



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTOS DE LA PROGESTERONA SOBRE LA SÍNTESIS DEL FACTOR
NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) Y EL FACTOR DE
CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) EN CEREBROS DE RATAS SOMETIDAS A
ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TOMAS MONFIL DE LOS SANTOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Gabriela Morali de la Brena
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

COMITÉ TUTOR: Dra. Patricia de Gortari Gallardo
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
Dra. Lourdes Massieu Trigo
Instituto de Fisiología UNAM

MÉXICO, D.F., Agosto 2013.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTOS DE LA PROGESTERONA SOBRE LA SÍNTESIS DEL FACTOR
NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) Y EL FACTOR DE
CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) EN CEREBROS DE RATAS SOMETIDAS A
ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TOMAS MONFIL DE LOS SANTOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Gabriela Morali de la Brena
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

COMITÉ TUTOR: Dra. Patricia de Gortari Gallardo
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
Dra. Lourdes Massieu Trigo
Instituto de Fisiología UNAM

MÉXICO, D.F., Agosto 2013.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 11 de marzo de 2013, aprobó el jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MONFIL DE LOS SANTOS TOMAS** con número de cuenta **511012349**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA SÍNTESIS DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) Y EL FACTOR DEL CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) EN CEREBROS DE RATA SOMETIDA A ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA"**, bajo la dirección de la **DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA**:

Presidente: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMAN
Vocal: DR. DANIEL REMBAO BOJÓRQUEZ
Secretario: DRA. PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI GALLARDO
Suplente: DRA. ALMA ORTIZ PLATA
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de mayo de 2013

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme realizar mis estudios de posgrado y por iniciar mi formación como investigador. También agradezco el apoyo financiero **PAEP 2012** para asistir al 1º congreso FALAN y el 55º congreso organizado por la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.

Al **CONACYT** por el apoyo económico brindado durante la maestría (No. Becario: **249651**) lo cual fue de mucha ayuda y facilitó mi estancia durante el tiempo en que se realizó este proyecto.

Un profundo agradecimiento a la **Dra Patricia De Gortari Gallardo** y a la **Dra. Lourdes Massieu Trigo** por aceptar y acompañar este proyecto formando parte del comité tutorial y además por el tiempo, dedicación y apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A toda mi familia que siempre me respaldo y especialmente a mis madre quien siempre me ha acompañado y motivado en los proyectos realizados y ha sido una gran fuerza impulsora en muchos aspectos **Meli** nuevamente y con todo mi ser te agradezco por todo.

A mi tutora la **Dra. Gabriela Morali** una vez más por guiar este proyecto, por el apoyo, confianza y muchas enseñanzas en esta nueva meta que hemos terminado, Gracias.

A **Erika Rodríguez** por su incansable apoyo y su amistad desde un principio, muchas gracias por tus consejos y paciencia.

A **Reyna** gracias por completarme, por la alegría y sabor que le das a la vida y vaya que le daras sabor!!!!... te amo, gracias por el total apoyo.

A **Clau** y **Ale** por su amistad y el apoyo en las horas de trabajo y en momento difíciles, sus consejos, algunas locuras compartidas y una extensa lista de agradecimientos, compañeras y amigas su bella amistad será recordada siempre.

A la **Dra. Patricia de Gortari** por aceptarme en su laboratorio, por una excelente atención a las necesidades del proyecto y una excelente amistad brindada, un profundo agradecimiento extrañare visitarle y esos excelentes fines de año pasados con ustedes.

A **Dania, Pau, David, Orlando, Amado, Paco, Mariana, Viri,** y todas las personas del laboratorio de Neurofisiología Molecular por su ayuda, amistad y los gratos momentos, también les extrañare mucho .

Al laboratorio de **Neurofisiología Molecular del Instituto Nacional de Psiquiatría Juan Ramón de la Fuente Muñis**, por permitirme usar sus instalaciones para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento especial a **Isabel Amaya** por todas las enseñanzas y la yuda, por integrarme al grupo de trabajo y ofrecerme un lugar con las mejores condiciones para trabajar, pero sobre todo por el cariño y la amistad que en todo momento recibí de tu parte te lo agradezco de todo corazón.

A las familias **Pacheco Santos y Santos Santiago** por recibirme en sus hogares y facilitar mi estancia en estos años muchas gracias.

DEDICATORIA

“El porvenir de un hijo es siempre obra de su madre”

Gracias mamá por darme tu cariño y amor, sin ti seguro mi vida no sería tan maravillosa como lo es hoy

INDICE.

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Isquemia Cerebral	4
Fisiopatología de la Isquemia Cerebral Global	7
Vulnerabilidad Neuronal Selectiva	10
Histopatología de la isquemia	13
Mecanismos de supervivencia y reparación ante la isquemia	14
Neurotrofinas	15
NGF.....	22
BDNF	24
Distribución de NGF y BDNF en el Sistema Nervioso Central	25
Receptores de NGF y BDNF	27
Neurotrofinas y daño cerebral	31
Estrategias farmacológicas de neuroprotección	34
ANTECEDENTES	34
OBJETIVOS	36
General	36
Particulares	36
HIPÓTESIS	36
MÉTODOS	37
Modelo de Isquemia Cerebral Global Aguda	37
Extracción y procesamiento de los cerebros	41

Extracción del RNAm	41
RT-PCR	42
Análisis estadístico	45
RESULTADOS	46
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolepropionico
AP-1	Factor de transcripción AP-1 (proteína activadora-1)
Apaf-1	Factor activador de peptidasa apoptótica-1
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
cDNA	DNA complementario
Ced-4	Proteína de muerte celular 4
DEPC	Di-etil pirocarbonato
DNA	Acido desorribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
Frs2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2
G3PDH	Gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa
GABA	Ácido γ -amino butírico
GDNF	Factor Neurotrófico Derivado de la Glia
GSHpx	Glutación peroxidasa
H2O2	Peróxido de hidrógeno
IFN- γ	Interferón γ
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
JNK	Cinasa c-Jun N terminal
LTD	Depresión a Largo Plazo

LTP	Potenciación a Largo Plazo
MAPK	Cinasa Activada por Mitógeno
MCAO	Oclusión de la Arteria Cerebral Media
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
NAD	Nicotinamida adenín dinucleótido
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofinas 4/5
-O	Radical anión superóxido
O _{as}	Oligo antisentido
O _s	Oligo sentido
P4	Progesterona
PARP	Polimerasa de poli-ADP ribosa
PI3K/AKT	Fosfoinositol-3 cinasa/AKT
PLC γ	Fosfolipasa C γ
PTB	Dominio de Union Fosfotirosina
Ras/Raf/ERK	Rat sarcoma/Acelerador rapido de fibroblastoma/cinasa regulada por señal extracelular
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa
SH2	Dominio 2 homologó Src
SOD	Superóxido dismutasa
Src2	Coactivador de receptor a esteroides 2
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante- β
TK	Receptores de la familia Tirocinasa
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α

TrkA	Receptor Tirosin-cinasa A
TrkB	Receptor Tirosin-cinasa B
TrkBFL	Receptor Tirosin-cinasa Full Lenght
TrkBT1	Receptor Tirosin-cinasa Truncado 1
TrkBT2	Receptor Tirosin-cinasa Truncado 2
TrkC	Receptor Tirosin-cinasa C
UTR 3'	Region no traducida-3'

RESUMEN

La isquemia cerebral global lleva a fenómenos fisiopatológicos que causan daño irreversible a grupos neuronales de regiones específicas, su magnitud varía dependiendo de la duración y severidad así como de la vulnerabilidad selectiva de estos grupos neuronales.

Además de los procesos de daño, la isquemia también activa mecanismos que contrarrestan el daño y promueven la reparación neuronal. Algunos de estos mecanismos son mediados por factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), se ha mostrado una disminución del daño neuronal cuando se administra exógenamente o cuando se induce su expresión endógena. La progesterona (P4) ejerce efectos neuroprotectores en varios modelos de daño, mediada en parte por las neurotrofinas como se ha demostrado en modelos de daño traumático al cerebro o en medula espinal.

En el presente estudio se evaluó el efecto de la progesterona en la expresión del RNAm de las neurotrofinas BDNF y NGF así como el receptor a BDNF el TrkB en el hipocampo de ratas después de isquemia cerebral global. Grupos de ratas macho Sprague-Dawley fueron tratados i.v. con progesterona (8mg/kg) (ISQ+P4) o con su vehículo (ISQ+VEH) a 15 min, 2, 6, 24, 48, 72 h después de un episodio transitorio de isquemia cerebral global (15 min) y un grupo de ratas intactas se utilizó como control. Se obtuvieron sus cerebros en fresco dos o siete días después de la isquemia, los homogenados de los cerebros se procesaron para cuantificar el contenido del RNAm de las neurotrofinas y TrkB por Reacción en Cadena de la Polimerasa-transcriptasa Reversa (RT-PCR). La isquemia cerebral global indujo a los dos días un incremento en la expresión de BDNF (161.5%) y de NGF (144.1%), así como una reducción de TrkB (85%) en comparación con los valores control. El tratamiento con progesterona incrementó la expresión de NGF (215.7%) y previno la reducción de la expresión del receptor TrkB revirtiéndolo a 173.3% del nivel control, dos días después de la isquemia. En el séptimo día después de la isquemia, la expresión de los RNAm's evaluados disminuyó a valores similares a los del grupo control. Estos resultados sugieren que al menos una parte de los efectos neuroprotectores de la progesterona en contra de la

isquemia cerebral global, pueden estar mediados por la expresión de BDNF, TrkB y NGF.

ABSTRACT

Global cerebral ischemia leads to pathophysiological phenomena causing irreversible damage to neuronal groups from specific regions, its magnitude varying with the severity and duration of ischemia, and the selective vulnerability of these neuronal groups. Besides damaging processes, ischemia also triggers mechanisms counteracting injury and promoting neuronal repair. Some of these mechanisms are mediated by neurotrophic factors as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF), decreasing neuronal injury when its endogenous expression is increased or when exogenously administered. Progesterone (P4) exerts neuroprotective effects in several models of damage, mediated in part by neurotrophins as demonstrated on traumatic injury to the brain and spinal cord. The aim of this study was to evaluate the effects of P4 on the expression of the BDNF, NGF and the tyrosine-kinase-B receptor (TrkB) mRNA, in the hippocampus of rats two or seven days after global cerebral ischemia. Two groups of rats were treated i.v. with either progesterone (8 mg/kg) (ISCH+P4), or its vehicle (ISCH+ VEH) at 15 min, 2, 6, 24, 48 and 72 h after a transient episode of global cerebral ischemia (15 min). Brains were obtained at two or seven days after ischemia and hippocampal homogenates processed for neurotrophins mRNA's by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Global cerebral ischemia induced an increase in the expression of BDNF (to 161.5%) and NGF (to 144.1%) though with a slight reduction of TrkB (to 85% of control values). P4 treatment enhanced the expression of BDNF (138.1%) and NGF (215.7%) and prevented the TrkB reduction reverting it to 137.3% of the control, two days after ischemia. By the seventh days after ischemia, expression of all mRNA's evaluated decreased towards control levels. Overall results suggest that the neuroprotective effects of P4 against global cerebral ischemia, may be mediated by BDNF, TrkB and NGF expression.

INTRODUCCIÓN

ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia cerebral es una alteración cerebrovascular que se origina por la reducción del flujo sanguíneo cerebral a valores por debajo de 10 ml/min/100 g de tejido, con lo que se reduce el 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, así como a la severidad y a la duración de la isquemia. La supresión o la reducción del aporte sanguíneo cerebral pueden limitarse a una parte del cerebro (isquemia focal) o afectar a este órgano en su totalidad (isquemia global) (Tabla 1). En los seres humanos, la isquemia focal ocurre por la oclusión durante periodos prolongados, de una arteria distante al círculo de Willis, muy frecuentemente la arteria cerebral media, de modo que en este tipo de isquemia se localiza una zona central 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 del flujo sanguíneo colateral (Roine,1996) (Fig.1). En esta zona de penumbra las estructuras 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 le denomina accidente isquémico transitorio si éste se revierte antes de las 24 horas o infarto cerebral si la duración de este episodio es superior a la 24 horas (Díez-Tejedor et al., 2001).

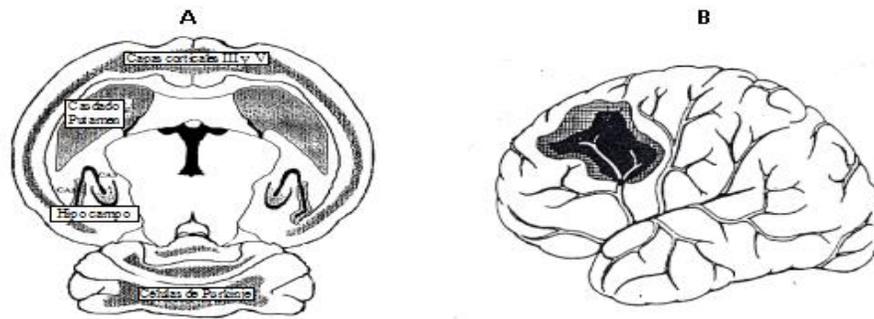


Figura 1. Representación esquemática de las zonas afectadas por una isquemia global vs focal. A) en la isquemia global todo el cerebro se halla en hipoperfusión sanguínea, pero hay zonas selectivamente vulnerables, como las que aquí se señalan. B) en la isquemia focal sólo el área específica del territorio de la arteria afectada se halla sin flujo sanguíneo.

En un episodio de isquemia cerebral global, usualmente relacionado con un paro cardíaco o con hipotensión severa, todo el cerebro se encuentra expuesto a la supresión o reducción del flujo sanguíneo y, por lo tanto, a los mecanismos fisiopatológicos de daño (Roine, 1996) (fig. 1). Sin embargo la reducción del suministro de oxígeno y glucosa al cerebro hasta concentraciones inferiores al 10% de lo normal, como ocurre durante la isquemia cerebral global aguda, provoca daño en estructuras cerebrales específicas consideradas como muy vulnerables que se manifiesta principalmente por la muerte de neuronas, entre las que se encuentran las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo, las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral, las neuronas espinosas del núcleo caudado y las células de Purkinje del cerebelo (Pulsinelli et al., 1982; Kogure et al, 1988; Siesjö et al, 1995; Sarraf- Yazdi et al, 1999).

Este daño provocado por la isquemia induce a su vez deterioro en aquellas funciones cerebrales cuya integración depende de las estructuras lesionadas. Así, tanto en modelos experimentales de isquemia global (Block, 1999) como en individuos que han sufrido esta patología (Zola-Morgan et al., 1986), por ejemplo en relación con un paro cardíaco y que ha dado como resultado un daño al hipocampo y a la corteza cerebral, se han descrito alteraciones cognoscitivas, afectivas y conductuales que frecuentemente se manifiestan en estados de

depresión y ansiedad, así como alteraciones en la capacidad de orientación espacial, la memoria de corto plazo y el aprendizaje motor, principalmente.

Tabla 1. Diferentes tipos de isquemia cerebral (Modificada a partir de Endres y Dirnagl, 2002).

MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA	POSIBLES CORRELACIONES EN HUMANOS	RESULTADOS HISTOLOGICOS
ISQUEMIA GLOBAL		
Permanente	Estrangulamiento Paro circulatorio Ahogamiento	Inflamación cerebral Muerte celular masiva
Transitoria (Isquemia/reperfusión)	Paro circulatorio con resucitación Ahogamiento con resucitación Hipotensión severa	Muerte celular tardía Astrogliosis
ISQUEMIA FOCAL		
Permanente (Oclusión de la Arteria Cerebral Media MCAO)	Infarto hemisférico (oclusión trombótica o embólica sin recanalización)	Pannecrosis Inflamación hemisférica
Transitoria prolongada (MCAO/Reperfusión)	Infarto con recanalización espontanea o terapia trombolítica (Daño por reperfusión)	Pannecrosis Inflamación
Transitoria mediana (MCAO breve/Reperfusión)	Ataque isquémico transitorio	Muerte celular tardía Astrogliosis

FISIOPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA

El metabolismo del cerebro depende exclusivamente del oxígeno y la glucosa que recibe y llega a consumir 75 litros de oxígeno molecular y 120 g de glucosa por día (Endres y Dirnagl, 2002). Aunque el peso del cerebro es sólo el 2% del peso total del cuerpo, el cerebro demanda el 20% de la perfusión total del cuerpo y el 20% del consumo total de oxígeno.

La reducción de la perfusión aún por tiempos cortos lleva a la falta de oxígeno y de metabolitos energéticos y puede resultar en un daño estructural. Hay valores umbrales de perfusión variables, por debajo de las cuales se afectan las funciones celulares y determinan si una célula sobrevivirá al insulto o morirá (Tabla 2).

TABLA 2. Umbrales de perfusión críticos durante la isquemia cerebral (Modificada a partir de Endres y Dirnagl, 2002).

UMBRALES DE PERFUSION (mg/g/min) que llevan a:	
Pérdida de la síntesis de proteínas	0.55 mg/g/min
Glicólisis anaeróbica	0.35 mg/g/min
Liberación sináptica de neurotransmisores	0.20 mg/g/min
Falla de energía metabólica	0.20 mg/g/min
Despolarización anóxica	0.15 mg/g/min

Diversos fenómenos fisiopatológicos son inducidos por la isquemia cerebral global aguda (ICGA) y tienen lugar durante la isquemia y la reperfusión, así como durante días y/o semanas después (Figura 2). Dentro de ellos, se encuentran: la falla de energía debida a la supresión transitoria del suministro de oxígeno y de glucosa que provoca la alteración de los mecanismos membranales que mantienen los gradientes iónicos intra y extracelulares; en consecuencia, ingresan a las células grandes cantidades de Na^+ induciendo despolarización membranal (denominada despolarización anóxica), el ingreso de Ca^{++} a través de canales dependientes de voltaje y la liberación de neurotransmisores incluyendo a los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato (White et al., 1996; Lipton, 1999; Sarraf-Yazdi et al., 1999; Gwag et al., 2002; Mehta et al., 2007).

La acción de los neurotransmisores excitadores en sus receptores ionotrópicos postsinápticos, especialmente los receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolepropionico (AMPA), provoca la apertura de canales de calcio y de sodio operados por ligando, dando como resultado un ingreso masivo y por consiguiente la acumulación intracelular de estos iones. Al incrementarse las concentraciones intracelulares de dichos iones se provoca un influjo secundario de cloro, con lo que aumenta la osmolaridad y la entrada de agua, lo que puede provocar edema y ruptura de la membrana celular (Kogure et al., 1988; Siesjö et al., 1995; Sarraf-Yazdi et al., 1999; Gwag et al., 2002). El calcio intracelular también se incrementa por su liberación a partir de los reservorios intracelulares, como el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Choi, 1987; Gwag et al., 2002) y por su parte, la sobrecarga de calcio a nivel mitocondrial provoca la pérdida del potencial de la membrana de este organelo y la liberación de proteínas proapoptóticas del espacio intermembranal hacia el citoplasma, como por ejemplo, el citocromo c, una proteína de membrana soluble en agua y un componente esencial de la cadena respiratoria mitocondrial; este citocromo c se transloca desde la mitocondria al citosol en neuronas piramidales de CA1 después de isquemia global (Sugawara et al, 1999). El citocromo c interactúa con Ced-4 homólogo de Apaf-1 y el trifosfato de desoxiadenosina formando el apoptosoma y llevando a la activación de la caspasa 9 (Kuida et al, 1998; Yoshida et al, 1998), la cual es presuntamente un iniciador de la cascada de las caspasas dependiente de citocromo c, lo que estimula a la caspasa 3, seguido por la activación de las caspasas 2, 6, 8 y 10. La caspasa 3 también activa a una DNAsa y esto lleva al daño del DNA.

La mitocondria está involucrada en las vías de apoptosis y necrosis, las cuales dependen de la severidad del daño o de la naturaleza de las vías de señalización que se activan (Fujimura et al, 2000; Green y Reed, 1998). Una isquemia severa altera completamente la función mitocondrial para la producción de ATP lo cual lleva a la muerte celular necrótica. Las caspasas en la señalización río abajo escinden varias proteínas sustrato como la polimerasa de poli-ADP ribosa (PARP); la escisión de este sustrato causa daño al DNA y acelerando subsecuentemente a

la muerte apoptótica. Una activación excesiva de PARP causa depleción de NAD y ATP local lo que provoca una insuficiencia de energía y a la muerte.

