



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTOS DE LA PROGESTERONA SOBRE MARCADORES DE MUERTE NEURONAL Y SOBRE ALGUNOS FENÓMENOS RESTRICTIVOS DEL CRECIMIENTO DE NEURITAS, EN RELACIÓN CON INDICADORES DE LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL HIPOCAMPO, LUEGO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**CLAUDIA ESPINOSA GARCÍA**

**DIRECTORA DE TESIS:**  
**DRA. GABRIELA MORALÍ DE LA BRENA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR:**  
**DR. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**MÉXICO D.F., ENERO DE 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## COMITÉ TUTOR

**Dra. Gabriela Morali de la Brena**

Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

**Dr. José Miguel Cervantes Alfaro**

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

**Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina**

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en:

- La Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.
- El Servicio de Cirugía Experimental y Bioterio, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por el apoyo económico otorgado para mi asistencia a los siguientes congresos internacionales:

- 40th Society for Neuroscience Annual Meeting “Neuroscience 2010”, San Diego, Estados Unidos.
- 42th Society for Neuroscience Annual Meeting “Neuroscience 2012”, Nueva Orleans, Estados Unidos.
- 7th International Meeting “Steroids and Nervous System 2013”, Turin, Italia.

A los miembros del jurado, por el tiempo y trabajo invertido en la revisión de esta tesis:

PRESIDENTE: Dr. Luis Felipe Montaña Estrada

SECRETARIO: Dra. Gabriela Morali de la Brena

VOCAL: Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

VOCAL: Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruíz

VOCAL: Dra. Lourdes Massieu Trigo

Este trabajo fue realizado con los apoyos otorgados a la Dra. Gabriela Morali de la Brena por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. CB-2009-01/134199 y por el Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social No. FIS/IMSS/PROT/G10/827.

Durante la realización de mis estudios de doctorado recibí una beca del CONACyT con número de registro 229241 y una del IMSS con número de folio 2010020.

**« Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas.»**

Santiago Ramón y Cajal

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa para mí muchas cosas, arduas jornadas de trabajo llenas de éxitos y de algunos fracasos, de risas y a veces de lágrimas, pero también de logros después de sortear varias batallas, aquí aplica bien el dicho de si no duele, no sirve...

No tengo palabras para agradecer lo suficiente a quienes formaron parte de estos años, empezaré con quienes estuvieron asesorándome desde el inicio del camino, mi Comité Tutor:

Dra. Gabriela Morali gracias por dirigirme y corregirme, por enseñarme tanto y también por apreciarme.

Dr. Miguel Cervantes gracias por todas sus valiosas aportaciones y sus muchas ideas.

Dr. Gabriel Gutiérrez gracias por el apoyo, la confianza y por todas sus preguntas.

En pocas palabras gracias por el tiempo y el esfuerzo que invertieron en mi formación.

Alguien muy importante que me dejó crecer en su unidad, la Dra. María Campos, gracias por aguantarme durante todo este tiempo....

A quienes me brindaron todos sus conocimientos para aprender ciertas técnicas y metodologías: mi querida Carmelita y Juan de Dios, ustedes son mis maestros de histotecnología y por cierto son los mejores que conozco, sepan lo mucho que los aprecio. Dra. Inés, además de ser mi gran amiga, las ratucas me hubieran arrancado un dedo sin sus tips y en ocasiones hubieran muerto sin sus cuidados, usted me enseñó a volar sola en el bioterio. Dra. Sandra Orozco le agradezco el hecho de permitirme hacer uso de sus instalaciones siempre que hubo necesidad, fue un gusto conocerla y aprecio mucho todo su apoyo.

A mis queridos amigos y compañeros de lab Ale, Tomás, Rodolfo, Niche, Emily y Christian, gracias por las risas, el apoyo y el cariño que me dieron siempre, los quiero mucho y gracias a ustedes siempre recordaré que sin bullying no hay amistad. Lau, Lily y Juan José, aunque es poco el tiempo que llevamos de conocernos, ustedes me aguantaron en la fase final, quizá la peor de todas, así que gracias por ello amigos.

Haydé, Alo, Hilda, Pau, Erika, Claudia, Luigui y Jimmy, cómo les agradezco que me quieran, me escuchen y me hechen tantas porritas siempre, saben que los llevo en mi corazón a todos malditos.

A mi familia, a ustedes qué les digo o cómo les agradezco, si ustedes son mis más grandes fans, su apoyo y su amor son invaluables para mí, los adoro.

Hugo gracias porque siempre estuviste a mi lado apoyándome y cuidándome, por eso y más te amo...

Finalmente, gracias a la UNAM que me abrió sus puertas, representando un nuevo reto para mí y una oportunidad para conocer nuevas personas y aprender de ellas.

# ÍNDICE

<b>Lista de figuras</b> .....	<b>8</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>9</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
1. Isquemia cerebral global.....	12
2. Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	12
2.1. Vulnerabilidad selectiva .....	14
2.2. Tipos de muerte neuronal .....	15
2.2.1. El papel de caspasa-3 en la muerte neuronal .....	15
2.2.2. Fragmentación del DNA post-isquemia.....	17
2.3. Alteraciones en la estructura neuronal inducidas por la isquemia .....	18
3. Neuroprotección y neuroreparación.....	18
4. Fenómenos de reparación inducidos por la isquemia.....	19
4.1. Ambiente restrictivo de la plasticidad post-isquemia .....	21
4.1.1. Factores inhibidores del crecimiento de neuritas.....	21
4.1.1.1. Nogo-A.....	21
4.1.1.1.1. Señalización intracelular asociada a Nogo-A .....	23
4.1.2. Cicatriz glial.....	24
4.1.2.1. Reacción astrogial.....	24
5. Estrategias experimentales para contrarrestar el medio restrictivo de la plasticidad después de la isquemia .....	26
5.1. Inmunoterapia.....	26
5.2. Terapias no-farmacológicas.....	27
5.3. Terapias farmacológicas .....	28
6. Agentes neuroprotectores.....	28
6.1. Progesterona .....	28
6.1.1. Efectos neuroprotectores/neuroreparadores de la progesterona.....	30
6.1.1.1 Mecanismos celulares/moleculares de acción de la progesterona .....	30
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>36</b>
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>39</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>40</b>
<b>V. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>40</b>
<b>VI. HIPÓTESIS</b> .....	<b>41</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
VII.1. Animales y condiciones experimentales .....	42

VII.2. Modelo de isquemia cerebral global aguda.....	42
VII.3. Técnica histológica de Nissl.....	43
VII.4. Técnica inmunohistoquímica para caspasa-3.....	44
VII.5. Ensayo de detección de caspasa-3 activa.....	45
VII.6. Técnica de TUNEL.....	45
VII.7. Evaluación funcional del hipocampo: Pruebas de aprendizaje y memoria espaciales.....	46
VII.8. Técnica inmunohistoquímica para Nogo-A, Ng-R y Rho-A.....	47
VII.9. Técnica inmunohistoquímica para GFAP.....	48
VII.10. Análisis estadístico.....	49
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
VIII.1. Efecto de la progesterona sobre la pérdida de neuronas piramidales de CA1 inducida por la isquemia.....	50
VIII.2. Efectos de la progesterona sobre el incremento de la caspasa-3 inducido por la isquemia.....	51
VIII.3. Efecto de la progesterona sobre la activación de la caspasa-3 inducida por la isquemia.....	52
VIII.4. Efectos de la progesterona sobre la fragmentación del DNA inducida por la isquemia.....	53
VIII.5. Efectos de la progesterona sobre las alteraciones del aprendizaje y la memoria espaciales resultantes de la isquemia.....	54
VIII.5.1. Aprendizaje espacial.....	54
VIII.5.2. Memoria espacial.....	55
VIII.6. Efectos de la progesterona sobre el incremento de Nogo-A, Ng-R y Rho-A inducido por la isquemia.....	57
VIII.7. Efectos de la progesterona sobre la reacción astrogliar inducida por la isquemia.....	61
<b>IX. DISCUSION .....</b>	<b>63</b>
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>XII. ANEXO 1.....</b>	<b>91</b>
Espinosa-García C, Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Aguilar-Hernández A, Monfil T, Cervantes M, Morali G. <b>Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia.</b> Neurosci Lett. 2013, 550:98-103.	
<b>XIII. ANEXO 2.....</b>	<b>92</b>



Espinosa-García C, Aguilar-Hernández A, Cervantes M, Morali G. **Effects of progesterone on neurite growth inhibitors in the hippocampus following global cerebral ischemia.** Brain Res. 2013. BRES-D-13-01004

**XIV. ARTICULOS EN PREPARACION ..... 93**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Curso temporal de los fenómenos de daño provocados por la isquemia.....	13
<b>Figura 2.</b> Estructura de la enzima Caspasa-3.....	16
<b>Figura 3.</b> Fragmentación del DNA resultante de la activación de la caspasa-3.....	17
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de muerte y de sobrevivencia activados por la isquemia.....	20
<b>Figura 5.</b> Estructura de la proteína Nogo.....	22
<b>Figura 6.</b> Vía de señalización inhibitoria activada por Nogo-A.....	24
<b>Figura 7.</b> Reacción astrogliar.....	25
<b>Figura 8.</b> Metabolismo de la progesterona.....	29
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de neuroprotección mediados por progesterona luego de isquemia.....	33
<b>Figura 10.</b> Población neuronal del hipocampo.....	50
<b>Figura 11.</b> Inmunorreactividad a caspasa-3 en el hipocampo.....	52
<b>Figura 12.</b> Activación de la caspasa-3 en el hipocampo.....	53
<b>Figura 13.</b> Fragmentación del DNA en el hipocampo.....	54
<b>Figura 14.</b> Ejecución de las ratas de los tres condiciones experimentales, en las pruebas de aprendizaje y de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.....	56
<b>Figura 15.</b> Inmunorreactividad a Nogo-A en el hipocampo.....	58
<b>Figura 16.</b> Inmunorreactividad a Ng-R en el hipocampo.....	59
<b>Figura 17.</b> Inmunorreactividad a Rho-A en el hipocampo.....	60
<b>Figura 18.</b> Inmunorreactividad a GFAP en el hipocampo.....	62
<b>Figura 19.</b> Diagrama que representa los efectos neuroprotectores de la progesterona en contra de la de muerte neuronal inducida por la isquemia.....	65
<b>Figura 20.</b> Diagrama que representa los efectos neurorreparadores de la progesterona en contra de los fenómenos de inhibición del crecimiento de neuritas inducidos por la isquemia.....	70

## ABREVIATURAS

<b>AIF</b>	Factor inductor de apoptosis
<b>ALO</b>	Alopregnanolona
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
<b>AQP4</b>	Acuaporina-4
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>BDNF</b>	Factor de crecimiento derivado del cerebro
<b>CAD</b>	DNAsa activada por caspasas
<b>CSPGs</b>	Proteoglicanos de condroitin sulfato
<b>GAP-43</b>	Proteína asociada al crecimiento-43
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>iCAD</b>	Inhibidor de la DNAsa activada por caspasas
<b>ICG</b>	Isquemia cerebral global
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>iNOS</b>	Sintasa del óxido nítrico inducible
<b>LRRs</b>	Repetidos ricos en leucina
<b>MCAO</b>	Oclusión de la arteria cerebral media
<b>MBP</b>	Proteína básica de la mielina
<b>mtPTP</b>	Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial
<b>Ng-R</b>	Receptor de Nogo-A
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NOS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>NOS-2</b>	Sintasa del óxido nítrico-2
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona
<b>PARP</b>	Poli-ADP-ribosa polimerasa
<b>RHOK</b>	Cinasa de Rho
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico
<b>Src-3</b>	Coactivador del receptor de esteroides-3
<b>TBI</b>	Daño traumático al cerebro
<b>TGF-2<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante-2 $\beta$
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La isquemia cerebral global (ICG) induce la muerte neuronal selectiva de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, asociada usualmente con alteraciones de las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria espaciales. La muerte de dichas neuronas puede estar mediada, al menos en parte, por la activación de la caspasa-3 que resulta en la fragmentación del DNA. Las pocas neuronas sobrevivientes de CA1 muestran cambios estructurales característicos de daño, pero también pueden presentar respuestas plásticas compensatorias. Sin embargo, la recuperación funcional luego de una lesión en el SNC adulto se ve limitada por el medio ambiente restrictivo de la plasticidad que incluye la presencia de proteínas inhibitoras del crecimiento de neuritas como Nogo-A y la barrera física y química que representa la cicatriz glial formada principalmente por astrocitos reactivos. Se sabe que la progesterona ( $P_4$ ) ejerce diversos efectos neuroprotectores/neuroreparadores en varios modelos de daño cerebral, incluyendo el daño inducido por ICG.

**OBJETIVOS:** Evaluar los efectos de la  $P_4$  sobre marcadores de muerte neuronal como son la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA y sobre fenómenos restrictivos de la plasticidad, como el inhibidor del crecimiento de neuritas Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector Rho-A y la reacción astrogial, en el hipocampo, y su asociación con parámetros de aprendizaje y memoria espaciales, luego de ICG.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Ratas macho adultas fueron sometidas a ICG por el modelo de oclusión de los cuatro vasos. La  $P_4$  (8 mg/kg, i.v.) o su vehículo (2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, i.v.) fueron administrados a los 15 min, 2, 6, 24, 48 y 72 h de reperusión. Se contaron las neuronas piramidales remanentes en la región CA1 del hipocampo, en cortes coronales de cerebro teñidos con la técnica histológica de Nissl. Se evaluaron los niveles y la activación de la caspasa-3 por inmunohistoquímica y mediante un ensayo de actividad *in situ*, respectivamente. Se evaluó la fragmentación del DNA por el método de TUNEL. Los niveles de Nogo-A, Ng-R, Rho-A y del marcador de astrocitos GFAP fueron evaluados por inmunohistoquímica. El aprendizaje y la memoria espaciales se evaluaron en el laberinto acuático de Morris (LAM).

