 35.5 y 37.5° C con la ayuda de un cojín eléctrico. Durante el periodo de isquemia y al inicio de la reperfusión, las ratas se encontraban inconscientes, en posición supina. La recuperación de la conciencia se manifestó por la presencia de movimientos voluntarios espontáneos y/o del reflejo de enderezamiento. La ausencia de ambos se considera un criterio válido de pérdida de la conciencia (Pulsinelli y Brierley, 1979; Herguido y cols, 1999). Al terminar los procedimientos se suturó la herida bajo anestesia con halotano, permitiéndose la recuperación total del animal. Sólo aquellos animales que permanecieron inconscientes durante la oclusión de las carótidas y por lo menos 20 minutos después de terminar este periodo, se incluyeron en el estudio.

EVALUACIONES CONDUCTUALES

Noventa días después del episodio de isquemia (edad, promedio \pm DE: 7.6 \pm 1.2 meses), cada uno de los animales fue sometido a las siguientes evaluaciones conductuales:

Aprendizaje y Memoria Espaciales.

Se utilizó el laberinto acuático de Morris (Morris y cols, 1982) que consiste en una tina circular de plástico, de 140 cm de diámetro y 50 cm de altura, pintada en su parte interior de negro y llena hasta una altura de 25 cm, con agua teñida de azul con violeta de genciana, a 28°C de temperatura. Dentro de la tina se colocó una plataforma de acrílico transparente cuya superficie de 13x13 cm quedó 2 cm por debajo del nivel del agua de modo que la rata no pudiera verla. La tina se dividió conceptualmente en 4 cuadrantes con respecto a los puntos cardinales y en 3 anillos concéntricos a intervalos de 23 cm a partir del centro de la tina, de manera que la plataforma oculta se colocó en la parte central del cuadrante NE en el segundo anillo concéntrico. Cada rata fue sometida a 2 ensayos diarios durante 6 días de entrenamiento para evaluar su orientación y aprendizaje espacial de la siguiente manera: se colocó a la rata dentro del agua, en uno de los puntos cardinales, de frente a la pared del laberinto y se le permitió nadar hasta localizar la plataforma oculta o hasta que

transcurrieran 60 segundos, luego de los cuales la rata fue guiada hacia la plataforma. En ambos casos se le permitió al animal permanecer en la plataforma por 15 segundos. Al término del ensayo la rata fue retirada de la plataforma y colocada en una caja de mantenimiento por 20 minutos antes del segundo ensayo. El punto cardinal de donde inició su recorrido cada animal se eligió al azar para los diferentes días de prueba pero fue el mismo para todos los animales, se cuidó que no se repitiera en los dos ensayos del mismo día, que para cada uno de los dos ensayos de cada día la rata saliera de un punto cercano y uno lejano a la ubicación de la plataforma y que los cuatro puntos cardinales estuvieran representados el mismo número de veces a través de los diferentes días. La ubicación permanente de los objetos del cuarto de experimentación y de la posición del experimentador con respecto a la tina constituyeron las señales espaciales disponibles para la orientación del animal para orientarse. Al séptimo día se sometió a los animales a un ensayo adicional de 30 segundos en el que se retiró la plataforma de escape y se evaluó la memoria espacial a través de la búsqueda que realizara el animal, de la plataforma (prueba de transferencia). Las pruebas fueron grabadas con una cámara de video localizada en un punto central, 2 m por encima de la tina y a partir de las grabaciones se obtuvieron los valores de la latencia de escape (tiempo que tardó el animal en localizar la plataforma) y se trazaron las rutas de nado de los animales en cada ensayo para determinar la distancia total recorrida y el despliegue de estrategias aloécnicas de búsqueda (aprendizaje espacial), calculando el índice que relaciona la distancia recorrida en los dos anillos internos con respecto a la recorrida en el anillo de la periferia (índice de recorrido interno/periférico). A partir de los datos de latencia de escape y distancia recorrida se obtuvieron los valores de velocidad de nado para descartar cualquier tipo de deficiencia motriz en el desempeño de los animales. En la prueba de transferencia se evaluaron los siguientes parámetros: la latencia para llegar por primera vez al punto que ocupaba la plataforma, el número de veces que la rata pasó por ese punto en los 30 segundos y el porcentaje de tiempo que la rata permaneció en el cuadrante de la plataforma en relación al tiempo total de prueba (30 seg).

Memoria de Referencia y Memoria de Trabajo.

Estos tipos de memoria se evaluaron utilizando el laberinto radial de ocho brazos, de Olton (Olton y Samuelson, 1976). Para ello, las ratas se mantuvieron en cajas individuales donde se limitó su ingestión de alimento para reducir y mantener su peso corporal en el 85% del peso inicial en el

término de los cinco días previos al inicio de un periodo de habituación y durante este periodo y los 10 días siguientes de prueba. Tanto durante el periodo de habituación (3 días), como durante el periodo de prueba (10 días), se ubicó un sólo observador dentro del cuarto, siempre en el mismo sitio, de modo que su posición y la de los objetos del cuarto de experimentación fueran los mismos y constituyeran las señales espaciales disponibles para la orientación del animal.

Durante el período de habituación (tres días) se permitió que cada una de las ratas exploraran el laberinto, durante 10 minutos cada día:

Primer día: Se colocaron dos trozos pequeños de cereal de frutas (40 miligramos cada uno) en cada uno de los 8 brazos del laberinto, uno a la mitad del trayecto y otro al final del brazo. Se colocó la rata en el área central del laberinto y se permitió que explorara libremente. Se registró el número de trozos de cereal que comió cada rata en el periodo de 10 minutos.

Segundo y tercer día: Se colocó un sólo trozo de cereal de fruta en cada uno de los brazos del laberinto, al final de cada brazo. Se colocó la rata en el área central y se permitió que explorara libremente. Se registró el número de trozos que comió en 10 minutos.

En algunos casos se agregaron 1 o 2 días más de habituación, según se requiriera, hasta que la rata lograra ingerir los 8 trozos de alimento en 10 minutos.

En preparación para la realización de las pruebas experimentales (una diaria, 10 días) se diseñó un esquema para cada rata en el que se asignaron 5 brazos para la colocación de trozos de alimento, de manera constante para cada rata a través de todas las pruebas.

Pruebas experimentales: Se colocó un trozo de cereal de fruta en el extremo de cada uno de los 5 brazos asignados para la rata; ésta se colocó en el área central y se le dejó explorar libremente hasta que comiera los 5 trozos de alimento o hasta un máximo de 10 minutos. Se registró en forma consecutiva el número del brazo en el que entraba la rata y comía el alimento.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

1. Tiempo de ejecución = tiempo requerido para comer los 5 trozos de frutilupis. Se asignó un valor de 10 min si no comió todos.
2. Errores de referencia = número de veces que entró a brazos no asignados.

3. Errores de trabajo = número de veces que entró a brazos a los que ya había entrado antes, ya sea que fueran brazos asignados o no.

Al finalizar la última prueba, se registró el peso corporal de cada rata y se le restituyó el alimento sin restricción para permitirle recuperar su peso corporal.

EVALUACIÓN DE LA POBLACIÓN DE NEURONAS PIRAMIDALES DEL HIPOCAMPO

Una vez que las ratas recuperaron su peso corporal, una semana después de la última prueba en el laberinto radial, se sometió a los animales a anestesia general profunda con pentobarbital (35mg/Kg) y se les perfundió por vía intracárdica con 200 ml de solución salina isotónica seguida de 200 ml de solución fijadora de formaldehído al 10% en buffer de fosfatos. Se extrajo el cerebro del cráneo y se postfijó por inmersión en el mismo fijador por un mínimo de 24 horas. De cada cerebro, se obtuvo una rebanada de 3mm de grosor, en donde quedaba ubicado el hipocampo y se realizó el proceso histológico y su inclusión en parafina.

A partir de los bloques en parafina se realizaron cortes de 10 μm de grueso, los cuales se adhirieron a portaobjetos. Se procesaron para su tinción con Violeta de Cresilo y se montaron con resina para su observación al microscopio. Para cada cerebro se analizaron cinco cortes al nivel del hipocampo dorsal, entre Bregma -3.14 y Bregma -4.52 (Paxinos y Watson, 1986) para realizar el conteo de neuronas piramidales presentes en cada hemisferio cerebral, en las diferentes regiones del cuerno de Ammon del hipocampo (CA1, CA2, CA3 y CA4), en campos observados al microscopio de luz, de 450 μm de diámetro, a un aumento de 400x. Sólo se incluyeron en el conteo aquellas neuronas con morfología normal, con contornos citoplásmico y nuclear definido y con nucléolo visible. Este procedimiento de muestreo permitió estimar la pérdida o preservación de las neuronas piramidales del hipocampo en los diferentes grupos de ratas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comparó la mortalidad de los grupos mediante la Prueba de Fisher. Los valores de latencia de escape en la prueba de orientación y aprendizaje espacial, del primer día de prueba en el laberinto acuático de Morris, se compararon con los subsiguientes utilizando las pruebas estadísticas de Friedman (ANOVA) y la de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon (*post-hoc*). Las comparaciones intergrupales de la latencia de escape en el laberinto de Morris fueron realizadas utilizando el ANOVA de Kruskal Wallis y la prueba *post-hoc* “U” de Mann Whitney. Los valores de distancia recorrida, velocidad de nado y los índices de trayectoria interna/periférica, fueron comparados entre los grupos utilizando un ANOVA para medidas repetidas y parcelas divididas y la prueba de Tukey como *post-hoc* (Siegel, 1970; Downie y Heath, 1983).

Los valores del número de errores de referencia y de errores de trabajo en el laberinto radial de Olton, se promediaron formando dos bloques de 5 días cada uno: de los días 1 al 5 y de los días 6 al 10. Los valores de los bloques 1 vs. 2 fueron comparados dentro de cada grupo utilizando la prueba de Wilcoxon. Los valores de cada bloque fueron comparados entre los grupos utilizando el ANOVA de Kruskal Wallis y la prueba *post-hoc* “U” de Mann Whitney (Siegel, 1970; Downie y Heath, 1983).

Se calculó el promedio del número de neuronas contadas en cada una de las áreas del cuerno de Ammón del hipocampo en los cinco cortes histológicos de cada cerebro para obtener un solo valor por animal en cada grupo, los cuales fueron promediados para su comparación estadística entre grupos. Para ello se utilizó un ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey, (Siegel, 1970; Downie y Heath, 1983). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando se tuvo un valor de $p \leq 0.05$.

9. RESULTADOS

MORTALIDAD

Los animales sometidos a manipulaciones anestésico-quirúrgicas, sin cauterización de las arterias vertebrales (sham-s/V) o con cauterización de estas arterias (sham-V) sobrevivieron en su totalidad sin complicaciones asociadas a estos procedimientos, se recuperaron adecuadamente y fueron sometidos a las pruebas conductuales correspondientes 90 días después.

En cambio, una parte de los animales sometidos a isquemia y tratados con vehículo (23 de 30; 77%), así como de los tratados con progesterona (5 de 12; 42%) y de los tratados con alopregnanolona (6 de 12; 50%) murieron dentro de las 48 h siguientes al periodo de oclusión de las carótidas. En general, esto ocurrió en los animales que presentaron indicadores de isquemia muy severa (inconsciencia profunda, extensión y rigidez de las extremidades durante la oclusión de las carótidas, así como un período de inconsciencia post-isquemia mayor a 30 minutos). La mortalidad de los animales tratados con progesterona o con THP fue significativamente menor ($p < 0.01$), que la de los animales tratados con vehículo (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de mortalidad en los diferentes grupos experimentales.

Grupo	n	Mortalidad (%)
Sham	10	0 ***
Isq + Veh	30	77 ***
Isq + P4	12	42 * *
Isq + THP	12	50 * *

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ en comparación con el grupo sham.

• $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ en comparación con el grupo Isq + Veh. Prueba de Fisher

EVALUACIONES FUNCIONALES

Aprendizaje Espacial: Latencia de escape y distancia recorrida.

Los animales del grupo control Sano, que no fueron sometidos a ningún procedimiento quirúrgico, aprendieron a localizar la plataforma oculta en el laberinto acuático de Morris, de modo que su ejecución se caracterizó por latencias de escape progresivamente menores (ANOVA de

Friedman: $p < 0.001$), las cuales desde el segundo día de prueba y en los días sucesivos (3 a 6) fueron significativamente menores que en el primero y que en el segundo día de prueba (prueba de Wilcoxon: $p < 0.05$). La reducción progresiva de las latencias de escape se asoció con recorridos de distancias significativamente menores a partir del tercer día de prueba en comparación con los dos primeros días (prueba de Wilcoxon: $p < 0.05$), con valores similares en los días 3 a 6 (Figs. 9A y 10A).

Los animales sometidos a maniobras anestésico-quirúrgicas, sin cauterización de las arterias vertebrales (Sham-s/V) y aquellos a los que se les cauterizaron estas arterias en forma permanente (Sham-V), pero que no fueron sometidos a isquemia mediante oclusión adicional de las carótidas, también mostraron una reducción significativa tanto de las latencias de escape como de las distancias recorridas, en los días de prueba sucesivos (ANOVA de Friedman: $p < 0.05$), con parámetros similares de ejecución en esta prueba, mostrando desde el día 3, latencias de escape y distancias recorridas, significativamente menores en comparación con el primer día de prueba (prueba de Wilcoxon: $p < 0.05$). Estos 2 grupos difirieron del grupo Sano en cuanto a que tardaron un día más en mostrar valores de latencia de escape y de distancia recorrida para localizar la plataforma, significativamente menores que en el primer día de prueba (Figs. 9A y 10A). Al igual que en los animales Sanos, en estos dos grupos Sham, no hubo diferencias en la latencia de escape ni en la distancia recorrida, en los días siguientes a partir del día 3 de prueba. Las menores latencias de los animales Sanos en relación con los Sham-V dio lugar a una diferencia significativa entre estos 3 grupos en la latencia de escape (ANOVA de mediciones repetidas: $F=4.662$, $p < 0.05$; *post hoc* de Tukey: $p < 0.05$), pero no hubo diferencias significativas en las distancias recorridas. El análisis de los resultados para cada día de prueba (ANOVA de Kruskal-Wallis) mostró diferencias significativas en las latencias de escape entre los grupos en el día 4 ($p < 0.05$). La comparación entre los grupos Sham-s/V y Sham-V para cada uno de los días de prueba no mostró ninguna diferencia significativa (prueba U de Mann-Whitney), pero estos dos grupos tuvieron latencias de escape mayores que los animales Sanos ($p < 0.05$) en el día 4 (Fig. 9A). No se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos en las distancias recorridas al comparar cada día de prueba (Fig. 10A).

Dado que en estos parámetros no se encontraron diferencias entre los grupos Sham-s/V y Sham-V, estos dos grupos en conjunto se utilizaron como grupo testigo (Sham, n=10) para comparar los resultados de los animales sometidos a isquemia.

El grupo sometido a isquemia y tratado con vehículo (Veh) no mostró la reducción progresiva de las latencias de escape y de las distancias recorridas que fueron observadas en los grupos Sano y Sham, de modo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de los diferentes días sucesivos (Figs. 9B y 10B). En cambio, los animales sometidos a isquemia y tratados con progesterona (P4) mostraron una reducción significativa tanto de las latencias de escape ($p < 0.001$) como de las distancias recorridas ($p < 0.001$) en los días de prueba sucesivos (Figs. 9B y 10B), con valores significativamente menores en los días 3, 5 y 6 ($p < 0.05$), que en el primer día. Los animales sometidos a isquemia y tratados con THP mostraron una reducción significativa tanto de las latencias de escape ($p < 0.01$) como de las distancias recorridas ($p < 0.05$) en los días de prueba sucesivos (Figs. 9B y 10B), con latencias de escape significativamente menores a partir del día 3 con respecto al día 1 ($p < 0.05$), en tanto que sólo se encontró diferencia en las distancias recorridas de los días 5 y 6 con respecto al día 1 ($p < 0.05$).

No se encontraron diferencias significativas al comparar la latencia de escape ni la distancia recorrida entre los grupos Sham (Sham-s/V y Sham-V integrados en un solo grupo), Veh, P4 y THP (ANOVA de mediciones repetidas). Sin embargo, la comparación de estos parámetros en cada día de prueba (prueba post hoc U de Mann-Whitney) mostró latencias de escape y distancias recorridas significativamente mayores en el grupo Veh con respecto al Sham en los días 4, 5 y 6 ($p < 0.05$) (Figs. 9B y 10B). Los grupos tratados con P4 y con THP no difirieron del grupo Sham en estos parámetros en ninguno de los días de prueba. Las latencias de escape de los grupos P4 y THP no difirieron de las del grupo Veh, aunque la distancia recorrida por las ratas tratadas con P4 en el 5º día de prueba fue significativamente menor ($p < 0.05$) que la del grupo Veh.