El ingreso y la permanencia de cantidades anormalmente grandes de calcio libre en las células desencadena un conjunto de alteraciones celulares progresivas que pueden llevar al daño neuronal irreversible y a la lisis de diversos componentes estructurales de las neuronas, por la activación de diversas proteínas efectoras con actividad enzimática, tales como: la fosfolipasa A2 que hidroliza a los fosfolípidos de las membranas celulares e incrementa los niveles de ácidos grasos libres como el araquidónico a partir del cual se producen leucotrienos y prostaglandinas con una producción concomitante de superóxido lo cual resulta en un daño al citoesqueleto; algunas proteasas, como las caspasas que degradan a importantes proteínas estructurales y funcionales (Earnshaw et al., 1999; Chang y Yang, 2000) y calpains que participan en la inhibición de la síntesis de proteínas; endonucleasas que rompen las cadenas de ADN; y la sintasa del óxido nítrico que contribuye a la formación de radicales peroxinitrito y otras especies reactivas de nitrógeno las cuales, junto con especies reactivas de oxígeno, inician los mecanismos de daño por radicales libres característicos de la reperfusión (White et al., 1996; Sarraf-Yazdi et al., 1999; Gwag et al., 2002). Se ha mostrado que especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen una importante participación en la muerte neuronal por apoptosis en isquemia cerebral y reperfusión así como en la fisiopatología de varios desórdenes neurológicos.

La reoxigenación durante la reperfusión provee un sustrato para diversas reacciones enzimáticas de oxidación en compartimientos citosólicos o en organelos subcelulares como las mitocondrias. La mitocondria produce radicales anión superóxido ($\cdot\text{O}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuya producción constante es controlada por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSHpx) y la catalasa; durante la reperfusión este sistema de defensa antioxidativo endógeno es probable que se perturbe como resultado de la sobreproducción de radicales libres por enzimas prooxidantes citosólicas y por la mitocondria, de la inactivación de los sistemas de detoxificación, y del agotamiento de antioxidantes en el tejido cerebral isquémico. Se ha demostrado que las ROS están involucradas en el daño oxidativo a macromoléculas celulares provocando la

peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la oxidación del DNA lo cual contribuye al daño isquémico cerebral (Hall y Braugher, 1989; Chan, 1994, 1996). Vías de señalización indirectas de ROS pueden causar también daño celular en isquemia cerebral y reperfusión (Chan, 2001).

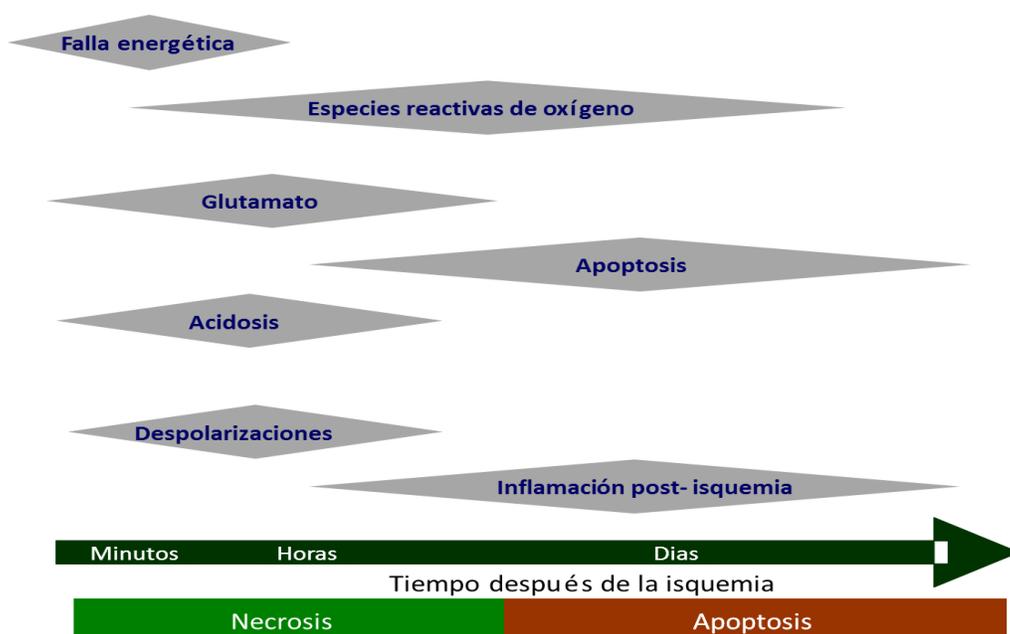


FIGURA 2. Curso temporal de los principales fenómenos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia cerebral, que pueden llevar a la muerte neuronal. Modificada a partir de Iadecola et al. (1999).

VULNERABILIDAD NEURONAL SELECTIVA

Como se mencionó anteriormente, no todas las áreas cerebrales y todos los tipos celulares son igualmente dañados por la isquemia. Entre las neuronas más vulnerables a la isquemia se encuentran las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo (CA) en particular las de las áreas CA1 y CA2 y el hilus dentado del hipocampo, seguidas de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral y las células de Purkinje del cerebelo. Entre las células medianamente vulnerables están las neuronas pequeñas y medianas del cuerpo estriado, mientras que las piramidales de CA3, las neuronas granulares del giro dentado y de las capas II y IV de la corteza cerebral son poco vulnerables (Pulsinelli, 1985). El daño a las estructuras cerebrales más vulnerables (hipocampo, corteza cerebral, cuerpo estriado y cerebelo) lleva a la alteración de

funciones cognoscitivas como el aprendizaje y la memoria, en cuya integración participan de manera importante.

La duración del episodio de isquemia pone de manifiesto diversos grados de vulnerabilidad de las estructuras cerebrales; por ejemplo, algunas estructuras que no se dañan con un periodo de 5 minutos de isquemia, sí presentan un daño ante periodos de isquemia de mayor duración (Wieloch, 1985; Kogure et al., 1988).

Se ha propuesto que la vulnerabilidad selectiva está relacionada con varias características de las neuronas:

1) Una de ellas es su ubicación dentro de redes vasculares, particularmente redes microvasculares del cerebro, que son afectadas por la isquemia y esto resulta en cambios en la distribución del flujo sanguíneo cerebral, con reducción en el aporte sanguíneo, lo que pone a las neuronas de estas regiones específicas en riesgo de daño neuronal irreversible (Tsukahara, 1998).

2) Otra característica relacionada con la vulnerabilidad selectiva de las neuronas es la abundante innervación excitatoria que reciben. En las áreas más vulnerables se ha descrito la presencia de una mayor cantidad de receptores a glutamato, tipo NMDA (N-metil-D-Aspartato), tipo AMPA/kainato con respecto a las áreas de menor vulnerabilidad (Wieloch, 1985). La activación de los receptores AMPA después de isquemia cerebral focal, la cual va acompañada por una elevación transitoria (30-60 min) de glutamato extracelular, ha sido propuesta como una causa primaria de muerte neuronal (Benveniste, 1984; Takaji et al., 1993; Opitz et al., 2000; Wang et al., 2002; Noh et al., 2005).

La subunidad GluR2 del receptor AMPA, presente en la mayoría de las neuronas, lo hace impermeable al Ca^{++} . La expresión alterada y por lo tanto la falta de función normal de dicha subunidad resulta en neurotoxicidad por Ca^{2+} dependiente del receptor AMPA, lo que puede ser un mecanismo potencial para muerte neuronal selectiva después del daño por hipoxia-isquemia. De hecho, la expresión y la función de esta subunidad parecen estar reducidas en neuronas vulnerables a hipoxia-isquemia (Gorter et al., 1997; Pellegrini-Gampietro et al., 1992; Koh, 1990; Benquet et al., 2008).

De este modo, el daño provocado por la isquemia a las neuronas piramidales resulta de la excitotoxicidad causada por la liberación presináptica masiva de neurotransmisores excitadores (glutamato y aspartato) o de la liberación de éstos a partir de las células gliales por la función alterada de los transportadores de aminoácidos excitadores, que despolarizan intensamente a estas neuronas causando un severo desbalance entre las entradas excitadoras e inhibitoras de las neuronas. Así por ejemplo, el daño al área CA1 de hipocampo resulta de la intensa descarga excitadora proveniente del área CA3, sin una adecuada descarga de las interneuronas GABAérgicas (Johnston, 2000). Coincidiendo con esto las neuronas piramidales de la neocorteza y del hipocampo son muy vulnerables a la isquemia y a la excitotoxicidad provocada por NMDA (Beal et al. 1991; Freund et al., 1990).

3) La expresión de algunos genes y la presencia de algunas proteínas se han relacionado con la vulnerabilidad a la isquemia. Por ejemplo, la proteína AP-1 se eleva de manera transitoria 3 h después de la isquemia en regiones resistentes a esta condición (CA3) pero no en las neuronas piramidales de CA1, a excepción de aquéllas que sobreviven luego de una isquemia no letal o luego de inducir tolerancia a la isquemia (Kapinya et al., 2000).

Por otra parte, las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL se han encontrado principalmente en neuronas del hipocampo que son resistentes a la isquemia como las de CA2, CA3 y el giro dentado, mientras que su concentración es menor en CA1 y el subículo (Fudge, 2004), lo que se ha interpretado como relevante para contrarrestar la apoptosis y para modular la permeabilidad de la membrana al calcio.

4) Entre otras proteínas relacionadas también con la vulnerabilidad a la isquemia, se ha descrito que en las neuronas piramidales altamente vulnerables de CA1, pero no en neuronas resistentes, ocurre una disminución significativa del RNAm de α -tubulina, una neuroproteína crucial para la restitución estructural y funcional de las neuronas, después de isquemia global (Kumar et al, 1993).

HISTOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

Como resultado de los fenómenos fisiopatológicos mencionados, pueden ocurrir lesiones histopatológicas, algunas de las cuales sólo pueden observarse cuando las alteraciones neuronales son irreversibles. Dependiendo de la severidad de la isquemia, las neuronas pueden tener un daño reversible que les permite sobrevivir o bien daño irreversible y muerte por procesos agudos (necrosis), muerte neuronal tardía (apoptosis) o muerte autofagocítica (Lipton, 1999).

La apoptosis y la muerte celular autofagocítica, no son exclusivas de los procesos de daño sino que también están involucradas en algunos procesos fisiológicos críticos en los organismos multicelulares, como son el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis celular y durante el recambio del sistema inmune (Galluzi et al., 2007). La apoptosis es un proceso activo en el que ocurre la expresión de algunos genes y la síntesis y activación de proteínas; se caracteriza morfológicamente por la condensación del núcleo y del citoplasma, la fragmentación nuclear y la aparición de agregados de cromatina condensada que dan lugar a la formación de cuerpos apoptóticos rodeados de membrana que pueden a su vez ser posteriormente fagocitados sin desencadenar un proceso inflamatorio.(Love, 2003; Elmore, 2003) Por otro lado, en la muerte celular autofagocítica ocurre la formación de autofagosomas que son el resultado de la fusión de los lisosomas con vesículas membranosas que generalmente son organelos celulares. (Chu, 2008).

La necrosis se diferencia de las otras dos por ser el resultado de una disfunción celular aguda, que en el caso de la isquemia ocurre en respuesta a los fenómenos fisiopatológicos descritos anteriormente y es un proceso severo relativamente pasivo, donde no se requiere la expresión de genes ni la activación o síntesis de proteínas. Morfológicamente, la necrosis está caracterizada por un incremento del volumen celular y de los organelos, entre ellos las mitocondrias, con la ruptura de las membranas plasmática y nuclear y la posterior liberación del contenido celular al medio intercelular, la cual puede causar daño en el tejido afectando a las células vecinas al activar y atraer diversos tipos celulares al lugar de la lesión como resultado de la liberación de moléculas pro-inflamatorias (Lipton, 1999; Graham y

Chen, 2001;Gwag et al., 2002; Love, 2003; Galluzzi et al., 2007; Mehta et al., 2007).

El proceso de muerte neuronal isquémica resultante de la activación de los diferentes fenómenos fisiopatológicos puede ser dividido en dos etapas principales:

Cambiosfuncionales y estructurales críticos, como incremento en la permeabilidad de la membrana, disfunción mitocondrial, disminución de la síntesis de proteínas y daño al citoesqueleto; y estados finales de muerte celular, con la morfología que caracteriza a cada tipo de muerte neuronal (Lipton, 1999).

Las neuronas que son más vulnerables a la isquemia pueden morir por necrosis ante una isquemia severa, con alteraciones morfológicas evidentes desde las primeras horas, pero tienen también la posibilidad de una muerte neuronal tardía, pese a que tras la reperfusión presenten una morfología y función normales. La muerte neuronal tardía suele presentarse horas o días después de la normalización del flujo cerebral local (Ferrer, 1999).

MECANISMOS DE SOBREVIVENCIA Y REPARACIÓN ANTE LA ISQUEMIA

En modelos de daño traumático e isquémico se ha demostrado que no todos los compuestos cuya síntesis y liberación son inducidas en la zona adyacente a la lesión contribuyen a la muerte neuronal, sino que también existen otros que participan en mecanismos de neuroprotección o de reparación (Leker y Shohami, 2002). En este caso, los compuestos mediadores de los diferentes fenómenos poseen propiedades que dan lugar a la reducción del daño y podrían ser vistos como mecanismos que tienden a contrarrestar el daño traumático o isquémico y a promover y mejorar la reparación neuronal.

Entre ellos, diversos factores de crecimiento o neurotrofinas son producidos en las primeras horas después de ocurrir lesiones cerebrales, incluyendo el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), los factores de crecimiento fibroblástico ácido o básico (FGF), y miembros de la familia del factor de

crecimiento transformante (TGF). Se cree que estos factores confieren protección principalmente interfiriendo con las vías de la apoptosis y previniendo de esta manera este tipo de muerte celular. Desafortunadamente, la secreción de esos agentes promotores de la sobrevivencia celular es limitada y usualmente no pueden contrarrestar suficientemente los procesos concurrentes de muerte neuronal, pero su identificación puede apoyar el desarrollo de estrategias terapéuticas que los promuevan.

Durante los procesos inflamatorios algunas de las citocinas secretadas por células inmunes como IL-1, IL-4, IL-5, TNF- α , TGF- β , IFN- γ pueden regular la producción y secreción de neurotrofinas por parte de las células nerviosas. La expresión de factores neurotróficos se incrementa después de un daño cerebral, como parte de la respuesta de los astrocitos a las citocinas y mediadores inflamatorios secretados por células inmunes como células T y macrófagos, células B, polimorfonucleares, mastocitos y monocitos, así como también en la microglía. Las neurotrofinas pueden disminuir la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, disminuir la expresión de moléculas co-estimuladoras, regular la proliferación de linfocitos T y B, aumentar la supervivencia de los linfocitos B de memoria, favorecer la síntesis de inmunoglobulinas, estimular la diferenciación de monocitos a macrófagos y fomentar la actividad fagocitaria de los mismos. Asimismo, las células del sistema inmune pueden expresar receptores para neurotrofinas y éstas modular su función, de modo que durante un proceso inflamatorio no solamente se limite la acción agresiva hacia el tejido sino que se invierta el patrón inmune hacia una respuesta antiinflamatoria y reparadora (Correale y Villa, 2004; Hohlfeld et al., 2000; Hohlfeld et al., 2006; Kerschensteiner et al., 2003; Moale et al., 2000; Muhallab, 2002; Tabakman et al., 2004; Torcia et al., 1996; Villoslada y Genain, 2004).

NEUROTROFINAS

El trabajo seminal de un grupo de embriólogos en los 50's llevó al descubrimiento y descripción de una familia de proteínas llamadas factores de crecimiento o neurotrofinas. Al contrario de las moléculas de señalización y de las moléculas de adhesión celular su expresión está limitada fundamentalmente a las neuronas y a

algunas otras estructuras diana no neuronales como los músculos (Purves, 1988). Las neurotrofinas (NT) promueven el crecimiento, supervivencia y diferenciación de neuronas en el sistema nervioso central y periférico, siendo fundamentales en muchas facetas de la función de sistema nervioso central (SNC), con participaciones críticas en la migración, arborización dendrítica, sinaptogénesis y otras formas de plasticidad sináptica dependientes de actividad. Todas las observaciones biológicas que se han hecho sobre las interacciones de las neurotrofinas sugieren que la señalización a través de neurotrofinas activa por lo menos tres tipos diferentes de respuestas: supervivencia/muerte celular, estabilización/eliminación de sinapsis y crecimiento/retracción de prolongaciones (Purves, 1988).

Estos factores de crecimiento son sustancias que las neuronas requieren para sobrevivir y diferenciarse; la característica distintiva de estos factores de crecimiento estriba en que actúan a concentraciones muy bajas. Químicamente, las neurotrofinas son heterodímeros de polipéptidos de bajo peso molecular, con residuos altamente básicos, sintetizadas como precursores de 30-35 kDa (pro-neurotrofinas) y son procesadas, cortadas en sitios aminoacídicos dibásicos altamente conservados, ya sea dentro del compartimento celular (vía convertasas) o extracelularmente (vía metaloproteasas 3, 7 y la plasmina) a neurotrofinas maduras, generando así a la proteína madura y adquiriendo actividad biológica (Mowla et al., 2001; Allen y Dawbarn, 2006). Usualmente se sintetizan en estructuras invadidas; de ahí son liberadas y se unen a un receptor de membrana de neuronas que se encuentran en contacto con ellas; se internaliza el dímero y sufre un transporte retrógrado para luego modular la activación de factores de transcripción y como consecuencia, la síntesis de diversas proteínas relacionadas con la función neuronal.

Además de estos efectos genómicos de las neurotrofinas que se describirán en detalle más adelante, existen otros descritos en la literatura relacionados con la modulación de la neurotransmisión y cuyos mecanismos de acción son más rápidos (cambios en la disponibilidad del Ca^{++} intracelular y en la excitabilidad de las neuronas).

Varias de las proteínas resultantes comparten algunas características comunes como: un número de aminoácidos similar (118-120), pesos moleculares parecidos (~12kDa), puntos isoeléctricos en un rango de 9-10, aproximadamente un 50% de identidad en su estructura primaria, forman un dímero estable por una unión química no covalente y poseen 6 residuos conservados de cisteína en la misma posición relativa, lo que da lugar a la formación de 3 puentes disulfuro intracadena (Maissonpierre et al, 1990, 1991; McDonald et al,1991) (Fig. 3). Cada molécula está caracterizada por un patrón específico de residuos básicos o ácidos cargados, expuestos en su superficie. Las diferencias entre las neurotrofinas son particularmente evidentes dentro de los bucles que sobresalen del núcleo de las moléculas, los cuales están formados por láminas beta (McDonald et al, 1995); estos bucles permiten los principales contactos entre las neurotrofinas y sus receptores específicos. Esta mezcla de similitudes estructurales se refleja en las propiedades biológicas de las neurotrofinas (Lewin y Barde, 1996).

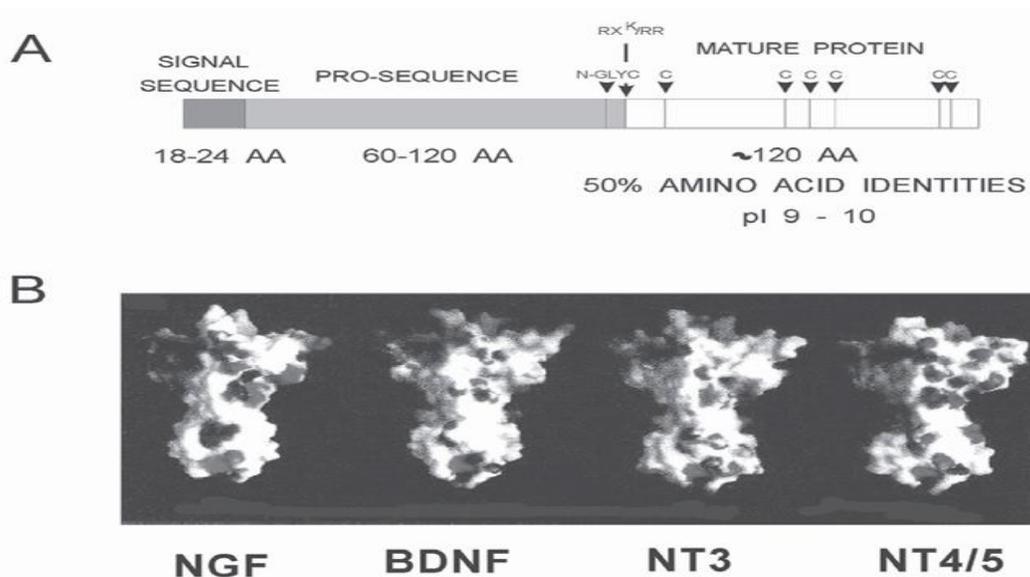


Figura 3. Estructura de las neurotrofinas. **A)** La región carboxiterminal biológicamente activa es aproximadamente idéntica en las 4 neurotrofinas que incluye el patrón de 6 residuos de cisteínas (C) que forman 3 puentes de cisteína bien conservados. **B)** En su forma madura forma heterodímeros con un pliegue alargado característico de proteínas de hojas β y con bucles que sobresalen. (Modificado de Dechant y Neumann, 2002)

Las neurotrofinas estimulan la sobrevivencia neuronal y estimulan procesos de crecimiento durante el desarrollo (Barde, 1994; Huang y Reichardt, 2001) así como en el sistema nervioso maduro (Lee et al, 2005); estos efectos involucran tanto acciones globales en la célula a través de una regulación de la expresión génica, como modificaciones locales del citoesqueleto axonal y dendrítico (Miller y Kaplan, 2001, 2003; Gehler et al, 2004). Las neurotrofinas conservan un fuerte control regulatorio sobre la sobrevivencia neuronal, la expresión génica y la función del sistema nervioso maduro (Lu et al., 2005) y ejercen efectos locales y discretos sobre el citoesqueleto.