**RESULTADOS:** La ICG indujo alteraciones del aprendizaje y la memoria espaciales, de modo que las latencias de escape fueron más largas y el número de pases por el sitio donde se localizaba la plataforma fue menor en comparación con el grupo Sham, a los 14 d post-isquemia. La ICG indujo una pérdida neuronal severa y selectiva en la región CA1 del hipocampo, de modo que el número de neuronas piramidales fue menor en comparación con el grupo Sham, a los 7 d post-isquemia. La ICG indujo un

incremento en los niveles de caspasa-3 en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo a las 72 h post-isquemia. La ICG indujo también un incremento en la activación de la caspasa-3 en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo a las 72 h post-isquemia. La ICG indujo la fragmentación del DNA en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo a las 72 h y a los 7 d post-isquemia. La ICG indujo un incremento en los niveles de Nogo-A, de Ng-R y de Rho-A en los cuerpos celulares de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, a las 24 h post-isquemia, con un máximo a las 72 h y persistiendo hasta los 14 d. La ICG indujo un incremento en la reacción astrogliar a partir de los 7 d post-isquemia, con un máximo a los 14 d, disminuyendo a los 28 d y regresando a valores control a los 97 d.

El tratamiento con  $P_4$  redujo significativamente el incremento en los niveles y en la activación de la caspasa-3 inducido por la ICG a las 72 h post-isquemia, así como la fragmentación del DNA y la pérdida neuronal a los 7 d en la región CA1 del hipocampo. El tratamiento con  $P_4$  redujo la extensión y la intensidad de la inmunoreactividad a Nogo-A, Ng-R y Rho-A en CA1 a las 72 h post-isquemia, el número de astrocitos hipertróficos y los niveles de GFAP a los 28 d post-isquemia. Estos efectos de la  $P_4$  estuvieron asociados con parámetros de una ejecución más eficiente en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el LAM, en comparación con la de los animales isquémicos tratados con vehículo a los 14 d post-isquemia.

**CONCLUSIONES:** La reducción de los niveles y de la activación de la caspasa-3, así como de la fragmentación del DNA puede formar parte de los efectos neuroprotectores de la progesterona en contra del daño por isquemia cerebral global/reperfusión. Estos efectos pudieron influir en la preservación de una población neuronal, que de otro modo se habría dañado por estos mecanismos, y que pudo ser relevante en la preservación funcional del hipocampo luego de isquemia cerebral global. Además, la reducción del inhibidor del crecimiento de neuritas Nogo-A, de su receptor Ng-R y de su efector Rho-A, así como de la magnitud de la reacción astrogliar, consistente con una mejor ejecución del aprendizaje y la memoria espaciales, puede formar parte de los efectos neuroreparadores de la progesterona después de un episodio de isquemia cerebral global/reperfusión. Estos efectos posiblemente permitieron que ocurrieran fenómenos de plasticidad, que también influyeron en la preservación funcional del hipocampo luego de isquemia cerebral global.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Isquemia cerebral global

La isquemia cerebral global 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 a todo el cerebro (Roine, 1997; Harukuni y Bhardwaj, 2006). La isquemia cerebral global ocurre en pacientes con falla cardíaca, bajo diversas situaciones, comúnmente se asocia a un paro cardíaco, siendo ésta una de las principales causas de mortalidad y morbilidad permanente en el mundo (Schneider et al., 2009; Karanjia y Geocardin, 2011).

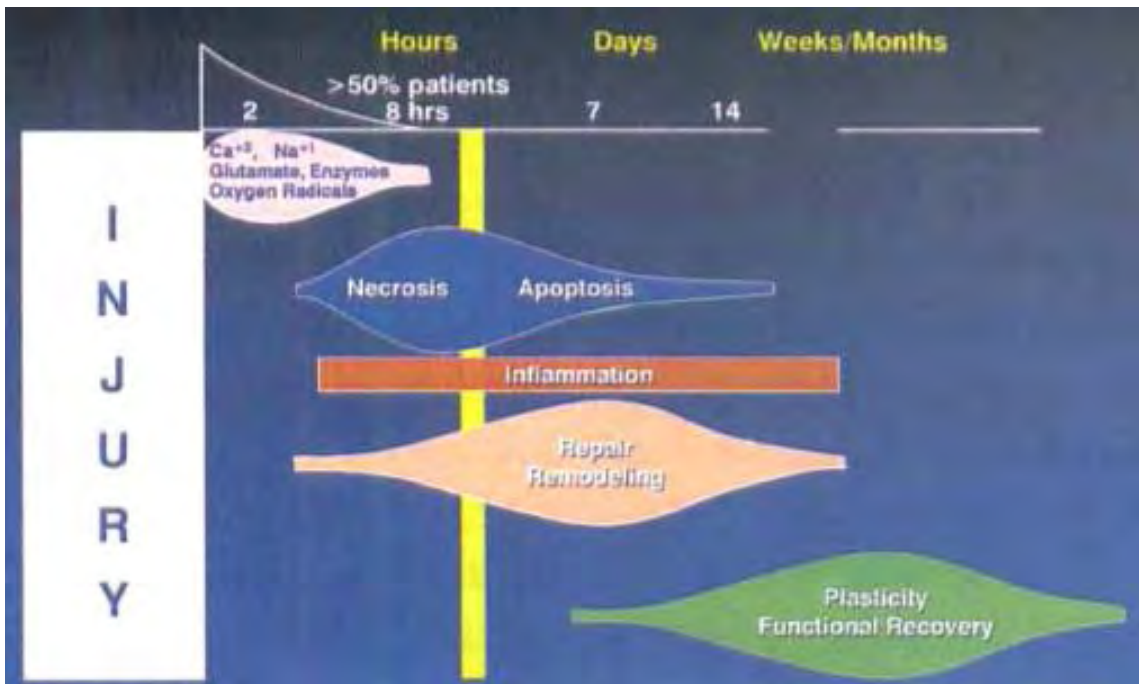
Las cifras varían en función del género (en edad reproductiva hay menor incidencia en las mujeres que en los hombres, aunque luego de la menopausia es igual en ambos); y de la edad (mayor después de los 65 años). Durante 2007, en México, poco más de 87 mil personas fallecieron a causa de alguna enfermedad del corazón. En el mundo, las enfermedades cardiovasculares cobran 17.5 millones de vidas al año (Dirección General de Información en Salud, 2004; Velázquez-Monroy et al., 2007; INEGI, 2009; González-Guzmán y Alcalá-Ramírez 2010).

## 2. Fisiopatología de la isquemia cerebral

La isquemia cerebral desencadena una secuencia de fenómenos que se inician por la falla energética relacionada con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y el déficit en la producción de ATP (White et al., 1996; Hertz, 2008).

La pérdida de los gradientes iónicos transmembranales debido a la falla de los intercambiadores iónicos dependientes de energía, principalmente la ATPasa sodio-potasio, induce la despolarización masiva de neuronas y de células gliales por la entrada de sodio al citoplasma, lo que a su vez provoca el ingreso de calcio, cloro y agua, resultando en edema celular (Rosenberg, 1999; Kahle et al., 2009). La falla energética y los cambios iónicos asociados producen la liberación pre-sináptica masiva de neurotransmisores excitatorios como el glutamato, que resulta en estimulación post-sináptica masiva de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), lo que induce un incremento en la concentración de calcio intracelular (Choi, 2001; Won et al., 2002; Hazell, 2007; Szydlowska y Tymianski, 2010). El calcio intracelular también se incrementa por su liberación a partir de los reservorios intracelulares, como el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Szydlowska y Tymianski, 2010) y por su parte, la sobrecarga de calcio provoca la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas pro-

apoptóticas del espacio intermembranal hacia el citoplasma (Niizuma et al., 2010). 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, entre los que destacan la activación de diversas proteínas efectoras, tales como: la fosfolipasa A2 (Muralikrishna Adibhatla y Hatcher, 2006), que hidroliza a los fosfolípidos de las membranas celulares e incrementa los niveles de ácidos grasos libres como el araquidónico, algunas proteasas como las calpaínas que degradan a importantes proteínas estructurales y funcionales (Rami, 2003); y la sintasa del óxido nítrico (Moro et al., 2004) que junto con especies reactivas de oxígeno forman especies reactivas de nitrógeno que inician los mecanismos de daño a macromoléculas, como lípidos de membrana, DNA y proteínas que contribuyen a la muerte neuronal (Gwag et al., 2002; Won et al., 2002; Mehta et al., 2007).



**Figura 1. Curso temporal de los fenómenos de daño provocados por la isquemia.** La isquemia induce en los primeros minutos una falla energética y con ello la pérdida de los gradientes iónicos transmembranales, lo cual induce la despolarización masiva de la neurona, la liberación masiva de neurotransmisores excitatorios como el glutamato y por tanto la entrada de calcio. La sobrecarga de calcio induce disfunción mitocondrial, producción de radicales libres, la activación de fosfolipasas, proteasas y endonucleasas que contribuyen a la muerte neuronal por necrosis y apoptosis. Los mecanismos de reparación que participan en el remodelamiento se activan desde las primeras horas y días post-isquemia. Los procesos de plasticidad que favorecen una recuperación funcional respectivamente, ocurren desde los primeros días pero persisten a largo plazo luego de la isquemia. Tomada de Barone y Feuerstein, 1999.

## 2.1. Vulnerabilidad selectiva

Ante una reducción del flujo sanguíneo en todo el cerebro, como ocurre durante un episodio de ICG, no todas las áreas cerebrales ni todos los tipos celulares son igualmente dañados, de ahí el término de vulnerabilidad selectiva (Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Lipton, 1999). Así, se han identificado a las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, a las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral, a las células de Purkinje del cerebelo y a las neuronas espinosas del núcleo caudado, como los tipos neuronales más susceptibles a la isquemia global (Pulsinelli, 1985; White et al., 1996; Araki et al., 1989; Kogure et al., 1988; Siesjö et al., 1995; Sarraf-Yazdi et al., 1999).

Sin embargo, las bases del fenómeno de vulnerabilidad selectiva no han sido totalmente determinadas. Se ha propuesto que la vulnerabilidad selectiva está relacionada con la abundante inervación excitadora que reciben estas neuronas. En las áreas vulnerables se ha descrito la presencia de una mayor cantidad de receptores NMDA, con respecto a las áreas de menor vulnerabilidad (Wieloch, 1985; Benquet et al., 2008). De este modo, el daño provocado por la isquemia resulta de la excitotoxicidad causada por la liberación masiva de neurotransmisores excitadores (Hazell, 2007), aunada a la disfunción selectiva de los astrocitos de esa región que entonces no recapturan el exceso de estos aminoácidos excitadores (Ouyang et al., 2007), y que por tanto despolarizan intensamente a estas neuronas. Por otro lado, las estructuras cerebrales se dañan de manera diferencial de acuerdo a la duración del periodo de isquemia; por ejemplo, 5 min de isquemia inducen la muerte neuronal tardía de casi todas las neuronas piramidales de CA1 (Kirino, 1982; Kirino et al., 1984), sin efectos en otras poblaciones; mientras que 20 min inducen la muerte celular de las neuronas de CA3 además de las de CA1, sin efectos en las células granulares del giro dentado o en las interneuronas de CA1 (Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Lipton, 1999; Radenović et al., 2008). Otro factor que se ha propuesto que influye en la vulnerabilidad de CA1 es la presencia de mayores niveles, en comparación con otras zonas del hipocampo, de moléculas que favorecen la activación de procesos de muerte después de un estímulo de daño, como son las proteínas pro-apoptóticas Bax (Chen et al., 1996; Cao et al., 2001) y la caspasa-3 (Gillardon et al., 1997; Chen et al., 1998; Ni et al., 1998; Niwa et al., 2001; Müller et al., 2004; Tanaka et al., 2004; Shimizu et al., 2007; Teschendorf et al., 2008), así como la salida del citocromo c de la mitocondria (Sugawara et al., 1999; Zhan et al., 2001).

El daño provocado por la isquemia induce a su vez deterioro en aquellas funciones cerebrales cuya integración depende de las estructuras lesionadas, como son la orientación espacial, el aprendizaje y la memoria espaciales, en el caso del hipocampo



(Zola-Morgan et al., 1986; Nunn et al., 1994; Block 1999; Hartman et al., 2005; von Euler et al., 2006).

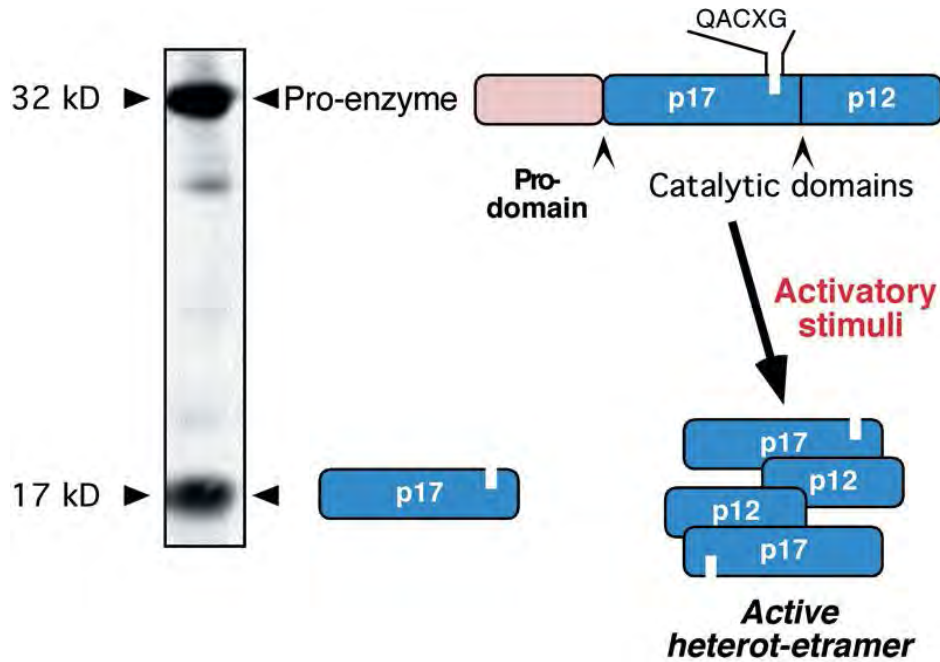
## **2.2. Tipos de muerte neuronal**

Existen al menos dos formas diferentes de muerte celular que participan en la muerte neuronal por isquemia (Lipton, 1999). La muerte por apoptosis no es exclusiva de los procesos de daño sino que también está involucrada 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 (Galluzzi 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 (Graham y Chen, 2001; Elmore, 2007); ésta 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, 2007). Por otro lado, la necrosis se diferencia de la apoptosis 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 (pérdida de gradientes iónicos, liberación masiva de glutamato - excitotoxicidad-, sobrecarga de calcio, disfunción mitocondrial, formación de radicales libres, activación de proteasas, etc.), y es un proceso severo relativamente pasivo, donde no se requiere la expresión de genes ni la síntesis o activación de proteínas (Syntichaki y Tavernarakis, 2003). 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 importantes daños 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 (Proskuryakov et al., 2003).