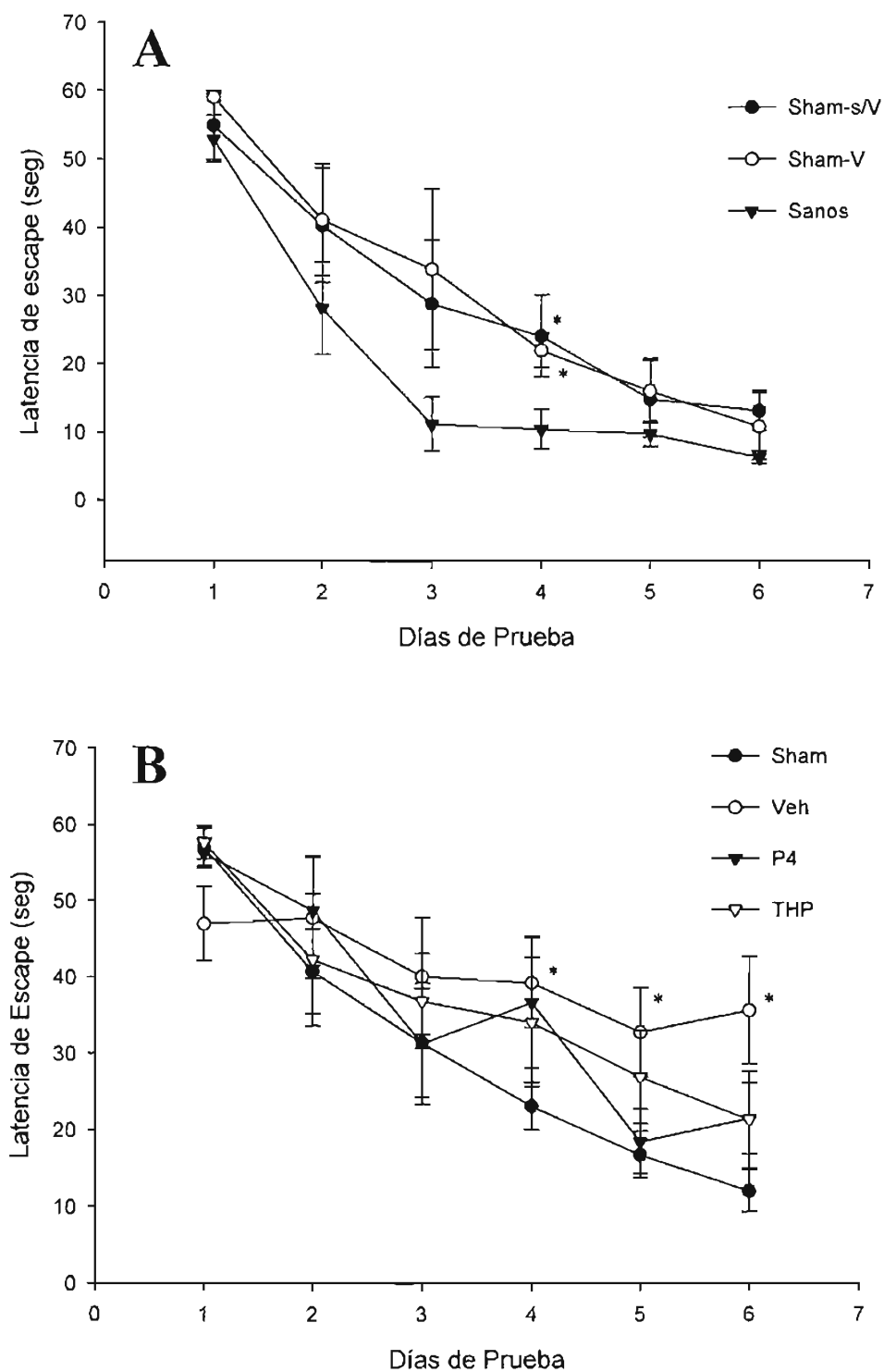


FIGURA 9. Latencias de escape (Promedios \pm E.E.) de las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B), en cada uno de los 6 días de prueba en el laberinto acuático de Morris. **A:** Los animales sham sin cauterización (Sham-s/V) y con cauterización de las arterias vertebrales (Sham-V), presentaron latencias de escape similares entre sí y un ligero retraso en la reducción de las mismas a través de los días de prueba, en comparación con los Sanos. **B:** Los animales sometidos a isquemia y tratados sólo con el vehículo (Veh) mostraron latencias de escape significativamente más largas que las de los animales Sham, en tanto que las ratas tratadas con P4 o con THP tuvieron latencias de escape similares a las de los animales Sham. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo de animales Sanos (A) o con los Sham (B). Prueba U de Mann-Whitney.

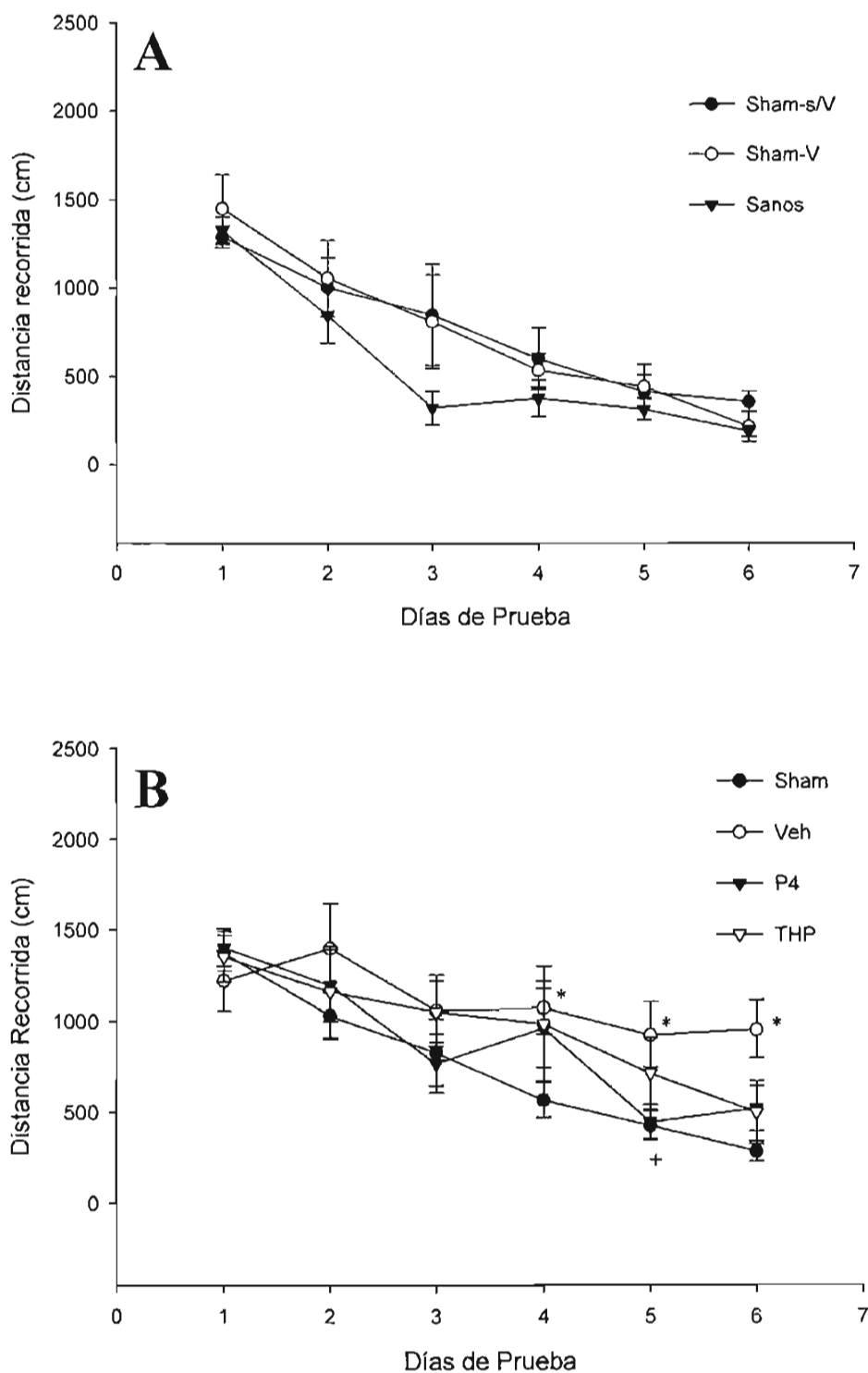


FIGURA 10. Distancias recorridas (Promedios \pm E.E.) por las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B), en cada uno de los 6 días de prueba para localizar la plataforma en el laberinto acuático de Morris. **A:** Los animales sham sin cauterización (Sham-s/V) y con cauterización de las arterias vertebrales (Sham-V), recorrieron distancias similares entre sí y con respecto a las de los Sanos. **B:** Los animales sometidos a isquemia y tratados sólo con el vehículo (Veh) recorrieron distancias significativamente más largas que los animales Sham, que no se redujeron con los días de prueba. Las ratas tratadas con P4 o con THP recorrieron distancias similares a las de los animales Sham y la distancia recorrida por el grupo P4 fue menor, en el día 5, con respecto al grupo Veh. * $p < 0.05$ Veh vs Sham; + $p < 0.05$ P4 vs Veh. Prueba U de Mann-Whitney.

Velocidad de nado.

La velocidad de nado en los animales Sanos difirió entre los días de prueba ($p < 0.01$), observándose mayores velocidades ($p < 0.05$) en los días 2 al 5 con respecto al día 1 (Fig. 11A). En los animales Sham-s/V, hubo una tendencia a aumentar la velocidad de nado en los días posteriores al día 1, con diferencias estadísticamente significativas entre los días 4 y 6 ($p < 0.05$). En los animales Sham-V, la velocidad de nado en el día 6 fue menor con respecto al día 2 ($p < 0.05$).

El análisis de la velocidad de nado (ANOVA de mediciones repetidas, $F=10.844$; $p=0.001$) mostró una diferencia significativa entre estos 3 grupos. La velocidad de nado del grupo sham-V tendió a ser menor que la del grupo sham-s/V (Fig 11A), pero sólo difirió significativamente en el 6° día de prueba ($p < 0.05$). La velocidad del grupo sham-V fue en general significativamente menor que la del grupo Sano ($p < 0.05$ en los días 2, 3 y 5; $p < 0.01$ en los días 4 y 6). Sólo en el día 4, la velocidad de nado de los animales Sham-s/V fue menor que la de los Sanos ($p < 0.01$).

Tomando al grupo Sham ($n=10$) en su conjunto, no se encontró ninguna diferencia en la velocidad de nado de este grupo entre los 6 días de prueba (Fig. 11B). En forma similar, en los grupos sometidos a isquemia y tratados con Veh, con P4 o con THP no se encontraron diferencias en la velocidad de nado entre los días de prueba, a excepción del grupo tratado con THP en que la velocidad fue mayor en el día 3 con respecto al 6 ($p < 0.05$).

No se encontraron diferencias significativas entre los 4 grupos al comparar este parámetro con el ANOVA de mediciones repetidas. Las comparaciones intergrupales sólo mostraron una mayor velocidad de nado del grupo Veh con respecto al Sham en el 2° día de prueba ($p < 0.05$).

Estrategia de búsqueda de la plataforma

En los ensayos efectuados en los días 1 y 2, las ratas de los grupos Sanos, Sham, P4 y THP realizaron una trayectoria de nado por la zona periférica del laberinto acuático (tigmotaxis), en tanto que en los ensayos de los días siguientes (3-6) sus recorridos fueron predominantemente en la zona correspondiente a los dos anillos concéntricos internos, de acuerdo con la división conceptual del laberinto, con mayor posibilidad de localizar la plataforma.

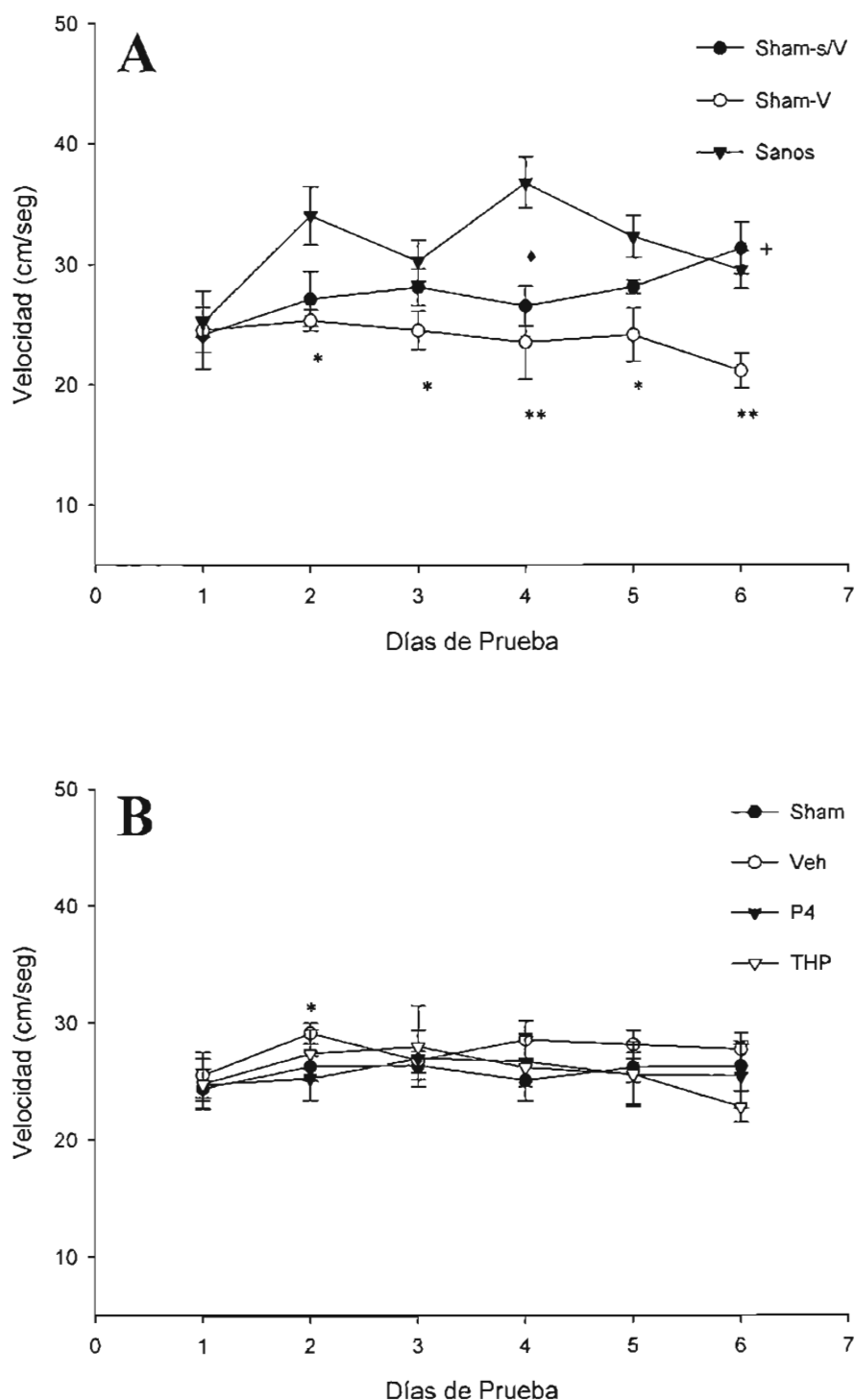


FIGURA 11. Velocidad de nado (Promedios \pm E.E.) por las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B), en cada uno de los 6 días de prueba en el laberinto de Morris. A: Los animales Sham-V presentaron una menor velocidad que el grupo Sham-s/V (en el día 6) y que el grupo Sanos (en los días 2-6). En el día 4, la velocidad de los animales Sham-s/V fue menor que la de los Sanos. B: El grupo Veh presentó una mayor velocidad de nado que el grupo Sham, en el día 2 de prueba. A: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ Sham-V vs Sanos; + $p < 0.05$ Sham-V vs Sham-s/V; * $p < 0.01$ Sham-s/V vs Sanos. B: * $p < 0.05$ Veh vs Sham. Prueba U de Mann-Whitney.

En cambio, los animales del grupo Veh, tuvieron desplazamientos con tigmotaxis persistente en los diferentes días de prueba, o bien presentaron trayectorias variables a través de los días, en las que, aún internándose en el laberinto, no llegaron a la plataforma, o bien llegaron al azar, como lo demuestra la inconsistencia para localizarla en los días de prueba sucesivos (Fig. 12).

La evaluación cuantitativa mediante los índices de recorrido interno/periférico, mostró que los índices variaron significativamente entre los días de prueba sucesivos en los grupos Sham-s/V, Sham-V y Sanos ($p < 0.01$), con incremento del recorrido en el interior en relación con la periferia del laberinto. En los animales Sham-s/V y Sham-V, la diferencia con respecto al día 1 fue significativa ($p < 0.05$) a partir del día 3. Del día 3 al 6 no hubo diferencias en este parámetro. En el grupo de animales Sanos el índice de recorrido interno/periférico también aumentó en los días sucesivos, siendo diferente con respecto al día 1 ($p < 0.05$) desde el día 2 (Fig 13A). No se encontraron diferencias en este parámetro entre los tres grupos al hacer la comparación global ni en la comparación día a día.

Cada uno de los 4 grupos experimentales presentó diferencias significativas en este parámetro a través de los días de prueba (Sham y P4: $p < 0.001$; Veh y THP: $p < 0.01$). Los índices de recorrido interno/periférico aumentaron progresivamente y desde el día 3, o el 4 en el caso de THP, fueron significativamente mayores que en el día 1 ($p < 0.01$ en el grupo Sham; $p < 0.05$ en los grupos Veh, THP y P4) (Fig. 13B).

Los índices de recorrido interno/periférico difirieron entre los 4 grupos (ANOVA de mediciones repetidas, $F=3.052$; $p < 0.05$). La diferencia estuvo dada por el menor recorrido interno del grupo Veh con respecto al Sham en los días 4 y 5 ($p < 0.05$), así como el mayor recorrido interno del grupo P4 en comparación con el Veh ($p < 0.05$), en particular en el día 6 ($p < 0.05$). Los índices de recorrido interno/periférico de los animales de los grupos P4 y THP fueron similares a los de los Sham (Fig. 13B).