Las neurotrofinas actúan a través de dos clases de receptores: los receptores tirosincinasa (Trk) A, B o C, que presentan una alta afinidad hacia las neurotrofinas maduras, y los p75, que presentan baja afinidad a las proteínas maduras pero alta hacia las inmaduras o precursoras (Lu et al, 2005).

Estereotípicamente, el primer receptor Trk se descubrió inicialmente como un oncogen producto del gen Trk (tropomiosincinasa), una oncoproteína quimérica de tirosincinasa presente en carcinoma de colon humano (Martin-Zanca et al., 1986). La ulterior caracterización de la contraparte del protooncogen (TrkA) y dos genes hermanos adicionales (TrkB y TrkC) (Martin-Zanca et al., 1989; Klein et al., 1989; Lamballe et al., 1991) permitió la constitución de una nueva subfamilia de receptores Trk. Actualmente, la familia de receptores Trk a neurotrofinas consta de tres miembros y uno de ellos agrupa a los 58 genes que codifican para receptores Trk en el genoma humano (Robinson et al., 2000). Dentro de esos 58 genes, los receptores Trk tienen características estructurales únicas y son ampliamente expresados en el sistema nervioso central y periférico, donde sus acciones son particularmente complejas y diversas.

Los receptores Trk son proteínas transmembranales de superficie, que poseen una actividad tirosincinasa intrínseca y sensible a un ligando. TrkA, TrkB y TrkC comparten una organización común tanto a nivel extracelular como intracelular. Su dominio extracelular exhibe dos juegos distintos de motivos relacionados con la adhesión celular: en el extremo amino terminal, arreglos de motivos ricos en leucina (LRM) flanqueados por dos agrupamientos de cisteínas (Fig 4). Junto al

segundo grupo de cisteínas, dos dominios consecutivos similares a inmunoglobulinas (Ig) del tipo C2, se extienden hacia abajo a un solo dominio transmembranal. En el lado interno de la membrana celular los receptores Trk muestran un dominio tirosincinasa (TK) seguido por un extensión corta carboxiterminal. Mientras que sus dominios TK comparten una topología similar con otros receptores Trk, características especiales permiten su clasificación dentro de los receptores Trk clase II, definido por la presencia de una secuencia consenso [DN]-[LIV]-x-Y-Y-R. La presencia clave de un dominio C2 similar a Ig, dentro de su parte extracelular, permite a los receptores Trk unirse específicamente a distintas neurotrofinas miembros de la familia del NGF. En particular, el segundo dominio C2 similar a Ig es la interfase principal para la selectividad y unión de NT, controlando la respuesta de TrkA, TrkB y TrkC a NGF, BDNF/NT-4/5 y NT-3, respectivamente (Pérez et al., 1995; O'Connell et al., 2000; Arévalo et al., 2001). Aparte del papel crítico en la unión ligando-receptor, los dominios C2 similar a Ig previenen una activación descontrolada de los receptores Trk, probablemente por repulsión recíproca de las formas monoméricas hasta la unión del ligando.

Desde un punto de vista genético, el sistema receptor-ligando usado por los receptores Trk para generar diversos efectos es relativamente simple. Además, su activación básica no es muy diferente de otros receptores TK, pues su oligomerización es inducida generalmente por unión de ligando, induciendo una fosforilación recíproca de sus residuos tirosina asociados dentro del bucle de autofosforilación, llamado también bucle de activación. Asimismo, la dimerización de receptores Trk inducida por neurotrofinas resulta en una autotransfosforilación y una rápida generación de sitios de acoplamiento fosforilados para proteínas citoplásmicas adaptadoras. Un denominador común, las proteínas atraídas por los residuos tirosina fosforilados, son aquéllas que contienen dominios PTB (unión a tirosina) y SH2 (homólogos Src2). Las proteínas adaptadoras mejor caracterizadas de los receptores Trk son Shc y Frs2; ambas interactúan con el residuo Trk Y490, incluido dentro del motivo NPXY. Estas interacciones inician cascadas de fosforilaciones centralizadas río abajo activando las vía Ras/Raf/Erk y la vía PI3K/AKT, a las cuales se atribuyen los efectos biológicos clásicos de

diferenciación y supervivencia promovidas por NT/Trk. Otro sitio principal de fosforilación de tirosina se encuentra en el extremo carboxiterminal del receptor, fuera del dominio tirosin cinasa, donde el residuo Y785 recluta mediante el dominio de unión SH2 de la proteína PLC γ , llevando a los más complejos efectos producidos por el sistema NT/Trk, la modulación de la plasticidad sináptica.

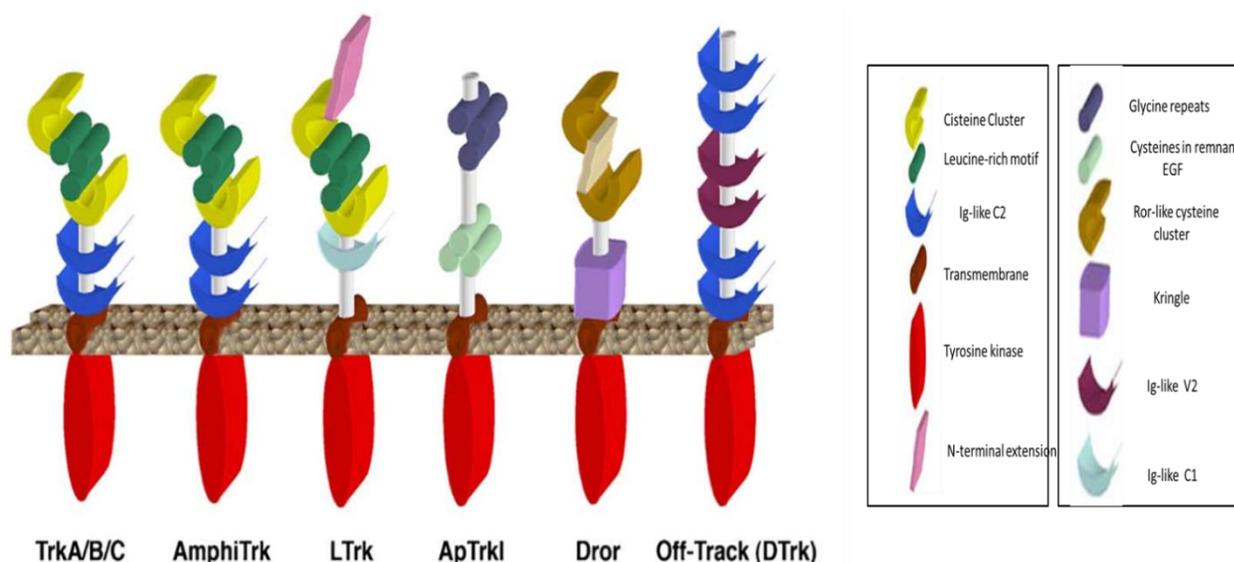


Figura 4. Dominios estructurales de receptores Trk y Trk relacionados de vertebrados e invertebrados. *Lymnaea*: LTrk; *Aplysia*: ApTrkI; *Drosophila*: Dror, Off-Track (DTrk); amphioxus (AmphiTrk); TrkA, TrkB, TrkC. Los módulos proteínicos y códigos de color se describen en el panel derecho. La barra longitudinal representa la membrana citoplasmática que separa los dominios extracelular (arriba) del dominio tirosin cinasa intracelular (abajo).

Estos fenómenos no sólo tienen influencia sobre el desarrollo neuronal, sino que también actúan en neuronas maduras y particularmente en células nerviosas dañadas o en degeneración (Lindvall et al., 1994; Tuszynski and Gage, 1995; Lykissas et al., 2007; Song et al., 2009).

En el sistema nervioso adulto las neurotrofinas modulan o activan respuestas sinápticas rápidas y causan cambios en la función de las sinapsis y en la morfología de las neuritas. Por consiguiente tienen influencia sobre funciones integrativas como la conducta, aprendizaje, formación de memoria y otras funciones cognoscitivas (Bibel et al., 2000).

En vista de los importantes efectos fisiológicos que ejercen las neurotrofinas en el cerebro y el sistema nervioso periférico, se les ha considerado como agentes candidatos para el tratamiento de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Las esperanzas en estas proteínas fueron promovidas por un gran número de estudios preclínicos que mostraron que la mayoría de las poblaciones neuronales afectadas por enfermedades neurodegenerativas responden a las neurotrofinas y expresan los receptores a éstas, aunque no hay pruebas de que la falta de estas neurotrofinas sea la causa involucrada en la manifestación de alguna patología neurodegenerativa.

Los blancos celulares de las neurotrofinas incluyen neuronas afectadas por enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral y polineuropatías periféricas. Además, las neurotrofinas actúan sobre neuronas afectadas por otras patologías psiquiátricas y neurológicas como la isquemia, epilepsia, depresión y desórdenes de alimentación. Trabajos en cultivos celulares y en modelos animales han aportado un sustento sólido a la hipótesis de que las neurotrofinas previenen la muerte neuronal (Dechant y Neuman, 2002).

Las neurotrofinas pueden inhibir o retrasar procesos degenerativos en neuronas bajo numerosas condiciones experimentales. Más aún, los niveles de expresión de las neurotrofinas y sus receptores son modificados en situaciones fisiopatológicas sustentando su participación en las respuestas celulares a procesos patológicos (Ferrer, 1999).

Además, las neurotrofinas tienen también varios papeles fuera del sistema nervioso, en el desarrollo cardiaco, neovascularización o en la homeostasis del sistema inmune (Reichardt, 2006).

NGF

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es la neurotrofina prototipo que definió las funciones y propiedades de esta clase de factores de crecimiento. En el sistema nervioso periférico los tejidos diana son típicamente células no neuronales; actúa también sobre neuronas simpáticas así como en neuronas sensoriales involucradas en nocicepción y sensibles a temperatura. Es sintetizado y liberado de tejidos diana de neuronas simpáticas, de varios tipos de neuronas sensoriales y de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior en el sistema nervioso central, en las que promueve su sobrevivencia y funcionalidad (Chen et al., 1997). Estas neuronas proyectan al hipocampo y se cree que son importantes en procesos de memoria.

Se ha reportado una alta expresión del RNAm de NGF en varios tejidos periféricos inervados por vías sensoriales y simpáticas incluyendo el conducto deferente, corazón, iris, piel, cápsula esplénica, y la glándula submaxilar. Se pueden observar cantidades más pequeñas en la glándula adrenal, testículos, hígado y músculos esqueléticos (Heumann et al., 1984; Shelton y Reichardt, 1984).

El gen de NGF está formado por cuatro exones y su transcripción da lugar a la síntesis de cuatro transcritos (A, B, C y D), debidos a la existencia de un doble sitio de iniciación de la transcripción y por procesamiento diferencial (“splicing”) del pre-mRNA, siendo el principal transcrito de 1.35 kb (Selby et al., 1987). Se traduce como un precursor largo conocido como pre-proNGF el cual contiene un péptido señal para la secreción de la proteína (pre-péptido), que se escinde en la traslocación al retículo endoplásmico para producir el homodímero precursor (pro-NGF) de 50 kDa. La pro secuencia de 103 aminoácidos es entonces procesada en la red trans Golgi por la proteasa furina en un sitio aminoácido dibásico altamente conservado y resulta en la liberación del dímero maduro de NGF de 26kDa (Shooter,2001). Otras proteasas aparte de la furina son capaces de escindir al pro-péptido en el espacio extracelular (Lee et al., 2001; Bruno y Cuello, 2006).

La proteína NGF está constituida por un complejo pentamérico con una subunidad α y dos subunidades β , todas asociadas no covalentemente y dos subunidades γ . La subunidad α tiene un peso molecular aproximadamente de 26 kDa y un punto isoeléctrico de alrededor de 4.3. La función exacta de la subunidad α se desconoce pero se cree que protege al NGF de la degradación enzimática. El par de subunidades β (β -NGFm), es enteramente responsable de la actividad biológica del NGF (Greene et al., 1971), es un homodímero de 118 aminoácidos que presenta tres puentes disulfuro intracatenarios y que se mantienen unidas por fuerzas no covalentes; el dímero tiene un peso molecular de 26.5 kDa y un punto isoeléctrico de 9.3 (Angeletti y Bradshaw 1971; Barde, 1989).

Se ha propuesto que las subunidades α y β podrían estar vinculadas con la regulación de los procesos de liberación y degradación del β -NGFm y brindar protección contra la acción de proteasas (Longo et al., 1989). Cada subunidad γ tiene un peso molecular de aproximadamente 26 kDa, un punto isoeléctrico de 5.5 y se sabe que es una esteropeptidasa específica de arginina. Esta subunidad al parecer tiene un papel en el procesamiento de NGF (Edwards et al., 1988; Greene et al., 1969; Server y Shooter, 1976; Varon et al., 1968).

La secuencia aminoacídica y la secuencia del RNAm del NGF se ha caracterizado y designado como una molécula altamente conservada que muestra grandes homologías entre diferentes especies. Estudios moleculares han revelado que el gen humano para NGF se localiza en el brazo corto proximal del cromosoma 1 (Francke et al., 1983, Scott et al., 1983). La estructura primaria del NGF de ratón (NGFm) es muy similar a la del ser humano; sólo 12 de 118 aminoácidos son diferentes (Barde, 1989).

Todos los componentes necesarios para el adecuado proceso de maduración y secreción del NGF se conservan en la secuencia del NGF maduro (Heymach et al., 1996). El NGF sintetizado es inmediatamente secretado, siendo los niveles intracelulares de NGF muy bajos (Furukawa et al., 1987).

BDNF

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) fue el segundo miembro que se describió de la familia de las neurotrofinas, el cual mostró promover la sobrevivencia de una

subpoblación de neuronas del ganglio de la raíz dorsal. Es una proteína con un peso molecular aproximado de 27 kDa (en su forma dimérica); se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central de los mamíferos, localizándose particularmente en el hipocampo y la neocorteza (Yao et al, 1997).

El BDNF comparte aproximadamente el 50% de homología con NGF, NT-3 y NT-4/5; cada neurotrofina consiste en un homodímero ligado en forma no covalente y contiene: un péptido señal, seguido de un codón de iniciación y una pro-región que contiene un sitio de glucosilación ligado al extremo amino terminal. Inicialmente producido como pro-neurotrofina, una convertasa de la pro-hormona como la Furina digiere la pro-neurotrofina (PM ~ 30 kDa) a una neurotrofina madura (PM~ 14kDa) (Chao y Bothwell, 2002). Las pro-neurotrofinas tienen características de unión y actividad biológica distintas en comparación con las neurotrofinas maduras (Lee et al, 2001).

El BDNF es sintetizado inicialmente como una proteína precursora (pre-pro BDNF) en el retículo endoplásmico. Después de una división del péptido señal, el pro-BDNF es transportado al aparato de Golgi para su empaquetamiento en vesículas secretoras constitutivas o reguladas. El pro-BDNF puede ser convertido intracelularmente a BDNF maduro (BDNFm) en trans Golgi, por un miembro de la familia de las proteasas subtilisina-kexina, la furina, o en los gránulos de secreción inmaduros por proteínas convertasas (Mowlaet al, 1999). Por largo tiempo se creyó que solo el BDNF maduro (BDNFm) es biológicamente activo y que el pro-BDNF, por estar localizado exclusivamente de forma intracelular, sirve como un precursor inactivo. Sin embargo, observaciones recientes de la secreción de pro-BDNF y su conversión a BDNFm *in vitro* por la plasmina o por metaloproteasas, sugiere que pro-BDNF puede ser biológicamente activo (Pang et al., 2004), aunque la eficiencia de la ruptura intracelular del pro-BDNF al

BDNFm es controversial (Matsumoto et al, 2008) y puede variar entre tipos neuronales. Como ya se había mencionado, los efectos neuronales de BDNF son mediados a través del receptor de alta afinidad TrkB; la unión a su receptor induce una dimerización, fosforilación y activación del dominio tirosinasa intracelular; estos eventos inician varias señales complejas intracelulares de cascadas de traducción, que subsecuentemente inducen respuestas biológicas.

El gen del BDNF tiene cuatro exones 5' (I-IV) que están asociados con distintos promotores, y un exón 3' (V) que codifica a la proteína madura del BDNF (Metsis et al, 1993; Timmusk et al, 1993). A partir del gen se forman ocho RNAm distintos, con transcritos que contienen los exones I-III expresados predominantemente en el cerebro y el exón IV en pulmón y corazón (Timmusk et al, 1993).

A través del uso de promotores alternativos, sitios de empalme y poliadenilación, se pueden producir al menos 18 transcritos, cada uno de los cuales codifica para una proteína BDNF idéntica. Aunque el significado de esta compleja organización transcripcional es crítica, una hipótesis es que provee múltiples niveles de regulación, a través del uso de promotores alternativos, estabilidad diferencial de RNAm o localización subcelular diferencial del RNAm o de la proteína. Además del uso de diferentes promotores, los transcritos de BDNF son poliadenilados en uno de dos sitios llevando a tener dos poblaciones de RNAm: unos con un UTR 3' corto y otros con un UTR 3' largo (Timmusk et al, 1993). Estos reservorios de RNA'sse localizan en distintos compartimentos celulares de las neuronas, estando los UTR 3' cortos restringidos al soma, mientras que los UTR 3' largos están en las dendritas, haciendo posible una transcripción local (An et al, 2008), de modo que parte de la proteína de BDNF en las dendritas proviene de la traducción local del RNAm dendrítico. En el gen de BDNF los UTR 3' son usados para dirigir los transcritos hacia las dendritas, donde son traducidos localmente y pueden actuar promoviendo la remodelación dendrítica, en el desarrollo postnatal tardío.

DISTRIBUCION DE NGF Y BDNF EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las neuronas que responden a NGF se pueden separar en dos grupos: neuronas periféricas (derivadas de la cresta neural) y otras neuronas del sistema nervioso

central. Las neuronas de la periferia incluyen neuronas adrenérgicas simpáticas y neuronas sensoriales primarias (Cohen, 1960; Cohen, et al., 1956). La exposición a NGF resulta en la diferenciación, extensión dendrítica y estimulación de la producción de enzimas sintetizadoras de neuropéptido (Thoenen y Barde, 1980). En el SNC, grupos selectos de neuronas colinérgicas parecen ser los principales blancos de NGF (Gnahn et al., 1983); un aumento de la proliferación y la sobrevivencia son la respuesta a NGF exógeno, de estas neuronas del SNC.

La expresión génica y la síntesis de NGF ocurren en múltiples sitios tanto periféricamente como en SNC. En algunos tejidos, la transcripción del RNAm de NGF se ha definido a nivel celular. La expresión de NGF ocurre en células de los túbulos convolutos granulares de la glándula submaxilar de ratón (Noji y et al, 1989; Salido, et al, 1988), así como en células de músculo liso, células epiteliales, fibroblastos y células de Schwann. Además de los tejidos ya mencionados, el NGF se ha encontrado en ganglios adrenérgicos simpáticos y sensoriales de la médula espinal dorsal (Heumann et al, 1984; Korsching et al, 1985), lo que apoya la idea de un transporte retrógrado a sitios activos de NGF.

A través del marcaje de canales de transporte retrógrado se han detectado neuronas colinérgicas inmunoreactivas a NGF en el hipocampo, corteza, septo medial, banda diagonal de Broca, núcleo basal de Meynert, bulbo olfatorio y en interneuronas del estriado (Korsching et al, 1985; Whittemore et al., 1986). Las cantidades más grandes del RNAm de NGF en SNC se localizan en el hipocampo y la corteza así como en regiones olfativas, los cuales representan blancos de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (Korsching et al, 1985; Large et al, 1986); específicamente la capa de células granulares y piramidales de las regiones hipocampales CA1 y CA3 muestran una marca intensa del RNAm de NGF (Ayer-Lelievre et al., 1988; Whittemore et al, 1988).

El RNAm de BDNF y de su receptor TrkB, al igual que la proteína BDNF y TrkB tiene una amplia distribución en el SNC (Merlio et al, 1993; Conner et al, 1997). En el cerebro de rata adulta, el RNAm de BDNF es expresado en el hipocampo, septum, hipotálamo, corteza y en núcleos adrenérgicos del tallo cerebral (Castren et al, 1995; Katoh-Semba et al, 1997). La inmunoreactividad a BDNF se ha

encontrado en rata adulta principalmente en corteza cerebral, hipocampo, cerebro basal anterior, estriado, hipotálamo, así como en tallo cerebral y cerebelo (Kawamoto et al, 1996), principalmente localizada en el soma, dendritas y axones, aunque en amígdala, áreas hipocámpicas y corticales, como en la corteza del cíngulo, parietal y entorrinal, la inmunoreactividad se encontró en el núcleo celular (Wetmore et al, 1991).