### **2.2.1. El papel de la caspasa-3 en la muerte neuronal**

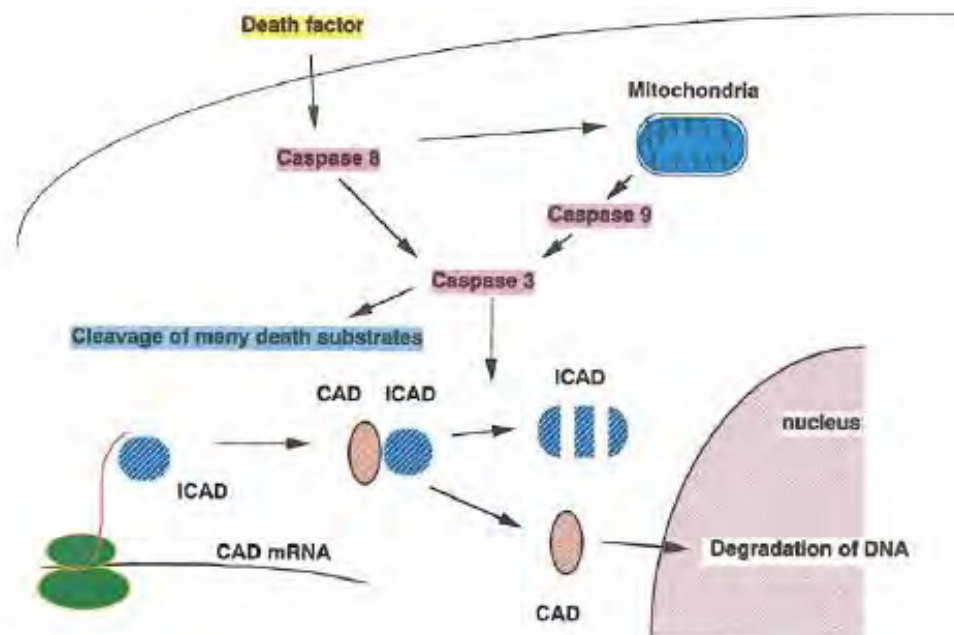
Las caspasas son proteasas dependientes de cisteína y específicas de aspartato, que se sintetizan en forma de zimógenos (pro-caspasas), estado en el cual se mantienen inactivas. Estos zimógenos están compuestos de tres dominios: un prodominio N-terminal, y los dominios p20 y p10 que luego de 2 cortes proteolíticos formarán la enzima madura y activa, organizada en un heterotetrámero que contiene dos p20/p10 heterodímeros y dos centros activos (Chowdhury et al., 2008).

La caspasa-3 es una de las caspasas efectoras, cuyo precursor, la pro-caspasa-3 tiene un peso molecular de 32 (p32), mientras que la forma enzimáticamente activa está formada por 2 subunidades de 17 KDa (p17) y 12 KDa (p12) derivados del precursor p32 (Fig. 2) (Nicholson et al., 1995).



**Figura 2.** Estructura de la enzima caspasa-3. A la derecha, se esquematiza la estructura de la pro-caspasa-3, formada por las subunidades p17 y p12 (en azul), el pro-dominio (en rosa), dos dominios catalíticos (flechas) y un sitio activo (QACXG). La forma activa de la caspasa-3 está formada por dos heterodímeros (p17 y p12) que forman un tetrámero. A la izquierda se pueden apreciar las bandas de 32 kDa y 17 kDa que se obtienen en un western Blot, utilizando un anticuerpo que reconoce tanto la forma inactiva (pro-caspasa-3), como la activa. Tomada de Los y Walczak, 2003.

Se sabe que la caspasa-3 ejerce su efecto proteolítico sobre proteínas que participan en la reparación del DNA, como son la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) y otros sustratos involucrados en el mantenimiento de la integridad estructural de la célula (Revisión en Chang y Yang, 2000). Uno de los blancos particulares de la caspasa-3 es el inhibidor (iCAD) de la DNAsa activada por caspasas (CAD) (Enari et al., 1998) que una vez fragmentado libera la forma activa de la CAD que se trasloca al núcleo y fragmenta al DNA (Fig. 3) (Nagata, 2000).



**Figura 3. Fragmentación del DNA resultante de la activación de la caspasa-3.** Tomada de Nagata, 2000.

En modelos de isquemia cerebral global se ha descrito un incremento en la expresión y en la activación de la caspasa-3 en la región CA1 que han sido interpretado como evidencia de que la muerte neuronal ocurre por apoptosis (Gillardon et al., 1997; Chen et al., 1998; Ni et al., 1998; Niwa et al., 2001; Rami et al., 2003; Müller et al., 2004; Tanaka et al., 2004; Shimizu et al., 2007; Teschendorf et al., 2008). La participación de la caspasa-3 activa en la muerte neuronal isquémica, ha sido también apoyada por la observación de que un inhibidor selectivo de caspasa-3 es neuroprotector disminuyendo la muerte neuronal (Chen et al., 1998; Himi et al., 1998).

### 2.2.2. Fragmentación del DNA post-isquemia

Otro de los eventos moleculares que ha sido tomado como indicador del fenómeno de muerte neuronal isquémica por apoptosis, es la fragmentación internucleosomal del DNA (Héron et al., 1993; MacManus et al., 1993; Ferrer et al., 1994; Sei et al., 1994; Iwai et al., 1995; Nitatori et al., 1995; Volpe et al., 1995; Gillardon et al., 1997; Petito et al., 1997; Teschendorf et al., 2008). Después de la isquemia, el DNA es degradado en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases y múltiplos de ellos, que son los que por electroforesis en geles de agarosa generan lo que se conoce como “patrón en escalera”.

Sin embargo, la fragmentación del DNA también ocurre en células necróticas, aunque en este caso se genera más bien un barrido de DNA que indica su degradación (Petito et al., 1997; Gwag et al., 2002). Aparentemente sólo la microscopía electrónica, dando

evidencia de la integridad o no de las membranas y de la existencia o no de los “cuerpos apoptóticos”, permite diferenciar entre la muerte neuronal por apoptosis o por necrosis (Colbourne et al., 1999; Zeng et al., 2000; Müller et al., 2004).

Sin embargo, independientemente de la naturaleza del daño celular (apoptótico o necrótico), la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA, en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, se han interpretado como marcadores de muerte neuronal y la reducción de su magnitud da evidencia de la preservación neuronal.

### **2.3. Alteraciones estructurales inducidas por la isquemia**

La isquemia cerebral global da lugar a diversas alteraciones estructurales que se manifiestan tanto a corto como a largo plazo en las neuronas piramidales de CA1. A este respecto, se ha descrito que las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA1 se desorientan de manera inusual, algunas dendritas apicales invaden los estratos radiado y piramidal. Por otro lado, a los 14 d post-isquemia, se ha observado la pérdida de espinas dendríticas, demostrando que una menor densidad de espinas dendríticas en los animales isquémicos correlaciona con alteraciones en su aprendizaje espacial (Neigh et al., 2004). A largo plazo (100 d post-isquemia), se ha descrito una disminución del grosor de CA1 interpretado como resultado no sólo de la pérdida neuronal, sino de la degeneración de las fibras pre-sinápticas y/o de una reducción de la densidad sináptica (Onodera et al., 1990).

### **3. Neuroprotección y neuroreparación**

El enfoque experimental de la neuroprotección tiene como objetivo influir, a través de procedimientos farmacológicos o no-farmacológicos, sobre aquellos fenómenos tempranos o tardíos de daño neuronal, o bien de reparación, de plasticidad y de recuperación funcional luego de isquemia cerebral global y reperfusión. Se han probado diferentes estrategias de neuroprotección en modelos animales de isquemia cerebral global, con el fin de prevenir, reducir o detener el progreso del daño isquémico cerebral bajo la premisa de una relación de oposición entre los mecanismos de acción de dichos agentes neuroprotectores o procedimientos no-farmacológicos y los mecanismos fisiopatológicos del daño cerebral, siendo éstos los blancos de las estrategias neuroprotectoras (Hurtado et al., 2006; Ginsberg, 2009; Cervantes et al., 2012).

Sin embargo, a la fecha las estrategias neuroprotectoras utilizadas en modelos animales de isquemia cerebral, no han sido exitosas al aplicarlas en ensayos clínicos, a excepción de la hipotermia que ha demostrado reducir la mortalidad y las

alteraciones neurológicas en pacientes que han sufrido un paro cardíaco (Arrich et al., 2012; Choi et al., 2012).

Por otro lado, existen mecanismos de reparación que promueven la recuperación funcional espontánea luego de isquemia. Uno de ellos es la plasticidad cerebral que se define como la habilidad del cerebro para cambiar su estructura y función durante la maduración, el aprendizaje, o bien en respuesta a estímulos ambientales o alguna patología (Di Filippo et al., 2008). Particularmente, luego de isquemia cerebral, la plasticidad de las neuronas sobrevivientes se reactiva con la finalidad de compensar la pérdida neuronal y preservar la función. Dentro de los posibles mecanismos de dicha plasticidad neural se incluyen la reorganización de las dendritas y/o el crecimiento de neuritas (Ruan et al., 2006; 2009; 2012).

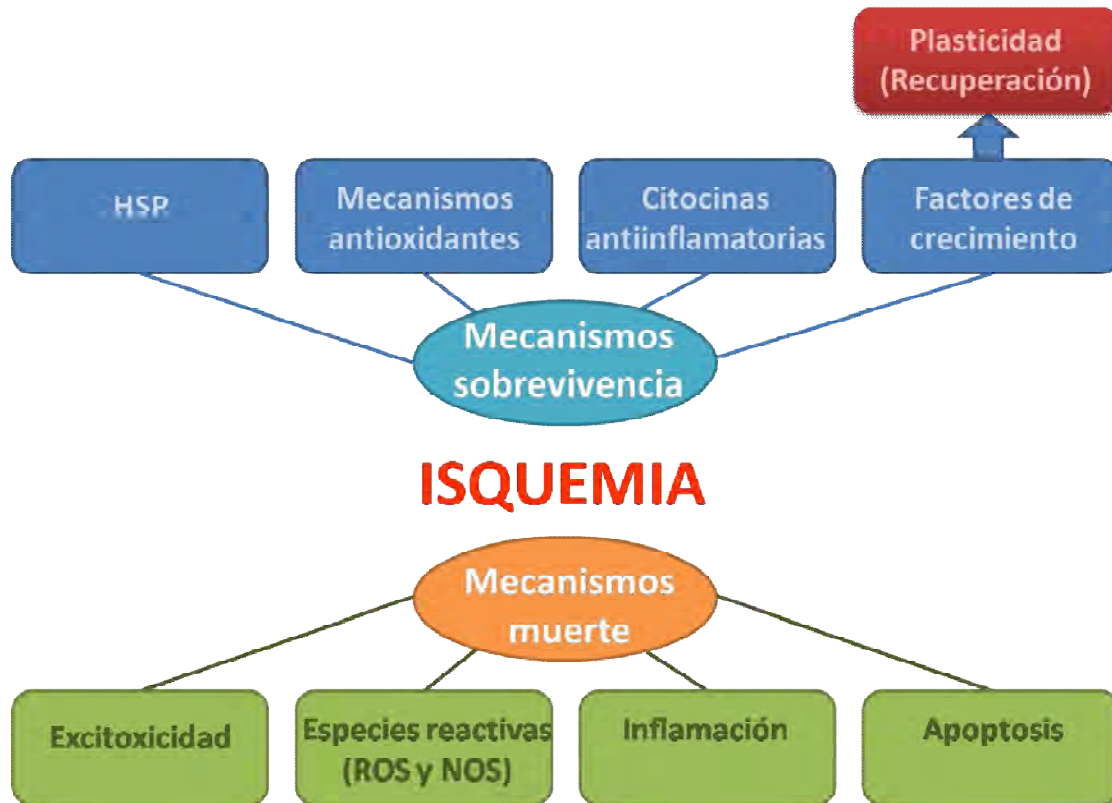
#### **4. Fenómenos de reparación inducidos por la isquemia**

Además de los fenómenos de daño que resultan en alteraciones estructurales y funcionales, se tiene evidencia de que la isquemia global, la isquemia focal y el daño traumático también promueven mecanismos endógenos tanto de protección que tienden a contrarrestar los mecanismos de daño, como de reparación plástica de los circuitos alterados (Fig. 4) (Johansson, 2000; 2007; Keyvani y Schallert, 2002; Leker y Shohami, 2002; Reinecke et al., 2003; Okano et al., 2007; Dirnagl y Meisel, 2008).

Por ejemplo, en estas situaciones patológicas aumentan algunas proteínas de choque térmico como la HSP70 que previenen la desnaturalización de otras proteínas; ocurre la activación de mecanismos antioxidantes endógenos; la producción de citocinas anti-inflamatorias y de proteínas anti-apoptóticas (Fig. 4) (Leker y Shohami, 2002). También, en las primeras horas después de la isquemia, ocurren aumentos en la producción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Fig. 2), entre otros, así como de su receptor Trk (Kobayashi et al., 1997; Keyvani y Schallert, 2002).

Estos factores, además de que interfieren con los procesos de daño excitotóxico y apoptótico, inducen respuestas plásticas al promover el crecimiento y la regeneración de los axones en la corteza cerebral y en el hipocampo de ratas adultas (Lindvall et al., 1994; Kokaia et al., 1996) y regular la actividad sináptica y la morfología neuronal, modificando las sinapsis existentes y generando nuevos contactos sinápticos (Thoenen, 1995; Vicario-Abejón et al., 2002; Lu, 2004). De este modo, se ha demostrado que luego de una isquemia focal ocurren aumentos en las arborizaciones dendríticas y en la sinaptogénesis en las áreas cercanas a la lesión (Johansson, 2000), que permiten al cerebro reorganizar los circuitos neuronales dañados. Estas

modificaciones tienen un curso temporal definido y frecuentemente se asocian con manifestaciones conductuales (Keyvani y Schallert, 2002).