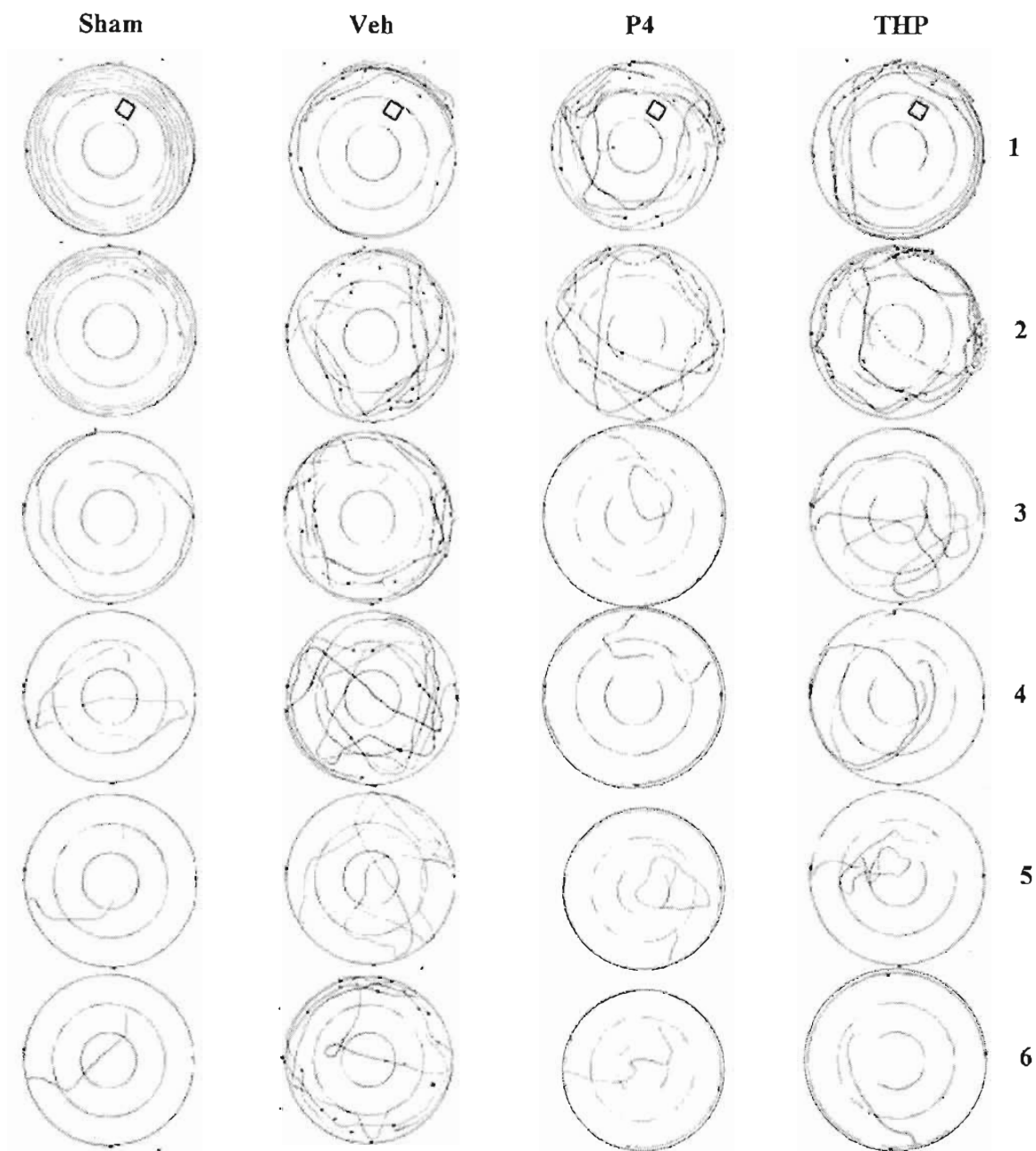


FIGURA12. Estrategia de búsqueda de la plataforma oculta en el laberinto acuático de Morris. Trazos representativos de las trayectorias recorridas por las ratas de los grupos experimentales, durante los seis días de prueba. En el trazo del primer día para cada grupo, se muestra con un pequeño cuadrado la posición de la plataforma durante las pruebas. En todos los grupos, a excepción del Veh, se redujo la tigmotaxis en los días sucesivos en favor de una trayectoria hacia el interior del laberinto, que les permitió localizar la plataforma.

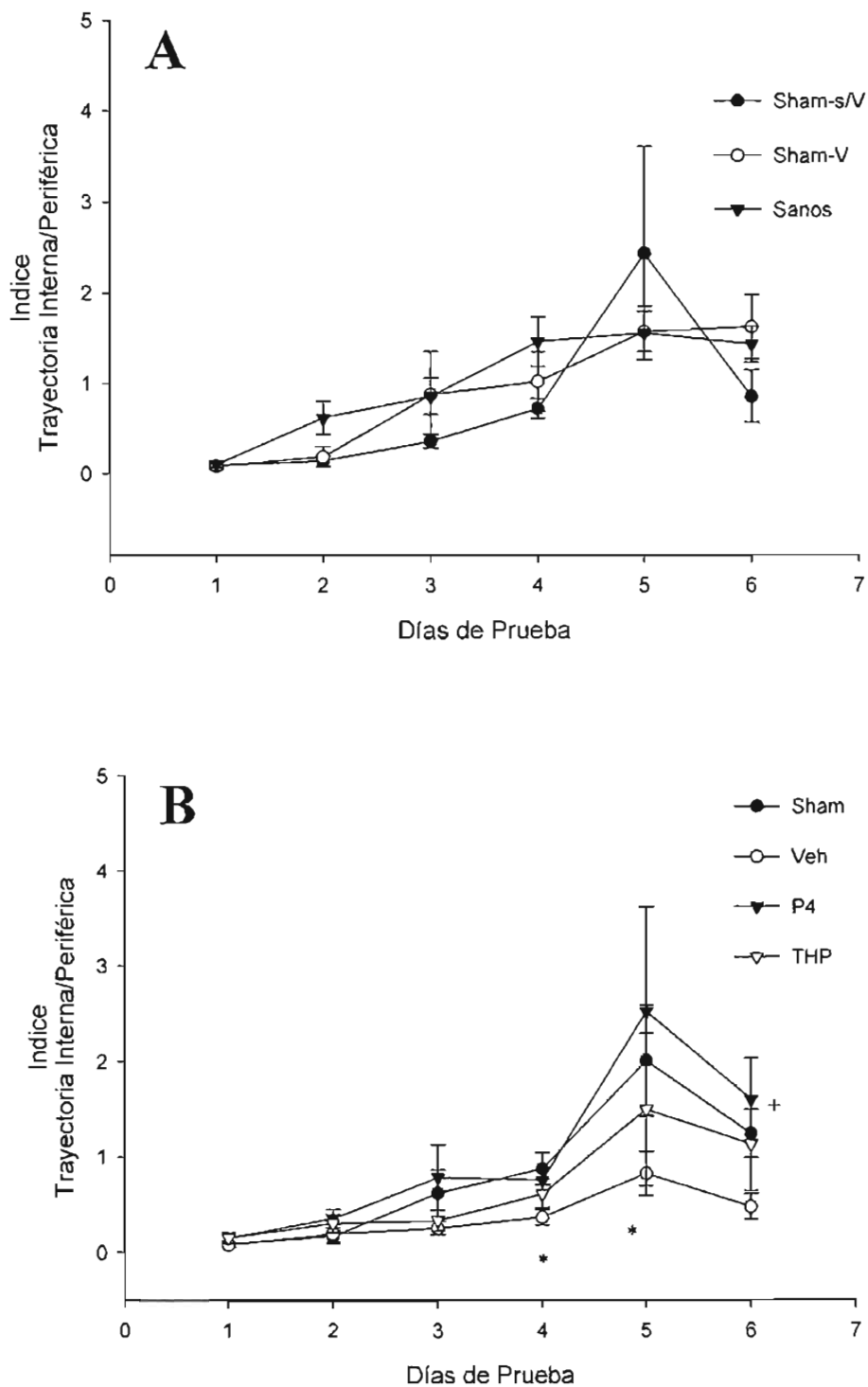


FIGURA 13. Estrategia de búsqueda de la plataforma en el laberinto acuático de Morris. Índices de recorrido interno/periférico (Promedios \pm EE) de las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B). **A** y **B**: En todos los grupos aumentó el recorrido interno con los días de prueba. **B**: Este aumento fue significativamente menor en el grupo Veh con respecto al Sham; por otra parte, el grupo tratado con P4 tuvo un mayor recorrido interno que el grupo Veh. * $p < 0.05$ Veh vs Sham; + $p < 0.05$ P4 vs Veh. Prueba U de Mann-Whitney.

Memoria Espacial

Latencia al primer pase y número de pases por el sitio donde se encontraba la plataforma; porcentaje de tiempo en el cuadrante de la plataforma

En la prueba de transferencia, los animales de los tres grupos testigo difirieron entre sí ($p < 0.01$) en la latencia al primer pase sobre el sitio en donde se encontraba la plataforma en los 6 días de entrenamiento, diferencia dada por la mayor latencia del grupo Sham-V ($p < 0.01$) y del Sham-s/V ($p < 0.05$) en comparación con los Sanos (Fig. 14A). No hubo diferencia significativa entre los dos grupos sham. También difirieron los tres grupos entre sí en el número de pases por el sitio que ocupaba la plataforma ($p < 0.05$), diferencia dada porque los animales del grupo Sham-s/V pasaron significativamente menos veces por ese sitio ($p < 0.05$), que los Sanos (Fig. 15A). No hubo diferencia entre estos tres grupos testigo, en el porcentaje de tiempo que pasaron en el cuadrante de la plataforma (Fig. 16A).

Al comparar los cuatro grupos experimentales, sólo se encontró una mayor latencia del grupo Veh al primer pase por el sitio de la plataforma ($p < 0.05$) con respecto al Sham (Fig. 14B). Aunque se encontró una tendencia en el grupo Veh y en menor grado en el grupo THP, a pasar menos veces por el sitio de la plataforma en comparación con el grupo Sham, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en este parámetro (Fig. 15B), ni en el tiempo que permanecieron en el cuadrante de la plataforma (Fig. 16B). Sin embargo, es importante resaltar que en los animales del grupo Veh sólo 2 de los 7 pasaron más de una vez por el sitio de la plataforma, en tanto que 4 de los 7 tratados con P4, 3 de los 6 tratados con THP y 8 de los 10 Sham regresaron más de una vez a buscar la plataforma. Además, llama la atención que algunas de las ratas tratadas con Veh, que sólo pasaron una vez por el sitio de la plataforma, aún con latencias cortas no regresaban al sitio, lo que sugiere alteraciones de su memoria espacial, en contraste con aquellas del grupo tratado con P4 que mostraron insistencia en el sitio de la plataforma; por otra parte, varios de los animales tratados con P4 o THP, que no pasaron por el sitio de la plataforma o sólo pasaron una vez en los 30 seg. de prueba, fueron animales que en la fase de aprendizaje tenían latencias de escape cercanas o mayores a 30 seg.

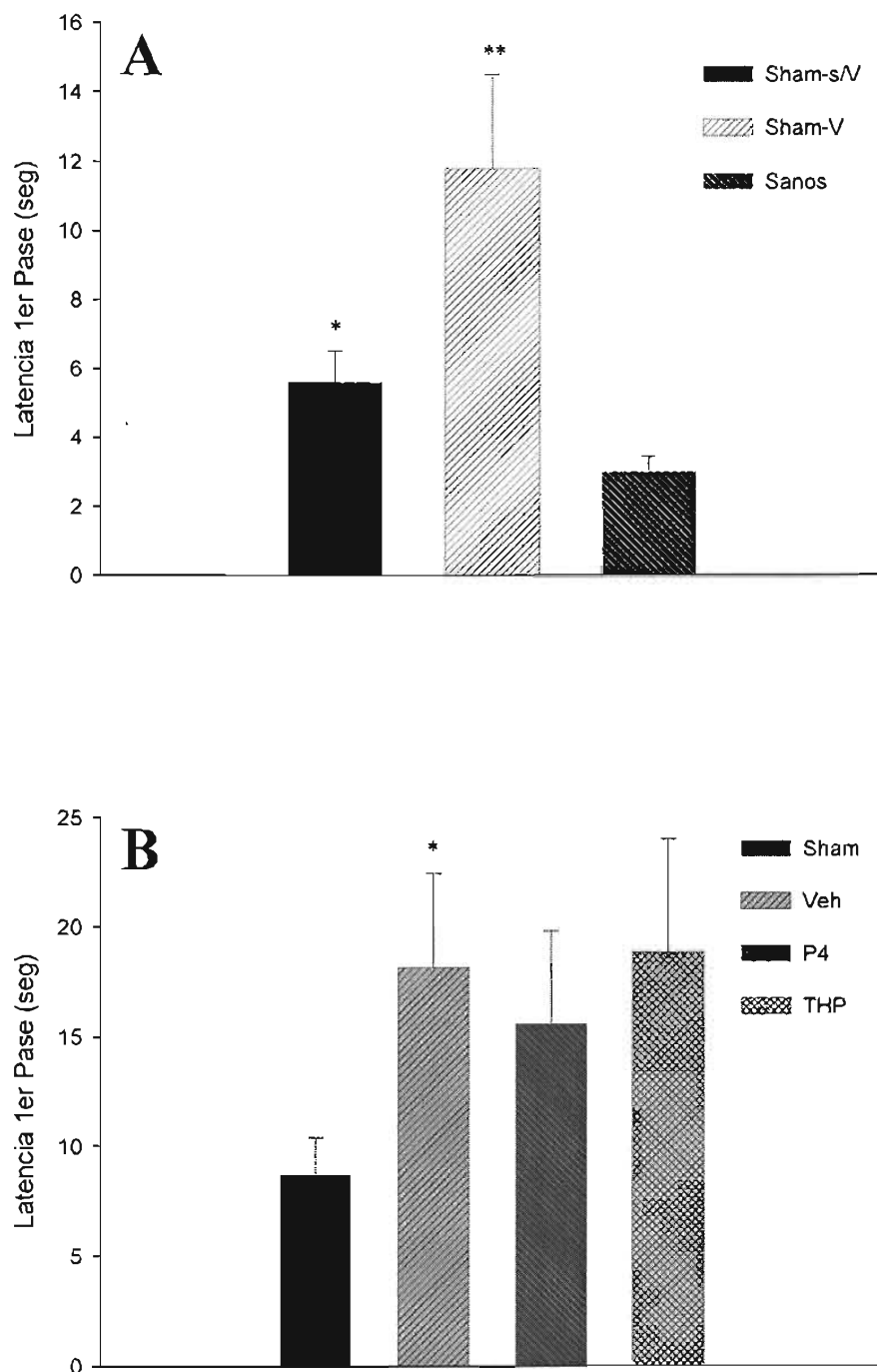


FIGURA 14. Latencia al primer pase por el sitio previamente ocupado por la plataforma (promedios \pm EEM), de las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B) durante la prueba de transferencia en el laberinto acuático de Morris. **A:** Los grupos Sham-s/V y Sham-V presentaron mayores latencias que los Sanos. **B:** El grupo Veh tuvo latencias más largas que las del grupo Sham. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo de animales Sanos (A) o con los Sham (B). Prueba U de Mann-Whitney.

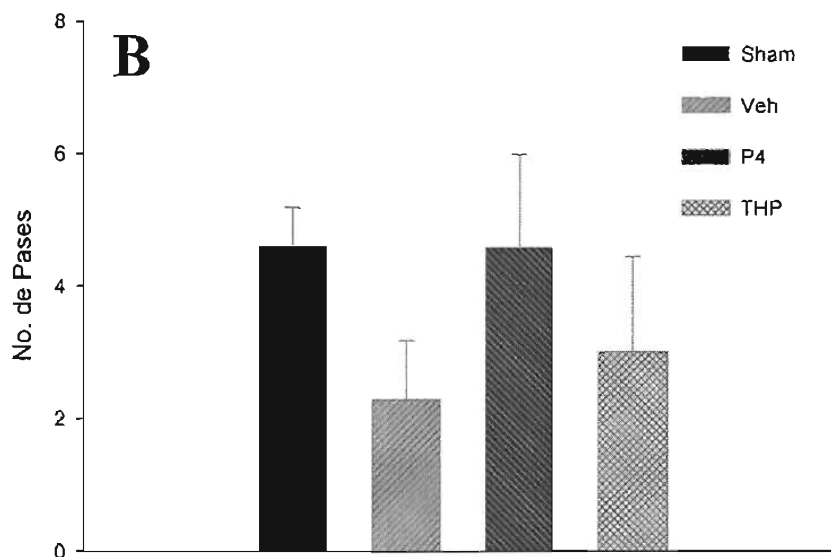
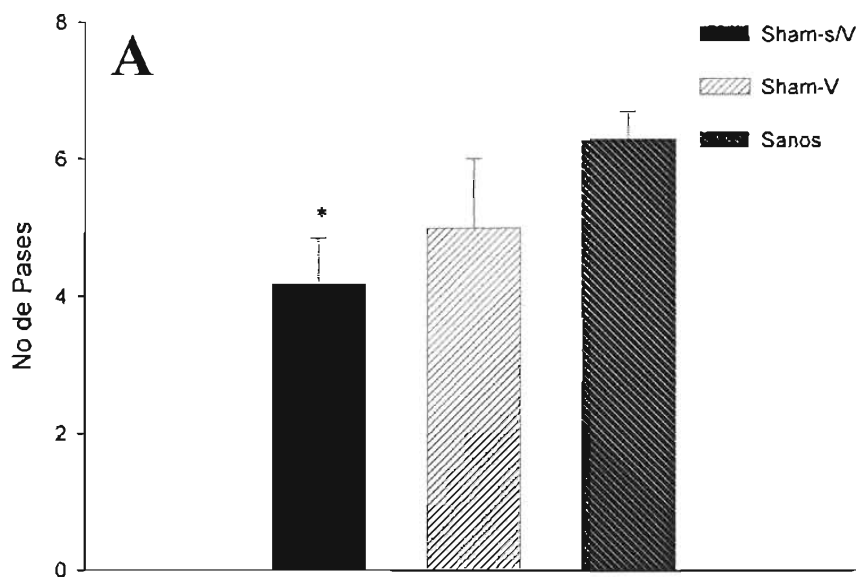


FIGURA 15. Número de veces (Promedio \pm EE) que pasaron por el sitio previamente ocupado por la plataforma, las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B) durante la prueba de transferencia en el laberinto acuático de Morris. A: Las ratas del grupo Sham-s/V pasaron menos veces por el sitio, que los Sanos. B: No hubo diferencias en este parámetro entre los grupos experimentales. * $p < 0.05$ en comparación con los Sanos.