RECEPTORES A NGF Y BDNF

Las diversas acciones de la neurotrofinas son efectuadas por su interacción con dos clases de receptores: los Trk (receptor tropomiosin cinasa) de la familia de TRK's (receptor tirosincinasa), y p75^{NTR} (receptor a neurotrofinas p75). Los subtipos de receptores se unen a neurotrofinas maduras con diferentes especificidades: TrkA se une preferencialmente a NGF, TrkB se une preferencialmente a BDNF y NT-4/5, en tanto que el TrkC muestra una preferencia por NT-3. El receptor p75^{NTR} une a todas las neurotrofinas con aproximadamente la misma baja afinidad y se ha demostrado que une a pro-neurotrofinas con una alta afinidad (Lee et al, 2001); este receptor puede también interactuar con varios receptores incluyendo los Trk (Hantzopoulos et al, 1994), de sortilina (Nykjaer et al, 2004) y de NOGO (Mi et al, 2004), siendo capaz de unir a otros ligandos además de las neurotrofinas, como el virus de la rabia (Tefferau et al, 1998), el péptido β -amiloide (Yaar et al, 1997) y péptidos prion (Della-Bianca et al, 2001). La complejidad de este sistema de señalización de múltiple ligando y múltiple receptor se pone en evidencia por las acciones opuestas de las neurotrofinas; por ejemplo, se ha reportado que los receptores Trk promueven la sobrevivencia neuronal y facilitan la eficacia en la transmisión sináptica, pero también hay evidencia de que p75 tiene una participación mediando la muerte celular y el deterioro funcional.

La unión de las neurotrofinas a los receptores Trk resulta en una dimerización del receptor y una consecuente auto-transfosforilación. La fosforilación de tirosinas en el bucle autorregulatorio activa al receptor cinasa, mientras que la fosforilación de otros residuos promueve la señalización creando sitios de acoplamiento para proteínas adaptadoras que acoplan al receptor a cascadas de señalización

intracelulares. Estas cascadas incluyen a la vía de la cinasa activada por mitógeno Ras (MAPK), la vía de la cinasa fosfatidil inositol-3-OH -Akt (PI3K/Akt) y la vía de la fosfolipasa C (PLC).

Los receptores TrkA se localizan principalmente en las neuronas sensoriales (nociceptivas y termoceptivas) y simpáticas del sistema nervioso periférico, así como en las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior y el estriado. Las neuronas del hipocampo, el tálamo y el tallo cerebral expresan el TrkA, pero en menor grado. Estos receptores se distribuyen homogéneamente en los somas y prolongaciones de las neuronas (Toma et al., 1997).

Varias isoformas del receptor, dos cinasas de TrkA, difieren por la presencia de seis residuos de aminoácidos (VSFSPV) localizados en el dominio extracelular cerca de la región transmembranal (Barrer et al., 1993; Horigome et al., 1993). Ambas isoformas parecen tener propiedades biológicas similares, pero diferentes patrones de expresión; mientras que la isoforma TrkA que lleva la secuencia VSFSPV se expresa principalmente en células neuronales, la otra isoforma se encuentra en células de origen no neuronal (Barrer et al., 1993; Horigome et al., 1993).

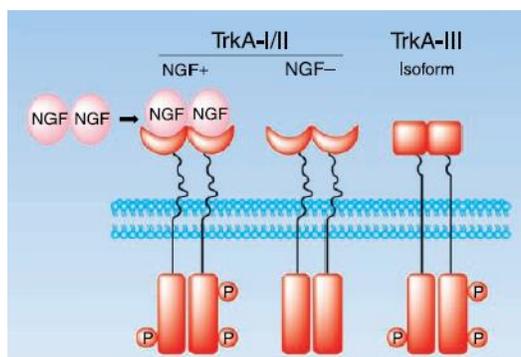


Figura 5. Distintas isoformas del receptor a NGF el TrkA. Modificado de Brodner, 2009

Los receptores TrkB son proteínas altamente glicosiladas que poseen 12 sitios potenciales de glicosilación N-terminal en el dominio extracelular (Haniu et al, 1995). Las formas truncadas carecen de actividad tirosincinasa intracelular y contienen distintas colas citoplasmáticas cortas (Klein et al, 1990; Middlemas et al, 1991). Diferentes isoformas de TrkB son originadas por splicing alternativo del

RNAm de TrkB, generando al menos tres receptores diferentes con distintas capacidades de señalización en roedores (Klein et al, 1989; 1990; Middlemas et al, 1991; Soppet et al, 1991): el receptor TrkB largo (TrkBFL) y dos formas truncadas (TrkBT1 y TrkBT2).

El receptor de alta afinidad TrkBFL se expresa exclusivamente en SNC (Klein et al., 1990), mientras que en la glia central solo se expresa TrkBT1 (Armanini et al, 1995; Rudge et al, 1994; Wetmore et al, 1995). Los efectos fisiológicos de las isoformas TrkBT1 y TrkBT2 se desconocen pero se ha sugerido que pueden tener al menos dos funciones principales: actuar como ligandos atrapando moléculas para regular la disponibilidad local de neurotrofinas (Biffo et al, 1995; Fryer et al, 1997), o funcionar como receptores dominantes negativos de respuesta a neurotrofinas por heterodimerización (Eide et al, 1996; Haapasalo et al, 2001; Ninkina et al, 1996); sin embargo las formas truncadas también son biológicamente activas pues estimulan señales de traducción. TrkBT1 ha mostrado tener un papel directo en la señalización para la liberación de Ca^{++} dependiente de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) en células gliales (Rose et al., 2003).

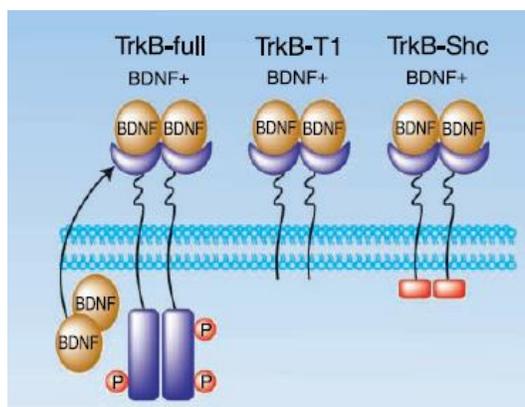


Figura 6. Distintas isoformas del receptor a NGF el TrkA. Modificado de Brodner, 2009

TrkB en el SNC se localiza de ha sido en cuerpos neuronales, axones y dendritas (Fryer et al, 1996), al igual que la proteína BDNF y su RNAm, en varias estructuras como la corteza cerebral, bulbo olfatorio, hipocampo, tálamo, hipotálamo, giro dentado, estriado, septum y ganglios basales, sustancia nigra, cerebelo, neuronas

motoras de la médula espinal y núcleos sensitivos del tallo cerebral (Yan et al, 1997). El RNAm de TrkB se ha identificado también en esas estructuras, especialmente en corteza frontal, corteza del cíngulo, corteza entorrinal, hipocampo e hipotálamo (Fryer et al, 1996). En el hipocampo se ha observado en las neuronas piramidales de las regiones CA1-CA4, así como en el cuerpo celular y en las dendritas de las neuronas granulares del giro dentado. El BDNF y sus receptores se han identificado en las mismas neuronas del hipocampo y la corteza (Kokaia et al, 1993), lo que sugiere mecanismos autócrinos o parácrinos para las acciones del BDNF en el SNC.

Las consecuencias biológicas de la expresión de p75 son controversiales, pero este receptor puede mediar la apoptosis en neuronas en desarrollo en ausencia de los receptores Trk. El p75 puede interactuar directamente con TrkA, TrkB y TrkC tanto en el dominio extracelular como en el intracelular; esta interacción puede facilitar respuestas funcionales a las neurotrofinas (Hantzopoulos et al., 1994). La expresión de p75 puede incrementar la sensibilidad de TrkA a concentraciones bajas de NGF. Sin embargo, su expresión induce apoptosis en presencia de NGF (Rabizadeh et al, 2006, Bunone et al., 1997). El efecto de p75 en la respuesta celular a las neurotrofinas es compleja y puede depender de la concentración del ligando, la proporción de receptores, el tipo celular en el que se exprese y el estado de diferenciación (Greene et al., 1995; Chao, 1992; Chao y Hempstead, 1995).

El receptor a neurotrofinas p75 activa mecanismos de señalización por una unión no covalente a moléculas intracelulares y los efectos celulares de su señalización son diversos; en poblaciones de precursores neuronales como las de la retina y la médula espinal, puede causar muerte celular apoptótica (Frade y Barde, 1998). Más aún, ejerce efectos locales regresivos sobre el crecimiento de neuritas (Yamashita et al, 1999). Aunado a su papel como receptor señalizador individual, también se une a los tres receptores Trk y su interacción física puede modificar la actividad tirosinasa así como la especificidad al ligando de estos receptores (Bibel et al, 1998). De una manera recíproca los receptores Trk tienen un efecto bloqueador en la señalización río abajo de p75 (Majdan y Miller, 1999).

El acoplamiento diferencial de las neurotrofinas a los subtipos de receptores que activan vías de señalización, tiene consecuencias funcionales distintas. La activación de los receptores Trk permite la sobrevivencia neuronal, el crecimiento axonal, la diferenciación dendrítica, y la inducción de LTP en el hipocampo; la activación de p75, en cambio, lleva a apoptosis neuronal, degeneración axonal, reduce la complejidad dendrítica e induce la depresión a largo plazo (LTD) (Amaral et al, 2007).

Un nivel de complejidad adicional viene de la unión de las neurotrofinas al receptor p75, en donde la activación de este receptor está acoplada a un grupo diferente de cascadas de traducción, como las vías de señalización NF- κ B y a c-Jun N-terminal, cinasa-p53-Bax (Kaplan y Miller, 2000).

El receptor p75 ejerce sus efectos locales sobre el crecimiento de neuritas interfiriendo con la actividad de RhoA (Yamashita et al, 1999); otra vía activada por este receptor vía ceramidas, lleva a la hidrólisis de esfingomielina (Dobrowsky et al, 1995; Dobrowsky y Carter, 1998) y a la activación del factor NF- κ B (Carter et al, 1996). Esta vía puede servir como una señal antiapoptótica balanceando la activación de las cascadas de muerte celular (Hamanoue et al, 1999; Goldhawk et al, 2000).

La composición precisa de la vía de muerte activada por p75 queda por ser establecida. La evidencia genética y bioquímica involucra a varias proteínas identificadas recientemente, que interaccionan entre si (Bibel y Barde, 2000). Efectos río abajo pueden incluir a la caspasa 3 (Agerman et al, 2000), la activación del complejo JNK-MAPK (Yoon et al, 1998), así como la activación de p53 y p73 (Aloyz et al, 1998; Pozniak et al, 2000).

NEUROTROFINAS Y DAÑO CEREBRAL

El daño al cerebro provocado por la actividad epiléptica, trauma, estrés sostenido, coma hipoglucémico, convulsiones e isquemia del cerebro anterior, incrementa la expresión de BDNF en el sistema nervioso central (Lindvall et al, 1994). La liberación de glutamato y el influjo de Ca^{++} son los factores más importantes que provocan un incremento de BDNF durante el daño al cerebro (Lindvall et al,

1994). Esto se ha visto en el hipocampo, la amígdala, la corteza cerebral, la corteza piriforme y la neocorteza. Se ha propuesto que los efectos funcionales de las neurotrofinas inducidas por daño al sistema nervioso central proveen protección contra el daño neuronal y estimulan la ramificación dendrítica y la reorganización sináptica (Lindvall et al, 1994). El BDNF está incluido entre los factores protectores que promueven el fenómeno de resistencia conocido como “resiliencia” de las células del cerebro, permitiéndoles así enfrentar los cambios agresivos.

Como se mencionó antes, el hipocampo es la estructura con mayor vulnerabilidad a la isquemia en la cual se han reportado alteraciones rápidas en los niveles de la proteína BDNF después de isquemia focal sostenida (Miyake et al, 2002), y en isquemia global transitoria del cerebro anterior (Kokaia et al, 1996; Lee et al, 2004, Lee et al, 2008). Asimismo, se han mostrado incrementos significativos del RNAm del BDNF como consecuencia de isquemia global en ratas, gerbos y ratones, con incrementos significativos dentro de periodos muy cortos como 30 minutos, 2, 6, y 12 horas; en periodos posteriores como 24, 48 horas y sobre todo a 7 y 14 días. Esta expresión tiende a regresar a niveles control o disminuyen los niveles del mensajero de esta neurotrofina en periodos posteriores (Katoh-Semba et al, 2001;Kokaia et al, 1994, 1995; Takeda et al, 1993; Tsukahara et al, 1998; Lindvall et al, 1992; Schmidh-Kastner et al, 2001; Himeda et al, 2006; Lee et al, 2002). También se mostró un incremento de esta neurotrofina cuando se les administró un fármaco neuroprotector (Uchino et al, 1997; Wang et al, 2006; Zang et al, 2006; Miyata et al, 2001; Cao et al, 2011; Kim et al 2009) o se realizó alguna maniobra neuroprotectora como hipotermia, pre-condicionamiento isquémico o exposición a ambientes enriquecidos (Moller et al, 1998; Truettner et al, 2002; Lee et al, 2008; D' Cruz et al, 2002; Ostrowsky et al, 2008) pero este incremento en la expresión tanto del RNAm como de la proteína no se pueden mantener por mucho tiempo para contrarrestar el daño ocasionado por la isquemia.

Se ha mostrado que el tratamiento con BDNF es neuroprotector tanto en isquemia global como en focal en modelos de ratas a los que se les inyectó en cerebro (Beck et al, 1994; Yamashita et al, 1997; Schabitz et al, 2000; Kiprianova et al, 1999) o en ratas a las que se les administró algún fármaco neuroprotector o se

intentaron maniobras neuroprotectoras que resultaron en un incremento en la expresión de BDNF (Qu et al, 2010; Salazar-Colocho et al, 2008; Wang et al, 2006; Miyata et al, 2001; Zhang et al, 2006; Cao et al, 2011; Truettner et al, 2002; Kim et al, 2009). Por el contrario, disminuciones en la expresión del RNAm de BDNF en regiones discretas del cerebro están asociadas con atrofia o muerte neuronal (Murer et al, 2001). El estrés también modifica los niveles del RNAm de BDNF en el hipocampo (Marmigere et al, 2003; Smidth, 1996; Smith et al, 1995; Watson et al, 1999). El hipocampo es una región cerebral particularmente vulnerable a varios tipos de daño y es una estructura cerebral muy importante para el aprendizaje y memoria espacial así como para la memoria declarativa (Eichenbaum, 1997; Eichenbaum, 1981).

Evidencia sustancial sugiere que entre otras funciones el NGF actúa protegiendo neuronas en respuesta a un daño severo y que la señalización de éste facilita el crecimiento y la reparación de neuritas. El NGF promueve sobrevivencia y crecimiento en células que expresan TrkA a través de la activación de las vías PI3K/AKT y Ras/MAPK (Grewal y cols., 1999; Kaplan y Miller, 2000). El NGF se incrementa a las 12h en CA1, CA3/giro dentado (Takeda, 1993) después de isquemia cerebral y a los dos días los niveles se disminuyen.

La progesterona y el estradiol tienen la capacidad de regular la síntesis del mensajero y la proteína de NGF de forma variable entre algunos órganos (Bjorling y cols., 2002).

Se ha demostrado que el NGF protege contra muerte neuronal y la administración de NGF exógeno ha mostrado prevenir o reducir significativamente déficits neurológicos después de daño hipóxico/isquémico (Sofroniew y cols., 2001). En daño traumático en la corteza, la progesterona demostró incrementar los niveles del NGF lo que se relacionó con mejoras en la recuperación de la conducta, en otros trabajos se ha mostrado que el incremento de NGF se correlaciona con beneficios post trauma como la atenuación de muerte de neuronas colinérgicas en cerebro basal anterior (Chen y cols., 2005; Mahmood y cols., 2002), promueve el crecimiento axonal en sustancia blanca (Pettigrew y cols., 2007), reduce la pérdida neuronal inducida por axotomía (Tuszinky y Gaje, 1995) e inhibe la

apoptosis neuronal, todos estos factores pueden ser modulados por la administración de P4.

ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS DE NEUROPROTECCION

El daño neuronal por isquemia se puede reducir mediante la administración previa o inmediata (dentro de los primeros minutos a partir del episodio de la isquemia) de fármacos que disminuyan o contrarresten uno o varios de los mecanismos fisiopatológicos que esta condición desencadena (como revisión, véase Letechipía et al, 2004; Cervantes et al., 2012).

De este modo, el daño específico a las neuronas piramidales de algunas áreas del cuerno de Ammón del hipocampo, como las de CA1 y el Hilus del giro dentado, y en menor grado las de CA2 y CA3, se han utilizado como un indicador de la severidad del daño por isquemia global, en tanto que la preservación de la neuronas piramidales de las regiones selectivamente vulnerables a la isquemia, es un indicador del efecto neuroprotector del fármaco utilizado.

ANTECEDENTES

Entre los muy diversos agentes que se ha demostrado que reducen la magnitud del daño cerebral en modelos experimentales de isquemia focal o global, así como en otros modelos de daño in vivo e in vitro, se encuentra la Progesterona (P4) (Gibson et al., 2008; Gibson et al., 2009; Herson et al., 2009; Hoffman et al., 2006; Hu et al., 2009; Sayeed and Stein, 2009; Schumacher et al., 2007; Singh, 2012; Stein, 2008; Vagnerova et al., 2008) (Jiang y cols., 1996; Chen y cols., 1999; Sayeed y cols., 2007; Gonzalez-Vidal y cols., 1998; Cervantes y cols., 2001; Morali y cols.,2005; Morali y cols., 2011), la cual tiene diversos mecanismos celulares de acción, algunos de ellos mediados por su conversión a uno de sus principales metabolitos, la 5 α ,3 α -alopregnanolona. Sus efectos neuroprotectores se han atribuido principalmente al incremento de la actividad GABAérgica inhibitoria, que contrarresta el daño ocasionado por los neurotransmisores excitadores; a sus acciones antioxidantes que reducen el daño oxidativo; a la disminución de la liberación de citocinas inflamatorias; y a sus acciones antiapoptóticas (Lambert et al., 1999; Singh, 2005; Stein, 2005; Stein et al., 2007).

En modelos de daño traumático al cerebro se ha demostrado que la progesterona reduce el daño neuronal (Jones et al., 1997; Roof y Hall, 2000; Roof y cols., 1994), la actividad de la caspasa 3 y la fragmentación del DNA (Djebaili et al., 2004, 2005), y aumenta la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 en corteza cerebral (Yao et al., 2005). La progesterona ha demostrado también tener efectos neuroprotectores in vitro, en neuronas del hipocampo en cultivo contra el daño por FeSO₄ y β -amiloide (Goodman et al., 1996) y glutamato (Nilsen y Brinton, 2002; Nilsen y Diaz-Brinton, 2003).

En modelos de isquemia cerebral focal, el tratamiento con progesterona reduce la extensión del infarto cerebral y mejora la recuperación neurológica de ratas o de ratones, evaluados en los primeros días o hasta 21 días después de ser sometidos a la oclusión transitoria o permanente de la arteria cerebral media (Chen et al., 1999; Ishrat et al., 2009; Jiang y cols., 1996; Sayeed et al., 2007).

Los efectos neuroprotectores de la progesterona en isquemia cerebral global han sido demostrados tanto en un modelo de paro cardiorespiratorio en gatas, como en un modelo de oclusión de los cuatro vasos (4-OV) en ratas. En ambos casos, el tratamiento con P4 ha permitido una recuperación neurológica adecuada de los animales después de la isquemia y una mejor ejecución en pruebas de aprendizaje y memoria espacial, en comparación con animales sin tratamiento y ha preservado al menos parcialmente la población de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo y sus características citoarquitectónicas incluyendo las arborizaciones y las espinas dendríticas (González-Vidal et al., 1998; Cervantes et al., 2001; Morali et al., 2005; 2011; 2012). También se han evaluado sus efectos en modelos de isquemia global en ratas ovariectomizadas y en ratones, y se ha demostrado que reduce algunos indicadores de daño oxidativo e inflamatorio, así como el edema (Aggarwal et al., 2008; Ozacmak y Sayan, 2009).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la administración de progesterona post-isquemia sobre la expresión del RNAm de BDNF y NGF así como del receptor TrkB en cerebro de ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar los efectos de la administración de progesterona post-isquemia sobre la expresión del RNAm de BDNF, de NGF y del receptor TrkB, en el cerebro de ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda, a los 2 días post-isquemia.
- 2) Analizar los efectos de la administración de progesterona post-isquemia sobre la expresión del RNAm de BDNF, de NGF y del receptor TrkB, en el cerebro de ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda, a los 7 días post-isquemia.