**Figura 4. Mecanismos endógenos de muerte y de supervivencia activados por la isquemia.** La isquemia y el daño traumático al cerebro inducen la activación de mecanismos de daño que promueven la muerte neuronal incluyendo la excitotoxicidad, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS), procesos inflamatorios y apoptosis. De manera simultánea, se activan mecanismos de protección que promueven la supervivencia neuronal incluyendo la expresión de proteínas de choque térmico (HSP), de antioxidantes, de citocinas anti-inflamatorias y de factores de crecimiento que promueven fenómenos de plasticidad que favorecen la recuperación funcional. El balance entre los mecanismos endógenos de daño y de recuperación determinará en última instancia el destino del cerebro dañado por la isquemia. Modificada de Leker y Shohami, 2002.

Dentro de las alteraciones estructurales que denotan cambios plásticos en respuesta a la isquemia cerebral global, se ha descrito que las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA1 aumentan en número y en longitud a las 24 h post-isquemia (Ruan et al., 2006). De manera similar, se observó un incremento en el número de espinas dendríticas a las 12 y 24 h post-isquemia, regresando al nivel basal a las 48 h. El tipo predominante de espinas dendríticas también se modifica con la isquemia, observándose una disminución en la densidad de espinas dendríticas cortas a las 12 y 48 h post-isquemia y en la de espinas delgadas a las 24 y 48 h (Ruan et al., 2009), mientras que la densidad de espinas de tipo hongo aumenta a las 48 h post-isquemia y la de tipo filopodio a las 24 h. La mayoría de las sinapsis de CA1 son asimétricas; con la isquemia global esta proporción se modifica, incrementando la densidad

sináptica total a las 12 y 24 h post-isquemia y disminuyendo posteriormente a las 48 h; pero aumentando también el número de sinapsis perforadas y disminuyendo el número de botones sinápticos a las 48 h (Ruan et al., 2012).

Desafortunadamente, la capacidad de los mecanismos endógenos de neuroprotección y neuroreparación para promover tanto la sobrevivencia celular como los fenómenos de plasticidad es limitada y usualmente, ante un daño severo, estos mecanismos no pueden contrarrestar suficientemente los procesos concurrentes de muerte neuronal.

Sin embargo, su identificación y esclarecimiento pueden apoyar el desarrollo de estrategias terapéuticas de neuroprotección que se basen no sólo en la oposición a los fenómenos celulares promotores del daño sino también en la inducción y la potenciación de los mecanismos endógenos de reparación y de plasticidad neuronal que ocurren en respuesta a la isquemia.

#### **4.1. Ambiente restrictivo de la plasticidad post-isquemia**

Los fenómenos plásticos de reparación se ven limitados al enfrentar un medio ambiente restrictivo del crecimiento y de la regeneración en el Sistema Nervioso Central (SNC) a causa de la presencia de proteínas inhibitoras del crecimiento de neuritas y de la barrera física que representa la cicatriz glial formada principalmente por los astrocitos reactivos (Sandvig et al., 2004; Schwab, 2004; Cao et al., 2010).

##### **4.1.1. Factores inhibidores del crecimiento de neuritas**

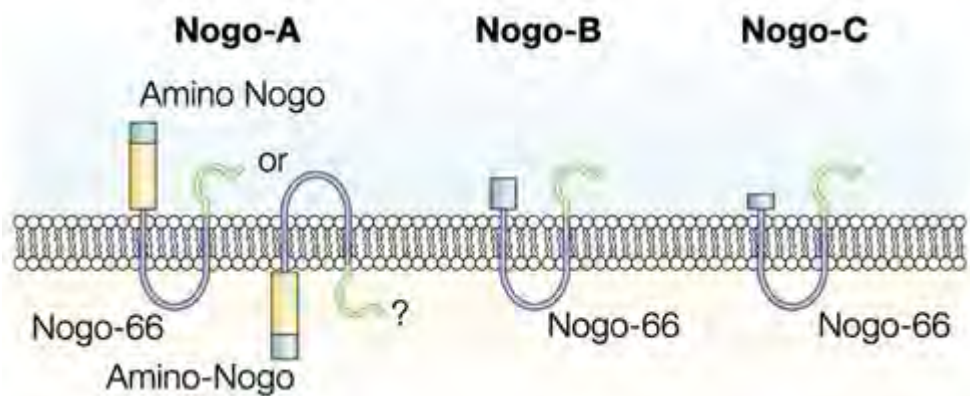
El crecimiento de neuritas y su inhibición son fenómenos que están en balance durante el desarrollo. La falta de regeneración tras una lesión no sólo es el resultado de la insuficiencia de los procesos endógenos de reparación, sino también una consecuencia del incremento de inhibidores del crecimiento de neuritas en el SNC (Xiang et al., 2005; Akbik et al., 2012; Pernet y Schwab, 2012).

###### **4.1.1.1. Nogo-A**

Ramón y Cajal fue la primera persona en sugerir que la materia blanca podía bloquear la regeneración del SNC (Filbin, 2003). A ello, le siguen los estudios de Caroni y Schwab (1988a), donde se identificaron moléculas implicadas en la inhibición del crecimiento de neuritas. A la fecha, se han descrito múltiples proteínas asociadas a mielina que contribuyen a las propiedades inhibitorias de la mielina, entre ellas se encuentra la proteína Nogo-A (Filbin, 2003; Grados-Munro y Fournier, 2003; Yiu y He, 2003; Liu et al., 2006; Xie y Zheng, 2008; Akbik et al., 2012; Pernet y Schwab, 2012).

Como se mencionó anteriormente, a finales de los años ochenta se demostró que gran parte de la actividad inhibitoria de la mielina se debía a dos componentes proteicos

que fueron denominados NI-250 y NI-35 (Caroni y Schwab, 1988 a y b). El anticuerpo IN-1, generado contra NI-250, bloquea parcialmente el efecto inhibitorio de la mielina y permite cierto grado de regeneración de neuritas y/o recuperación funcional luego de isquemia cerebral focal (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Weissner et al., 2003; Lee et al., 2004; Seymour et al., 2005; Cheatwood et al., 2008; Fang et al., 2010; Wang et al., 2010; Tsai et al., 2011). La proteína Nogo-A es codificada por el gen nogo, también llamado reticulón 4, que da lugar a tres isoformas mediante el uso de dos promotores y splicing alternativo (Fig. 5) (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000). Las tres proteínas comparten el extremo amino terminal, donde se localiza una secuencia de localización reticular y dos dominios transmembranales (Fig. 5) (Oertle y Schwab, 2003). Estos dos dominios están separados por un fragmento de 66 a.a. conocido como Nogo-66. Además, Nogo-A, la isoforma mayor, posee un dominio exclusivo localizado en el extremo amino terminal denominado amino Nogo en el cual, junto con Nogo-66, se localiza su actividad inhibitoria (Fig. 5) (Oertle et al., 2003).



**Figura 5. Estructura de la proteína Nogo.** Existen 3 isoformas de la proteína Nogo –A, B y C. Las secuencias en común se muestran en azul y verde. La proteína Nogo tiene dos dominios inhibitorios: el dominio Nogo-66, común en las tres isoformas, y el dominio amino terminal, denominado amino Nogo, exclusivo de Nogo-A. Se ha propuesto que Nogo-A puede adoptar dos topologías, dependiendo de si el dominio Nogo-66 o bien el amino Nogo se encuentran hacia el lado extracelular. Tomada de Filbin, 2003.

Inicialmente, Nogo-A fue descrita como una proteína propia de oligodendrocitos, sin embargo, se ha demostrado que también se expresa en la mayoría de las neuronas (Josephson et al., 2002; Huber et al., 2002; Wang et al., 2002; Hunt et al., 2003). Además de localizarse en el retículo endoplásmico, Nogo-A se presenta también en la membrana plasmática de oligodendrocitos y neuronas, donde expone al exterior sus dos dominios inhibitorios (Fig. 5) (Oertle et al., 2003). Se han propuesto varias funciones para Nogo-A intracelular, como son la regulación de la apoptosis, la regulación del tráfico vesicular, y la formación de canales en el retículo endoplásmico como lo hacen otros miembros de la familia reticulón (Oertle y Schwab, 2003; Oertle et



al., 2003). Su función mejor caracterizada es la de proteína inhibidora del crecimiento de neuritas. Este papel ha quedado ampliamente demostrado por diversos experimentos de bloqueo, incluyendo los anticuerpos IN-1 y NEP1-40, que se mencionarán más adelante (Schwab, 2004; Xie y Zheng, 2008).

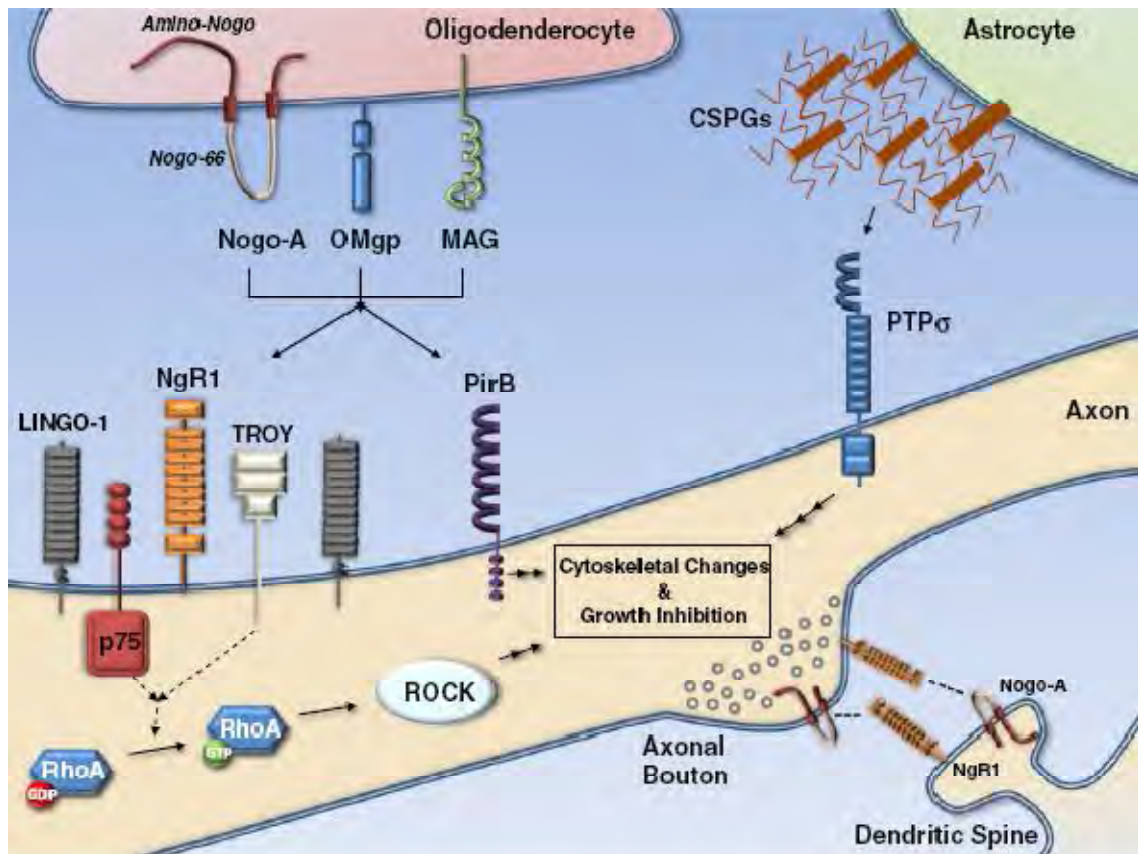
#### **4.1.1.1.1. Señalización intracelular asociada a Nogo-A**

El efecto inhibitorio de una proteína sobre la regeneración de neuritas, está determinado sus receptores y la señalización intracelular que induzca la activación de éstos.

A este respecto, se ha demostrado que Nogo-A, particularmente su fragmento Nogo-66, se une a un receptor denominado Ng-R (Fig. 6; Fournier et al., 2001; Yiu y He, 2003; Xie y Zheng, 2008; Cao et al., 2010; Akbik et al., 2012). El Ng-R es una proteína de 473 a.a. que pertenece a la familia caracterizada por la presencia de repetidos ricos en leucina (LRRs). Ng-R contiene ocho LRRs en el dominio N-terminal, encargados de la unión a Nogo-A y un dominio C-terminal de unión a glicosilfosfatidil inositol, no tiene dominios transmembranales ni citoplasmáticos (Fournier et al., 2002). El Ng-R se expresa exclusivamente en neuronas después del nacimiento y está ausente durante el desarrollo embrionario, aunque no en todas las poblaciones neuronales, y se localiza preferentemente en los axones y las terminales sinápticas neuronales (Josephson et al., 2002; Barrette et al., 2007). Existen dos homólogos del Ng-R, también llamado Ng-R1, el Ng-R2 y el Ng-R3, aunque ninguno tiene afinidad por Nogo-A (Cao et al., 2010).

Por otro lado, dado que el Ng-R no tiene dominios citoplasmáticos, requiere de las proteínas p75, TROY y LINGO-1 como co-receptores para transducir la señal (Fig. 6; Xie y Zheng, 2008; Akbik et al., 2012). Dentro de los efectores corriente abajo, se encuentran la GTPasa Rho-A que activa a la cinasa de Rho-A (ROCK) e induce un rearrreglo en el citoesqueleto e inhibición del crecimiento (Fig. 6; Yiu y He, 2006; Akbik et al., 2012).

A este respecto, se ha demostrado un incremento en la expresión, a nivel de RNAm y proteína, de Nogo-A, Ng-R y Rho-A en la corteza cerebral luego de isquemia cerebral focal (Cheatwood et al., 2008; Jiang et al., 2009) y global (Zhou et al., 2003).



**Figura 6. Vía de señalización inhibitoria activada por Nogo-A.** Los oligodendrocitos y ciertos tipos de neuronas expresan Nogo-A que se une a su receptor Ng-R1, el cual interacciona a los co-receptores p75 o TROY y LINGO-1 para formar un complejo receptor que transduce la señal inhibitoria en las neuronas vecinas. En dichas neuronas, el receptor NgR1 estimula la activación de la GTPasa RhoA que induce el rearrreglo del citoesqueleto inhibiendo el crecimiento de neuritas. Tomada de Akbik et al., 2012.