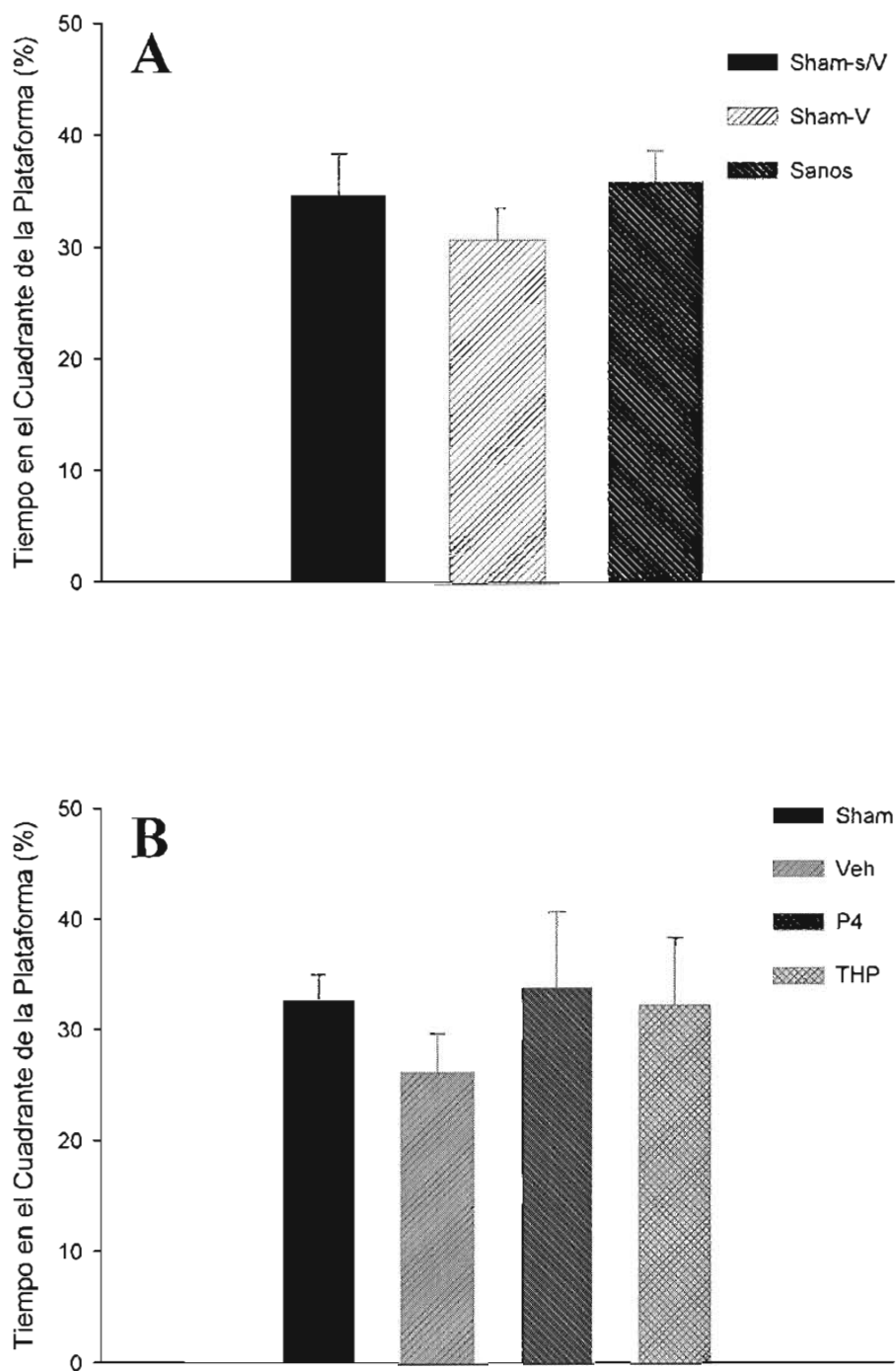


FIGURA 16. Porcentaje de tiempo que permanecieron en el cuadrante en donde previamente se encontraba la plataforma, en relación al tiempo total de prueba (Promedios \pm E.E.), las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B) en la prueba de transferencia en el laberinto acuático de Morris. No se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos.

Memoria de referencia y de trabajo

Tiempo de ejecución

En el laberinto radial de Olton, los animales de los 3 grupos testigo (Sham-s/V, Sham-V y Sano) en los días sucesivos de prueba aprendieron a localizar los brazos que tenían alimento, de modo que mostraron menores tiempos de ejecución de la prueba ($p < 0.05$) en los días 6-10 que en los días 1-5 (Fig. 17A). Al comparar los tiempos de ejecución de los 3 grupos, no se encontraron diferencias significativas entre ellos en ninguno de los días.

En los 4 grupos experimentales también se redujo el tiempo de ejecución en los días 6-10 con respecto a los días 1-5 ($p < 0.05$). En los grupos Veh y THP se observó un retraso en la reducción de los tiempos de ejecución de esta prueba, de modo que en los días 4 y 5 se encontró una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los grupos, dada especialmente por el mayor tiempo de ejecución de los grupos Veh y THP en comparación al Sham ($p < 0.05$), en tanto que los animales tratados con P4 tuvieron tiempos de ejecución similares a los de los animales Sham. En los siguientes días no se encontraron diferencias entre los cuatro grupos (Figura 17B).

Errores de referencia

De los 3 grupos testigo, aunque hubo una tendencia a disminuir el número de errores en los días sucesivos, sólo los animales del grupo Sanos tuvieron menor número de errores de referencia ($p < 0.05$) en el bloque 2 (días 6-10) que en el 1er bloque (días 1-5) (Fig. 18A). No se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos al comparar sus errores de referencia en cada uno de los bloques.

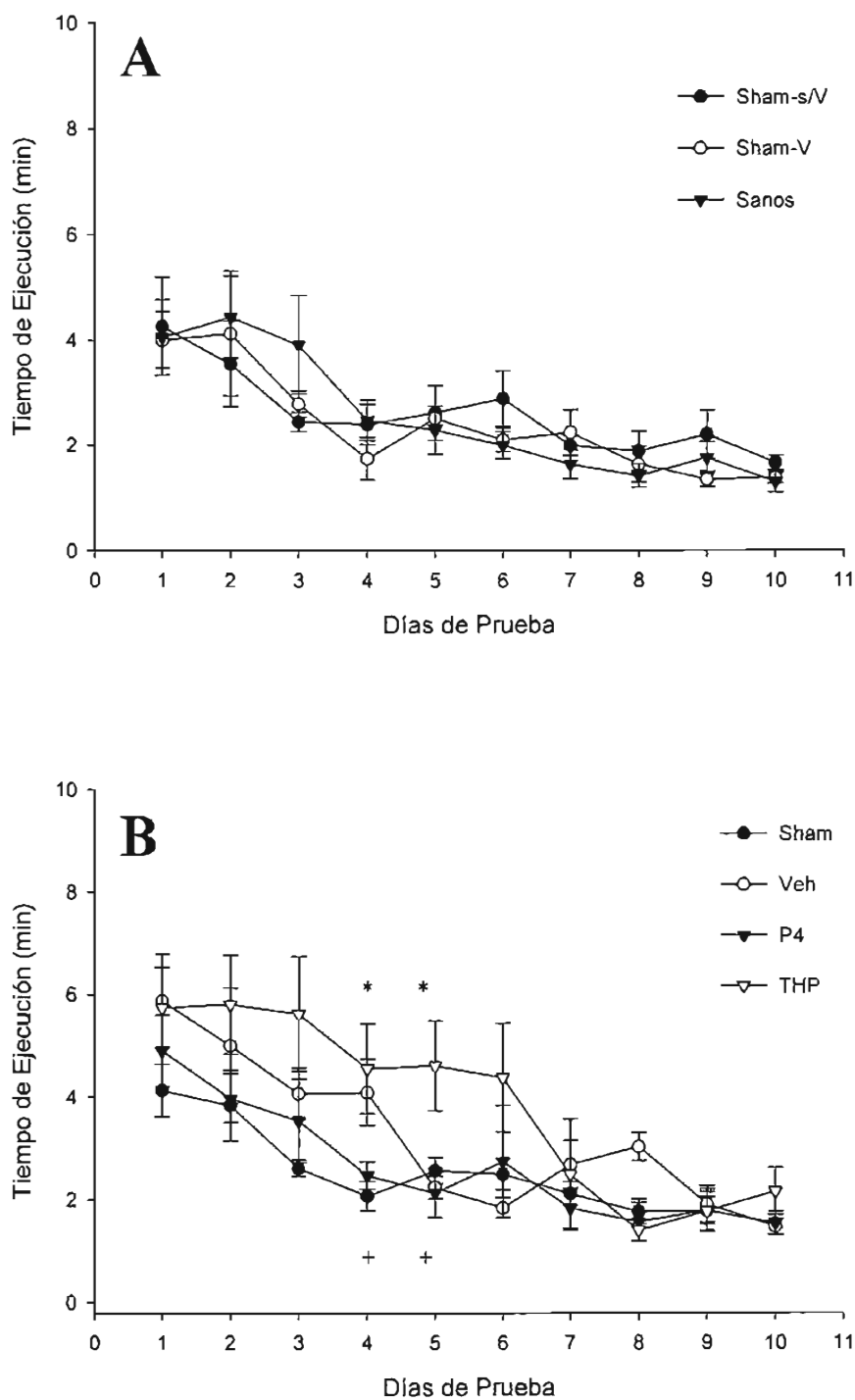


FIGURA 17. Tiempo de ejecución de la tarea (Promedio \pm EEM) en el laberinto radial de ocho brazos de Olton, de las ratas de los grupos testigo (A) y experimentales (B) a través de los 10 días de prueba. A: En los tres grupos testigo se redujo gradualmente el tiempo de ejecución. B: Se observa un retraso en la reducción de los tiempos de ejecución de los grupos Veh y THP, en tanto que el grupo tratado con P4 tuvo tiempos similares a los del grupo Sham. + $p < 0.05$ Veh vs Sham; * $p < 0.05$ THP vs Sham. Prueba U de Mann-Whitney.

En ninguno de los grupos experimentales se encontraron diferencias en el número de errores de referencia del bloque 1 en comparación con el bloque 2. De manera similar al tiempo de ejecución, en el bloque 1 se encontró diferencia entre los grupos ($p < 0.05$), debida a un mayor número de errores del grupo Veh y del grupo THP con respecto al Sham ($p < 0.05$), mientras que el grupo tratado con P4 no fue diferente que el grupo Sham. Aunque el grupo Veh tuvo un número ligeramente mayor de errores en los días del bloque 2 que los otros grupos, no se encontraron diferencias significativas entre los 4 grupos al comparar sus errores de referencia en el bloque 2 (Fig. 18B).

Errores de trabajo

Al comparar los errores de trabajo de los 3 grupos testigo entre los bloques, sólo los animales Sanos tuvieron menor número de errores ($p < 0.05$) en el bloque 2 en relación al 1er bloque (Fig. 19A). No se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos al comparar sus errores de trabajo en cada uno de los bloques.

Al igual que para los errores de referencia, en ninguno de los grupos experimentales se encontraron diferencias en el número de errores de trabajo del bloque 2 en comparación al bloque 1.

Por otra parte, tanto en el bloque 1 ($p < 0.01$) como en el 2 ($p < 0.05$), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Fig. 19B). En el bloque 1 la diferencia se debió a un mayor número de errores de los grupos Veh y THP con respecto al Sham ($p < 0.01$); así como del grupo P4 en comparación con el Sham ($p < 0.05$). En el bloque 2 sólo el grupo Veh presentó mayor número de errores de trabajo que el Sham ($p < 0.001$), en tanto que los grupos P4 y THP no difirieron del grupo Sham.

POBLACIÓN DE NEURONAS PIRAMIDALES EN EL HIPOCAMPO

Las ratas que no fueron sometidas a ninguna manipulación anestésico-quirúrgica (grupo de animales Sanos) presentaron abundantes neuronas piramidales en las regiones CA1 a CA4 del cuerno de Ammon del hipocampo de los cortes histológicos analizados. Las ratas de los grupos Sham-s/V y Sham-V presentaron poblaciones neuronales en general similares a las de los animales Sanos, sin diferencias estadísticamente significativas (Fig. 20A).

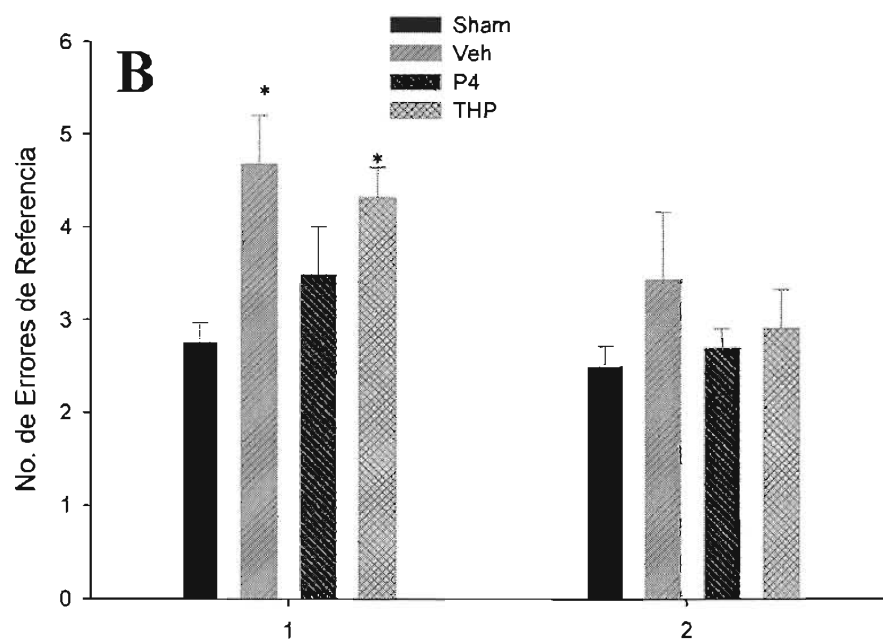
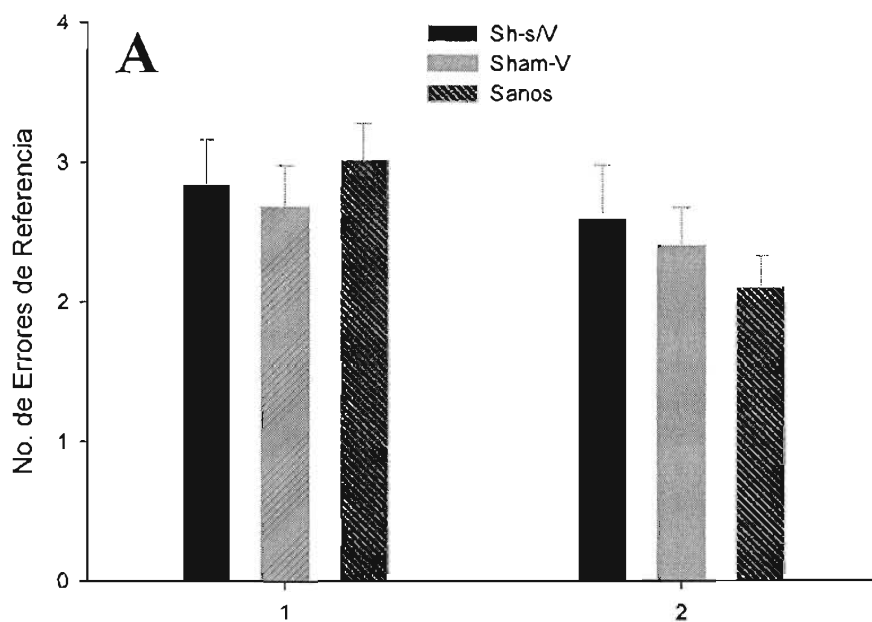


FIGURA 18. Número de errores de referencia (Promedios \pm EE) cometidos por las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B) en los días 1-5 (bloque 1) y 6-10 (bloque 2) de prueba en el laberinto radial de ocho brazos de Olton. **B:** Se observa un mayor número de errores en los grupos Veh y THP en comparación con el grupo Sham en el bloque 1, pero no en el 2. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo Sham. Prueba U de Mann-Whitney.