HIPOTESIS

La administración de progesterona post-isquemia incrementará la síntesis del RNAm de BDNF, de NGF y de TrkB a los dos y siete días post-isquemia en ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda.

METODOS

Se utilizaron ratas macho adultas (5-6 meses de edad), de la cepa Sprague-Dawley, que se mantuvieron en jaulas individuales (20x25x42 cm) en un cuarto con ciclos de luz:oscuridad de 12:12h (luz de 06:00 a 18:00) y temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), controlados.

Las ratas se dividieron en tres grupos experimentales:

1.- INTACTO (INT), grupo de ratas intactas (n=6), de la misma edad que las experimentales, sin ser sometidas a ninguna manipulación.

2.- ISQ+VEH, grupo que se sometió a un episodio de isquemia cerebral global aguda mediante el modelo de oclusión de los cuatro vasos (4VO) y tratado con el vehículo de progesterona (0.5 ml, iv), a los 15 min, 2, 6, 24, 48 y 72 horas post-isquemia. (Ratas evaluadas 2 días post-isquemia, n= 6; ratas evaluadas 7 días post-isquemia, n=6).

3.- ISQ+P4, grupo que se sometió a un episodio de isquemia cerebral global aguda mediante el modelo 4VO y tratado con progesterona soluble en agua (complejo de progesterona con β - ciclodextrina, Sigma Chemical Co., San Luis. MO, EEUU), 8 mg/kg, iv, a los 15 min, 2, 6, 24, 48 y 72 horas post-isquemia. (Ratas evaluadas 2 días post-isquemia, n= 6; ratas evaluadas 7 días post-isquemia, n=5).

MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA

El episodio de isquemia cerebral global aguda se indujo utilizando el modelo de “oclusión de los cuatro vasos” siguiendo el procedimiento previamente descrito por otros autores (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988). Bajo anestesia con xilazina (10 mg/kg, im) y ketamina (90 mg/kg, im) se hizo una incisión en la piel de la nuca por detrás del hueso occipital y se separaron en la línea media los músculos de la nuca hasta lograr el acceso a las apófisis transversas de la primera vértebra cervical. Se localizó en cada una de ellas, la arteria vertebral en su punto de emergencia a través del foramen alar y se

cauterizó con un electrocauterio manual, con lo que quedaron ocluidas permanentemente (fig. 7).

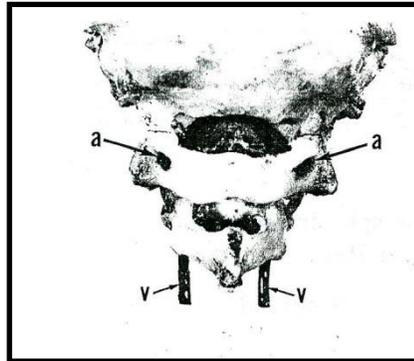


Figura 7. Vista dorsal de la porción posterior de un cráneo de rata y de la primera y segunda vértebras cervicales. Abreviaturas: a, foramen alar de la primera vértebra cervical; v, arterias vertebrales en su trayecto rostral a través del canal vertebral y por debajo del foramen alar. Tomado de Pulsinelli y Brierley (1979).

A través de otra incisión en la región ventral del cuello, se tuvo acceso a las arterias carótidas comunes, se aislaron del nervio vago, se dejaron referidas mediante una porción de hilo de seda calibre 3-0 para su acceso dos días después (figura 5). Se introdujo un hilo de seda quirúrgica gruesa calibre 0 a través de la incisión ventral del cuello, el que se hizo pasar por detrás de la tráquea, esófago, arterias carótidas comunes y nervios vagos. Los cabos del hilo se pasaron por debajo de la piel hasta la nuca de modo de salir por un punto de la incisión dorsal y se anudaron para evitar su retracción. A través de esa misma incisión se localizó la vena yugular izquierda, se disectó una porción de ella, de aproximadamente 1 cm y se ligó el extremo distal con hilo de seda (3-0) ocluyendo el flujo. El extremo proximal se rodeó con otro hilo de seda (3-0) y se realizó una incisión en la vena, por donde se insertó un catéter de polietileno (PE 50) de 15 cm de longitud previamente lleno con solución salina, el cual se sujetó firmemente en el interior de la vena apretando y anudando el hilo que la rodeaba. El extremo libre del catéter se hizo pasar por debajo de la piel hasta salir por la incisión de la nuca y se anudó sobre sí mismo para cerrarlo. Se dejó este catéter

a permanencia para la posterior administración de los tratamientos correspondientes a cada grupo. Se suturaron las heridas.

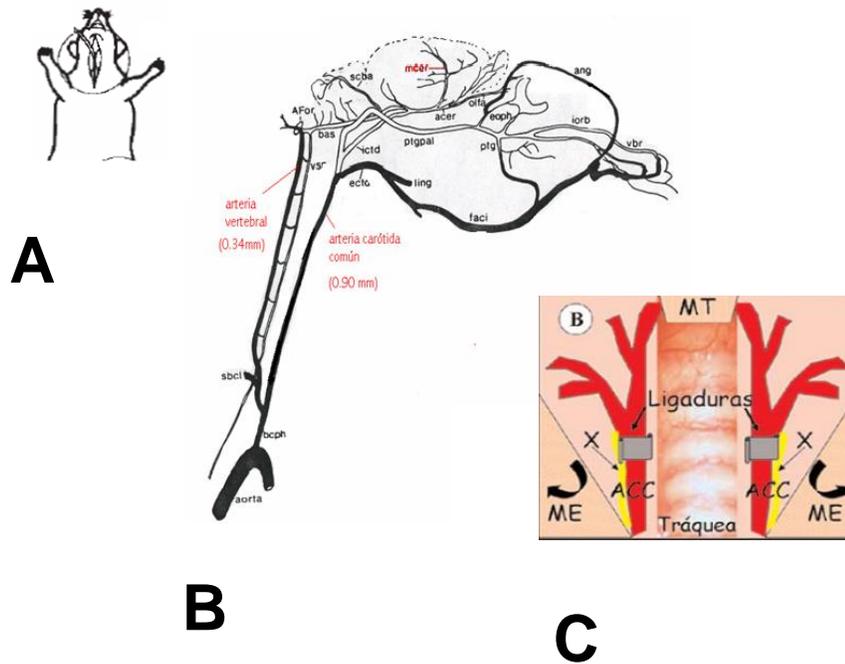


Figura 8. Representación esquemática de los procedimientos realizados y de la ubicación anatómica de las arterias vertebrales y carótidas localizadas en la primera fase de la oclusión de los cuatro vasos. A) incisión ventral en el cuello de la rata. . B) origen y trayectoria de las principales arterias que irrigan al cerebro y que son ocluidas para provocar isquemia global por el modelo de “oclusión de los cuatro vasos”, C) representación esquemática de la oclusión de las arterias carótidas comunes. Tomado de (A) Roda, 1998; (B) Oliveira, 2005; (C) Academic Press Inc 2ª ed.

Dos días después, bajo anestesia con sevoflurano (2% en O₂) se retrajo el hilo de seda en la nuca y se torció para comprimir los músculos cervicales y paravertebrales y con ello la red vascular que se encuentra entre esos músculos, para evitar el flujo sanguíneo colateral que llega al cerebro a través de ella. Se abrió la incisión ventral del cuello y se localizaron las carótidas comunes.

Bajo estas condiciones y observado bajo un microscopio de cirugía se ocluyeron estas arterias utilizando clips quirúrgicos microvasculares, se retiró la anestesia y se mantuvo la oclusión durante 15 o 20 min para provocar la isquemia (figura 9). Al terminar este periodo se retiraron los clips y se suspendió la compresión de la musculatura paravertebral. Se registró en forma continua la temperatura corporal durante todo el procedimiento y se mantuvo entre 35.5 y 37.5 °C con el uso de un

cojín eléctrico. Se verificó bajo el microscopio la suspensión del flujo sanguíneo durante la oclusión de las carótidas y su restitución al retirar los clips.



Figura 9. Inducción de la isquemia cerebral global por oclusión de las carótidas comunes mediante clips quirúrgicos durante 15 o 20 min. La rata permanece inconsciente durante ese periodo.

Fue un requisito del modelo, que la rata permaneciera inconsciente todo el periodo de oclusión y por lo menos 20 minutos después de éste, como indicador de la severidad de la isquemia. Al terminar los procedimientos quirúrgicos se mantuvo a cada rata unos cuantos minutos en observación, se registró la recuperación del estado de conciencia tomando como indicador el reflejo de enderezamiento y luego de su recuperación se suturó la herida bajo anestesia con sevofluorano.

Quince minutos después del episodio de isquemia y a los tiempos mencionados anteriormente se les administró el tratamiento vía intravenosa correspondiente a cada grupo y se vigiló su recuperación.

OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LOS CEREBROS

EXTRACCION DE RNA

Para la cuantificación del RNAm los cerebros se obtuvieron en fresco por decapitación y se congelaron inmediatamente en hielo seco y se mantuvieron a -72°C hasta su procesamiento. Una vez reunidas todas las muestras de los grupos experimentales se realizó una disección en la cual se colocó el cerebro congelado sobre su parte dorsal sobre una caja de Petri con hielo seco para mantener al cerebro en congelación; basados en imágenes del atlas del cerebro de ratas se realizaron cortes con una navaja de modo de obtener una rebanada de aproximadamente 3 mm de la zona correspondiente al hipocampo dorsal, entre las coordenadas Bregma -2.30 a Bregma -4.52 de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1986).

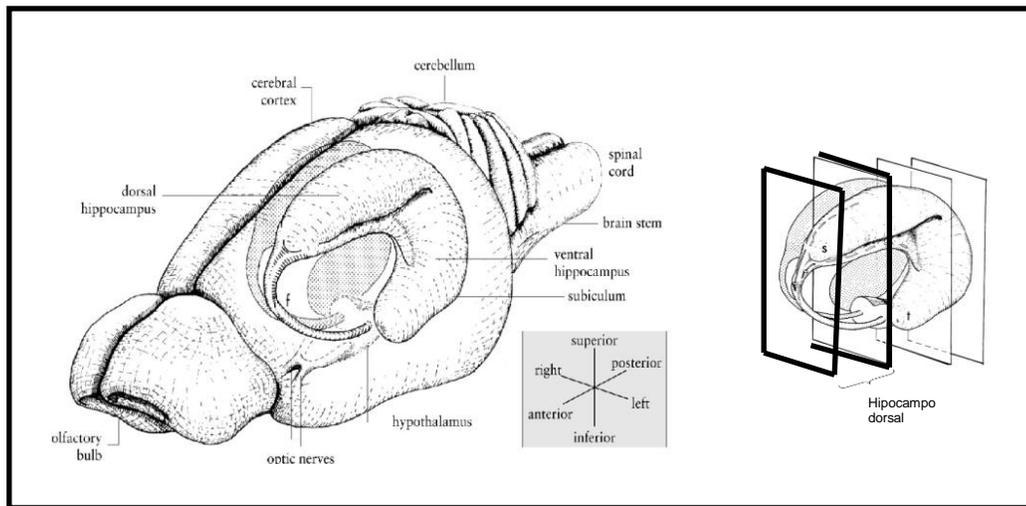


Figura 10. Esquema representativo del hipocampo, A) esquema del hipocampo en cerebro de rata, B) representación de la rebanada que contiene al hipocampo dorsal evaluado en este trabajo

Se realizó la extracción de RNAm total por medio de la técnica de Tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). El hipocampo se descongeló y se le adicionó un volumen de $500\ \mu\text{l}$ de una mezcla de solución D y β -mercaptoetanol para hacer un homogenado por medio de un sonicador (Sonics Vibra Cell Ultrasonic Procesor). Después al homogenado se le adicionó en el siguiente

orden: 1 volumen de fenol saturado, 1/10 de volumen de acetato de sodio y 3/10 de cloroformo isoamílico, pasando por vórtex en cada paso y se dejaron reposar por 15 min en hielo; después la mezcla se centrifugó 20 min a 10000 rpm a 4°C, se recuperó a fase acuosa y se adicionó un volumen de isopropanol frio; se guardaron las muestras a -20°C toda la noche. Al siguiente día se hizo un centrifugado a 13800 rpm a 4°C por 30 minutos, se decantó el sobrenadante (isopropanol) y el precipitado se resuspendió en etanol al 75% y se centrifugó a 10000 rpm a 4°C por 20 minutos (3 veces). Al final del último lavado se decantó el sobrenadante de etanol y el precipitado se secó en un savant por 5 minutos, una vez seco el pellet se mantuvo en refrigeración a -20°C.

Al siguiente día el precipitado se resuspendió en H₂O/DEPC para hacer lecturas de la pureza del RNA extraído, en un espectrofotómetro a 230-260-280 nm; si la relación 260/230 fue menor a 1.5, indicando que aún contenía sales entonces se le agregó acetato de sodio y después etanol al 75% y se almacenó a -20°C y al siguiente día se lavó y se realizaron lecturas nuevamente. Se evaluó la integridad del RNAm extraído por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 50V-100 A por una hora; el gel se reveló en bromuro de etidio y se adquirió la imagen en un transiluminador UV. Una vez teniendo el RNA extraído se inactivó por 5 min en baño maría a 65°C y se hizo la transcripción a cDNA en baño maria a 37°C por dos horas con la siguiente mezcla: H₂O/DEPC, buffer, DTT, dNTP's, oligo poli T, transcriptasa reversa.

RT-PCR

Se realizaron estandarizaciones a diferentes condiciones, temperaturas y número de ciclos para BDNF, TrkB y NGF y el control de carga utilizado β-actina.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) primero se inactivó el RNAm en baño maría a 65°C por 5 minutos y luego se colocaron en hielo, se hizo la siguiente mezcla para PCR:

H ₂ O/DEPC	35µl	oligo s	1µl
Buffer	5µl	oligo as	1µl

MgCl₂2.5µl
 dNTP's1µl

Taq Pol0.5µl
 cDNA2µl

La PCR se realizó en un termociclador Ependorf con los siguientes programas: se realizaron ciclos de los oligos usados en este trabajo (tabla 3). BDNF de 27 ciclos, TrkB 25 ciclos, NGF 30 ciclos todos con 25µmol a 64°C, para β-actina 23 ciclos, 25µmol a 64°C; cada ciclo consta de 3 temperaturas, la primera es de 94°C fase de desnaturalización, la segunda temperatura es de 64°C fase de unión de las sondas a sus secuencias complementarias y por último una temperatura de 72°C fase de elongación de la cadena complementaria por la taq polimerasa. Una vez terminada la PCR se corrió el RNAm en un gel de agarosa al 2% por 40 min a 50V-100 A, se revelaron en bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador UV, se capturaron con un programa de análisis de imágenes y por último se semicuantificó. En la tabla 3 se muestran las secuencias de los oligos utilizadas en la PCR sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 3. Secuencias de oligos usados para PCR

GEN	SECUENCIA SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO
BDNF	AGGACGCGGACTTGTACT	GCTGTGACCCACTCGCTAAT
TrkB	CTACCTGGCATCCCAACT	AGCCGCTCCTTGTCTTGTTA
NGF	CCAAGGACGCAGCTTTCTAT	CTCCTGTGAGTCCTGTTGAA
β- actina	GACGATGCTCCCCGGGCTGTATTC	TCTCTTGCTCTGGGCCTCGTCACC

En la tabla 4 y en la figura 11 se muestran los ciclos y condiciones para cada oligo evaluado en este trabajo.

Tabla 4. Condiciones y numero de ciclos de amplificación para cada gen.

OLIGO	T(°C)	pMol/μl	Ciclos
BDNF	64	25	27
TrkB	64	25	25
NGF	64	25	30
B-actina	64	25	23

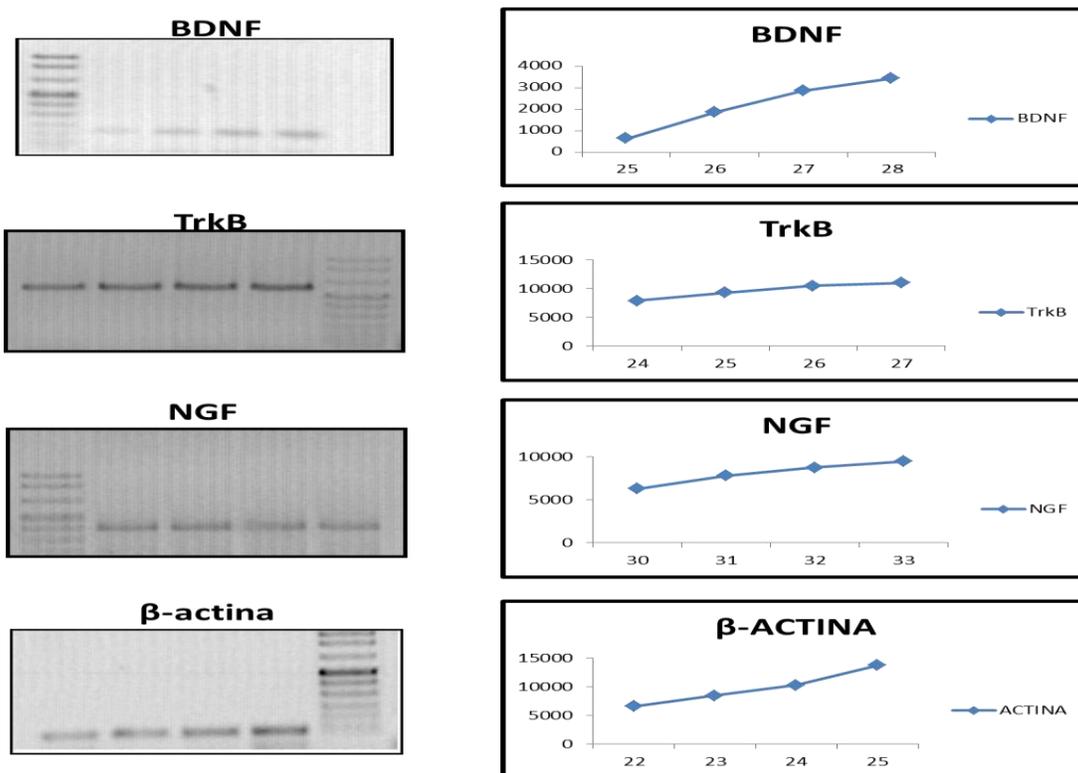


Figura 11. Estandarización de la amplificación del RNAm de BDNF, así como del control usado β-actina.

ANALISIS ESTADISTICO

A los valores obtenidos de los 3 grupos experimentales en la cuantificación en el gel de agarosa se les restó el valor de su blanco (valor de BDNF-BCO) para obtener el valor de expresión tanto para el BDNF, TrkB y NGF como para los controles de carga utilizados β -actina (Act-BCO) y G3PDH (G3-BCO); después se hizo una división del valor de BDNF y β -actina (BDNF/Act). El resultado de esta división se expresó como porcentaje con el siguiente cálculo (BDNF/Act * 100/media del grupo INT). Con los porcentajes de expresión obtenidos para cada rata se obtuvo un promedio para cada grupo y se hizo una comparación entre los grupos utilizando un análisis de varianza ANOVA y la prueba post-hoc de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

SEMICUANTIFICACION DE LA EXPRESION DEL RNAm DE BDNF POR RT-PCR

A los dos días post-isquemia se observó un aumento en la expresión del RNAm en el hipocampo dorsal en ambos grupos isquémicos ISQ+VEH (161.48%) e ISQ+P4 (138.08%) pero este aumento solamente fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el grupo ISQ+VEH en comparación con el grupo control intacto (100%), como se muestra en la figura 12. El aumento del grupo tratado con progesterona no presentó diferencia significativa en comparación con los otros grupos experimentales.