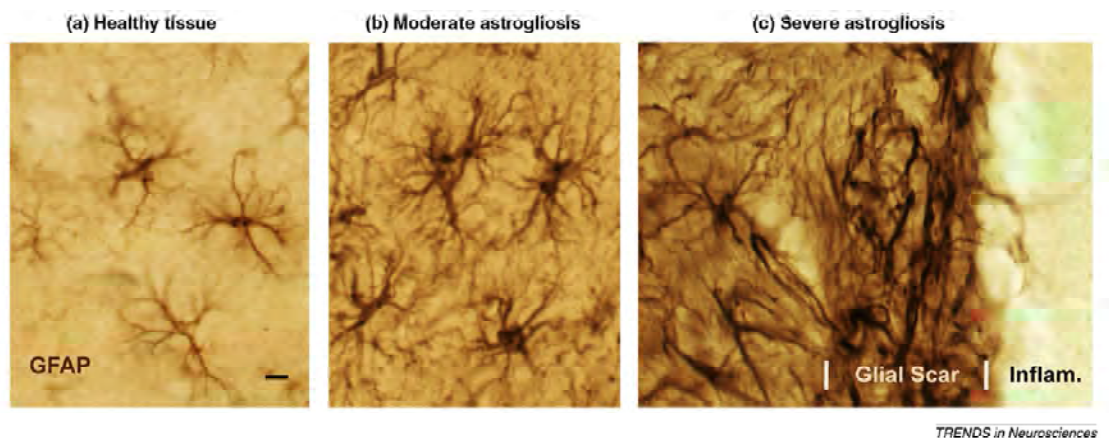
#### 4.1.2. Cicatriz glial

El SNC puede sufrir agresiones de índole muy diversa, tales como isquemia, daño traumático, infecciones o hemorragias, insultos que desencadenan una cascada de eventos que inducen la formación a largo plazo de una cicatriz glial (Sofroniew, 2009). La cicatriz glial está formada por astrocitos reactivos y una matriz extracelular inhibitoria que forman una barrera tanto física como química para la regeneración en el SNC (Fawcett y Asher, 1999; Fitch y Silver; 2008; Sofroniew, 2009).

##### 4.1.2.1. Reacción astrogial

El funcionamiento normal del cerebro depende de las estrechas interacciones que se establecen entre las neuronas y las células gliales. Particularmente, los astrocitos contribuyen de manera esencial al funcionamiento neuronal normal ya que regulan el flujo sanguíneo cerebral (producen y liberan varios mediadores moleculares como las prostaglandinas, el óxido nítrico y el ácido araquidónico que incrementan o disminuyen

el flujo sanguíneo), proveen a las neuronas de metabolitos energéticos (producen lactato a partir de glucógeno en condiciones de hipoglicemia) y las protegen del estrés oxidativo (mediante la producción de glutatión), participan en la regulación de la transmisión sináptica (el incremento intracelular de calcio en los astrocitos puede regular la excitabilidad neuronal, liberan neurotransmisores, hipótesis de la sinapsis tripartita) y en fenómenos de plasticidad (producción de factores de crecimiento), y mantienen el balance iónico (los procesos de los astrocitos tienen acuaporina-4 (AQP4) un canal de agua y además poseen transportadores de  $K^+$ , intercambiadores de  $Na^+/H^+$ , transportadores de bicarbonato, ATPasa de protones que actúan como regulador de la homeostasis de fluidos) y de neurotransmisores (ciclo glutamato-glutamina) (Chen y Swanson, 2003; Benarroch, 2005; Sofroniew y Vinters, 2010). Sin embargo, como resultado de una lesión (física, química, isquémica, etc.), los astrocitos de la zona afectada experimentan una respuesta en la que pasan del estado “quiescente” a su forma “reactiva”. Durante este proceso, los astrocitos se hipertrofian, sobreexpresan proteínas de filamentos intermedios (como la proteína ácida fibrilar glial, GFAP), activan la proliferación celular (hiperplasia) y forman parte de la cicatriz glial (Fig. 7) (Fawcett y Asher, 1999; Kálmán, 2004; Silver y Miller, 2004; Fitch y Silver, 2008; Sofroniew, 2009; Buffo et al., 2010).



**Figura 7. Reacción astrogliosa.** Fotomicrografías de astrocitos en un tejido sano (a) y de diferentes grados de astrogliosis reactiva (b, c) y de la formación de la cicatriz glial tras insultos de diferente tipo y severidad. Inmunorreactividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Nótese que la inmunorreactividad a GFAP evidencia los procesos y el cuerpo celular de los astrocitos. En (a) se observa la apariencia normal de los astrocitos; procesos delgados. En (b) se observa una astrogliosis moderada en la corteza cerebral de ratón luego de la inyección de lipopolisacárido (antígeno bacteriano); procesos engrosados. En (c) se observa una astrogliosis severa y la formación de la cicatriz glial, adyacente a una región de la corteza cerebral de ratón que muestra inflamación luego de daño traumático; procesos extendidos y sobrepuestos entre sí. Barra de calibración= 8  $\mu$ m. Tomada de Sofroniew, 2009.

Los astrocitos reactivos producen determinadas moléculas como los proteoglicanos de condroitin sulfato (CSPGs) que incorporan a su membrana plasmática o bien secretan

a la matriz extracelular. Dichas moléculas tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de neuritas y forman parte del ambiente inhibitorio de la zona afectada (Silver y Miller, 2004).

En respuesta a la pérdida selectiva de neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo, se ha descrito un incremento en la inmunorreactividad a GFAP resultante de la hipertrofia e hiperplasia de astrocitos presentes en los estratos radiado, lacunoso molecular, y en menor medida en el estrato piramidal luego de isquemia cerebral global (Petito et al., 1990; Tanaka et al., 1992; Ordy et al., 1993; Petito y Halaby, 1993; Martins y Chadi, 2001; Sugawara et al., 2002; Sulkowski et al., 2002).

## **5. Estrategias experimentales para contrarrestar el medio restrictivo de la plasticidad después de la isquemia**

Diversas estrategias han sido diseñadas para permitir los procesos de regeneración luego de una lesión en el SNC. Entre ellas se encuentran: el trasplante de células troncales, el aporte de factores neurotróficos y la neutralización del medio ambiente extracelular inhibitorio como se describe más adelante (Horner y Gage, 2000; Xiang et al., 2005; McCreedy et al., 2012; Pernet and Schwab, 2012).

Para neutralizar el medio ambiente extracelular inhibitorio, se ha propuesto que se puede modular la composición de la matriz extracelular removiendo algunos de sus componentes inhibitorios, como son los CSPGs, o bien se puede incrementar la permisividad del SNC bloqueando el efecto de los inhibidores del crecimiento de neuritas (Xiang et al., 2005; McCreedy et al., 2012).

Existen dos aproximaciones para bloquear el efecto de los inhibidores del crecimiento de neuritas a través: (1) del bloqueo directo de esas moléculas o bien de sus receptores y (2) del bloqueo de las vías de señalización intracelular de las neuronas para reducir su respuesta a estos inhibidores (Homer y Gage, 2000; Xiang et al., 2005; McCreedy et al., 2012).

### **5.1. Inmunoterapia**

Los déficits funcionales resultantes de un daño al SNC dependen de la localización y de la severidad del mismo. A este respecto, se ha descrito que luego de isquemia cerebral focal se presentan déficits de tipo sensorial, motor y cognitivo (Markgraf et al., 1992; Wahl et al., 1992). En tanto que un episodio de isquemia cerebral global induce ciertas alteraciones sensorimotoras únicamente de forma transitoria que se manifiestan entre 24-48 h post-isquemia (Block, 1999), y otras persistentes a largo plazo, como son aquellas alteraciones en el aprendizaje y la memoria espaciales que son consecuencia de la pérdida de neuronas piramidales en la región CA1 del

hipocampo (Zola-Morgan et al., 1986; Nunn et al., 1994; Block 1999; Hartman et al., 2005; von Euler et al., 2006).

El bloqueo de la inhibición del crecimiento de neuritas mediante la administración de anticuerpos dirigidos contra Nogo-A (IN-1) o bien contra su receptor Ng-R (NEP1-40) ha demostrado que promueve la recuperación funcional y la plasticidad estructural (Revisión en Pernet and Schwab, 2012).

De hecho, la inmunoterapia con anti-Nogo-A y anti-Ng-R administrados ya sea inmediatamente, 24 h, 7 d o incluso 9 semanas después de isquemia focal induce crecimiento axonal compensatorio (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Weissner et al., 2003; Seymour et a., 2005; Wang et al., 2010; Tsai et al., 2011) e incrementa las arborizaciones dendríticas y la densidad de espinas (Papadopoulos et al., 2006). Estos cambios compensatorios fueron correlacionados con la recuperación funcional evaluada en la caja con escaleras (staircase test) y prueba de alcanzar alimento con la pata anterior (forelimb reaching test) (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Weissner et al., 2003; Fang et al., 2010; Tsai et al., 2011). Los hallazgos de estos estudios sugieren que el bloqueo de la actividad de Nogo-A es una intervención farmacológica importante para restablecer la función que se pierde luego de una lesión en el SNC. Actualmente, se llevan a cabo ensayos clínicos fase I/II con anticuerpos anti-Nogo-A en pacientes con lesión traumática de médula espinal ([www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00406016](http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00406016)) y con esclerosis lateral amiotrófica ([www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00875446](http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00875446)).

## **5.2. Terapias no-farmacológicas**

Además de la inmunoterapia, existen algunas estrategias no-farmacológicas que han mostrado ser efectivas para modular la vía de señalización de Nogo-A. Entre ellas, la terapia con oxígeno hiperbárico administrada durante 2 h comenzando 1 h después de un episodio de isquemia cerebral global, reduce los niveles de Nogo-A, Ng-R y Rho-A en la corteza cerebral desde las 6 h hasta los 7 d post-isquemia (Zhou et al., 2003). Además de estas acciones, se ha demostrado que la terapia con oxígeno hiperbárico reduce la pérdida neuronal (Zhou et al., 2003), incrementa el suministro de oxígeno al tejido isquémico, disminuye el edema, la lipoperoxidación, la inflamación y la apoptosis (Revisión en Matchett et al., 2009).

De manera similar, 1 semana de ejercicio físico voluntario comenzando 3 h después de un daño cerebral por percusión con fluido, previene el incremento en los niveles de Nogo-A en el hipocampo mediante un mecanismo mediado por BDNF (Chytrova et al., 2008).

### **5.3. Terapias farmacológicas**

En cuanto a los efectos de fármacos capaces de modular la vía de señalización de Nogo-A, existe escasa información. La efedrina, un agente simpatomimético indirecto, administrada inmediatamente después de isquemia neonatal y una vez al día durante 7 d, atenúa la inmunorreactividad a Nogo-A en la corteza cerebral y reduce las alteraciones en el aprendizaje y la memoria espaciales evaluados 4 semanas después del episodio de hipoxia-isquemia (Chen et al., 2009). La indometacina, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, administrada inmediatamente después de TBI, suprime el incremento en la expresión de Nogo-A (RNAm y proteína) en el hipocampo a las 8 h, efecto asociado a una menor producción de IL-1 $\beta$  (Chao et al., 2012). El  $\alpha$ -tocoferol, un antioxidante natural, administrado 6 h después de TBI y una vez al día hasta la obtención de los cerebros, reduce la expresión de Nogo-A (RNAm y proteína) en la corteza cerebral a los 1, 3, 7 y 21 d, y la de Ng-R a los 3, 14 y 21 d, así como los déficits neurológicos (puntuación que indica la severidad de los déficits neurológicos evaluando el movimiento, la percepción sensorial, el equilibrio y los reflejos) desde los 3 hasta los 14 d post-lesión (Yang et al., 2013).

## **6. Agentes neuroprotectores**

La reducción de los indicadores morfológicos y funcionales de daño, luego de un episodio de isquemia, mediante la administración de fármacos que disminuyan o contrarresten uno o varios de los mecanismos fisiopatológicos desencadenados por esta condición, o que promuevan los fenómenos de reparación y plasticidad, es un parámetro de la eficacia de estos fármacos y una meta fundamental en neuroprotección.

La agentes neuroprotectores se pueden agrupar de acuerdo con su mecanismo de acción en contra del daño isquémico: bloqueadores de canales de calcio, antagonistas de glutamato, agentes GABAérgicos, agentes antioxidantes, compuestos anti-inflamatorios, entre otros (Revisión en Cervantes et al., 2012).

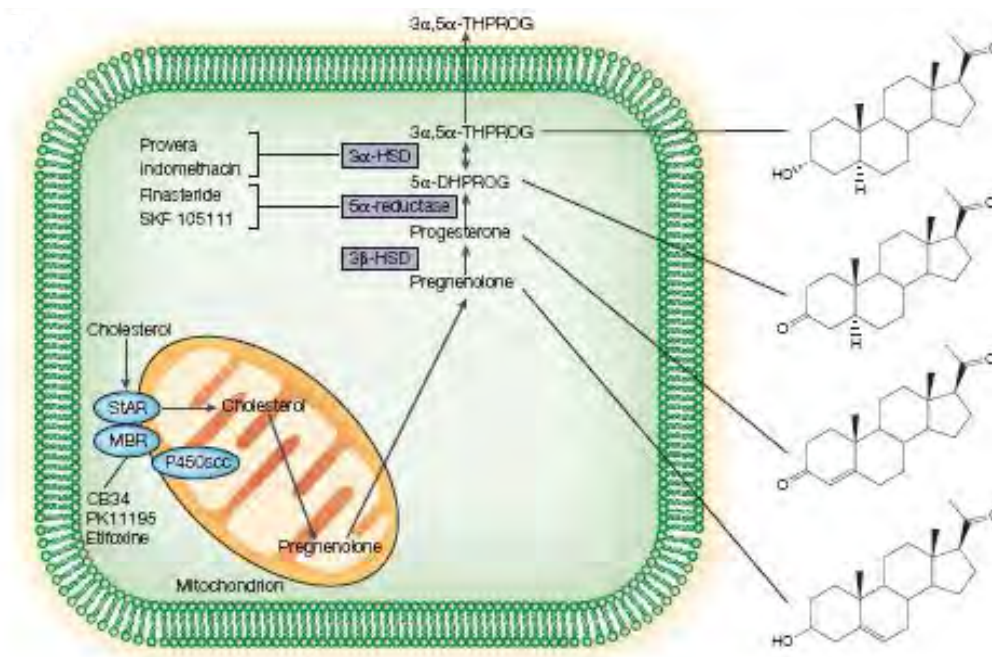
### **6.1. Progesterona**

Dado que los procesos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia ocurren tanto en secuencia como de manera simultánea durante la isquemia y después de la reperusión, los agentes neuroprotectores con múltiples mecanismos celulares y/o moleculares de acción representan una ventaja sobre aquellos que sólo tienen un único mecanismo de acción. Entre los agentes neuroprotectores pleiotrópicos, se encuentra la progesterona.