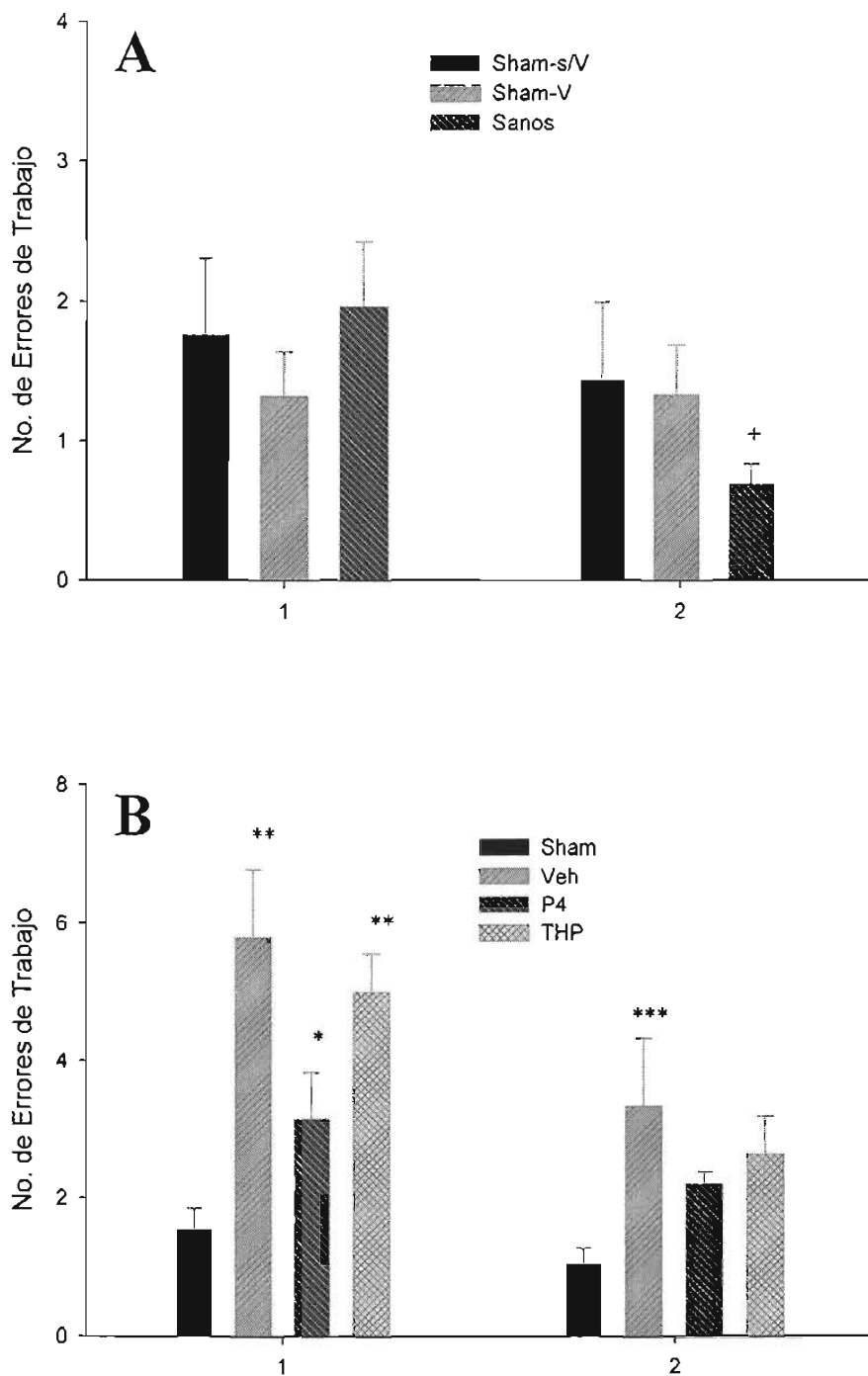


FIGURA 19. Número de errores de trabajo (Promedios \pm EEM) cometidos por las ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B) en los días 1-5 (bloque 1) y 6-10 (bloque 2) de prueba en el laberinto radial de ocho brazos de Olton. **B:** Se observa un mayor número de errores en los grupos Veh, P4 y THP en comparación con el grupo Sham en el bloque 1, pero en el 2 sólo el grupo Veh difiere del Sham. + $p < 0.05$ en comparación con el bloque 1; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ en comparación con el grupo Sham. Prueba U de Mann-Whitney.

Las ratas de los grupos sometidos a isquemia, tratados con Veh, con P4 o con THP presentaron en general una disminución significativa de la población de neuronas piramidales en las diferentes regiones del cuerno de Ammon, con valores promedio significativamente menores que los de los animales Sham (Fig. 20B). Sin embargo, se observó una gran variabilidad en la población de neuronas piramidales preservadas en las diferentes regiones del hipocampo, dentro de cada grupo. Imágenes representativas de las regiones CA1 a CA4 de los diferentes grupos se presentan en las Figs. 21 y 22.

Tabla 2. Población de neuronas piramidales (porcentaje en relación al grupo Sham) presentes en las diferentes regiones del cuerno de Ammon de las ratas de los diferentes grupos sometidos a isquemia.

Grupo	CA1	CA2	CA3	CA4
Veh	26.6 ***	36.6 ***	51.7 *	36.2 ***
P4	21.0 ***	31.8 **	59.2 *	35.3 **
THP	3.9 ***	31.4 **	67.5 *	60.2 *

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. Sham (100%)

Prueba de Tukey sobre la población neuronal (No. de neuronas/campo).

En particular, en el grupo tratado con Veh se observó una severa despoblación en las diferentes regiones del cuerno de Ammon, en comparación con el grupo Sham (CA1: $p < 0.001$; CA2: $p < 0.001$; CA3: $p < 0.05$; CA4: $p < 0.001$) (Fig. 20B; Tabla 2).

En los grupos tratados con P4 o con THP, se observó igualmente una despoblación severa en las diferentes regiones en relación al grupo Sham, que en el caso de THP fue menor en CA4 (CA1: $p < 0.001$; CA2: $p < 0.01$; CA3: $p < 0.05$; CA4: $p < 0.01$ en el caso de P4 y $p < 0.05$ en el caso de THP) (Figs. 20B, 21 y 22; Tabla 2). En algunos animales tratados con progesterona se observó una preservación parcial de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, conservando su ubicación en una fila (Fig. 23).

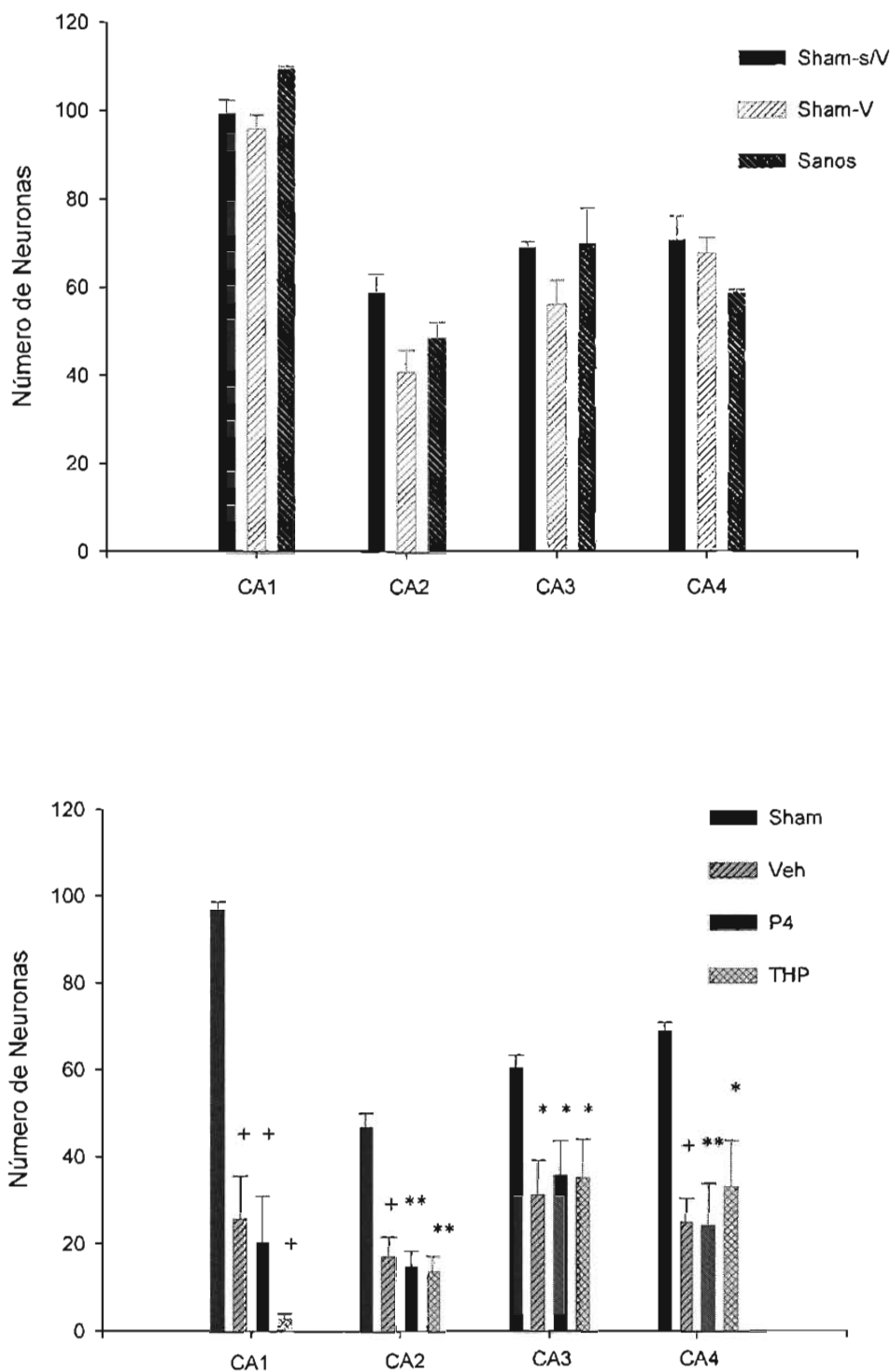


FIGURA 20. Población de neuronas piramidales (Promedio \pm EEM) presentes en áreas de $70\ 000\ \mu\text{m}^2$ de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 del cuerno de Ammon del hipocampo de ratas de los grupos testigo (A) o experimentales (B). A: Los grupos sometidos a maniobras simuladas (Sham-s/V y Sham-V) presentaron una población neuronal similar a la de los Sanos en las cuatro regiones estudiadas. B: Los grupos sometidos a ischemia (Veh, P4 y THP) presentaron una despoblación similar y significativa en las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 con respecto al grupo Sham.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; + $p < 0.001$.

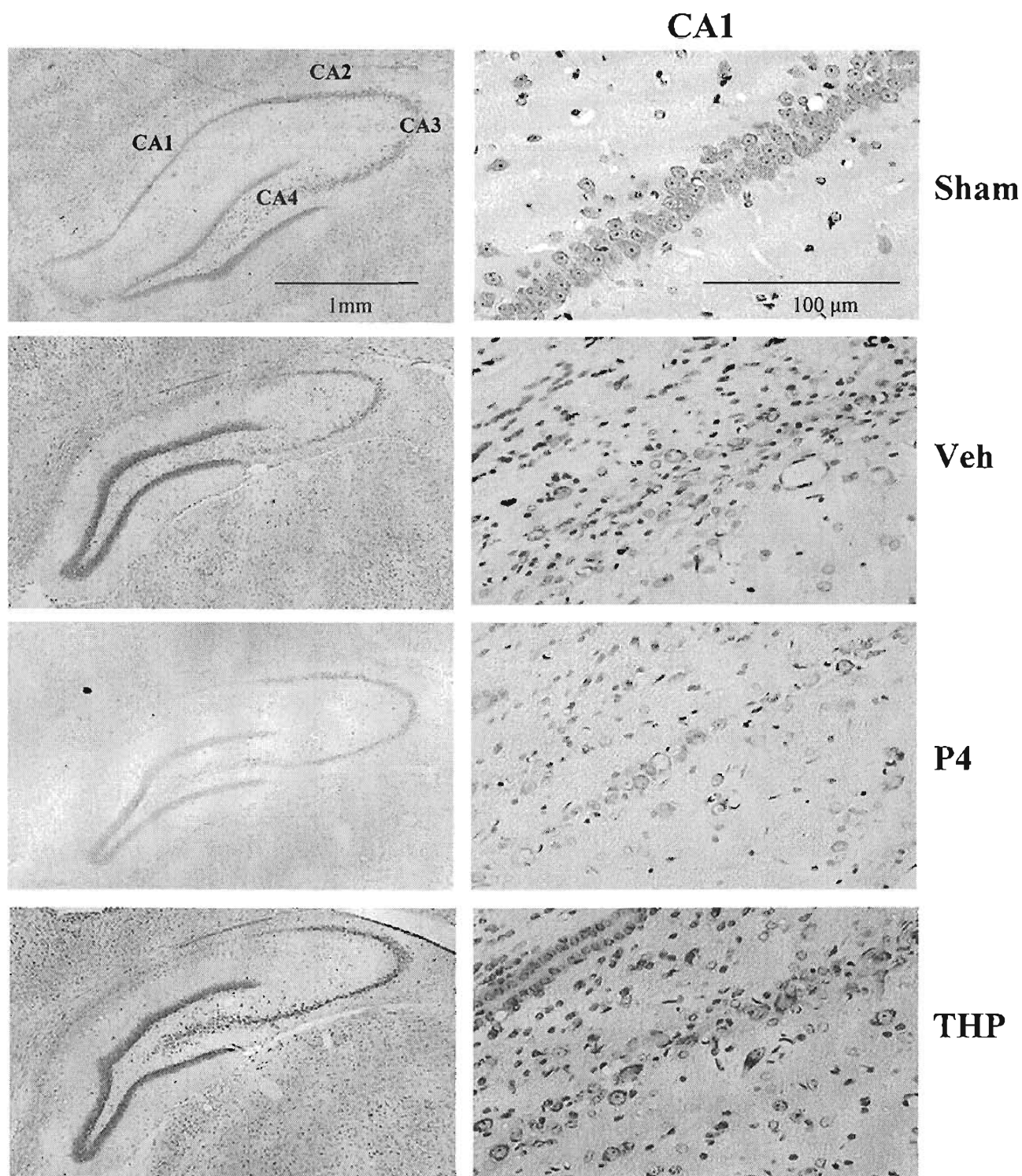


FIGURA 21. Cortes coronales representativos de los cerebros de las ratas sometidas a la manipulación sham (Sham) o a isquemia cerebral global y tratadas con Veh, P4 o THP. A la izquierda, se muestran las diferentes regiones que constituyen el cuerno de Ammon del hipocampo y a la derecha, la región CA1 del hipocampo a mayor amplificación. Nótese la despoblación severa y similar en CA1 en los animales de los grupos Veh, P4 y THP con respecto a la del grupo Sham. Tinción con violeta de cresilo. 40X y 400X respectivamente.

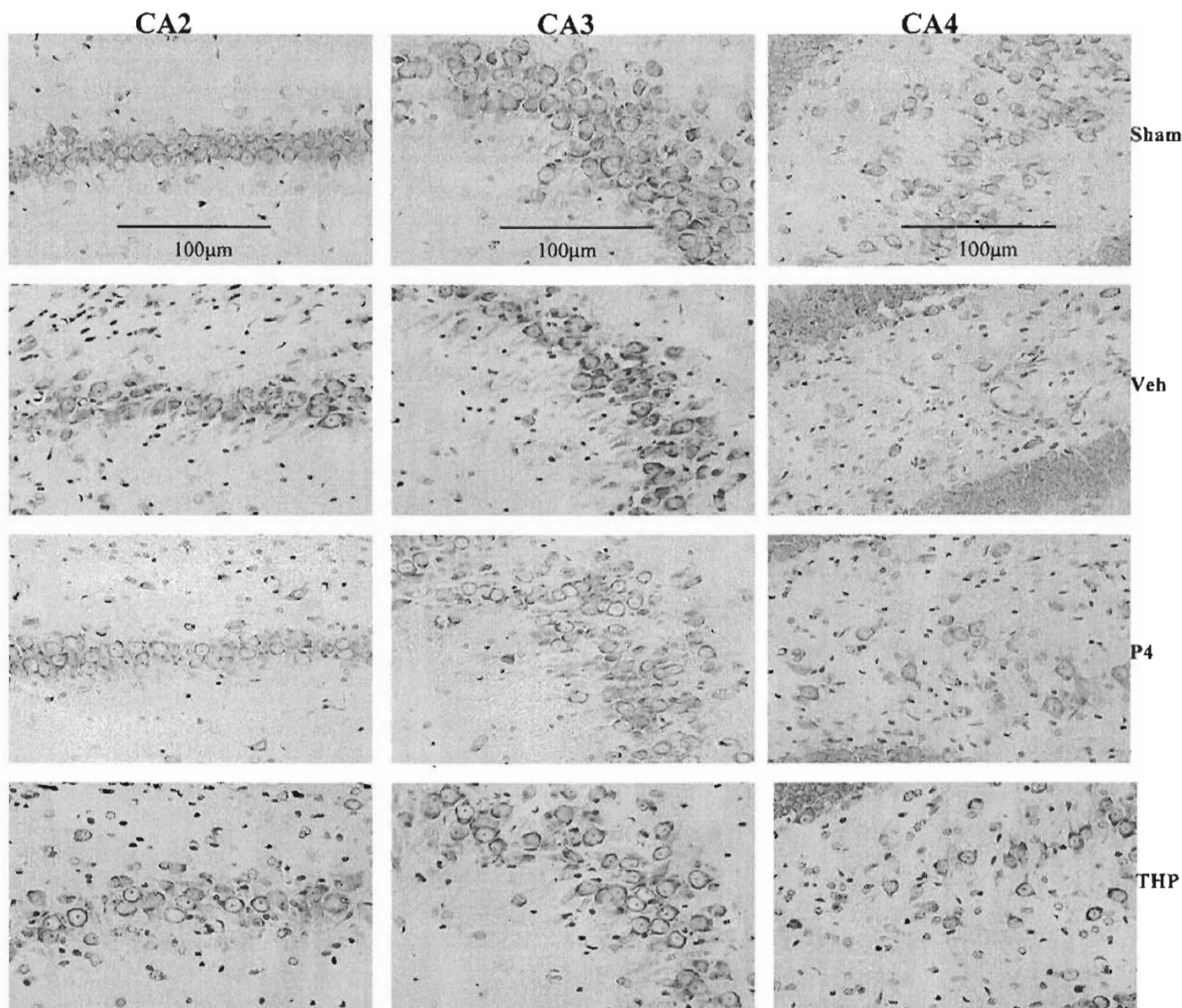


FIGURA 22. Cortes coronales representativos de los cerebros de las ratas sometidas a la manipulación sham (Sham) o a isquemia global y tratadas con Veh, P4 o THP. Se muestran imágenes representativas de las regiones CA2, CA3 y CA4. Nótese la despoblación parcial en CA2 y CA3, y CA4 en los animales de los grupos Veh, P4 y THP en comparación al grupo Sham. Tinción con violeta de cresilo. 400X.