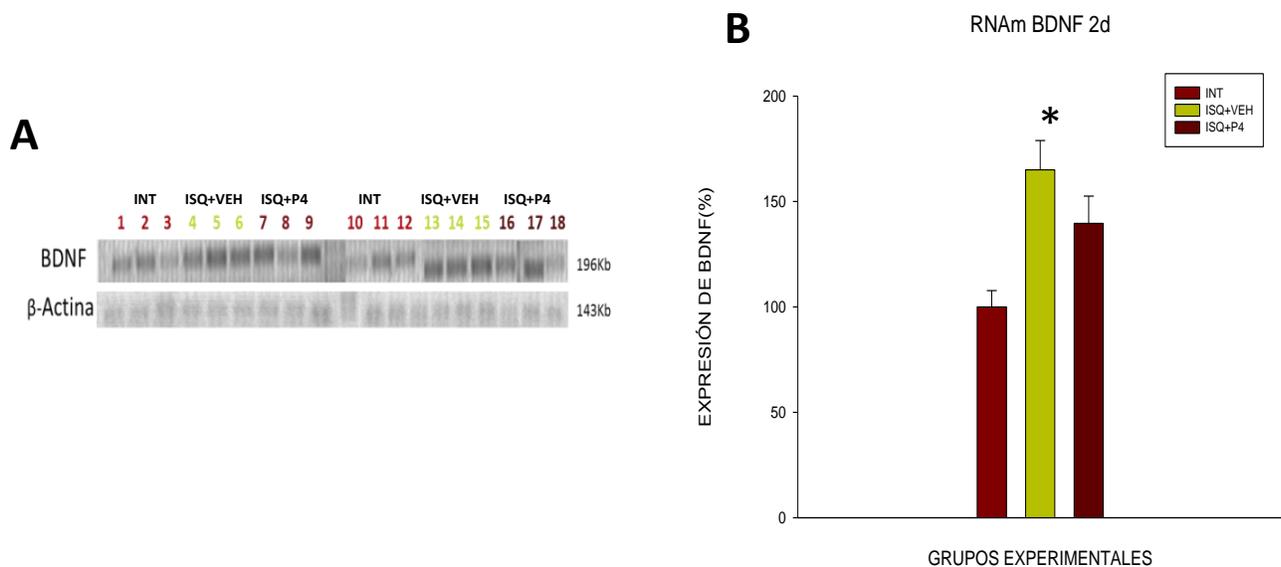


Figura 12. Expresión del RNAm de BDNF, 2 días post-isquemia en el hipocampo dorsal de ratas isquémicas con y sin tratamiento y en ratas intactas. A) Imagen de los genes amplificados por RT-PCR. B) Porcentajes de expresión en los grupos sometidos a isquemia y tratados con vehículo (ISQ+VEH) o con progesterona (ISQ+P4), en relación con la expresión del control intacto (INT) tomado como 100%. Cada columna representa la media \pm ES de estos porcentajes. * $p < 0.05$ ISQ+VEH vs INT; prueba de Bonferroni.

Siete días post-isquemia sólo se observó un ligero aumento en ambos grupos isquémicos ISQ+VEH (111.65%) e ISQ+P4 (112.03%), el cual no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control INT ni hubo diferencias entre estos dos grupos, como se puede ver en la figura 13.

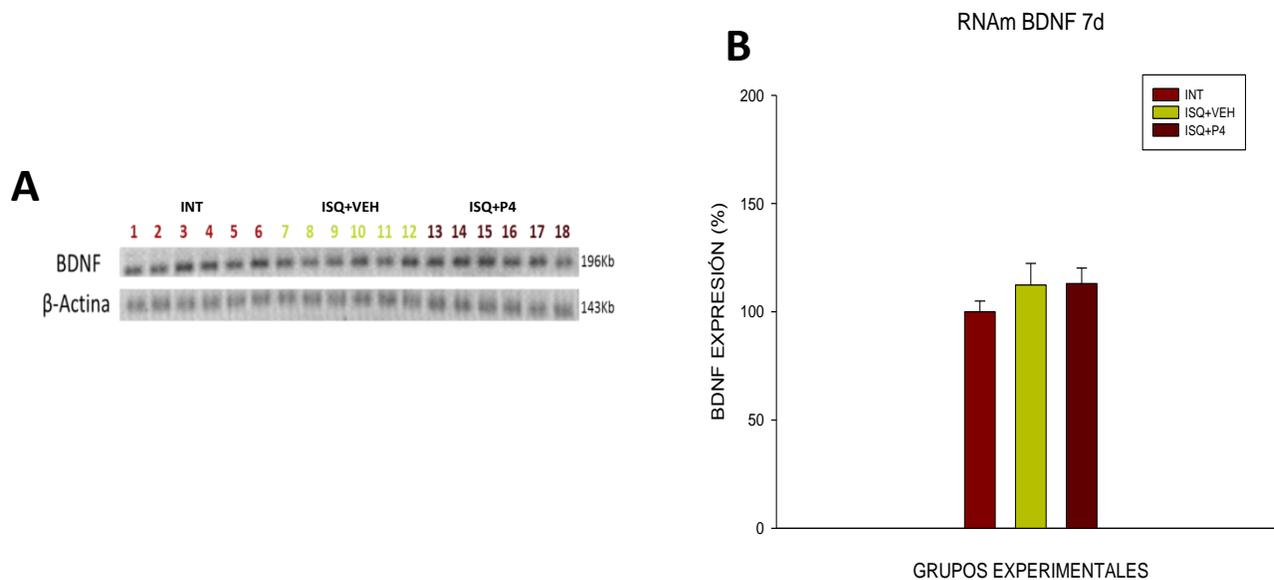


Figura 13. Expresión del RNAm de BDNF, 7 días post-isquemia en el hipocampo dorsal de ratas isquémicas con y sin tratamiento y en ratas intactas. A) Imagen de los genes amplificados por RT-PCR. B) Porcentaje de expresión en los grupos sometidos a isquemia y tratados con vehículo (ISQ+VEH) o con progesterona (ISQ+P4), en relación con la expresión del control intacto (INT) tomado como 100%. Cada columna representa la media \pm ES de estos porcentajes. * $p < 0.05$; prueba de Bonferroni.

EVALUACION DEL RNAm DE TrkB POR RT-PCR

En el caso de la expresión del receptor a BDNF de alta afinidad, el TrkB, a los dos días post-isquemia, se observó una ligera disminución en el grupo ISQ+VEH (85.20%), no significativo en relación con el grupo intacto tomado como 100% y un aumento en los niveles del mensajero de TrkB en el grupo ISQ+P4 (137.33%), estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en comparación con el grupo ISQ+VEH pero no con respecto al grupo control (fig. 14)

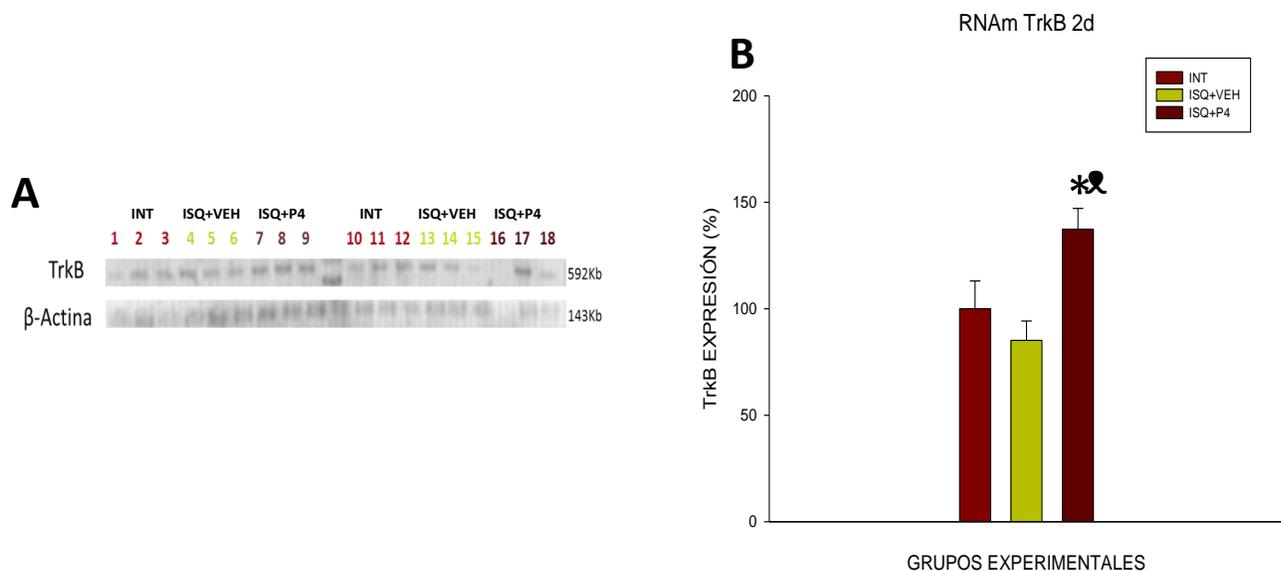


Figura 14. Expresión del RNAm de TrkB, 2 días post-isquemia en el hipocampo dorsal de ratas isquémicas con y sin tratamiento y en ratas intactas. A) Imagen de los genes amplificados por RT-PCR. B) Porcentajes de expresión en los grupos sometidos a isquemia y tratados con vehículo (ISQ+VEH) o con progesterona (ISQ+P4), en relación con la expresión del control intacto (INT) tomado como 100%. Cada columna representa la media \pm ES de estos porcentajes * $p < 0.05$ ISQ+P4 vs INT, $p < 0.05$ ISQ+P4 vs ISQ+VEH; prueba de Bonferroni.

A los siete días de la isquemia no se encontraron diferencias significativas en la expresión del TrkB, siendo los valores de los grupos isquémicos muy similares a los del grupo INT: ISQ+VEH, 108.71%; ISQ+P4, 101.93 (fig 15).

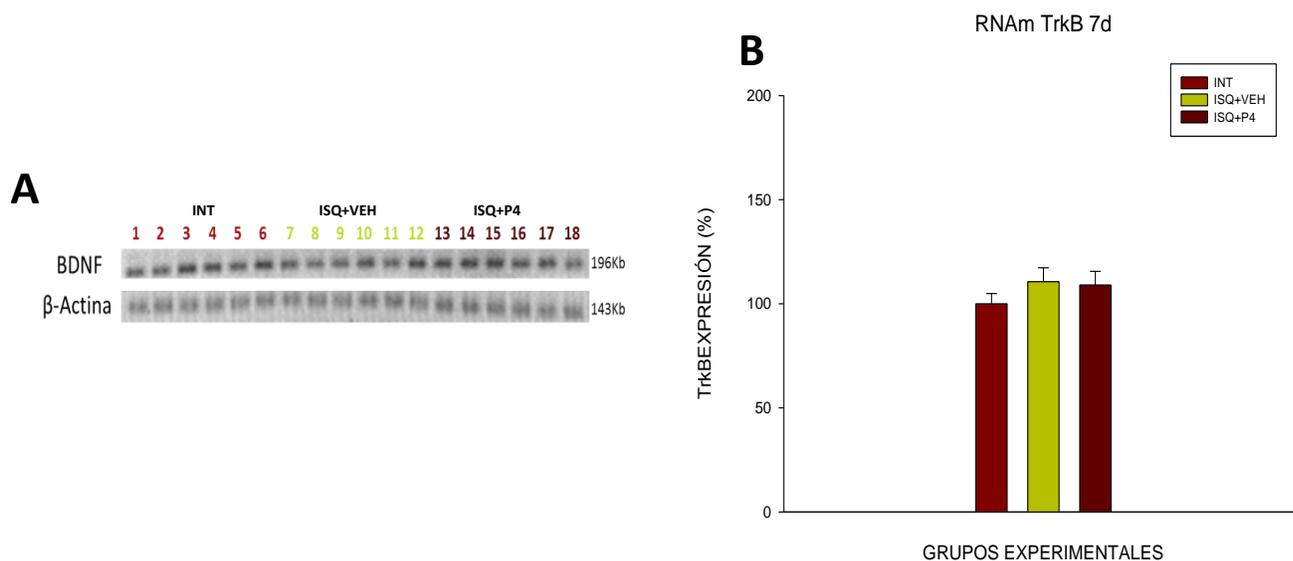


Figura 15. Expresión del RNAm de TrkB, 7 días post-isquemia en el hipocampo dorsal de ratas isquémicas con y sin tratamiento en ratas intactas. A) Imagen de los genes amplificados por RT-PCR. B) Porcentajes de expresión en los grupos sometidos a isquemia y tratados con vehículo (ISQ+VEH) o con progesterona (ISQ+P4), en relación con la expresión del control intacto (INT) tomado como 100%. Cada columna representa la media \pm ES de estos porcentajes * $p < 0.05$; prueba de Bonferroni.

EVALUACION DEL RNAm DE NGF POR RT-PCR

El RNAm de NGF cuantificado dos días después de la isquemia mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) (fig 16) en los dos grupos isquémicos cuando se compararon con el control INT. En el grupo tratado con P4, el aumento de la expresión del RNAm del NGF fue mayor que el del grupo ISQ+VEH, con diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$).

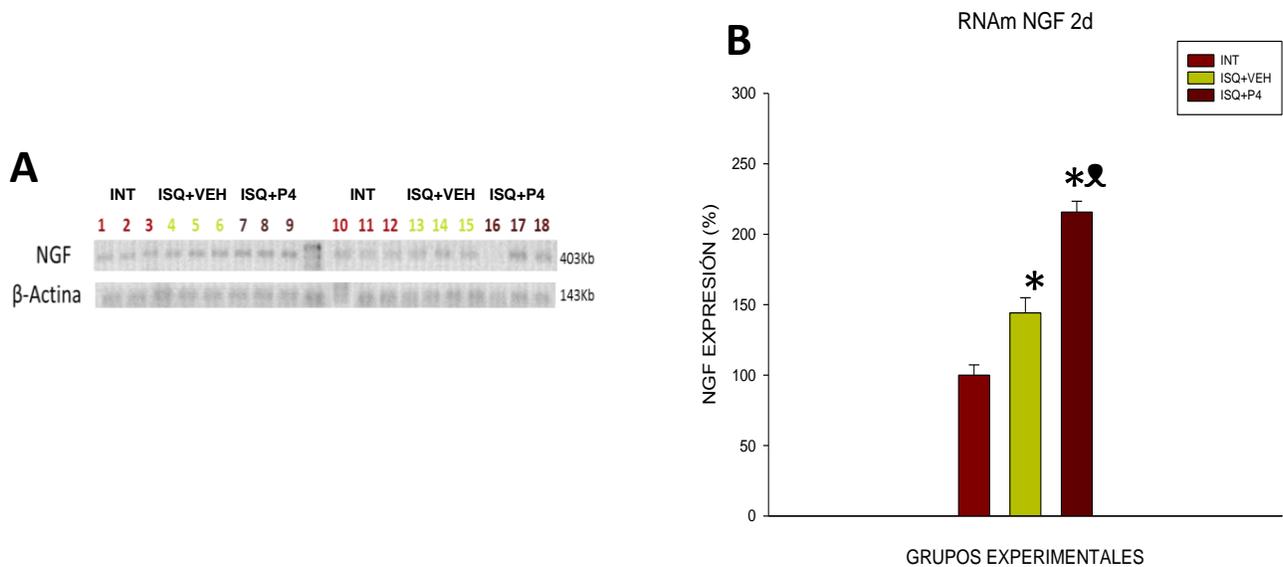


Figura 16. Expresión del RNAm de NGF, 2 días post-isquemia en el hipocampo dorsal de ratas isquémicas con y sin tratamiento y en ratas intactas. A) Imagen de los genes amplificados por RT-PCR. B) Porcentajes de expresión en los grupos sometidos a isquemia y tratados con vehículo (ISQ+VEH) o con progesterona (ISQ+P4), en relación con la expresión del control intacto (INT) tomado como 100%. Cada columna representa la media \pm ES de estos porcentajes * $p < 0.05$ ISQ+VEH vs INT, * $p < 0.05$ ISQ+P4 vs INT, [ⓧ] $p < 0.05$ ISQ+P4 vs VEH; prueba de Bonferroni.

A los 7 días después de la isquemia aún se encontraron aumentados los niveles del NGF en el grupo ISQ+VEH (122.08%) y en el grupo ISQ+P4 (127.09%) (fig. 17), pero la diferencia solamente fue significativa ($p < 0.05$) entre el grupo tratado con progesterona y el grupo control INT.

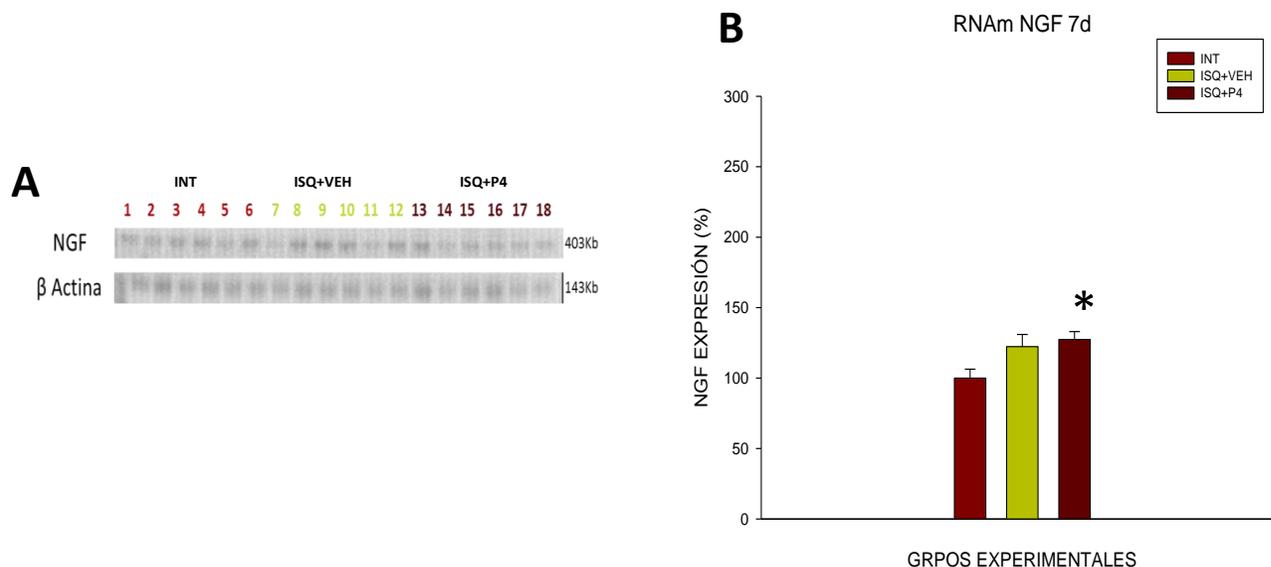


Figura 17. Expresión del RNAm de NGF, 7 días post-isquemia en el hipocampo dorsal de ratas isquémicas con y sin tratamiento en ratas intactas. A) Imagen de los genes amplificados por RT-PCR. B) Porcentajes de expresión en los grupos sometidos a isquemia y tratados con vehículo (ISQ+VEH) o con progesterona (ISQ+P4), en relación con la expresión del control intacto (INT) tomado como 100%. Cada columna representa la media \pm ES de estos porcentajes * $p < 0.05$ ISQ+P4 vs INT; prueba de Bonferroni.

DISCUSIÓN

El cerebro está dotado con un rico complemento de mecanismos de defensa los cuales se ponen de manifiesto ante un daño agudo. El daño isquémico que activa vías que llevan a la muerte celular, por otra parte activa también mecanismos protectores sistémicos y locales que contrarrestan parcialmente la progresión del daño. Aunque los efectores del daño prevalezcan al final, hay evidencias que sugieren que los mecanismos neuroprotectores limitan el daño y sientan las bases para la reparación y reorganización. Las vías que median la reparación pueden tener mecanismos distintos y ocurrir a diferente escala de tiempo de aquellos que subyacen la protección endógena en la fase aguda (Iadecola y Anrather, 2011). Como se mencionó en los antecedentes, uno de los mecanismos que se activa es la expresión de neurotrofinas.

Entre ellas, el BDNF aumenta su expresión en el hipocampo en respuesta a un daño, como ha sido demostrado en varios modelos experimentales de daño al sistema nervioso central (Dougherty et al, 2000; Ernfors et al., 1991; Kokaia et al, 1998; Lindvall et al., 1992; Matsushima et al., 1998; Rickhag et al, 2006,2007).

La isquemia induce un incremento de la expresión del RNAm de BDNF, comienza pocas horas después de la isquemia como ha sido mostrado en varios trabajos. En el giro dentado se ha demostrado desde los 30 minutos y en menor grado a 6h, en tanto que a 24 y 48h se ven disminuidos (Truettner et al., 2002). En otros trabajos se han reportado aumentos entre 2, 3 y 6 horas que para las 24 horas disminuyeron (Tsukahara et al., 1998; Kokaia et al, 1996; Lee et al., 2004, 2008; Schmidh-Kastner et al., 2001). Otros autores encontraron estos aumentos a tiempos cortos, con un pico máximo a 2 días, mientras que para los 7 y 14 días estaban disminuidos (Takeda et al.,1993; Blanquet et al., 2006; Lindvall et al.,1992; Kokaia et al., 1994, 1995; Tsukahara et al., 1998; Schmidh-Kastner et al., 2001; Himeda et al., 2006; Lee et al., 2002; Stavchansky et al., 2011).

Una de las vías activadas por la isquemia y que induce el aumento de BDNF es una cascada de señalización bifásica que involucra tres mediadores clave de sobrevivencia y plasticidad en el giro dentado: CAMKIV, CREB y BDNF. La activación de esta vía CAMKIV/CREB/BDNF en el giro dentado, pero no en CA1,

parece ser crítica para conferirle a esta región un efecto neuroprotector temprano en contra de la isquemia, dado que es una respuesta muy inicial dependiente del influjo masivo de Ca⁺⁺ y posiblemente mediada por los receptores NMDA. Así, Blanquet et al, (2006) mostraron que 6h después de la isquemia global una primer oleada de CREB fosforilado (pCREB) causa un incremento marcado en la síntesis de BDNF alcanzando un pico máximo a las 24h; esta síntesis de BDNF a su vez induce una segunda oleada de pCREB a las 48h, manteniendo una síntesis de BDNF sostenida por al menos 2 días, disminuyendo a los 7 días.