La progesterona ( $P_4$ ) es una hormona esteroide, cuyo nombre sistemático es 4-pregnen-3,20-diona, sintetizada por el ovario (cuerpo lúteo), la corteza adrenal y la placenta en las hembras y por los testículos y la corteza adrenal en los machos. Las concentraciones de  $P_4$  en el plasma son generalmente más altas en las hembras que en los machos, excepto durante la fase folicular o las fases de estro y diestro del ciclo estral de la rata, en que las concentraciones de las hembras son muy similares a las de los machos (Piva et al., 1973; Karla y Karla, 1974). El que en los machos también haya producción de  $P_4$  sugiere el papel de esta hormona en ambos sexos (Singh y Su, 2013).

Sin embargo, la  $P_4$  ha sido reconocida como un neuroesteroide (Paul y Purdy, 1992), por lo que tanto la  $P_4$ , como algunos de sus metabolitos, también son sintetizados por las neuronas de la corteza cerebral, hipocampo, bulbos olfatorios, tálamo y amígdala; por las células gliales en el sistema nervioso central y por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (Schumacher et al., 2012).

Como todas las hormonas esteroideas, la  $P_4$  puede ser sintetizada a partir del colesterol. La biotransformación del colesterol a  $P_4$  involucra 2 pasos: la conversión de colesterol a pregnenolona por el citocromo P450 scc (enzima que corta la cadena lateral del colesterol) y la conversión de pregnenolona a  $P_4$  por la  $\Delta 5$ - $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD). La  $P_4$  es metabolizada por la  $5\alpha$ -reductasa a  $5\alpha$ -dihidroprogesterona, la cual es reducida a  $3\alpha, 5\alpha$ -tetrahidroprogesterona por la  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Fig. 8) (Belelli y Lambert, 2005).



**Figura 8. Síntesis y metabolismo de la progesterona.** Tomada y modificada de Belelli y Lambert, 2005.

En general, la  $P_4$  actúa a través de (1) mecanismos genómicos y (2) no-genómicos. Los mecanismos genómicos de  $P_4$  involucran su interacción con un receptor intracelular específico que una vez unido a la hormona se dimeriza y actúa como factor de transcripción induciendo la expresión de diversos genes blanco. Los mecanismos no-genómicos de  $P_4$  son variados y no implican la asociación directa del esteroide con el receptor intracelular, sino su interacción con receptores de neurotransmisores como el receptor  $GABA_A$  reduciendo la excitabilidad neuronal, o con algunas proteínas membranales y activar vías de señalización que inducen la expresión de otros genes blanco (Brinton et al., 2008; Singh y Su, 2013).

### **6.1.1. Efectos neuroprotectores/neurorreparadores de la progesterona**

Algunos de los mecanismos de acción de la  $P_4$  le confieren propiedades neuroprotectoras y neurorreparadoras en diversos modelos de daño, como la lesión traumática al cerebro (TBI) (Stein, 2008; 2011; 2012), la lesión traumática de médula espinal (Labombarda et al., 2002; 2010), el daño epileptoide y excitotóxico (Frye, 2000; 2010), la isquemia focal (Gibson et al., 2009; Kipp et al., 2012) y la isquemia global (Cervantes et al., 2012).

El interés por el estudio de los efectos neuroprotectores de la  $P_4$  surgió a partir de las observaciones de Roof et al. (1992) quienes demostraron que el contenido de agua en el cerebro (edema cerebral) era mayor en ratas macho que en hembras después de TBI. En este mismo estudio se descartó el efecto de los estrógenos porque al administrar exógenamente estradiol y progesterona en secuencia o por separado a ratas ovariectomizadas, sólo se redujo el edema en las ratas tratadas con  $P_4$ .

A partir de estos estudios se han generado múltiples evidencias de los efectos neuroprotectores y neurorreparadores de la  $P_4$  reduciendo el volumen de la lesión o la pérdida neuronal, así como las alteraciones neurológicas y funcionales en modelos experimentales de daño epileptoide, daño traumático al cerebro, isquemia focal, isquemia global y lesión traumática de la médula espinal, en algunos casos reduciendo parcialmente la reacción astrogliar y promoviendo la mielinización, la plasticidad estructural y la neurogénesis (García-Estrada et al., 1993; González-Vidal et al., 1998; García-Estrada et al., 1999; Labombarda et al., 2000; Cervantes et al., 2002; Goss et al., 2003; Ciriza et al., 2004; Grossman et al., 2004; Djebaili et al., 2004; 2005; Morali et al., 2005; 2011; 2012; Barha et al., 2011; Garay et al., 2012).

### **6.1.1. Mecanismos celulares/moleculares de las acciones de progesterona**

La  $P_4$  produce sus múltiples efectos neuroprotectores en el cerebro a través de varios mecanismos celulares de acción:



### 1. EFECTOS DE P<sub>4</sub> SOBRE ALGUNOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN

La P<sub>4</sub> y sus metabolitos, principalmente la 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -tetrahidroprogesterona o alopregnanolona (ALO), pueden modular el funcionamiento del complejo receptor GABA<sub>A</sub>, funcionando como moduladores alostéricos positivos al aumentar la afinidad del receptor por el GABA, con lo que se incrementa la frecuencia y la duración de la apertura del canal de cloro acoplado a este receptor (Fig. 9) (Majewska, 1990; Lambert et al., 1999; Belelli y Lambert, 2005; Wang, 2011). A este respecto, se ha demostrado que la P<sub>4</sub> es neuroprotectora en modelos de excitotoxicidad *in vitro* (Ardeshiri et al., 2006; Atif et al., 2009; Radley et al., 2012). Además, estudios recientes han demostrado que la P<sub>4</sub> puede bloquear la entrada de calcio a las neuronas mediante la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje, disminuyendo así la muerte neuronal *in vitro* (Luoma et al., 2011; 2012); o bien a través de su interacción con el receptor  $\sigma$ 1 (Cai et al., 2008).

### 2. PROPIEDADES ANTI-EDEMA DE P<sub>4</sub>

Se ha demostrado que la P<sub>4</sub> reduce el edema después de isquemia focal o TBI (Betz y Coester, 1990; Roof et al., 1993; Wright et al., 2001; Gibson et al., 2005; Guo et al., 2006; Kasturi y Stein, 2009). Uno de los posibles mecanismos por los que P<sub>4</sub> puede reducir la formación del edema cerebral es a través de sus acciones sobre la barrera hematoencefálica. Es decir, la P<sub>4</sub> puede inhibir directamente el transporte iónico activo responsable de la formación del edema, bloqueando canales de sodio, de potasio y de calcio dependientes de voltaje (Betz, 1990; Kelley y Mermelstein, 2011). Otra de las posibilidades es la propuesta de Guo et al. (2006) quienes demostraron que P<sub>4</sub> reduce la expresión de acuaporina-4 (AQP4) (Fig. 9) después de TBI. La AQP4 es una proteína que forma un canal para el agua que se expresa en el cerebro, predominantemente en los pies de los astrocitos que limitan el paso de fluidos, como los contenidos en el líquido cefalorraquídeo y la sangre, hacia el parénquima cerebral. Dicha distribución sugiere que la AQP4 controla el flujo de agua hacia adentro y hacia afuera del cerebro (Papadopoulos y Verkman, 2007).

### 3. ACCIONES ANTI-INFLAMATORIAS DE P<sub>4</sub>

Se ha descrito que la P<sub>4</sub> reduce la expresión de varias citocinas pro-inflamatorias, como son IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  después de isquemia (Fig. 9) o TBI (He et al., 2004; Gibson et al., 2005; Pan et al., 2007; Aggarwal et al., 2008; Ishrat et al., 2010; Jiang et al., 2011).

Además, se ha demostrado que disminuye la expresión post-isquemia de varias enzimas pro-inflamatorias, como la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y la

sintasa del óxido nítrico-2 (NOS-2) involucradas en la síntesis de óxido nítrico que favorece la formación de especies reactivas de nitrógeno (Coughlan et al., 2005; Gibson et al., 2005; pro-inflamatoria), y la COX-2 involucrada en la síntesis de prostaglandinas (Jiang et al., 2011).

#### 4. EFECTOS DE P<sub>4</sub> SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Se ha demostrado que tanto la P<sub>4</sub> como su metabolito activo, la ALO, preservan la integridad de la barrera hematoencefálica, mediante la reducción de los niveles y de la actividad de las metaloproteinasas 2 (MMP-2) y 9 (MMP-9), evitando la degradación de las proteínas de las uniones intercelulares estrechas, ocludina-1 y claudina-5, reduciendo la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a las 72 h post- isquemia (Ishrat et al., 2010).

#### 5. ACCIONES ANTIOXIDANTES DE P<sub>4</sub>

Aunque la P<sub>4</sub> no tiene una estructura química característica de un antioxidante, dosis altas de esta hormona son efectivas para reducir los niveles de la 8-isoprostaglandina F2 alfa, un marcador de lipoperoxidación después de TBI (Roof et al., 1997). Además se ha demostrado que la P<sub>4</sub> incrementa los sistemas antioxidantes endógenos, particularmente la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa después de TBI (Shahrokhi et al., 2012) e isquemia cerebral global (Aggarwal et al., 2008); reduce los niveles de malondialdehído (otro marcador de lipoperoxidación) y preserva los niveles de glutatión reducido (principal antioxidante endógeno) en ratas ovariectomizadas sometidas a isquemia cerebral global (Ozacmak y Sayan, 2009).

#### 6. EFECTOS DE P<sub>4</sub> SOBRE LA INTEGRIDAD MITOCONDRIAL

La mitocondria se considera como el lugar donde convergen las diferentes vías de señalización apoptótica. El poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mtPTP) es un complejo multiproteico que se forma en las zonas de unión entre las membranas interna y externa de la mitocondria, cuya interacción da lugar a la formación de un canal que permite la salida de moléculas con actividad pro-apoptótica, como citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF) (Crompton, 1999; Christophe y Nicolas, 2006).

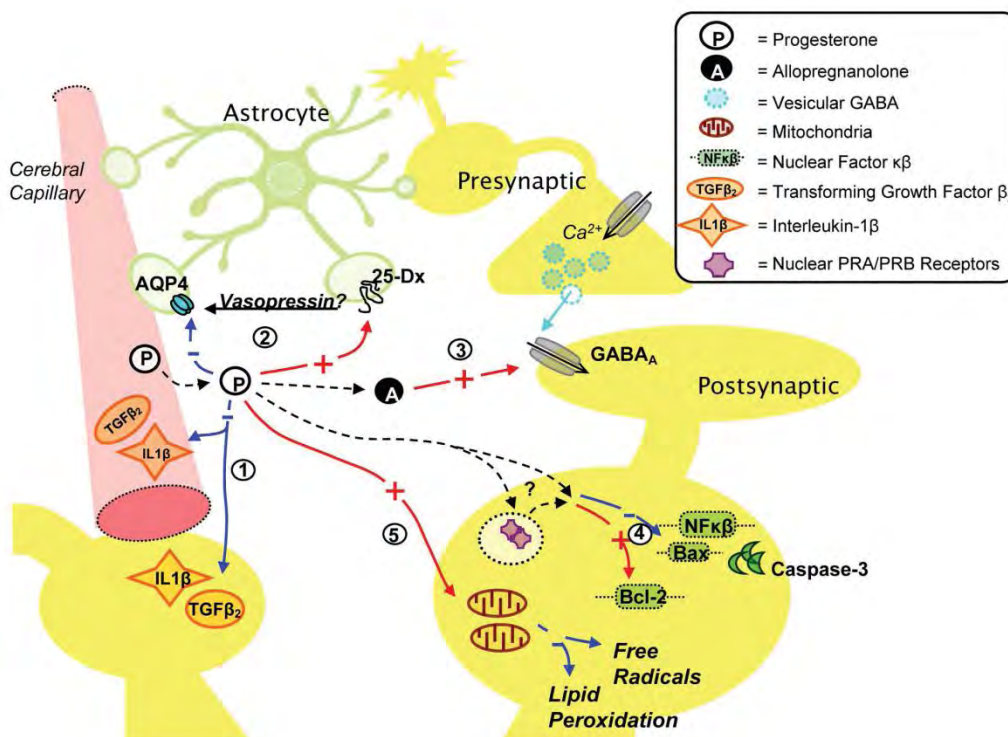
P<sub>4</sub>, a través de su metabolito ALO, inhibe la apertura del mtPTP inducida por calcio mediante la interacción directa del esteroide con el mtPTP, lo cual previene la salida del citocromo c como ha sido demostrado en mitoplastos derivados de mitocondrias de cerebro de ratas sometidas a TBI e isquemia focal (Sayeed et al., 2009).

## 7. ACCIONES ANTI-APOPTÓTICAS DE P<sub>4</sub>

Se ha demostrado que la P<sub>4</sub> incrementa la expresión (RNAm y proteína) de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Fig. 8) en modelos de isquemia *in vitro* (Nilsen y Brinton, 2002), o *in vivo* después de TBI (Yao et al., 2005) mediante su mecanismo genómico. En contraste, P<sub>4</sub> disminuye la expresión de proteínas pro-apoptóticas, como caspasa-3 y Bax (Fig. 9) después de isquemia *in vitro* (Lockhart et al., 2002; Ardeshiri et al., 2006) o TBI (Djebali et al., 2004).

## 8. EFECTOS DE P<sub>4</sub> SOBRE ALGUNAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

A nivel de la membrana plasmática, el receptor de P<sub>4</sub> contiene un dominio amino terminal rico en prolina, homólogo a Src-3 (coactivador del receptor de esteroides-3), con el que es capaz de interactuar con varias proteínas en respuesta a su unión con la P<sub>4</sub>. Una de estas proteínas es la cinasa Src, que a su vez activa la cascada de las pequeñas GTPasas Ras/Raf y las cinasas ERK/MAPK (Lösel y Wehling, 2003; Brinton et al., 2008), disminuyendo la muerte neuronal post-isquemia (Cai et al., 2008). Recientemente, se ha demostrado que la P<sub>4</sub> activa la vía de la cinasa PI3K que induce un incremento en la expresión de factores de crecimiento como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y BDNF (factor de crecimiento derivado del cerebro), disminuyendo la muerte neuronal post-isquemia (Ishrat et al., 2012).