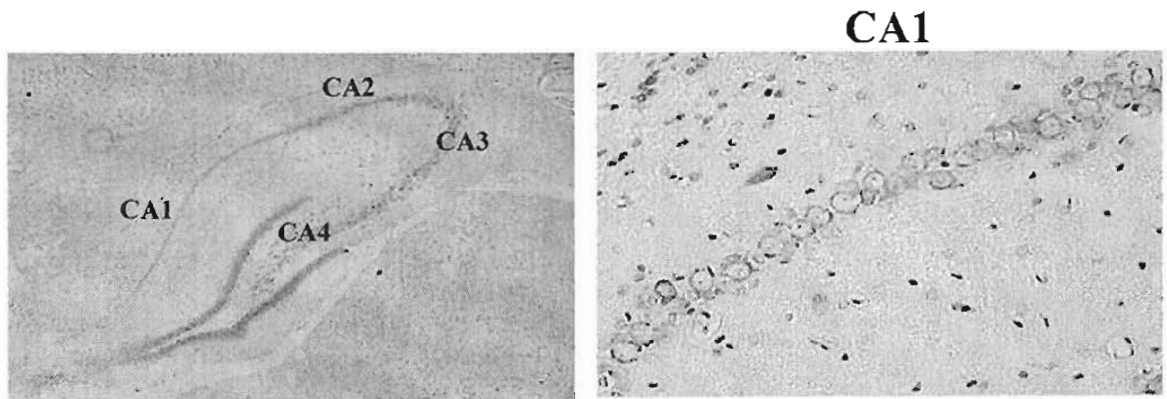


FIGURA 23. Cortes coronales del cerebro de una de las ratas sometidas a isquemia global y tratadas con P4. A la izquierda, se muestran las diferentes regiones que constituyen el cuerno de Ammon del hipocampo y a la derecha, la región CA1 del hipocampo a mayor ampliación. Nótese la preservación parcial de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, conservando su ubicación en una fila. Tinción con violeta de cresilo. 400X.

10. DISCUSIÓN.

En numerosos estudios se ha investigado el daño provocado por isquemia cerebral global aguda sobre la población neuronal de las estructuras cerebrales vulnerables a la isquemia (en particular del hipocampo) y sobre los indicadores de su estado funcional. No siempre se ha encontrado una correlación clara entre la pérdida neuronal en el hipocampo y las deficiencias del aprendizaje y la memoria. Estas discrepancias se deben en parte a diferencias en el modelo empleado, diferencias en la duración y en la severidad del episodio de isquemia, así como a diferencias en el tiempo post-isquemia en el que se han realizado estas evaluaciones. De ahí que el objetivo de este trabajo fue evaluar a largo plazo (3 meses post-isquemia) el efecto neuroprotector de la progesterona y de la alopregnanolona, administradas después de un episodio de isquemia severa, sobre algunas de las alteraciones funcionales del hipocampo y sobre la reducción de la población de neuronas piramidales de esta estructura cerebral, resultantes de esta condición.

MORTALIDAD

En el presente estudio, en forma similar a lo que ocurrió en los animales Sanos, no se presentó mortalidad en los animales de los grupos Sham-s/V y Sham-V, lo que demuestra que la manipulación anestésico-quirúrgica que implica el modelo de oclusión de los 4 vasos, sin provocar isquemia cerebral global, e inclusive la cauterización permanente de las arterias vertebrales, no representa un riesgo para la sobrevivencia de los animales. Ratas sometidas a manipulaciones quirúrgicas simuladas, con cauterización de las arterias vertebrales (grupo Sham-V en este estudio), constituyen en la mayoría de los estudios el grupo Sham o testigo experimental para evaluar los efectos de la isquemia. La mortalidad que se reporta para este tipo de animales en esos estudios también es nula (Herguido y cols, 1999,).

En contraste con los animales Sham, la isquemia provocó una alta mortalidad en los animales tratados sólo con vehículo (77%). Este valor coincide con los descritos por otros autores (70-84%) cuando el periodo de isquemia que utilizan es severo y superior a 15 minutos (Herguido y cols, 1999; Rosenbaum y cols, 1990). En algunos trabajos en los que el periodo de isquemia es menor a 15 minutos, la mortalidad es de alrededor del 50% (Pulsinelli y Brierley, 1979; Herguido y cols, 1999). Un periodo de isquemia menor a 15 minutos tiene la ventaja de lograr mayor sobrevivencia de los

animales, pero puede presentar la desventaja de que el daño neuronal a la región CA1 no sea suficiente para evidenciar déficits funcionales de aprendizaje y memoria (Gionet y cols, 1991).

Entre los factores que determinan la mortalidad de los animales sometidos a isquemia se encuentran los siguientes: el daño excitotóxico primario y secundario que se puede manifestar como crisis convulsivas en las primeras dos horas o hasta las 48 horas post-isquemia, especialmente luego de una isquemia muy severa; y el aumento de la presión intracraneana dada por el edema intracelular e intersticial, lo cual resulta en un daño secundario por compresión del tejido cerebral y por compresión de la microvasculatura, situación que prolonga la isquemia. El hecho de que los animales tratados con P4 o con THP hayan presentado una mortalidad significativamente menor a la de los animales tratados con Veh coincide con lo observado en gatas sometidas a isquemia cerebral global por paro cardiorrespiratorio (Cervantes M, Gonzalez-Vidal MD y Morali G, observaciones no publicadas) y en ratas sometidas al modelo de isquemia por 4-VO (Montes y cols. manuscrito en preparación), en las que el tratamiento con P4 varios días antes y después de la isquemia redujo significativamente la mortalidad. En el presente estudio, el tratamiento con P4 y con THP comenzó a administrarse 15 minutos después de iniciarse la reperfusión post-isquemia, de modo que varios de los fenómenos fisiopatológicos que ocurren durante la isquemia y en los primeros minutos de la reperfusión ya estaban presentes. Estos mecanismos incluyen el desbalance iónico resultante de la falla de energía y la excitotoxicidad mediada por el glutamato. Por lo tanto, es posible que la P4 y la THP administradas post-isquemia, hayan interferido más bien con el progreso de los mecanismos fisiopatológicos ya iniciados (excitotoxicidad) o hayan impedido o reducido la magnitud de fenómenos subsecuentes (edema cerebral) que contribuyen en mayor grado a la mortalidad. Los efectos de estas progestinas pueden atribuirse a la modulación positiva de los receptores GABA_A (Majewska, 1992; Mahesh y cols, 1996; Frye y Scalise, 2000) y a la modulación negativa de los receptores NMDA (Smith, 1991; Lockhart y cols, 2002), que reducen la excitabilidad neuronal y con ello la actividad epileptoide (Frye y Scalise, 2000; Hoffman y cols, 2003). También se ha descrito la reducción por P4 o THP del edema cerebral a través de varios mecanismos que incluyen la interferencia con los mecanismos iónicos responsables del edema citotóxico, así como la reducción de la formación de moléculas

proinflamatorias como la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de crecimiento transformante β 2 (TGF- β 2) y la NOS-2 (Betz y Coester, 1990; Limmroth y cols, 1996; Wright y cols, 2001; Gibson y cols, 2005).

La isquemia cerebral indujo en los animales tratados con Veh, un deterioro de la ejecución en las pruebas realizadas, con un curso temporal diferente al de los animales Sanos y los Sham, con persistencia de latencias largas y recorridos largos en el laberinto acuático de Morris (indicativos de alteraciones en el aprendizaje espacial), así como de errores en la memoria de trabajo en el laberinto radial de Olton, en días de prueba en los que los Sanos y los Sham ya alcanzaban el valor mínimo observado, en estos parámetros.

El hecho de que en el laberinto de Morris, la velocidad de nado no haya diferido entre los animales de los grupos Veh y Sham, significa que las mayores latencias de escape y distancias recorridas del grupo Veh no fueron debidas a alteraciones motoras provocadas por la isquemia y que hubieran persistido tres meses post-isquemia. Otros autores tampoco han encontrado diferencias en la velocidad de nado entre los animales Sham y los sometidos a isquemia (Nunn y cols, 1994; Block, 1999). De este modo, las latencias de escape largas así como las mayores distancias recorridas se pueden atribuir más bien a alteraciones en las estrategias de búsqueda de la plataforma en los diferentes días de prueba, las cuales se manifestaron como trayectorias variables con recorridos tanto internos como periféricos al azar, o con un mayor recorrido periférico en comparación con el grupo Sham. Estas alteraciones coinciden con las que se han descrito previamente por varios autores en estudios a corto plazo (menos de 30 días post-isquemia) (Nunn y cols, 1994; Olsen y cols, 1994; Hartman y cols, 2005) y en estudios a largo plazo (Nelson y cols, 1997; Nakatomi y cols, 2002).

Igualmente, en el laberinto de Olton, los animales sometidos a isquemia y tratados con Veh mostraron más errores de referencia y de trabajo que los Sham en los días 1-5 (bloque 1) y esta diferencia persistió en los días 6-10 (bloque 2) para los errores de trabajo, lo que indica sus alteraciones en la memoria. Esto coincide con estudios de otros autores en periodos de observación más largos (65 días consecutivos a partir del día 30 post-isquemia) en cuanto a que la memoria de trabajo, pero no la de referencia, permanece alterada en los animales sometidos a isquemia en comparación con los animales sham (Volpe y cols, 1984).

El que persista la diferencia en el número de errores de trabajo pero no de referencia con respecto al grupo Sham puede deberse, como se ha sugerido, a que la memoria de referencia es un reto menor para la rata que la de trabajo, por la asociación que hace el animal entre la presencia del alimento como reforzador en brazos que no cambian con respecto a las claves espaciales que también son constantes. En cambio, se considera que, el que la secuencia de visita de los diferentes brazos no sea la misma en los días sucesivos, hace más difícil para la rata el recordar qué brazos ya visitó (memoria de trabajo) (Volpe y cols, 1984; Volpe y cols, 1989). Es importante señalar que el tiempo en el que se ejecute la tarea de localizar los brazos con alimento, es un factor que influye sobre el número de errores de trabajo cometidos. Así, en estudios de otros autores utilizando una variante del laberinto radial para evaluar la memoria de trabajo en la que la rata debe recordar a corto plazo (luego de 10 seg) vs. mediano plazo (luego de un retardo de 5 min), qué brazo ya visitó, se ha encontrado que ratas con lesión del hipocampo dorsal pueden realizar mejor la tarea a corto plazo que a mediano plazo (Lee y Kesner, 2003), En el presente estudio, cabe mencionar que, si bien no se analizó en forma cuantitativa la memoria de corto vs. mediano plazo, se observó que cuando las ratas sometidas a isquemia terminaban la elección de los 5 brazos con alimento, en tiempos cortos (menos de 1 minuto), cometían menos errores de trabajo que cuando transcurrían tiempos mayores. Esto pudiera indicar la mejor integración de su memoria a corto, que a mediano plazo.

En contraste, el tratamiento con P4 o con THP se asoció con una ejecución similar a la del grupo Sham en el laberinto de Morris, con latencias de escape, distancias recorridas y estrategias de búsqueda de la plataforma similares; así como en el laberinto radial de Olton, como lo indica el número de errores de trabajo similar al del grupo sham en los días 6-10 (bloque 2), en tanto que este número de errores en el grupo Veh seguía siendo mayor. La similitud de los resultados entre los grupos Sham, P4 y THP muestra el efecto neuroprotector parcial de estos tratamientos sobre la integridad funcional del hipocampo al reducir las alteraciones del aprendizaje espacial, así como de la memoria de referencia y de trabajo.

Las alteraciones funcionales en los animales sometidos a isquemia y tratados con Veh estuvieron asociadas con una despoblación severa de la región CA1 del hipocampo; la despoblación de esta zona luego de un episodio de isquemia severo ha sido descrita por varios autores coincidiendo con

la mayor vulnerabilidad a la isquemia que se ha descrito para esta región. En el presente estudio, además de la región CA1, se observó despoblación severa en las regiones CA2, CA3 y CA4, hecho que ha sido descrito por otros autores cuando se somete a los animales a una isquemia severa de más de 20 minutos.

En la mayoría de los trabajos en los que se encuentran alteraciones funcionales en los animales sometidos a isquemia, se describe una correlación entre la pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo y los déficits de aprendizaje espacial. No obstante, cuando el daño neuronal de CA1 es parcial (menor al 70%, dado generalmente por periodos de isquemia menores a 15 minutos) la relación es pobre y variable; la relación es clara cuando la despoblación de CA1 es mayor al 70% (Hodges y cols, 1997; Nelson y cols, 1997; Block, 1999).

Por otra parte Nelson y cols. (1997) describieron que además del daño en CA1, existe daño significativo en CA3 en ratas sometidas a un periodo de isquemia de 20 minutos; ellos observaron que las deficiencias en el laberinto acuático eran máximas cuando había daño en CA1 y CA3 y propusieron que el daño a CA3 tenía un efecto aditivo al de CA1. Los resultados del presente estudio coinciden con los de estos autores puesto que los animales del grupo Veh que tuvieron mayor pérdida neuronal tanto en CA1 como en CA3 son los que mostraron mayores deficiencias en el laberinto acuático. Cabe mencionar que algunos de los animales de este grupo mostraron alteraciones en el laberinto acuático pese a no haber tenido despoblación severa en CA1, pero sí en CA3. Estos resultados sugieren un papel importante de la región CA3, además de CA1, en el aprendizaje espacial. Estudios con lesiones neurotóxicas en la región CA3 han mostrado alteraciones en las evaluaciones hechas en el laberinto acuático (Handelmann y Olton, 1981; Jarrard, 1997). Además, en un modelo propuesto por Redish y Touretzky (1998), se sugiere que las rutas aprendidas en el laberinto acuático son almacenadas en las conexiones colaterales recurrentes de las neuronas piramidales de CA3. Las alteraciones de la memoria de referencia y de la memoria de trabajo en los animales tratados con Veh también estuvieron asociadas a la despoblación severa en CA1 y/o en CA3. Otros autores han observado alteraciones en la memoria de referencia y de trabajo también en relación con pérdida neuronal en CA1 y en menor grado en CA3, en ratas sometidas a isquemia (Volpe y cols. 1984), en ratas con lesión en CA3 por ácido kainico (Handelmann y Olton, 1981) o con lesiones en la fimbria-

fórnix (Olton, 1984). Estos datos indican la participación de la región CA3, además de CA1, en estos tipos de memoria.

De manera similar a otros autores (Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Matsuyama y cols, 1993), además de la severa despoblación de CA1 y CA3, la isquemia global provocó una despoblación significativa en la región CA4. No obstante que se ha reconocido a las neuronas de CA4 como muy vulnerables a la isquemia, en particular aquellas positivas a somatostatina (Johansen y cols, 1987; Matsuyama y cols, 1993), su papel en el aprendizaje espacial no se ha determinado ampliamente. Sin embargo, en la opinión de algunos autores (Nelson y cols, 1997) es necesario examinar la relación entre las deficiencias del aprendizaje espacial y la pérdida de neuronas no piramidales en CA4 que pudiera también afectar la ejecución en pruebas cognoscitivas. Otro factor que pudiera afectar la ejecución de los animales en la prueba de Morris es el daño de áreas extrahipocámpicas (cuerpo estriado, corteza cerebral) que puede ocurrir luego de una isquemia severa (Pulsinelli y Brierley, 1979; Smith y cols, 1984; Cervantes y cols, 2002) y que participan en el aprendizaje espacial (Djebaili y cols, 2004).

En el presente trabajo, en los animales tratados con Veh, la despoblación severa de las diferentes regiones del hipocampo fue la esperada puesto que no hubo oposición a los diversos mecanismos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia como el que hubiera ocurrido a través de una intervención terapéutica de neuroprotección. Por otra parte, los mecanismos endógenos que pudieran oponerse a los mecanismos de daño desencadenados por el periodo de isquemia severo de 20 minutos, tampoco impidieron la muerte neuronal masiva en el hipocampo. Además, el hecho de que la despoblación del hipocampo de los animales de este grupo se haya relacionado con alteraciones funcionales después de 3 meses, indica que por su parte, los mecanismos plásticos de reparación no fueron suficientes para recuperar la integridad funcional de los circuitos alterados. Probablemente en la escasa población de células sobrevivientes del grupo Veh, las alteraciones neuroquímicas, electrofisiológicas o citoarquitectónicas que han sido descritas luego de un episodio de isquemia (Hori y Carpenter 1994; Matesic y Lin, 1994; Corbett y Nurse, 1998) fueron permanentes e impidieron una reconexión de los circuitos alterados, que en su caso, pudiera haber sido compatible con las funciones en las que participa el hipocampo.

En los animales tratados con Progesterona o alopregnanolona, pese a que su ejecución en las pruebas de aprendizaje y memoria fue en la mayoría de los parámetros, similar a la de los animales Sham, se encontró una despoblación neuronal severa en las diferentes regiones del hipocampo, similar a la de los animales tratados con Veh. Esto pudo deberse a que los tratamientos fueron administrados 15 min después de iniciada la reperfusión, cuando los mecanismos tempranos de daño inducidos por la isquemia (despolarización anóxica, excitotoxicidad por glutamato, inicio del daño oxidativo) ya se habían iniciado. Es posible que la administración de P4 o de THP haya interferido más bien con el progreso de estos mecanismos fisiopatológicos a través de la modulación positiva de los receptores GABA_A (Mahesh y cols, 1996; Frye y Scalise, 2000), modulación negativa de los receptores NMDA (Smith, 1991; Lockhart y cols, 2002), interacción con los receptores σ (Bergeron y cols, 1996; Schumacher y cols, 2000), o reduciendo la magnitud de fenómenos celulares anormales que contribuyen adicionalmente al daño y contra los cuales se han demostrado los efectos de estas hormonas, tales como el edema cerebral (Betz y Coester, 1990; Limmroth y cols, 1996; Wright y cols, 2001; Gibson y cols, 2005), los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno (Roof y cols, 1997) y eventos celulares proapoptóticos al incrementar la proteína Bcl-2 ((Nilsen y Brinton, 2002) y disminuir la caspasa 3 (Djebaili y cols, 2004).