Por otra parte, la activación de CREB también está involucrada en la expresión del receptor TrkB durante la isquemia. Mediante la unión de CREB a un sitio CRE localizado 450 nucleótidos del extremo 5' del sitio de inicio de transcripción del promotor 2 de TrkB se estimula la expresión de TrkB. De esta manera, la distribución regional y el curso temporal de la inducción de CREB corresponden a la de BDNF y TrkB, sugiriendo que ambos genes están regulados por CREB (Walton et al., 1996; Merlio et al., 1993; Narumiya et al., 1998).

En el caso del NGF, la liberación de neurotransmisores excitadores y la sobrecarga de calcio durante la isquemia activa los genes inmediatos tempranos (IEG) en la fase de reperfusión (Wessel et al, 1991). Los productos de las familias de IEG, Fos y Jun forman complejos de transcripción como AP-1, los cuales pueden activar genes de respuesta tardía como el NGF (D'Mello et al., 1991). El promotor del gen de NGF tiene un sitio de unión a AP-1 el cual se une a un complejo de transcripción Fos/Jun (D'Mello et al., 1991; Hengerer et al., 1990), dando así lugar a la regulación de esta neurotrofina.

Coincidiendo con esta información, en el presente trabajo se observó un incremento en la expresión del mensajero de BDNF y de NGF dos días después de la isquemia, que disminuyó a valores control a los siete días post-isquemia.

En varios modelos experimentales se ha mostrado que la progesterona incrementa la expresión del BDNF (Singh et al., 1995; Kaur et al., 2007; Gonzalez et al., 2004; Gonzalez-Deniselle et al 2007).

El receptor intracelular/nuclear clásico de la progesterona es el principal mediador de los efectos de esta hormona en la expresión del BDNF, dado que este efecto

se bloquea por un inhibidor farmacológico del receptor eliminando el efecto, así como en ratones knockout del receptor de progesterona (Jodhka et al., 2009).

Ishrat et al, (2012) mostraron que el BDNF media los efectos de la progesterona para reducir la lesión isquémica en ratas sometidas a isquemia focal. Por el contrario, el atenuar experimentalmente los niveles de BDNF después de isquemia cerebral reduce la recuperación funcional (Chen et al., 2005; Ploughman et al., 2009).

En este trabajo la progesterona pareció atenuar el incremento en la expresión de RNAm de BDNF inducido dos días después de la isquemia y no modificó la expresión de este RNAm a los siete días post-isquemia

Los efectos de las neurotrofinas dependen de sus niveles, su afinidad de unión a receptores transmembranales y las cascadas de señalización río abajo estimuladas luego de la activación del receptor.

El papel del BDNF en la sobrevivencia neuronal se lleva a cabo a través de la activación de su receptor de alta afinidad TrkB (Lu et al., 2005; Manadas et al., 2007). Los receptores tirosina fosforilados activan las vías de señalización ERK y PI3K que contribuyen en los efectos neurotrófico de BDNF y proveen neuroprotección bajo condiciones excitotóxicas (Almeida et al., 2005; Manadas et al., 2007) y promueven la sobrevivencia neuronal (Dudek et al., 1997; Bonni et al., 1999). En el cerebro adulto la expresión de TrkB es capaz de responder a estímulos externos; entonces, un incremento rápido y transitorio del RNAm se produce por daño hipóxico/isquémico, donde se ha mostrado un aumento en la expresión del RNAm de TrkB con niveles máximos a las 2 horas después de 10 o 20 minutos de isquemia global, y a las 24 horas disminuyeron los niveles (Merlio et al., 1993; Narumiya et al., 1998).

Recientemente se reportó un incremento del RNAm de TrkB dentro de los primeros minutos (30 min) después de isquemia, que a las 24 horas se disminuyó (Stavchansky et al., 2011). La administración de la progesterona estimuló en el presente trabajo la expresión del mensajero de TrkB dos días después de la isquemia. Este aumento pudiera ser relevante para los efectos neuroprotectores de progesterona facilitando la interacción del BDNF con el receptor y la

consecuente activación de cascadas de señalización. Se sabe que esta interacción activa la cascada de PI3K que lleva a la activación de Akt (Kaur et al 2007) que es un regulador clave de supervivencia y muerte celular después de isquemia (Noshita et al., 2003), la cual inicia una serie de fosforilaciones en proteínas involucradas en procesos de activación de apoptosis inhibiéndolas, como la proteína BAD (Bcl-2/Bcl-x-promotor de muerte asociado) (Zhu et al., 2002) un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, la cual cuando no está fosforilada promueve la apoptosis uniéndose a Bcl-xL causando la liberación del citocromo c, y formando también un canal en la membrana mitocondrial por Bax (White, 2000), Akt también inhibe la actividad proteolítica de la caspasa 9 (Cardone et al., 1999), lo que lleva a procesos de supervivencia neuronal.

También podemos inferir que a nivel de la proteína podría haber un incremento en los niveles del BDNF pues se ha reportado que el BDNF es capaz de regular la expresión de su receptor TrkB en ratas control y en estados patológicos, y que la prevención de muerte neuronal por BDNF después de isquemia transitoria está asociada con el incremento de su receptor específico (Ferrer, 1998).

En cuanto al NGF, evidencia sustancial sugiere que entre otras funciones el NGF actúa protegiendo neuronas de elementos endógenos tóxicos generados durante la respuesta a un daño severo y que la señalización de este facilita el crecimiento y la reparación. El NGF promueve supervivencia y crecimiento en células que expresan TrkA a través de la activación de las vías PI3K/AKT y Ras/MAPK (Grewal et al., 1999; Kaplan y Miller, 2000). Se ha demostrado que el NGF protege contra muerte neuronal y la administración de NGF exógeno ha mostrado prevenir o reducir significativamente déficits neurológicos después de daño hipóxico/isquémico (Sofroniew et al., 2001), seis horas después de isquemia global no hay marca de apoptosis pero ésta se incrementa a tres y siete días, lo cual se revierte con el tratamiento de NGF. Este tratamiento también incrementó la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 a 6 horas post isquemia (Zhou et al., 2011).

Datos de otros autores han mostrado incrementos de NGF a tiempos cortos después de isquemia (Stavchansky et al., 2011; Takeda et al., 1998; Kokaia et al., 1995; Himeda et al., 2006).

En daño traumático en la corteza, la progesterona ha demostrado incrementar los niveles del NGF lo que se relacionó con mejoras en la recuperación neurológica (Cekic, 2012). No se tenía información sobre el posible aumento de NGF después de isquemia por el tratamiento con progesterona. En el presente trabajo el aumento de NGF observado dos días después de la isquemia, fue incrementado aún más por el tratamiento con progesterona y este aumento persistió aunque a menor nivel, siete días después de la isquemia. Este resultado pudiera formar parte de los efectos neuroprotectores de progesterona.

CONCLUSIONES

La Isquemia Cerebral Global induce un incremento transitorio de la expresión del RNAm de las neurotrofinas BDNF y NGF, pero no del receptor de alta afinidad a BDNF el TrkB dos días después de isquemia; incremento que no se mantuvo a los siete días; esto posiblemente represente una respuesta endógena parcial a los fenómenos fisiopatológicos activados por la isquemia.

El tratamiento con progesterona potenció el incremento de la expresión del RNAm del NGF a dos días post-isquemia y mantuvo el incremento siete días después. Este incremento posiblemente sea de relevancia para los efectos neuroprotectores de esta hormona.

El incremento en la expresión del receptor TrkB por el tratamiento con progesterona a los dos días pudiera optimizar la respuesta protectora mediada por BDNF.

Estos resultados, junto con reportes previos en el laboratorio sobre los efectos neuroprotectores de la progesterona contra el daño por isquemia cerebral global, sugieren que los efectos de la progesterona podrían estar mediados en parte por el BDNF y el NGF, reduciendo posiblemente la pérdida neuronal en el hipocampo, así como aumentando los fenómenos de plasticidad y reparación después de isquemia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal R**, Medhi B, Pathak A, Dhawan V, Chakrabarti A. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by global cerebral ischemia in mice. *J Pharmacol* 2008; 60: 731-737.
- Allen S**, Dawbarn D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. 2006 *Clinical Science*;110:175-191.
- Almeida RD**, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Grãos MM, Carvalho RF, Carvalho AP, Duarte CB. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3/kinase pathways. 2005. *Cell Death Differ*; 12:1329–1343.
- Alsina B**, Vu T, Cohen-Cory S. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. 2001. *Nat Neurosci*; 4: 1093-101.
- Angeletti R**, Bradshaw R. NGF from mouse submaxillary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 2417-20.
- Ann J**, Gharami, Liao G, Woo N, Lau A, Vanevski F, Torre E, Jones K, Feng Y, Lu B, Xu B. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. 2008. *Cell*; 134:175-187.
- Arevalo, J.C.**, Conde, B., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Martin-Zanca, D., Perez, P., 2001. A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* 20, 1229– 1234
- Ayer-Lelievre, C**, Olson, L, Ebendal, T, Seiger, A, Persson H. Expression of beta-nerve growth factor gene in hippocampal neurons. 1988. *Science* 240:1339-1341;.
- Barde Y**, Edgar D, Thoenen H. purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. 1982. *EMBO J*; 1:549-553
- Barbas H**, Blatt GJ. Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus*. 1995; 5: 511-533.
- Barde Y**. Trophic factors and neural survival. *Neuron* 1989; 2: 1525-34.
- Barde YA**. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. 1994. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 390: 1855-1859.
- Barker PA**, Lomen-i-ioerth C, Gensch EM, Meakin SO, GlassDJ, Shooter EM: Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *Biol Chem* 1993, 268:1515&15157.

- Blanquet PR**, Mariani J, Fournier B. Identification of a biphasic signaling pathway involved in ischemic resistance of the hippocampal dentate gyrus. 2006. *Experimental Neurology*; 202:357–372
- Beck T**, Lindholm D, Castren E, Wree A. Brain-derived neurotrophic factor protects against cell damage in rat hippocampus. 1994. *J Cereb Blood Flow Metab*; 14:689-692.
- Bibel M**, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. 1998. *EMBO J*; 616-622.
- Bibel M**, Barde Y-A. Neurotrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. 2000. *Genes Dev*; 14:2919-2937.
- Block F**. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol* 1999; 58:279-295.
- Bonni A**, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and independent mechanisms. 1999. *Science*; 286:1358 –1365.
- Bruno MA**, Cuello AC. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. 2006. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6735–6740
- Bunone G**, Mariotti A, Compagni A, Morandi E, Della Valle G. Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 1997;14:1463–70.
- Cai W**, Zhu Y, Furuya K, Li Z, Sokabe M, Chen L. Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55:127–138.
- Cardone M.H.**, Roy N., Stennicke H.R., et al. Regulation of cell death protease caspase 9 by phosphorylation. 1998 *Science* 282, 1318–1321.
- Cekic M**, Johnson SJ, Bhatt VH, Stein DG. Progesterone treatment alters neurotrophin/proneurotrophin balance and receptor expression in rats with traumatic brain injury. 2012. *Restor Neurol Neurosci.*;30:115-26.
- Cervantes M**. Efectos de algunos fármacos en contra del daño cerebral provocado por isquemia-anoxia. En: *Temas selectos de Neurociencias*. J Velázquez-Moctezuma (Ed.), UAM-Iztapalapa. México. 1995, pp: 149-171.
- 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.
- Chang HY**, Yang X. Proteases for cell suicide: function and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64:821-846.

- Chao MV.** Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. 1992. *Neuron*; 9: 583–93.
- Chao MV, Hempstead BL.** p75 and Trk: a two-receptor system. 1995. *Trends Neurosci*; 18:321–6.
- Chao M, Bothwell M.** Neurotrophins: to cleave or not to cleave. 2002. *Neuron*; 33:9-12.
- Chen, K., Nishimura, M., Armanini, M., Crowley, C., Spencer, S. and Phillips, H.** Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits. 1997. *J. Neurosci.* 17, 7288–7296
- Chen J, Zacharek A, Zhang C, Jiang H, Li Y, Roberts C, Lu M, Kapke A, Chopp M.** Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. 2005. *J Neurosci* 25:2366–2375.
- 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 DW.** Ionic dependence of glutamate toxicity. *J Neurosci* 1987; 7:369-79.
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. 1987. *Anal Biochem* ;162:156-9.
- Chu CT.** Eaten alive: autophagy and neuronal cell death after hypoxia-ischemia. *Am J Pathol.* 2008; 172:284-7
- Clary DO, Reichardt LF.** An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11133–7.
- Cohen S, Levi-Montalcini R.** A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. 1956. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42: 571-574.
- Cohen, S.** Purification of a nerve growth-promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:302-311; 1960.
- Conner J, et al.** Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. 1997. *J Neurosci*; 17:2295-2313
- Diez-tejedor E, Alonso de Leciñana M,** fisiopatología de la isquemia cerebral: el daño isquémico repercusión. En: *banarrague Menteria F, Cantu C (Eds). Enfermedad Vasculare Cerebral. McGraw Hill Interamericana.* 1988 pp. 13-25.

- Djebaili M**, Guo Q, Pettus EH, Hoffman SW, Stein DG. The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2005; 22:106-18.
- D'Mello S.R.**, Heinrich G. Structural and functional identification of regulatory regions and cis elements surrounding the nerve growth factor gene promoter. 1991. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 11 255–264.
- Dougherty KD**, Dreyfus C F & Black IB. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. 2000. *Neurobiology of Disease*; 7: 574–585.
- Dudek H**, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. 1997. *Science*; 275:661– 665
- Earnshaw WC**, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:383.
- Eide F**, Vining E, Eide B, Zhang K, Wang X, Reichardt L. Naturally occurring truncated TrkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. 1996. *J Neurosci*; 16:3123-3129.
- Elmore S**. Apoptosis: a review of programmed cell death. 2007. *Toxicol Pathol*; 35:495-516.
- Endres M y Dirnagl U**. Ischemia and stroke. En: Alzheimer C (ed.). *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*. Kluwer Academic/Plenum Publishers/Landes Bioscience. EEUU. 2002.
- Ernfors, P.**, Bengzon, J., Kokaia, Z., Persson, H., & Lindvall, O. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factor in the brain during kindling epileptogenesis. 1991. *Neuron*; 7: 165–176.
- Ferrer Isidre**, Jordi Ballabriga, Eulalia Martí, Esther Pérez, Jordi Alberch, Ernest Arenas. BDNF Up-Regulates TrkB Protein and Prevents the Death of CA1 Neurons Following Transient Forebrain Ischemia. 1998. *Brain Pathology* 8: 253-261.
- Ferrer I**. Neuronal death mechanisms in cerebral ischemia. 1999. *Rev Neurol*; 30;29:515-21.
- Francke U**, de Martinville B, Coussens L, Ullrich A. The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. 1983. *Science*; 222: 1248-1251.
- Fryer R**, Kaplan D, Feinstein S, Radeke M, Grayson D, Kromer L. Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. 1996. *J Comp Neurol*; 374:21-40.

- Fryer R**, Kaplan B, Kromer L. Truncated TrkB receptors on nonneuronal cells inhibits BDNF- induced neurite out growth in vitro. 1997. *Exp Neurol*; 148:616-627.
- Fudge JL**. Bcl-2 immunoreactive neurons are differentially distributed in subregions of the amygdala and hippocampus of the adult macaque. *Neuroscience*. 2004; 127:539-556.
- Gallo G**, Letourneau PC. Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. 1998. *J Neurosci*; 18: 5403-14.
- Galluzzi L**, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. 2007. *Cell Death Differ*; 14:1237-43.
- Galluzzi L**, Kroemer G, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007; 87(1):99-103.
- Gnahn, H.**; Hefti, F.; Heumann, R.; Schwab, M. E.; Thoenen, H. NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (CHAT) in the neonatal rat forebrain: Evidence for a physiological role of NGF in the brain?. 1983. *Brain Res*. 285:45-52;.
- Gehler S**, Shaw AE, Sarmiere PD, Bamburg JR, Letourneau PC. Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone filopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor cofilin. 2004. *J Neurosci*; 24: 10741-9.
- Gonzalez SL**, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Mougel A, Guennoun R, Schumacher M, et al. Progesterone neuroprotection in spinal cord trauma involves up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in motoneurons. 2005. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 94: 143–149.
- Gonzalez Deniselle MC**, Garay L, Gonzalez S, Saravia F, Labombarda F, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone modulates brain-derived neurotrophic factor and choline acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons. 2007. *Exp Neurol*; 203:406–414.
- 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. Estrogen attenuates and corticosterone exacerbates excitotoxicity oxidative injury and amyloid-beta peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem*. 1996; 66:1836-1844
- Gorter JA**, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosebaum DM, Optz T, Bennett MV, Connor JA, and Zukin RS. Global ischemia induces downregulation of GluR2 mRNA and increases AMPA receptor mediated- Ca^{2+} influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J. Neurosci*. 1997; 17: 6179.

- Graham SH**, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21(2):99-109.
- Greene, L. A**, Varon S, Piltch A and Shooter E. M.. Substructure of the P-subunit of mouse 7s nerve growth factor. 1971. *Neurobiology* 1: 37-48.
- Greene LA**, Kaplan DR. Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5:579–87.
- Greene L A**, Shooter EM, and Varon S. Subunit interaction and enzymatic activity of mouse 7s nerve growth factor. 1969. *Biochemistry* 8: 3735-3741.
- Grewal SS**, York RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons.1999. *Curr Opin Neurobiol*; 9: 544-53.
- Gwag BJ**, Won SJ, Kim DY. Excitotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in ischemic neuronal death. En: *New concepts in cerebral ischemia*. RCS Lin (Ed.). CRC Press. Boca Raton, FL, 2002, pp: 79-112.
- Haapasalo A**, Koponen E, Hoppe E, Wong G, Castren E. Truncated TrkB^{BT1} is dominant negative inhibitor TrkB⁺- mediated cell survival. 2001. *Biochem Biophys Res Commun*; 280:1352-1358
- Haniu H**, Talvenheimo J, Le J, Katta V, Welcher A, Rohde, M. Extracellular domain of neurotrophin receptor TrkB: disulfide structure, N-glycosylation sites, and ligand binding. 1995. *Arch Biochem Biophys*; 322:256-264.
- Hantzopoulos PA**, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. 1994. *Neuron*;13:187– 201.
- Hengerer B**, Lindholm D, Heumann R, R  ther U, Wagner EF, Thoenen H. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. 1990. *Proc Natl Acad Sci USA*;87: 3899-903
- Hennigan A**, O`Callagan R, Kelly a. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. 2007. *Biochemical society transactions*; 35:424-427.
- Heumann, R.**; Korshing, S.; Scott, J.; Thoenen, H. Relation-ship between levels of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. *EMBO J.* 3:3183-3189; 1984
- Himeda T**, Tounai H, Hayakawa N, Araki T. Postischemic alterations of BDNF, NGF, HSP 70 and ubiquitin immunoreactivity in the gerbil hippocampus: pharmacological approach. 2006. *Cell Mol Neurobiol*; 27: 229-50.
- Horigome K**, Pryor JC, Bullock ED, Johnson EM Jr: Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem* 1993, 268:1488--14887.