**Figura 9. Mecanismos de neuroprotección mediados por progesterona luego de isquemia.** La progesterona atraviesa la barrera hematoencefálica y puede actuar a través de la unión con su receptor, o bien a través de mecanismos no-genómicos (unión con receptor de

membrana (25-Dx o con el receptor GABA<sub>A</sub>) contrarrestando fenómenos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia, como son 1) la inflamación—vía la supresión de la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 2; 2) el edema—vía 25-Dx o reduciendo la expresión de la acuaporina-4 (AQP4); 3) la excitotoxicidad—vía su metabolito activo la alopregnanolona que se une al receptor GABA<sub>A</sub> suprimiendo la neurotransmisión excitatoria; 4) la apoptosis—vía la reducción de la expresión de genes pro-apoptóticos como la caspase-3 y Bax, o bien incrementando la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 y 5) La lipoperoxidación y el estrés oxidativo. Tomada de Gibson et al., 2009.

Por otro lado, la P<sub>4</sub> produce sus múltiples efectos neurorreparadores en el cerebro a través de varios mecanismos celulares de acción:

#### 9. EFECTOS DE P<sub>4</sub> SOBRE LA REMIELINIZACIÓN

Se ha demostrado la actividad pro-mielinizante de la P<sub>4</sub> (Revisión en Schumacher et al., 2012). En el SNC, la P<sub>4</sub> incrementa la expresión de la proteína básica de la mielina (MBP) y de la CNPasa *in vitro* (Ghoumari et al., 2003). Por otro lado, en el SNP, la P<sub>4</sub> también incrementa la expresión de MBP y promueve la proliferación, la diferenciación y la maduración de oligodendrocitos después de lesión traumática de la médula espinal (Labombarda et al., 2006; 2009; 2011) y de encefalitis autoinmune (Garay et al., 2011; 2012). El tratamiento a corto plazo con P<sub>4</sub> incrementa la expresión de los factores de transcripción Olig2 y Nkx2.2 que participan en el proceso de diferenciación de los oligodendrocitos, mientras que el tratamiento a largo plazo incrementa la expresión de Olig1 involucrado en la reparación de lesiones desmielinizantes, estimulando la maduración de los oligodendrocitos y la síntesis de la fosfolipoproteína que es uno de los constituyentes principales de la mielina (Labombarda et al., 2009; Garay et al., 2012).

#### 10. EFECTOS DE P<sub>4</sub> SOBRE LA NEUROGENESIS

Se ha demostrado que el tratamiento con P<sub>4</sub> restaura a niveles control los procesos de proliferación y muerte celular en el giro dentado, que se incrementan después de TBI (Barha et al., 2011). Por otro lado, en animales intactos, el tratamiento con P<sub>4</sub> incrementó la proliferación celular en el giro dentado (Zhang et al., 2010b). De hecho se ha descrito que la P<sub>4</sub> incrementa la proliferación de progenitores neurales *in vitro* (Liu et al., 2009) e *in vivo* después de isquemia cerebral focal vía ERK/MAPK (Zhang et al., 2010b).

Por otro lado, se ha descrito que la ALO induce la proliferación de progenitores neurales *in vitro*; incrementando la expresión de genes que promueven la mitosis (ciclina E, CDK1, ciclina B y PCNA) y suprimiendo la expresión de genes que reprimen la proliferación celular (CDK4, CDK6, p16, p18) (Wang et al., 2005).

## 11. EFECTOS DE P<sub>4</sub> SOBRE LA SINAPTOGENESIS

Se ha demostrado que la administración de P<sub>4</sub> antes y después de un episodio de isquemia cerebral global incrementa la expresión de la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43) y de la sinaptofisina en la región CA1 del hipocampo, como indicadores de sinaptogénesis (Zhao et al., 2011).

Se considera que la formación de la sinapsis es un evento tripartito que involucra no sólo la participación de las neuronas pre- y post-sinápticas sino también la de los astrocitos (Pfrieger, 2009). Se ha demostrado que la P<sub>4</sub> incrementa el número de sinapsis y la expresión de la agrina en astrocitos, proteína que induce la formación de sinapsis *in vitro* (Tournell et al., 2006).

## 12. EFECTOS DE P<sub>4</sub> SOBRE LA REACCIÓN GLIAL

- Astrocitos

Se ha demostrado que la P<sub>4</sub> disminuye la proliferación de astrocitos, su hipertrofia y la expresión de GFAP después de una lesión cerebral penetrante (García-Estrada et al., 1993), de TBI (Djebaili et al., 2005; Tang et al., 2013) y de lesión de médula espinal (Labombarda et al., 2000; 2011).

- Microglia

Se ha demostrado que la P<sub>4</sub> reduce la activación microglial, reduciendo los niveles de los marcadores de microglía Iba-1 después de isquemia cerebral focal (Jiang et al., 2011) y OX-42 en un modelo de encefalitis autoinmune (Garay et al., 2011) y luego de lesión traumática de médula espinal (Labombarda et al., 2011).

## II. ANTECEDENTES

Los efectos neuroprotectores de la progesterona en contra del daño provocado por isquemia cerebral global aguda han sido demostrados en nuestro laboratorio tanto en gatas ovariectomizadas (González-Vidal et al., 1998; Cervantes et al., 2002) como en ratas macho (Moralí et al., 2005; 2011; 2012).

En particular, en estudios realizados en gatas ovariectomizadas, tratadas con progesterona durante 7 días antes y 7 días después de un paro cardiorrespiratorio, se han manifestado los efectos neuroprotectores de esta hormona en contra del daño por isquemia cerebral global. Las gatas tratadas con progesterona mostraron una mejor recuperación en los días siguientes al paro, que las tratadas con vehículo (menores alteraciones en parámetros neurológicos del nivel de conciencia, respiración, nervios craneales, reflejos espinales, posturales y locomotores, y reacciones conductuales) y una menor pérdida de neuronas piramidales del hipocampo y de neuronas espinosas del núcleo caudado, 14 d después del episodio de isquemia (González-Vidal et al., 1998; Cervantes et al., 2002).

Dado que en la clínica, la situación más común es que los pacientes reciban atención médica una vez que ya han sufrido el episodio de isquemia cerebral global, se diseñaron nuevos estudios en los que el tratamiento con progesterona se administró en ratas macho a partir de los 15 min de reperusión y durante tres días post-isquemia. Bajo estas condiciones se observó una preservación parcial de la población de neuronas piramidales en CA1 y una preservación del grosor de la corteza cerebral, evaluados a los 21 d post-isquemia, en comparación con los animales tratados con vehículo (Moralí et al., 2005). Se realizaron también estudios morfo-funcionales a largo plazo (4 meses post-isquemia) en este mismo modelo en ratas, en los que además del estudio histológico del hipocampo y de la corteza cerebral se evaluaron funciones dependientes del hipocampo como el aprendizaje y la memoria espaciales. Se demostró que el tratamiento con progesterona redujo las alteraciones de estas funciones, provocadas por la isquemia cerebral global aguda, observándose gradualmente trayectorias de nado más dirigidas hacia la plataforma en el laberinto de Morris, menores latencias de escape y menores distancias recorridas, así como un mayor número de pases, en ausencia de la plataforma, por el sitio donde se localizaba ésta en los días de entrenamiento, en comparación con los animales tratados con vehículo (Moralí et al., 2011). Esta preservación funcional del hipocampo ocurrió aún cuando se presentó una pérdida severa de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo. Además, el tratamiento con progesterona preservó las características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales remanentes en la región CA1 del

hipocampo, que presentaron un número de bifurcaciones dendríticas similar al grupo control sano, ausentes en los animales tratados con vehículo, y un mayor número de espinas en hongo en comparación con el grupo control (Moralí et al., 2012), interpretándose como cambios plásticos compensatorios que pudieran haber influido en la preservación funcional del hipocampo, mencionada anteriormente.

En otros modelos de daño con una fisiopatología semejante a la de la isquemia cerebral global, se ha descrito que la progesterona reduce los niveles y la actividad de la caspasa-3 en la corteza cerebral; por ejemplo después de daño traumático al cerebro (Djebaili et al., 2004; 2005) y de isquemia cerebral focal (Ishrat et al., 2012), así como la fragmentación del DNA en la corteza cerebral después de isquemia cerebral focal (Ishrat et al., 2012) y en neuronas en cultivo expuestas a NMDA (Lockhart et al., 2002) o deprivadas de oxígeno y glucosa (Ardeshiri et al., 2006). En la primera parte del presente trabajo se analizaron los efectos de la progesterona sobre estos marcadores de muerte neuronal en el hipocampo para determinar si su reducción forma parte de los efectos neuroprotectores de esta hormona en contra del daño del hipocampo resultante de la isquemia cerebral global aguda.

Por otro lado, no se ha estudiado el efecto de la isquemia cerebral global aguda sobre algunos fenómenos restrictivos de la plasticidad en el hipocampo, como son el inhibidor del crecimiento de neuritas Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector Rho-A; aunque se ha demostrado un incremento en la expresión de estas proteínas en la corteza cerebral después de isquemia cerebral focal (Cheatwood et al., 2008; Jiang et al., 2009) y global (Zhou et al., 2003). A este respecto, se ha descrito que terapias farmacológicas como la administración de anticuerpos anti-Nogo-A o anti-Ng-R (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Weissner et al., 2003; Seymour et al., 2005; Wang et al., 2010; Tsai et al., 2011) y de agentes neuroprotectores como la efedrina (Chen et al., 2009), la indometacina (Chao et al., 2012) y el  $\alpha$ -tocoferol (Yang et al., 2013), y no-farmacológicas como la terapia con oxígeno hiperbárico (Zhou et al., 2003) y el ejercicio (Chytrova et al., 2008), disminuyen los niveles de estas proteínas y promueven fenómenos de plasticidad favoreciendo la recuperación funcional después de isquemia cerebral focal o daño traumático al cerebro. Por otro lado, se ha demostrado que la progesterona atenúa la magnitud de la reacción astrogliar, disminuyendo la proliferación de astrocitos, su hipertrofia y la expresión de GFAP después de una lesión cerebral penetrante (García-Estrada et al., 1993), de daño traumático al cerebro (Djebaili et al., 2005) y de una lesión traumática de médula espinal (Labombarda et al., 2000; 2011).

En la segunda parte del presente trabajo se analizaron los efectos de la isquemia cerebral global y de la progesterona sobre estos inhibidores del crecimiento de neuritas y sobre la magnitud de la reacción astrogliar en el hipocampo, para evaluar la posible acción neuroreparadora de la progesterona en contra de fenómenos que limitan la plasticidad post-isquemia.



### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La progesterona ejerce efectos neuroprotectores y neurorreparadores en diversos modelos de daño al SNC. La administración post-isquemia de progesterona reduce las alteraciones sobre el aprendizaje y la memoria espaciales, que dependen de la integridad morfo-funcional del hipocampo, pese a que sólo hubo una preservación parcial de la población neuronal, lo que sugiere que el tratamiento con progesterona pudiera determinar características diferentes a las de los animales sin tratamiento neuroprotector, en la conectividad de las neuronas remanentes en el hipocampo, asociadas a la buena ejecución de tareas de aprendizaje y memoria espacial.

Sin embargo, no se conoce si los efectos neuroprotectores de la progesterona en contra de la muerte neuronal resultante de la isquemia cerebral global, están mediados por la reducción de la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA.

Por otro lado, tampoco se sabe si la reducción de los factores inhibidores del crecimiento de neuritas Nogo-A, Ng-R y Rho-A, así como la reducción de la reacción astrogliar forman parte de los efectos neurorreparadores de la progesterona que permitan restablecer o mantener la conectividad de las neuronas remanentes y por lo tanto la integridad funcional de las estructuras cerebrales vulnerables a la isquemia.

Por ello es de interés responder a las siguientes preguntas:

¿Los efectos neuroprotectores de la progesterona incluyen la reducción de la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA en el hipocampo de ratas sometidas a un episodio de isquemia cerebral global aguda?

¿Los efectos neurorreparadores de la progesterona se relacionan con una reducción de los factores inhibidores del crecimiento de neuritas Nogo-A, Ng-R y Rho-a y de la reacción glial en el hipocampo de ratas sometidas a un episodio de isquemia cerebral global aguda?

#### **IV. OBJETIVO GENERAL:**

Analizar los efectos de la administración post-isquemia de progesterona sobre los niveles y activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA como indicadores de mecanismos de muerte neuronal, así como sobre los niveles de Nogo-A, Ng-R y Rho-A, y GFAP en el hipocampo como indicadores de fenómenos restrictivos de la plasticidad, en relación con indicadores de la integridad funcional del hipocampo, en ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda.

#### **V. OBJETIVOS PARTICULARES:**

En ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda, con y sin tratamiento con progesterona:

1. Analizar los cambios en los niveles de la caspasa-3 en el hipocampo, mediante la evaluación del número de neuronas positivas a caspasa-3 y de la intensidad de la inmunoreactividad a caspasa-3 a las 72 h post-isquemia.
2. Analizar los cambios en la activación de la caspasa-3 en el hipocampo, mediante la evaluación de la intensidad de la fluorescencia para caspasa-3 activa a las 72 h post-isquemia.
3. Analizar los cambios en la fragmentación del DNA, mediante la evaluación del número de células positivas a TUNEL en el hipocampo, a las 72 h y a los 7 d post-isquemia.
4. Analizar los cambios en la población de neuronas piramidales del hipocampo, mediante el conteo de este tipo de neuronas en un área representativa de CA1 a los 7 d post-isquemia.
5. Analizar la integridad funcional del hipocampo, mediante indicadores del desempeño en pruebas de aprendizaje y memoria espaciales en el laberinto acuático de Morris, de los 7 a los 14 d post-isquemia.
6. Analizar los cambios en los niveles del inhibidor del crecimiento de neuritas Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector Rho-A en el hipocampo, mediante la evaluación de la intensidad de la inmunoreactividad a estas proteínas a las 24 h, 72 h, 7 d y 14 d post-isquemia.
7. Analizar los cambios en la magnitud de la reacción astrogliar en el hipocampo, mediante la evaluación del número de astrocitos totales e hipertróficos positivos a GFAP y de la intensidad de la inmunoreactividad a GFAP a las 72 h, 7 d, 14 d, 28 d y 97 d post-isquemia.
8. Establecer la asociación entre los niveles de las proteínas Nogo-A, Ng-R y Rho-A y la integridad funcional del hipocampo.

## **VI. HIPÓTESIS**

El tratamiento con progesterona reducirá la expresión y activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo inducida por isquemia cerebral global en ratas.