En un trabajo realizado previamente por nuestro grupo de trabajo en gatas en el que el esquema de tratamiento incluyó la administración de la progesterona tanto pre- como post-isquemia, se observó a los 14 días post-isquemia una preservación significativa de las regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 del hipocampo (González-Vidal, 1998), este esquema de administración demostró ser exitoso posiblemente por haber interferido con algunos de los mecanismos de daño iniciales que ocurren durante la isquemia o en las etapas tempranas de la reperfusión. En otro estudio realizado en el laboratorio, se observó a los 21 días post-isquemia una preservación parcial pero significativa de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA2 del hipocampo en ratas tratadas con progesterona a partir de los 15 minutos después de un episodio de isquemia global (Moralí y cols, 2005); aunque la dosis y el esquema de administración fueron similares a los del presente estudio, la mayor preservación neuronal en ese trabajo pudiera haberse debido a que el periodo de isquemia fue de menor severidad (15 minutos) que la del presente estudio. Además, en los dos estudios citados la

evaluación histológica se realizó a los 14 y 21 días post-isquemia respectivamente, en tanto que en el presente estudio, se realizó aproximadamente 4 meses post-isquemia, al término de las evaluaciones conductuales, existiendo la posibilidad de que la muerte neuronal haya continuado después de los 21 días post-isquemia. Este fenómeno de muerte neuronal tardía adicional a la muerte masiva que ocurre en los primeros días después de la ischemia, ha sido descrito en diversos trabajos. Por ejemplo en gerbos se ha observado que la hipotermia post-isquemia preserva 90% de las neuronas de CA1 cuando se evaluó a 30 días, pero sólo 70% cuando la evaluación fue realizada a los 6 meses post-isquemia (Colbourne y Corbett, 1995).

Dado que no se encontraron diferencias en la población de neuronas piramidales en los distintos campos del cuerno de Ammon del hipocampo entre los animales tratados con Veh, con P4 o con THP, en contraste con la mejor ejecución en las pruebas de aprendizaje y memoria de los grupos tratados con estas hormonas, es razonable pensar que las funciones no sólo dependen del número de neuronas remanentes sino de la manera como están organizadas. Otros autores también han encontrado menores alteraciones del aprendizaje espacial en los animales tratados con progesterona (post-lesión) luego de daño traumático a la corteza cerebral (Goss y cols, 2003) y luego de ischemia focal, a pesar de no haberse reducido el volumen de la lesión y del infarto respectivamente.

Es posible que bajo las condiciones de severidad del episodio de ischemia utilizados en el presente estudio, la dosis o el esquema de tratamiento con P4 o con THP no haya sido suficiente para impedir la muerte neuronal. Sin embargo, la preservación funcional sugiere que estos tratamientos pudieron dar lugar a condiciones tisulares diferentes a las del grupo tratado sólo con Veh, que permitieron no sólo reducir los procesos celulares de daño sino que también promovieron procesos de reparación celular y de neuroplasticidad.

En relación con lo anterior, se sabe que P4, disminuye la gliosis reactiva y la proliferación de astrocitos luego de daño cerebral por lesión penetrante (García-Estrada y cols, 1993), aumenta el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en el hipocampo (Gibbs, 1999) y luego de daño en la médula espinal (González y cols, 2004). Además tanto P4 como THP promueven la síntesis de mielina después de daño a nervios periféricos (Koenig y cols, 1995; Azcoitia y cols 2003;) y en el SNC (Ghoumari y cols, 2003; Ibañez y cols, 2004). Estos efectos de P4 o THP, pudieran haberse sumado a

los mecanismos endógenos de recuperación; y en conjunto, favorecer la recuperación plástica de los circuitos neuronales alterados permitiendo así también la recuperación funcional del hipocampo mostrada en las pruebas de aprendizaje y memoria. De manera similar, se ha demostrado que la infusión intraventricular de factores de crecimiento (factor de crecimiento de fibroblastos, FGF-2 y el factor de crecimiento epidermal, EGF) promueve la sinaptogénesis y reduce las deficiencias del aprendizaje y memoria espaciales provocadas por la isquemia (Nakatomi y cols, 2002).

Otra posibilidad de la recuperación funcional en los animales tratados con P4 o con THP con respecto a los de Veh, es la participación de otras estructuras cerebrales diferentes al hipocampo en el aprendizaje y la memoria. Se ha reportado en estudios con lesión al hipocampo y/o a la corteza prefrontal que una vez que se provoca daño al hipocampo, la corteza es capaz de mantener la memoria de trabajo a corto plazo (10 segundos) evaluada en el laberinto radial de Olton, pero no a mediano plazo (5 minutos), en tanto que el hipocampo es capaz de mantener la ejecución de ambas tareas, a pesar de la lesión permanente de la corteza (Lee y Kesner, 2003).

Los resultados obtenidos en los grupos testigo muestran que los procedimientos anestésico-quirúrgicos y/o la cauterización permanente de las arterias vertebrales a los que fueron sometidos los animales de los grupos Sham-s/V y Sham-V provocaron sólo un discreto deterioro en algunos indicadores de la integridad funcional del hipocampo (retraso de un día en el aprendizaje espacial en comparación con los animales Sanos y aumento de la latencia de los Sham-V en comparación con los Sanos, para pasar por el sitio previamente ocupado por la plataforma en la prueba de transferencia) pero en general no modificaron en forma significativa el aprendizaje y la memoria espaciales de los animales, ni su memoria de referencia y de trabajo. En particular, la posible disminución del flujo sanguíneo causada por la cauterización permanente a largo plazo de las arterias vertebrales, dos de las cuatro principales arterias que llevan flujo sanguíneo al cerebro, no parece haber sido suficiente para provocar alteraciones funcionales severas (ni pérdida neuronal en el hipocampo). Aunque hay poca información al respecto, existe la posibilidad de que el flujo sanguíneo que persistió a través de las carótidas haya sido suficiente para compensar esta reducción. Otros autores también han mostrado que la cauterización permanente de las arterias vertebrales no afecta la ejecución de las ratas en el laberinto

acuático de Morris con respecto a los sanos (Nunn y cols, 1994), en tanto que la oclusión permanente de las carótidas provoca pérdida de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo y alteraciones de la memoria (De la Torre y cols, 1993; Pappas y cols, 1996). Al parecer el grado de hipoperfusión es el que determina que se manifieste daño histológico y funcional ya que gerbos sometidos durante 8 semanas a una reducción del 25% del flujo sanguíneo cerebral, muestran una disminución de la proteína MAP-2 y alteraciones funcionales pese a no existir pérdida neuronal en el hipocampo (Kudo y cols, 1990). Se puede considerar que en el presente estudio, en el caso del grupo Sham-V no se presentaron alteraciones funcionales significativas debido a que el grado de hipoperfusión fue bajo; sin embargo, no se puede descartar un posible daño gradual más lento que se pudiera manifestar en evaluaciones realizadas a mayor tiempo post-isquemia.

Queda por explorar si otras dosis de P4 o de THP, o bien otros esquemas de tratamiento post-isquemia pudieran ser más efectivos para reducir la pérdida neuronal en el hipocampo que permita una mejor recuperación funcional. También resulta interesante estudiar como se encuentra reestructurada la citoarquitectura neuronal de los animales tratados con P4 o con THP, que permitió la recuperación funcional mostrada en este trabajo.

11. CONCLUSIONES

1. El episodio de isquemia cerebral global provocó una alta mortalidad en las ratas del grupo Veh. Las ratas que sobrevivieron el periodo de prueba post-isquemia (90 días) presentaron una despoblación severa en el cuerno de Ammon del hipocampo que se asoció con alteraciones significativas de su aprendizaje espacial y de la memoria de trabajo.

2. El tratamiento con P4 o con THP administrado luego de 15 minutos de iniciada la reperusión post-isquemia, como parte de sus efectos neuroprotectores, redujo significativamente la mortalidad de los animales posiblemente al interferir con algunos de los mecanismos de daño provocados por la isquemia.

3. Estos tratamientos ejercieron un efecto neuroprotector parcial sobre la integridad funcional del hipocampo, luego de un episodio de isquemia global, al reducir en forma significativa las alteraciones del aprendizaje espacial y de la memoria de trabajo.

4. El efecto neuroprotector parcial de P4 y de THP sobre la integridad funcional del hipocampo se puso de manifiesto pese a la despoblación neuronal severa del cuerno de Ammon.

5. Lo anterior sugiere que el tratamiento con P4 o con THP pudo dar lugar a condiciones tisulares que permitieron no sólo reducir los procesos celulares de daño sino que también promovieron procesos de reparación celular y de neuroplasticidad.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkayed NJ, Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke* 2000; 31:161-168.
- An G, Lin TN, Liu JS, Xue JJ, He YY, Hsu CY. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 1993; 33:457-464.
- Auer RN, Jensen ML, Wishaw IQ. Neurobehavioural deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus. *J Neurosci* 1989; 9:1641-1647.
- Azcoitia I, Fernández-Galaz C, Sierra A, Garcia-Segura LM. Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J Neurocytol* 1999; 28:699-710.
- Azcoitia J, Leonelli E, Magnaghi V, Veiga S, García-Segura LM, Melcangi RC. Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiol Aging* 2003; 24:853-860.
- Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* 1998; 29:1937-1951.
- Beck T, Lutz B, Thole U, Wree A. Assessing chronic brain damage by quantification of regional volumes in postischemic rat brains. *Brain Res* 1993; 605:280-286.
- Bergeron R, De Montigny C, Debonnel G. Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neurosci* 1996; 16:1193-1202.
- Betz AL, Coester HC. Effect of steroids on edema and sodium uptake on the brain during focal ischemia in rats. *Stroke* 1990; 21:1199-1204.
- Bleyaert AL, Nemoto EM, Safar P, Stezoski W, Mickel JJ, Moossy J, Rao GR. Thiopental amelioration of brain damage after global cerebral ischemia in monkeys. *Anesthesiol* 1978; 49:390-398.
- Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol* 1999; 58:279-295.
- Block F, Schwarz M. Global ischemia neuronal damage relates to behavioural deficits: a pharmacological approach. *Neuroscience* 1998; 82:791-803.
- Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24:133-150
- Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 1208-1214.
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY-T, Ginsberg MD. Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci Lett* 1989; 101:299-304.

- Busto R, Dietrich WD, Globus MY-T, Valdés I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7:729-738.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *NeuroReport* 1998; 9:3993-3996.
- Capdeville C. Méthodes d'appréciation du déficit neurologique induit par une ischémie cérébrale transitoire chez le rat éveillé. *J Pharmacol (Paris)* 1984; 15:231-237.
- Cervantes M, González-Vidal MD, Ruelas R, Escobar A, Morali G. Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res* 2002; 33:6-14.
- Cervantes M, Ruelas R, Chávez-Carrillo I, Contreras-Gomez A, Antonio-Ocampo A. Effects of propofol on alterations of multineuronal activity of limbic and mesencephalic structures and neurological deficit elicited by acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res* 1995; 26:385-395.
- Cervantes M, Ruelas R, Sánchez R, Alvarez-Resendiz G. Brain injury following cardiorespiratory arrest in cats. Effects of Alfaxalone-Alphadolone. *Bol Estud Med Biol* 1989; 37:17-27.
- Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27:1124-FALTA
- Chan JR, Phillips LJ, Glaser M. Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:10459-10464.
- Chen J, Nagayama T, Jin K. Induction of caspase3like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998; 18:4914-4928.
- Chen J, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler RA, et al. Expression of the apoptosis effector gene bax is upregulated in vulnerable hippocampal neurons following global ischemia. *J Neurochem* 1996; 67:64-71.
- Chen J, Chopp M, Li Y. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci* 1999; 171:24-30.
- Choi JM, Romeo RD, Brake WG, Bethea CL, Rosenwaks Z, McEwen BS. Estradiol increases pre- and post-synaptic proteins in the CA1 region of the hippocampus in female rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 2003; 144:4734-4738.
- Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP. Global ischemia activates nuclear factor-kB in forebrain neurons of rats. *Stroke* 1997; 28:1073-1081.
- Clifton GL, Taft WC, Blair RE, Choi SC, Delorenzo RJ. Conditions for pharmacologic evaluation in the gerbil model of forebrain ischemia. *Stroke* 1989; 20:1545-1552.
- Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci* 1999; 19: 4200-4211.
- Colbourne F, Corbett D. Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil. *Brain Res* 1994; 654:265-272.

- Colbourne F, Corbett D. Delayed postischemic hypothermia: A six months survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J Neurosci* 1995; 15:7250-7260.
- Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Progress in Neurobiology* 1998; 54:531-548.
- Cottrell JE. Possible mechanisms of pharmacological neuronal protection. *J Neurosurg Anesthesiol* 1995; 7:31-37.
- Davies MG, Hagen P. The vascular endothelium. *Annals Surg* 1993; 218:593-609.
- Davis HP, Tribuna J, Pulsinelli WA, Volpe BT. Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. *Physiol Behav* 1986; 37:387-392.
- De la Torre JC, Fortin T, Park GA, Pappas BA, Richard MT. Brain blood flow restoration "rescues" chronically damaged rat CA1 neurons. *Brain Res* 1993; 623:6-15.
- Díez-Tejedor E, Del Bruto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. *Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. Rev Neurol* 2001; 33:455-464.
- Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience* 2004; 123:349-359.
- Downie MM, Heath RW. *Basic Statistical Methods*. Harper & Row, New York, 1983. pp. 347.
- Duvdevani R, Roof RL, Fulop Z, Hoffman SW, Stein DG. Blood-brain barrier breakdown and edema formation following frontal cortical contusion: does hormonal status play a role?. *J Neurotrauma* 1995; 12:65-75.
- Ferrer I, Ballabriga J, Martí E, Pozas E, Planas AM, Blasi J. BDNF and TrkB colocalize in CA1 neurons resistant to transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56:790-797.
- Ferrer I, Tortosa A, Macaya A, Sierra A, Moreno D, Munell F. Evidence of internucleosomal DNA fragmentation following hypoxiaischemia in the infant rat brain, and transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *Brain Pathol* 1994; 4:115-122.
- Finklestein SP, Fisher M, Furlan AJ, Goldstein LB, Gorelick PB, Kaste M, Lees KR, Traaystman RJ. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30:2752-2758.
- Frye CA, Scalise TJ. Anti-seizure effects of progesterone and 3 α , 5-THP in Kainic acid and perforant pathway models of epilepsy. *Psychoneuroendocrinology* 2000; 25:407-420.
- Gago N, Akwa Y, Sananes N, Guennoun R, Baulieu EE, El Etr M, et al. Progesterone and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism. *Glia* 2001; 36:295-308.
- Gao TM, Xu ZC. In vivo intracellular demonstration of an ischemia-induced postsynaptic potential from CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus. *Neurosci* 1996; 75:665-669.

- Garcia-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, Garcia-Segura LM. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res* 1993; 628:271-278.
- Ghoumari AM, Ibañez C, El-Etr M, Leclerc P, Eychenne B, O' Malley BW, Baulieu EE, Schumacher M. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slices cultures of rat cerebellum. *J Neurochem* 2003; 86:848-859.
- Gibbs RB. Treatment with estrogen and progesterone effects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res* 1999; 844:20-27.
- Gibson CL, Murphy SP. Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24:805-813.
- Gibson CL, Constantin D, Prior MJW, Bath PMW, Murphy SP. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2005; 193:522-530.
- Gionet TX, Thomas JD, Warner DS, Goodlett CR, Wassermann EA, West JR. Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats. *Stroke* 1991; 22:1040-1047.
- Gisvold SE, Safar P, Hendrick HL, Rad G, Moosy J, Alexander H. Thiopental treatment after global brain ischemia in pigtailed monkeys. *Anesthesiol* 1984; 60:88-96.
- González SL, Labombarda F, González Deniselle MC, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone up-regulates neuronal brain-derived neurotrophic factor expression in the injured spinal cord. *Neuroscience* 2004; 125:605-614.
- González SL, Labombarda F, González Deniselle MC, Mougél A, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone neuroprotection in spinal cord trauma involves up-regulation brain-derived neurotrophic factor in motoneurons. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2005; 94:143-149.
- González-Vidal MD, Cervera-Gaviria M, Ruelas R, Escobar A, Morali G, Cervantes M. Progesterone: Protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res* 1998; 29:117-124.
- Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. Estrogens attenuate and corticoesterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1996; 66:1836-1844.
- Goss CW, Hoffman SW, Stein DG. Behavioral effects and anatomic correlates after brain injury: a progesterone dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76:231-242.
- Gwag BJ, Won SJ, Kim DY. Excitotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in ischemic neuronal death. En: RCS Lin (ed.), *New Concepts in Cerebral Ischemia. Methods & New frontiers in Neuroscience*, CRC Press, Boca Raton EEUU, 2002. pp:79-112.