- Huang EJ**, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. 2001. *Annu Rev Neurosci*; 24:677-736.
- Hu B**, Nikolakopoulou AM, Cohen-Cory S. BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. 2005. *Development*; 132: 4285-98.
- Iadecola Costantino** & Anrather Josef. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. 2011. *Nature Neurosci*; 14: 1363-1368.
- Ishrat T**, Sayeed I, Atif F, Hua F, Stein DG. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. 2012. *Neuroscience* 210:442–450.
- Ishrat T**, Sayeed I, Atif F, Stein DG. Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal ischemia in rats. *Brain Res* 2009; 1257: 94-101.
- Jiang N**, Chopp M, Stein DG. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res* 1996; 735:101-107. Brain-derived neurotrophic Factor expression. 2009. *Endocrinology*; 150:3162–3168.
- Jodhka PK**, Kaur P, Underwood W, Lydon JP, Singh M. The differences in neuroprotective efficacy of progesterone and medroxyprogesterone acetate correlate with their effects on
- Jovanovic JN**, Czernik AJ, Fiemberg AA, Greengard P, Sihra TS. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. 2000. *Nat Neurosci*; 3: 323-9
- Kandel RE**, Schwartz HJ, Jessel MT. *Principios de Neurociencia*. 4^a ed. McGraw-Hill/ Interamericana Madrid. 2000: pp 325-403
- Kapinya K**, Penzel R, Sonner C, Kiesling M. Temporary changes of AP-1 transcription factor binding activity in the gerbil hippocampus after transient cerebral ischemia and ischemic tolerance induction. *Brain Res*. 2000; 872:283-293.
- Kaplan DR**, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. 2000. *Curr Opin Neurobiol*; 10: 381-91.
- Kaur Paramjit**, Parmmeet K. Jodhka, Wendy A. Underwood, Courtney A. Bowles, Nancy Ellen C, Christopher M, and Meharvan Singh. Progesterone Increases BDNF Expression and protects against glutamate toxicity in a MAPK- and PI3-K - dependent manner in cerebral cortical explants. 2007. *J Neurosci Res*. 15; 85: 2441–2449.
- Klein R**, Conway D, Parada L, Barbacid M. The TRK tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. 1990. *Cell*; 61:647-656

- Klein, R.**, Parada, L.F., Coulier, F., Barbacid, M., 1989. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* 8, 3701– 3709.
- Kogure K**, Tanaka J, Araqui T. The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. *Neurochem Pathol.*1998; 9: 145-170.
- Koh JY**, Goldberg MP, Hartley DM, and Choi DW. Non-NMDA receptor mediated neurotoxicity in cortical culture. *J. Neurosci.* 1990; 10: 693.
- Kokaia Z**, Metsis M, Kokaia M, Bengzon J, Elmer E, Smith ML, Timmusk T, SiesjoBK, Persson H, Lindvall O. Brain insults in rats induce increased expression of the BDNF gene through differential use of multiple promoters. 1994. *Eur J Neurosci*;5:476-485.
- Kokaia Z**, Bengzon J, Metsis M, Kokaia M, Persson H, Lindvall O. Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. 1993. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:6711-6715.
- Kokaia Z**, Nawa H, Uchino H Elmer E, Kokaia M, Carnahan J, Smith L, Siesjo B, Lindvall O. Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat. 1996. *Brain Res Mol Res*; 38:139-144.
- Kokaia Z**, Andsberg G, Yan Q, Lindvall O. Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport. 1998. *Exp Neurol*; 154:289-301.
- Korsching S**, Thoenen H. Nerve growth factor supply for sensory neurons: Site of origin and competition with the sympathetic nervous system. 1985. *Neurosci. Lett.* 54:201-205.
- Korsching S**, Auburger G, Scott J, Thoenen H. Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. 1985. *EMBO J.* 4: 1389-1393.
- Kumar K**, Savithiry S, Madhucar BV. Comparison of alpha-tubulin mRNA and heat shock protein-70 mRNA in gerbil brain following 10 min of ischemia. 1993. *Brain Res Mol Brain Res.* ; 20:130-136.
- Lamballe, F**, Klein R, Barbacid M. TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. 1991. *Cell* 66, 967– 979.
- Large TH**, Bodary SC, Clegg DO, Weskamp G, Otten U, and Reichardt L. F. "Nerve growth factor gene expression in the developing rat brain,". 1986. *Science*, vol. 234, no. 4774, pp. 352–355.

- Lee R**, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. 2001. *Science* 294: 1945–1948.
- Lee Tsong-Hai**, Jen-Tsung Yang, Hiroyuki Kato, June Hsieh Wu and Sien-Tsong Chen. Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Immunoreactivity and mRNA in the Hippocampal CA1 and Cortical Areas After Chronic Ischemia in rats. 2004. *Journal of Neuroscience Research*; 76:705–712
- Lee TH**, Kato H, Chen ST, Kogure K, Itoyama Y. Expression disparity of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in ischemic hippocampal neurons. 2002. *NeuroReport*. 13:2271–5
- Lee Tsong-Hai**, Jen-Tsung Yang, Yu-Shien Ko, Hiroyuki Kato, Yasuto Itoyama, Kyuya Kogure. Influence of ischemic preconditioning on levels of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia. 2008. *Brain Res*; 1187: 1– 11.
- Levine E**, Dreyfus E, Black I and Plummer M. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neuron via postsynaptic tyrosine kinase receptor. 1995. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92:8074-8077.
- Lin G**, Bella A J, Lue T F and Lin C S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) acts primarily via the JAK/STAT pathway to promote neurite growth in the major pelvic ganglion of the rat: part 2. 2006. *J. Sex. Med.* 3, 821–827.
- Lindvall O**, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjö BK, et al. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. 1992. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89, 648–652.
- Lindvall O**, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. 1994. *Trends Neurosci*; 17:490-496.
- Lekker RR** y Shohami E. Cerebral ischemia and trauma - different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev.* 2002;39:55-73
- Lewin GR**, Barde YA. Physiology of the Neurotrophins. 1996. *Ann Rev Neurosci*; 19:289- 317.
- Longo FM**, Woo J, Mobley WC. Purification of nerve growth factor. 1989. In Wiley J, ed. *Nerve growth factors*. New York: Rush RA; p. 3-30.
- López Antúnez L**. Anatomía funcional del sistema nervioso. Edit. Limusa. 2000: 25: 617- 655.
- Love S**. Apoptosis and brain ischaemia. 2003. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*;27:267-82.

- Lu B**, Pang PT, Woo NH. The ying and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 603-14.
- Lu B**. Acute and long-term regulation of synapses by neurotrophins. 2004. *Prog Brain Res*; 146: 137-50.
- Lykissas MG**, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. 2007 *Curr. Neurovasc. Res.*, 4: 143-151.
- Mahesh VB**, Brann VW, Hendry LB. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 56:209-219.
- Mahmood A**, Lu D, Wang L, Chopp M. Intracerebral transplantation of marrowstromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. 2002. *J. Neurotrauma*; 19:1609–1617.
- Maissonpiere P**, LeBaun M, Espinosa R, Ip N, Bellusio L, de le Monte S, Squinto S, Furth M, Yacopoulos. Human and brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distribution, and chromosomal localizations. 1991. *Genomics*; 10:558-568
- Maisonpiere PC**, Belluscio L, Fiedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. nT3, BDNF and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 1990; 5:501-509.
- Manadas BJ**, Melo CV, Gomes JR, Duarte CB (2007) Neurotrophin signaling and cell survival. In: *Interaction between neurons and glia in aging and disease* (Rego AC, Cunha RA, Oliveira CR, Malva JO, eds), pp 137–172. New York: Springer.
- Martin-Zanca D.**, Hughes, S.H., Barbacid, M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. 1986. *Nature* 319, 743–748.
- Martin-Zanca D**, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M. Molecular and biochemical characterization of the human trk protooncogene. 1989. *Mol. Cell. Biol.* 9, 24–33.
- Matsushima K**, Schmidt-Kastner R, Hogan MJ & Hakim AM. Cortical spreading depression activates trophic factor expression in neurons and astrocytes and protects against subsequent focal brain ischemia. 1998. *Brain Research*; 807:47–60.
- Matsumoto T**, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde Y . Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not proBDNF. 2008. *Nat Neurosci*; 11:131-133.

- Marmigere F**, rage F, Givalios L, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adults rats. 2003. *Hippocampus*; 13:646-655.
- McDonald NQ**, Chao MV. Structural determinants of neurotrophin action. 1995. *J Biol Chem*;270:19669-19672.
- Mehta SL**, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 2007;54:34-66.
- Merlio J**, et al. Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. 1993. *Neuron*; 10:151-164.
- Metsis M** et al. Diferential usage of multiple brain-deriven neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. 1993. *Prod Natl Acad Sci USA*; 90:8802-8806.
- Middlemas D**, Lindverg R, Hunter T. TrkB a neural receptor tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. 1991. *Mol Cell Biol*; 11:143-153.
- Middlemas D**, Reid S, Blair J, Burton L, Stanton B, Kaplan D, Hunter T, nikolics K, Parada L. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 are ligands for the TrkB tyrosine kinase receptor. 1991. *Cell*; 65:895-903.
- Miyake Keiko**, Yamamoto Wataru, Tadokoro Mina, Takagi Norio, Sasakawa Kyoko, Nitta Atsumi, Furukawa Shoei, Takeo Satoshi. Alterations in hippocampal GAP-43, BDNF, and L1 following sustained cerebral ischemia. 2002. *Brain Res*; 935: 24–31
- Montes P**. 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. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM. 2005.
- Moralí G**, Letechipía-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. *Neurosci Lett* 2005; 382:286-90.
- Moralí G**, Montes P, Hernández-Morales L, Espinosa-García C, Monfil T, Cervantes M. Neuroprotective effects of progesterone and allopregnanolone on long-term cognitive outcome after global cerebral ischemia. *Restor Neurol Neurosci* 29, 2011 (en prensa).
- Mowla SJ**, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor of brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 2001; 276:12660-12666.

- Ng Y P**, Cheung Z H and Ip NY. STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. 2006. *J. Biol. Chem.* 281, 15636–15644.
- Narumiya S**, et al. Enhanced expression of full-length trkB receptors in young rat brain with hypoxic/ischemic injury. 1998. *Brain Res*; 797:278– 286.
- Ninkina N**, Adu J, Fischer A, Pinon L, Buchman V, Davies A. Expression and functions of TrkB variants in developing sensory neurons. 1996. *EMBO J*; 15:6385-6393.
- Noji S**, Yamaai T, Koyama E, Taniguchi S. Localization of epidermal growth factor and nerve growth factor mRNAs in mouse submandibular gland by a simplified in situ hybridization with riboprobes. 1989. *Radioisotopes* 38:366-372;.
- Noshita N**, Sugawara T, Lewén A, Hayashi T, and Chan P.H. Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice. 2003. *Stroke* 34, 1513–1518.
- Nykjaer A**, Lee r, Teng K, Cansen P, Madsen P, Nielsen M, Jacobsen C, Kliemann M, Schwartz E, Willnow T et al. (2004). *Nature*; 427:843-848.
- O’Connell L**, Hongo JA, Presta LG, Tsoulfas, P. TrkA amino acids controlling specificity for nerve growth factor. 2000. *J. Biol. Chem.* 275, 7870– 7877.
- Ohira K**, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M. TrkB-T1 regulates de RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. 2006. *Biochem Biophys Res Commun*; 342: 867-74. Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. 2001. *Int J Mol Med*; 7:455-478.
- Ozacmak VH**, Sayan H. the effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiol Res* 2009; 58: 909-912.
- Pang P**, Teng H, Zaitsev E, Woo N, Sakata K, Zhen S, Teng K, Yung W. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. 2004. *Science*; 306:487-491.
- Paxinos G**, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. N. York. 1986.
- Pellegrini-Giampietro DE**, Zukin RS, Bennett MV, Cho S, and Pulsinella. Switch in glutamate receptor subunit in gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 10499.
- Perez, P**, Coll PM, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV.,. NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. 1995. *Mol. Cell. Neurosci.* 6,97– 105.

- Pettigrew DB**, Li YQ, Kuntz CT, Crutcher KA. Global expression of NGF promotes sympathetic axonal growth in CNS white matter but does not alter its parallel orientation. 2007. *Exp. Neurol*; 203: 95–109.
- Ploughman M**, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore J, Corbett D. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. 2009. *Stroke* 40:1490–1495.
- Pozniak CD**, Radinovic S, Yang A et al. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. 2000. *SCIENCE*; 289:304-306.
- Pulsinelly WA**. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res*. 1985; 63:29.
- Pulsinelli WA**, Bierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979; 10: 267-272.
- Pulsinelli WA**, Bierley JB, Plum F. temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Nuerol*. 1982; 11:491-498.
- 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.
- Purves D**. Body and brain; a trophic theory of neuronal connections. 1988. Cambridge: Harvard Univ. Press.
- Qu WS**, Wang YH, Wang JP, Tang YX, Zhang Q, Tian DS, Yu ZY, Xie MJ, Wang W. Galectin-1 enhances astrocytic BDNF production and improves functional outcome in rats following ischemia. 2010. *Neurochem Res*; 35:1716-24.
- Rabizadeh S**, Oh J, Zhong LT, et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 1993; 261:345–8.
- Reichardt L.F.**, Neurotrophin-regulated signalling pathways, 2006 *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B Biol. Sci*; 361: 1545–1564.
- Rickhag M**, Teilum M & Wieloch T. Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neurtin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. 2007. *Brain Research, Brain Research*, 203–210.
- Rickhag M**, Wieloch T, Gido G, Elmér E, Krogh M, Murray J, et al. Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue. 2006. *Journal of Neurochemistry*, 96, 14–29.
- Robinson, DR**, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. 2000. *Oncogene* 19, 5548–5557.

- Roine RO.** Global cerebral ischemia. En: *Current Review of Cerebrovascular Disease*. Ed. Current Medicine Philadelphia. 1996; pp 159-169.
- Rose C,** Blum R, Pichler A, Lepier A, Kafitz K, Konnert A. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in gli cells. 2003. *Nature*; 426:74-78.
- Rostas J,** Brent B, Voss K, Errington M, Bliss T and Gurd J. Enhanced tyrosine phosphorylation of the 2B subunit of N- methyl-D-aspartate receptor in long-term potentiation.1996. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:10452-10456.
- Rudge J,** Li Y, Pasnikowski E, Matsson M, Pan L, Yancopoulos D, Wiegand S, Lindsay R, Ip N. Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. *Eur J Neurosci*; 6:693-705.
- Salido, EC;** Yen, PH, Shapiro LJ, Fisher D A, Barajas L. In situ hybridization of nerve growth factor mRNA in the mouse submandibular gland. 1988. *Lab. Invest.* 59:625-630.
- Sarraf-yazdi S,** Laskowitz D, Warner DS. Pathophysiology of ischemic brain damage. En: Shuaib a, Goldstein LB, eds. *Management of Acute Stroke*. Maecrl Dekker. N. York. 1999. pp 243-277.
- Sayed I,** Wali B, Stein DG. Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. 2007. *Restor Neurol Neurosci*; 25:151-9.
- Scott J,** Selby M, Urdea M, Quiroga M, Bell GI, Rutter WJ. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. 1983. *Nature*; 302: 538-540.
- Schinder A,** Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. 2000. *Trends Neurosci*; 23:639-45.
- Schmidt-Kastner R,** Truettner J, Lin B, Zhao W, Saul I, Busto R,. Ginsberg MD. Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat. 2001. *Molecular Brain Research*; 92 :157–166
- Schmidt-Kastner R,** Wetmore C, Olson L. Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggest multiple roles in hippocampus, striatum and cortex. 1996. *Neuroscience*; 74:161-183.
- Segal RA** and Greenberg M E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. 1996. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 463– 489.

- Server AC** and Shooter EM. Nerve growth factor. 1977. *Adv. Protein Chem.* 31: 339-409,.
- Shelton, DL**, Reichardt, LF. Studies on the expression of beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: Level and regional distribution of NGF mRNA suggests that NGF functions as atrophic factor for several distinct populations of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2714-2718;1986.
- Shooter EM**. Early days of the nerve growth factor proteins. 2001. *Annu Rev Neurosci* 24: 601–629.
- Siesjo BK**, Katsura K, Kristian T. the biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1995; 7:47-52.
- Singh M**. Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. 2001. *Endocrine* 14:407–415.
- Singh M**. Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1052:145-51.
- Sofroniew MV**, Howe CL, Mobley W. Nerve growth factor signalling, neuroprotection and neural repair. 2001. *Ann. Rev. Neurosci*; 24: 1217-1281,
- Song XY**, Zhang FH, Zhou FH, Zhong J, Zhou XF. Deletion of p75^{NTR} impairs regeneration of peripheral nerves in mice. 2009. *Life Sci.*, 84: 61-68.
- Soulé J**, Messaoudi E, Bramham CR. Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. 2006. *Biochem Soc Trans*; 34: 600-4.
- Stavchansky VV**, Tvorogova TV, Botsina A YU, Skvortsova VI, Limborska SA, Myasoedov NF and Dergunova LV. Effect of Semax and Its C-terminal Peptide PGP on Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Rat Brain during Incomplete Global Ischemia. 2011. *Molekulyarnaya Biologiya*; 45: 1026–1035.
- Stein DG**. The case for progesterone. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1052:152-69.
- Stein DG**, Wright DW, Kellermann AL. Does progesterone have neuroprotective properties?. *Ann Emerg Med.* 2007 :1-9.
- Swanson LW**. Brain maps: structure of the rat brain. Elsevier. 1998: Amsterdam.
- Tacconelli A**, Farina AR, Cappabianca L, et al. TrkA alternative splicing: a regulated tumorpromoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2004;6:347–60. PubMed doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.011.
- Takeda A**, Onodera H, Sugimoto A, Kogure, Obinata M, Shibahara S. Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. 1993. *Neuroscience*; 55 :23–31.

- Timmusk T**, Palm K, Metsis M, Reintsm T, Paalme V, Saarma M, Peerson H. multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. 1993. *Neuron*. 10 :475-489
- Thoenen, H.**; Barde, Y. A. Physiology of nerve growth factor. 1980. *Physiol. Rev.* 60:1284-1335;
- Toma J**, Rogers D, Senger D, Campenot R, Miller F. Spatial regulation of neuronal gene expression in response to nerve growth factor. 1997. *DevBiol*; 184: 1-9.
- Truettner J**, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD, Pérez-Pinzón MA Effect of ischemic preconditioning on the expression of putative neuroprotective genes in the rat brain. 2002. *Brain Res Mol Brain Res*; 30: 106-15.
- Tsukahara Tetsuya**, Koji Iihara, Nobuo Hashimoto, Tetsuji Nishijima, Takashi Taniguchi. Increases in levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and its promoters after Transient forebrain ischemia in the rat brain. 1998. *Neurochem Int.* 33: 201-207.
- Tuszynski MH**, Gage FH. Bridging grafts and transient nerve growth factor infusions promote long-term central nervous system neuronal rescue and partial functional recovery. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4621–25
- Tuszynski MH** and Gage FH. Maintaining the neuronal phenotype after injury in the adult CNS. Neurotrophic factors, axonal growth substrates, and gene therapy. 1995. *Mol. Neurobiol.*, 10: 151-167.
- Tyler WJ**, Zhang X, Hartman K, Winterer J, Muller W, Stanton P, et al. BDNF increases release probability and the size of a rapidly recycling vesicle pool within rat hippocampal excitatory synapses. 2006. *J Physiol*; 574: 787-803.
- Tyler WJ**, Pozzo-Miller L. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. 2003. *J Physiol*; 553: 497-509.
- Varon S**, Nomura J, and . Shooter EM. Reversible dissociation of mouse nerve growth factor protein into different subunits. 1968. *Biochemistry* 7: 1296-1303.
- Vicario-Abejón C**, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. 2002. *Nat Rev Neurosci*; 3: 965-74.
- Walton M**, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M. The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair. 1996. *Brain Res Mol Brain Res*; 31;43: 21-9.
- Wang J**, Luis S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. 2003. *Nat Neurosci*; 6:1039-1046

- Wessel T.C.**, Joh T.H., Volpe B.T., In situ hybridization analysis of c-fos and c-jun expression in the rat brain following transient forebrain ischemia. 1991. *Brain Res.* 567 231–240.
- Wetmore C**, Cao Y, Petterson R, Olson L. Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and inter-neuronal transfer as visualized with anti-peptide antibodies. 1991. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:9843-9847.
- WetmoreC**, Olson L. Neuronal and nonneuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions. 1995. *J Comp Neurol*; 353:143-159.
- Wieloch T**. Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *Progress in Brain Res.* 1985; 63: 69-85.
- White B.C.**Sullivan J.M., DeGracia D.J., et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. 2000. *J.Neurol.Sci*179,1–33.
- White BC**, Grossman LI, O'Neill BJ, DeGracia DJ, Neumar RW, Rafols JA, Krause GS. Global brain ischemia and reperfusion. *Ann Emerg Med* 1996; 27:588-94.
- White NM** y R J McDonald, "Multiple parallel memory systems in the brain of the rat.*Neurobiology of Learning and Memory*, 2002; 77: 125-184.
- Whittemore SR**, Friedman PL, Larhammar D, Persson H, Gonzales-Carvajal M, Holets, V. R. Rat/~-nerve growth factor sequence and site of synthesis in the adult hippocampus. 1988. *J. Neurosci. Res.* 20:403-410;.
- Whittemore, SR.**; Ebendal, T.; Larkfors, L.; Olson, L.; Seiger, A.; Stromberg, I.; Persson, H. Developmental and regional expression of beta nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system, 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83:817-821;.
- Yamashita K**, Wiessner C, Lindholm D, Tohenen H, Hossman K.post-occlusion treatment with BDNF reduces infarct size in a model of permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat. 1997. *Metab Brain Dis*; 12:271-280.
- YamashitaT**, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. 1999. *Neuron*; 24:585-593.
- Yan Q**, Radeke M, Matheson C, Talvenheimo J, Welcher A, Feinstein S. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. 1997. *J Comp Neurol*; 378 135-157.
- Yan Q**, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, BennettL, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. 1997. *Neuroscience*; 78: 431-48.

- Zhou HZ**, Lv TM, Shen P, Wang ML, Luo BD. Protective effects of nerve growthfactor vs Danshen on hippocampal neuron against global ischemia-reperfusion injuryin gerbils. 2011. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*; 31: 965-
- Zhu Y.**, Yang G.-Y., Ahlemeyer B., et al. Transforming growth factor- β 1 increases Bad phosphorylation and protects neurons against damage. 2002. *J. Neurosci.* 22,3898–3909.