- Haddad GG, Jiang C. O₂ deprivation in the central nervous system: On mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Progr Neurobiol* 1993; 40:277-318.
- Hallmayer J, Hossman A, Mies G. Low dose of barbiturate for prevention of hippocampal lesion after brief ischemic episode. *Act Neuropathol* 1985; 68:7-31.
- Handelmann GE, Olton DS. Spatial memory following damage to hippocampal CA3 pyramidal cells with kainic acid: Impairment and recovery with preoperative training. *Brain Res* 1981; 217:41-58.
- Hansen AK, Lundbaek J. Ion distributions in brain during ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol* 1989; 1: 353-356.
- Hara H, Sukamoto T, Kogure K. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Progress in Neurobiology* 1993; 40:645-670.
- Hartman RE, Lee JM, Zipfeld GJ, Wozniak DF. Characterizing learning and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2005; 1043:48-56.
- Hata R, Mies G, Wiessner C, Hossmann KA. Differential expression of c-fos and hsp72 mRNA in focal cerebral ischemia of mice. *Neuroreport* 1998; 9:27-32.
- Hayashi T, Sakurai M, Itoyama Y, Abe K. Oxidative damage and breakage of DNA in rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res* 1999; 832:159-163.
- He J, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2004; 189:404-412.
- Herguido MJ, Carceller F, Roda JM, Avendaño C. Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats: a critical assessment. *Neuroscience* 1999; 93:71-80.
- Hodges H, Nelson A, Virley D, Kershaw TR, Sinden JD. Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: Prospects for transplant therapy. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1997; 56:763-780.
- Hockenberry D, Núñez G, Milliman CL, Scheriber RD, Korsmeyer SJ. Bcl2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-336.
- Hoffman GE, Moore N, Murphy AZ. Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. *Experimental Neurology* 2003; 182:124-134.
- Hori N, Carpenter DO. Functional and morphological changes induced by transiente *in vivo* ischemia. *Exp Neurol* 1994; 129:279-289.
- Hossmann KA.. Hemodynamics of postischemic reperfusion of the brain. En: *Current neurosurgical practice: Protection of the brain from ischemia*. Weinstein PR, Faden AL. (Eds). Williams and Wilkins. Baltimore. 1990. pp. 21-36.
- Hunter AJ, Mackay KB, Rogers DC. To what extent have functional studies of ischemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? *TIPS* 1998; 19: 59-66.
- Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. En: Walz W. Ed. *Cerebral ischemia. Molecular and Cellular Pathophysiology*. Humana Press. Totowa NJ 1999. pp. 3-32.

- Ibañez C, Shields SA, Liere P, El-Etr M, Baulieu EE, Schumacher M, Franklin RJM. Systemic progesterone administration results in a partial reversal of the age-associated decline in CNS remyelination following toxin-induced demyelination in male rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30:80.
- Ito U, Spatz M, Walker JT, Klatz I. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Acta Neuropath (Berl.)* 1975; 32:209-223.
- Jarrard LE. Selective hippocampal lesions and behavior: Effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Neurosci* 1997; 97:873-889.
- Jaspers RMA, Block F, Heim C, Sontag KH. Spatial learning is affected by transient occlusion of common carotid arteries (2VO): Comparison of behavioural and histopathological changes after “2VO” and “four vessel occlusion” in rats. *Neurosci Lett* 1990; 117:149-153.
- Jiang N, Chopp M, Stein D, Feit H. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res* 1996; 735:101-107.
- Johansen FF, Diemer NH. Enhancement of GABA neurotransmission after cerebral ischemia in the rat reduces loss of hippocampal CA1 pyramidal cells. *Acta Neurol Scand* 1991; 84:1-6.
- Johansen FF, Zimmer J, Diemer NH. Early loss of somatostatin neurons in dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes CA-1 pyramidal cell loss. *Acta Neuropathol (Berl)* 1987; 73:110-114.
- Johansson BB, Belichenko PV. Neuronal plasticity and dendritic spines: Effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:89-96.
- Jorgensen MB, Deckert J, Wright DC, Gehlert DR. Delayed *c-fos* proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: An in situ hybridation study. *Brain Res* 1989; 484:393-398.
- Jorgensen MB, Finsen BR, Jensen MB, Castellano B, Diemer NH, Zimmer J. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 1993; 120:70-88.
- Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology* 1989; 125:2083-2091.
- Kameyama M, Susuki J, Shirane R, Ogawa A. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat- Three vessel occlusion model. *Stroke* 1985; 16:489-493.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill/Interamericana Madrid España, 2001. pp. 1400.
- Kapinya K, Penzel R, Sommer C, Kiessling M. Temporary changes of the AP-1 transcription factor binding activity in the gerbil hippocampus after transient global ischemia, and ischemic tolerance induction. *Brain Res* 2000; 872:282-293.
- Kato K, Kogure K, Nakano S. Neuronal damage following repeated ischemia in the gerbil. *Brain Res* 1989; 479:366-370.

- Kawagoe JK, Abe S, Sato L, Nagano N, Nakamura S, Kogure K. Distributions of heat shock protein-70 mRNAs and heat shock cognate protein-70 mRNAs after transient global ischemia in gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12:794-801.
- Kenneth PM. Effects of γ -aminobutyric acid modulation on neuronal ischemia in rabbits. *Stroke* 1994; 25:2271-2275.
- Kiprianova I, Freiman TM, Desiderato S, Schwab S, Galmbacher R, Gillardon F, Spranger M. Brain derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. *Journal of Neuroscience Research* 1999; 56:21-27.
- Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemia cell damage. En: *Molecular mechanisms of ischemia brain damage*. Kogure K, Hossman KA, Siesjö BK, Welsh FA. (Eds). *Progress in Brain Res*. New York. Vol 63, 1985. pp.39-58.
- Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; 239:57-69.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Tsujimoto Y, Ohtsuki T, Kuwabara K, Matsushita K. Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of BCL-2 in transgenic mice. *Stroke*. 1998; 29:2616-2621.
- Kiyota Y, Miyamoto M, Nagaoka A. Relationship between brain damage and impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1991; 538:295-302.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressouches A, Guennoun R. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 1995; 268:1500-1502.
- Kogure K, Tanaka J, Araki T. The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. *Neurochem Pathol* 1988; 9:145-170.
- Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 1996; 272:1013.
- Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis alter ischemic brain insults. *Current Opinion in Neurobiology* 2003; 13:127-132.
- Kokaia Z, Nawa H, Uchino H, Elmer E, Kokaia M, et al. Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat. *Mol Brain Res* 1996; 38:139-144.
- Kondo Y, Ogawa N, Asanuma M, Ota Z, Mori A. Regional differences in late-onset iron deposition, ferritin, transferrin, astrocyte proliferation, and microglial activation after transient forebrain ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15:216
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19:312-318.
- Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen DE, Waeg G, Mattson MP. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* 1997; 17:5089-5100.

- Kubli-Garffias C, Cervantes M, Beber C. Changes in multiunit activity and EEG induced by the administration of natural progestins to flaxedil immobilized cats. *Brain Res* 1976; 114:71-81.
- Kudo T, Tada K, Takeda M, Nishimura T. Learning impairment and microtubule-associated protein 2 decrease in gerbils under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 1990; 21:1205-1209.
- Kumon Y, Kim SC, Tompkins P, Stevens A, Sakaki S, Loftus CM. Neuroprotective effect of postischemic administration of progesterone in spontaneously hypertensive rats with focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 2000; 92 :848-852.
- Lee I, Kesner RP. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci* 2003; 23:1517-1523.
- Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev* 2002; 39:55-73.
- Letchipía-Vallejo G, González-Burgos I, Cervantes M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. *Arch Med Res* 2001; 32:186-192.
- Limmroth V, Lee WS, Moskowitz MA. GABAA-receptor-mediated effects of progesterone, its ring-A-reduced metabolites and synthetic neuroactive steroids on neurogenic oedema in the rat meninges. *Br J Pharmacol* 1996; 117:99-104.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79:1431-1568.
- Lockhart EM, Warner DS, Pearlstein DH, Penning SM, Boustany RM. Allopregnanolone attenuates N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture. *Neuroscience letters* 2002; 328:33-36.
- López-Antúnez L. Anatomía funcional del sistema nervioso. Ed. Limusa, México D.F. 2000. pp. 783.
- Lu B, Figurov A. Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Reviews in the Neurosciences* 1997; 8:1-12.
- MacManus JP, Linnik MD. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17:815-832.
- Mahesh VB, Brann DW, Hendry LB. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 56:209.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 1986; 232:1004-1007.
- Matesic DF, Lin RCS. Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J Neurochem* 1994; 63:1012-1020.
- Matsuo Y, Kihara T, Ikeda M, Ninomiya M, Onodera H, Kogure K. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15:941-947.
- Matsuyama T, Tsuchiyama M, Nakamura H, Matsumoto M, Sugita M. Hilar somatostatin neurons are more vulnerable to an ischemic event than CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13:299-304.

- Mattson MP, Culmsee C. Pathogenesis of ischemic stroke. En: Mattson MP, ed., Pathogenesis of neurodegenerative disorders., Human Press. N. Jersey, 2001. pp. 190-215.
- McBean DE, Kelly PAT. Rodent models of global cerebral ischemia: A comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen Pharmac* 1998; 30:431-434.
- McCullough LD, Hurn PD. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:228-235.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Rev* 2001; 37:3-12.
- Minamisawa H, Nordstrom CH, Smith ML, Siesjö BK. The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10:365-374.
- Mitani A, Andou Y, Matsuda S, Arai T, Sakanaka M, Kataoka K. Origin of ischemia-induced glutamate efflux in the CA1 field of the gerbil hippocampus : An in vivo brain microdialysis study . *J Neurochem* 1994; 63:2152-2164.
- Miyazaki S, Katayama Y, Lyeth BG. Enduring suppression of hippocampal long-term potentiation following traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 1992; 585:335-339.
- Moller F, Smith ML, Siesjö BK. Effect of hypothermia on ischemic brain damage, a comparison between preischemic and postischemic cooling. *Neurosci Res Commun* 1989; 5:87-94.
- Moralí G, Itechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Montes P, Hernández-Morales L, Cervantes M. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neuroscience Letters* 2005; 382:286-290.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlings JNP, O'Keefe J. Place navigation is impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297:681-683.
- Murakami K, Kondo T, Epstein CL, Chan PH. Overexpression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke* 1997; 28:1797-1804.
- Murphy SJ, Littleton-Kearney MT, Hurn PD. Progesterone administration during reperfusion, but not preischemia alone, reduces injury in ovariectomized rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:1181-1188.
- Nakano S, Kato H, Kogure K. Neuronal damage in the rat hippocampus in a new model of repeated reversible transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1989; 178-180.
- Nakano S, Kogure K, Fujikura H. Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain. *Neuroscience* 1990; 38:115-124.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002; 110:429-441.
- Nelson A, Lebessi A, Sowinski P, Hodges H. Comparison of effects of global cerebral ischaemia on spatial learning in the standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance. *Behav Brain Res* 1997; 85:93-115.

- Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. *Molecular Neuropharmacology*. Ed McGraw-Hill. EUA 2001. pp. 539.
- Nilsen J, Diaz-Brinton R. Impact of progestins on estrogen-Induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 2002; 143:205-212.
- Nunn JA, LePeillet E, Netto CA, Hodges H, Gray JA, Meldrum BS. Global ischaemia: hippocampal pathology and spatial deficits in the water maze. *Behav Brain Res* 1994; 62:41-54.
- O'Reilly SM, Grubb NR, O'Carroll RE. In-hospital cardiac arrest leads to chronic memory impairment. *Resuscitation* 2003; 58:73-79.
- Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164:719-721.
- Olsen GM, Scheel -Krüger J, Moller A, Jensen LH. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. *Behav Neurosci* 1994; 108:681-690.
- Olton DS. Memory function and the hippocampus. En: Seifert W (ed), *Neurobiology of the Hippocampus*. N York, Academic Press. 1984.
- Olton DS, Samuelson RJ. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 1976; 2:97-116.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74:609-619.
- Pajovic S, Saicic ZS, Spacic MB, Petrovic VM, Martinovic JV. Effects of progesterone and estradiol benzoate on superoxide dismutase activity in the brain of male rats. *Experientia* 1996; 52:221-224.
- Pajovic S, Saicic ZS, Spacic MB, Petrovic VM. The effect of ovarian hormones on antioxidant enzyme activities in the brain of male rats. *Physiol Res* 2003; 52:189-194.
- Pappas BA, de la Torre JC, Davison CM, Keyes MT, Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res* 1996; 708:50-58..
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. N.York, 1986.
- Piantadosi CA, Zhang J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke* 1996; 27:327.
- Pulsinelli W. Selective neuronal vulnerability: Morfological and molecular characteristics. *Prog Brain Res* 1985; 63:29-37.
- Pulsinelli W, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982; 11:491-498.
- Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10:267-272.

- Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: Method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 1988; 19:913-914.
- Rami A. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiology of Disease* 2003; 13:75-88.
- Ramirez VD, Zheng J. Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Front Neuroendocrinol* 1996; 17:402-439.
- Redish AD, Tourestzky DS. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Computation* 1998; 10:73-111.
- Roof RL, Duvdevani R, Braswell L, Stein DG. Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats. *Exp Neurol* 1994; 129:64-69.
- Roof RL, Duvdevani R, Heyburn JW, Stein DG. Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp Neurol* 1996; 138:246-251.
- Roof RL, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol* 1997; 31:1-11.
- Roine RO. Global cerebral ischemia. En: Fisher M, Bogouslavsky J, eds., *Current Rev Cerebrovascular Dis., Current Medicine*. Philadelphia, 1997. pp. 159-164.
- Rosenbaum DM, Grotta JC, Pettigrew LC, Ostrow P, Strong R, Rhoades H, Picone CM, Grotta AT. Baclofen does not protect against cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1990; 21:138-140.
- Rosenberg GA. Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 42:209-216.
- Rupprecht P. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28:139-168.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 2001; 21:6221-6232.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing purkinje cell in rats. *Neuroscience Letters* 2002; 322:111-115.
- Sarraf-Yazdi S, Laskowitz D, Warner DS. Pathophysiology of ischemic brain damage. En: Shuaib A, Goldstein LB, eds., *Management of Acute Stroke.*, Marcel Dekker. N. York, 1999. pp. 243-277.
- Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: The pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24:351-371.
- Schmidt-Kastner R, Fliss H, Hakim AM. Subtle neuronal death in striatum after short forebrain ischemia in rats detected by in situ end-labeling for DNA damage. *Stroke* 1997; 28:163-170.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 1991; 40:599-636.
- Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud PL, Robel P, De Nicola AF, Baulieu EE. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: Trophic and protective effects. *Journal of Neurocytology* 2000; 29:307-326.

- Sekhon LHS, Morgan MK, Spence I, Weber NC. Chronic cerebral hypoperfusion and impairment neuronal function in rats. *Stroke* 1994; 25:1022-1027.
- Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, Rao SS, Weiz JH. Preferential Zn^{2+} influx through Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2414.
- Shapiro HM. Barbiturates in brain ischemia. *Br J Anaest* 1985; 57:82-95.
- Shuaib A, Ijaz S, Hasan S, Kalra J. Gamma-vinyl GABA prevents hippocampal and substantia nigra reticulata damage in repetitive transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1992; 590:13-17.
- Shuaib A, Ijaz S, Kanthan R. Clomethiazole protects the brain in transient forebrain ischemia when used up to 4 h after the insult. *Neurosci Lett* 1995; 197:109-112.
- Siegel S. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Trillas, México, 1970. pp. 346.
- Siesjö BK, Katsura K, Kristián T. The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthesiol* 1995; 7:47-52.
- Smith ML, Auer RN, Siesjö BK. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1984; 64:319-332.
- Smith SS. Progesterone administration attenuates excitatory amino acid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 1991; 42:309-320.
- Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* 2001; 24:386-391.
- Susuki R, Yamaguchi T, Inaba Y, Wagner HG. (1985). Microphysiology of selectively vulnerable neurons. En: *Molecular mechanisms of ischemic brain damage*. Kogure K, Hossman KA, Siesjö BK, Welsh FA. (Eds.). Progress in Brain Research. Elsevier Science Publ. Co., New York. 63:59-68.
- Teyler TJ, Discenna P. The topological anatomy of the hippocampus: a clue to its function. *Brain Res Bull* 1984; 12:711-719.
- Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, Shaffrey CI, Chopp M. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine* 1999; 24:2134-2138.
- Todd MM, Chadwick HS, Shapiro HM, Dunlop BJ, Marshall LF, Dueck R. The neurologic effects of thiopental therapy following experimental cardiac arrest in cats. *Anesthesiology* 1982; 57:76-87.
- Todd NV, Picozzi P, Crockard A, Russell RR. Reperfusion after cerebral ischemia: Influence of duration of ischemia. *Stroke* 1986; 17:460-466.
- Tomida S, Nowak J, Vass K, Lohr JM, Klatzo I. Experimental model for repetitive ischemic attacks in the gerbil: the cumulative effect of repeated ischemic insults. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7:773-782.
- Trachman H. Cell volume regulation: A review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances: II. *Pediatr Nephrol* 1992; 6:104-112.

- Tsubokawa H, Oguro K, Masuzawa T, Kawai N. Ca^{2+} -dependent non-NMDA receptor-mediated synaptic currents in ischemic CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 1994; 71:1190-1196.
- Valtysson J, Hillered L, Andine P, Hagberg H, Persson L. Neuropathological end points in experimental stroke pharmacotherapy: the importance of both early and late evaluation. *Acta Neurochir* 1994; 129:58-63.
- Veiga S, García –Segura LM, Azcoitia I. Propiedades neuroprotectoras de los esteroides sexuales y los neuroesteroides. *Rev Neurol* 2004; 39:1043-1051.
- Volpe BT, Davis HP, Colombo PJ. Preoperative training modifies radial maze performance in rats with ischemic hippocampal injury. *Stroke* 1989; 20:1700-1706.
- Volpe BT, Davis HP, Towle A, Dunlap WP. Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlate with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions. *Behav Neurosci* 1992; 106:457-464.
- Volpe BT, Pulsinelli WA, Tribuna J, Davis HP. Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia. *Stroke* 1984; 15:558-562.
- Wagner SR, Lanier WL. Metabolism of glucose, glycogen, and high-energy phosphates during complete cerebral ischemia. *Anesthesiol* 1994; 81:1516-1526.
- Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nature Neuroscience* 2003; 6:1039-1046.
- Wang KWK. Calpain and caspase in ischemic and traumatic brain injury. En: RCS Lin (ed.), *New Concepts in Cerebral Ischemia. Methods & New frontiers in Neuroscience*, CRC Press, Boca Raton EEUU, 2002. pp:79-112.
- Wieloch T. Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *Progress in Brain Res* 1985; 63:69-85.
- Wright DW, Bauer ME, Hoffman SW, Stein DG. Serum progesterone levels correlate with decreased cerebral edema after traumatic brain injury in male rats. *J Neurotrauma* 2001; 18:901-909.
- Woolley CS, McEwen BS. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 1993; 336:293-306.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 1986; 6:2950-2967.