La isquemia cerebral global aguda incrementará la expresión del inhibidor de crecimiento de neuritas Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector, la GTPasa Rho-A en el hipocampo.

El tratamiento con progesterona reducirá la expresión del inhibidor de crecimiento de neuritas Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector, la GTPasa Rho-A, así como la reacción astrogliol en el hipocampo inducidas por isquemia cerebral global en ratas.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### Métodos comunes a las dos partes de esta tesis:

#### VII.1. Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley adultas, con peso corporal entre 400 y 500g, que fueron sometidas a una de las siguientes condiciones experimentales y a los procedimientos que se describen a continuación:

SHAM: Animales sometidos a las maniobras simuladas del modelo de isquemia cerebral global aguda por “oclusión de los 4 vasos” (4-VO) (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988) sin interrumpir el flujo sanguíneo cerebral.

ISQUEMIA + VEHÍCULO (ISQ+VEH): Animales sometidos a isquemia por 4-VO (oclusión permanente de las arterias vertebrales y transitoria, 15 minutos, de las arterias carótidas comunes), con administración del vehículo de progesterona (ciclo- $\beta$ -dextrina al 20% en agua inyectable, i.v.) a varios tiempos de reperfusión: 15 min, 2, 6, 24, 48 y 72 h.

ISQUEMIA + PROGESTERONA (ISQ+P<sub>4</sub>): Animales sometidos a isquemia por 4-VO con administración de progesterona (8 mg/Kg, i.v.) a varios tiempos de reperfusión: 15 min, 2, 6, 24, 48 y 72 h. Este esquema de tratamiento ha demostrado tener efectos neuro-protectores (Moralí et al., 2005; 2011; 2012). Los procedimientos quirúrgicos y el manejo de los animales para la obtención de los cerebros se realizaron bajo anestesia; estos procedimientos y las demás manipulaciones incluyendo las evaluaciones conductuales, fueron realizados de acuerdo con los lineamientos establecidos internacionalmente (NIH Publications No. 80-23) y adoptados en la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, para evitar el sufrimiento innecesario de los animales.

#### VII.2. Modelo de isquemia cerebral global aguda

El episodio de isquemia cerebral global/reperfusión fue provocado siguiendo el procedimiento previamente descrito por otros autores (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988) e implementado por nosotros en el laboratorio. Bajo anestesia con xilacina (10 mg/Kg, i.m.) y ketamina (90 mg/Kg, i.m.) se practicó una incisión en la piel de la nuca y se separaron los músculos por disección, en la línea media, hasta lograr el acceso a las primeras vértebras cervicales. Se localizó a cada lado, en el foramen alar del atlas (primera vértebra cervical), la arteria vertebral y se cauterizó con lo que cada una quedó ocluida permanentemente. A través de un acceso en la parte ventral del cuello, se localizaron las arterias carótidas comunes, se

disecaron y se dejaron referidas mediante hilos de seda (calibre 000) para su acceso 48 h después. Se introdujo un hilo de seda quirúrgica gruesa (calibre 0) por detrás de la tráquea, esófago, carótidas y nervios vagos, pero por delante de la musculatura cervical y paravertebral, y sus cabos se pasaron por debajo de la piel hasta salir por la incisión de la nuca. Se suturaron las heridas y se permitió la recuperación total del animal. Dos días después, bajo anestesia con sevoflurano al 2%, se tiró de los cabos de la seda gruesa y se torcieron a fin de comprimir la musculatura cervical y paravertebral; se abrió la incisión que permitió el acceso a las carótidas, se separaron del tejido adyacente, se retiró la aplicación del sevoflurano y se permitió que el animal se recuperara parcialmente de la anestesia. Cuando la rata comenzó a despertar, se ocluyeron ambas carótidas en forma simultánea con clips vasculares durante 15 min, verificando bajo microscopio de cirugía que el flujo hubiera quedado suspendido. Al cabo de este periodo se quitaron los clips que ocluían el flujo y se verificó que éste se reiniciara. La rata debió permanecer inconsciente durante la oclusión de las arterias carótidas y por 20-50 min después de haberse retirado los clips, como un criterio de haber sufrido una isquemia severa. Se retiró la seda gruesa, se suturaron las heridas, se hidrató a los animales con solución salina s.c., y se permitió su recuperación total.

#### **Métodos correspondientes a la primera parte de esta tesis:**

**Parte 1: Efecto neuroprotector de la progesterona sobre mecanismos de muerte neuronal (activación de la caspasa-3 y fragmentación del DNA) inducidos por la isquemia cerebral global aguda**

#### **VII.3. Técnica histológica de Nissl**

Para el estudio histológico del daño neuronal en el hipocampo, los animales fueron perfundidos vía intracardiaca con solución lavadora (pH 7.4) seguida por paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7.4) a los 7 d post-isquemia. De esos cerebros, se obtuvieron rebanadas coronales conteniendo al hipocampo dorsal, de 4 mm de grosor, que fueron procesadas hasta su inclusión en parafina. A partir de los bloques de parafina, se obtuvieron 2 cortes de 10  $\mu$ m de espesor por cada animal. Estos cortes se colocaron en un portaobjetos preparado con gelatina. Un día después, las laminillas se desparafinaron dentro de una estufa a 60° C por 15-30 min, se sumergieron en una caja Coplin con xilol y se hidrataron con alcoholes de concentración decreciente hasta llevarlos a agua destilada. Una vez hidratados, se tiñeron con violeta de cresilo al 0.1% durante 10 min. Se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Una vez secos se humedecieron con xilol y las laminillas se montaron con resina sintética. Para su evaluación, bajo microscopía de luz (400x), se contó el número de neuronas

piramidales remanentes con morfología sana (con membranas citoplásmica y nuclear distinguibles, y nucléolo visible) en un área de 70,000  $\mu\text{m}^2$  de la parte media de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo. Los conteos del hipocampo derecho e izquierdo de cada uno de los 2 cortes se promediaron para tener un solo valor por cada animal. Con estos datos, se calculó la media del número de neuronas remanentes para cada condición experimental.

#### **VII.4. Técnica inmunohistoquímica para caspasa-3**

Para el estudio inmunohistoquímico de la enzima caspasa-3, los animales fueron perfundidos vía intracardiaca con solución lavadora seguida por paraformaldehído al 4% en PBS a las 72 h post-isquemia, tiempo en el que se ha descrito que incrementa su nivel luego de isquemia cerebral global (Gillardon et al., 1997; Chen et al., 1998; Rami et al., 2003; Tanaka et al., 2004; Teschendorf et al., 2008). De esos cerebros, se obtuvieron rebanadas coronales conteniendo al hipocampo dorsal, de 4 mm de grosor, que fueron sumergidas en concentraciones crecientes de sacarosa en PBS (10, 20, 30 % durante 24 h cada una) para su crioprotección; posterior a este tiempo, las rebanadas se congelaron en hielo seco. A partir de esas rebanadas, se obtuvieron 2 cortes de 40  $\mu\text{m}$  de espesor por cada animal, en un criostato (Leica 1900, Berlin, Germany). Dichos cortes se procesaron en flotación, incubándose en forma sucesiva con los siguientes reactivos: peróxido de hidrógeno al 3% por 10 min para bloquear la actividad endógena de la peroxidasa, tritón X-100 al 0.1 % en PBS por 10 min para su permeabilización, albúmina sérica bovina al 5% en tritón por 2 h para bloquear uniones inespecíficas del anticuerpo y por último con el anticuerpo primario anti-caspasa-3p20 (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) por 48 h a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (LSAB kit, DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 30 min y con el complejo de estreptavidina-peroxidasa (LSAB kit, DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 30 min. Finalmente, se revelaron con 3-3'-diaminobencidina (DAKO, Carpinteria, CA, USA), se lavaron, se colocaron en laminillas preparadas con gelatina y se montaron con resina sintética. Para su evaluación, bajo microscopía de luz (400x), se contó el número de neuronas positivas a caspasa-3 presentes en 385  $\mu\text{m}$  de la parte media de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo. Además, se determinó el valor de densidad óptica (DO) de cada una de dichas neuronas, utilizando el software de NIH Image J 1.61. Para ambos parámetros, las mediciones del hipocampo derecho e izquierdo de cada uno de los 2 cortes se promediaron para tener un solo valor por cada animal. Con estos datos, se calculó la media del número de neuronas positivas a caspasa-3 y la media de la DO de esas neuronas positivas, para cada condición experimental.

### **VII.5. Ensayo de detección de caspasa-3 activa**

Para la detección de la forma activa de la enzima caspasa-3, los animales fueron decapitados y se obtuvieron sus cerebros a las 72 h post-isquemia, tiempo en el que se ha descrito que incrementa su actividad luego de isquemia cerebral global (Gillardon et al., 1997; Chen et al., 1998; Rami et al., 2003; Tanaka et al., 2004; Teschendorf et al., 2008). De los cerebros obtenidos en fresco, se obtuvieron rebanadas coronales de 4 mm de grosor, conteniendo al hipocampo dorsal, que fueron congeladas rápidamente en hielo seco. A partir de esas rebanadas, se obtuvieron 2 cortes de 40 µm de espesor por cada animal, que se montaron en portaobjetos preparados con gelatina. Se utilizó el kit de detección de APOLOGIX (Cell Technology Inc., Mountain View, CA, USA) que contiene un inhibidor de caspasa-3 (FAM-DEVD-FMK) marcado con carboxifluoresceína que se une selectivamente a la forma activa de la enzima, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes de contra-tiñeron con DAPI por 10 min y se incubaron con el inhibidor del kit por 2 h en una incubadora a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>, cubriéndolos de la luz. Se lavaron con el buffer del kit y se montaron con medio de fluorescencia. Para su evaluación, bajo microscopía de fluorescencia (200x), se usaron filtros de paso de banda para DAPI (excitación 358 nm, emisión 461 nm) y para FICT (excitación 490 nm, emisión 520 nm), y se capturaron imágenes. A partir de esas imágenes se determinó el valor de intensidad de la fluorescencia en 770 µm del estrato piramidal de la parte media de la región CA1 utilizando el software NIH Image J 1.61. Los valores de intensidad del hipocampo derecho e izquierdo de cada uno de los 2 cortes se promediaron para tener un solo valor por cada animal. Con estos datos se calculó la media para cada condición experimental.

### **VII.6. Técnica de TUNEL**

Para el estudio de la fragmentación del DNA, algunos animales fueron perfundidos vía intracardiaca con solución lavadora seguida por paraformaldehído al 4% en PBS a las 72 h y otros a los 7 d post-isquemia, tiempos en los que se ha demostrado que ocurre este fenómeno luego de isquemia cerebral global (Gillardon et al., 1997; Petito et al., 1997; Teschendorf et al., 2008). De esos cerebros, se obtuvieron rebanadas coronales conteniendo al hipocampo dorsal, de 4 mm de grosor, que fueron procesadas hasta su inclusión en parafina. A partir de los bloques de parafina, se obtuvieron 2 cortes de 4 µm de espesor por cada animal. Estos cortes se colocaron en un portaobjetos preparado con gelatina. Un día después, las laminillas se desparafinaron dentro de una estufa a 60° C por 15-30 min, se sumergieron en una caja Coplin con xilol y se hidrataron con alcoholes de concentración decreciente hasta llevarlos a agua

destilada. Se utilizó el kit In Situ Cell Death Detection (ROCHE Applied Science, Penzberg, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron en forma sucesiva con los siguientes reactivos: DAPI para contra teñir, por 10 min; proteinasa K (ROCHE Applied Science, Penzberg, Germany) 1:1000 (20 µg/mL) para eliminar las histonas del DNA, por 30 min; peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol para bloquear uniones inespecíficas, por 30 min; tritón X-100 al 0.1% en PBS, por 2 min a 4°C; y posteriormente con la solución de TUNEL del kit (10 µL de la enzima + 90 µL de la solución de nucleótidos marcados) a 37°C en una estufa por 30 min, cubriéndolas de la luz. Finalmente, las laminillas se montaron con medio de fluorescencia. Para su evaluación, bajo microscopía de fluorescencia (200x), se usaron filtros de paso de banda para DAPI (excitación 358 nm, emisión 461 nm) y para FICT (excitación 490 nm, emisión 520 nm), se capturaron imágenes con una cámara y se contó el número de células positivas a TUNEL en 770 µm del estrato piramidal de la parte media de la región CA1. Los conteos del hipocampo derecho e izquierdo de cada uno de los 2 cortes se promediaron para tener un solo valor por cada animal. Con estos datos, se calculó la media del número de células positivas a TUNEL para cada condición experimental.

#### **Métodos correspondientes a la segunda parte de esta tesis:**

**Parte 2: Efecto neuroreparador de la progesterona sobre fenómenos restrictivos de la plasticidad (inhibidores del crecimiento de neuritas y reacción astrogial) después de isquemia cerebral global aguda**

#### **VII.7. Evaluación funcional del hipocampo: Pruebas de aprendizaje y memoria espaciales**

Se utilizó el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984) que consiste en una tina circular de 140 cm de diámetro y 50 cm de altura llena hasta una altura de 25 cm con agua teñida de morado. Dentro de la tina se colocó un prisma cuadrangular de acrílico cuya superficie de 13 x 13 cm permaneció 2 cm por debajo del nivel del agua, sirviendo como plataforma. La tina fue dividida conceptualmente en 4 cuadrantes y 3 anillos concéntricos de manera que la plataforma sumergida se colocó en el cuadrante NE en el segundo círculo concéntrico. A los 7 d post-isquemia, cada rata fue sometida a 2 ensayos diarios durante 6 días que consistieron en lo siguiente: se colocó a la rata dentro del agua, de frente a la pared del laberinto, y se le permitió nadar hasta localizar la plataforma oculta o hasta que transcurrieran 60 seg luego de los cuales la rata fue guiada hacia la plataforma donde se le permitió permanecer por 15 seg. Al término del ensayo, la rata fue retirada de la plataforma y colocada en su caja de mantenimiento por 20 min antes del segundo ensayo. El punto de inicio de la prueba



para cada animal en los seis días de prueba fue diferente y fue elegido al azar y la posición de la plataforma permaneció constante. Los objetos del cuarto de experimentación y el experimentador constituyeron las señales espaciales disponibles para el animal. Las pruebas fueron videograbadas con una cámara colocada en una posición fija, arriba de la tina, al centro, y a partir de las grabaciones se obtuvieron las imágenes de las trayectorias de nado y los valores de la latencia de escape (tiempo que tarda el animal en localizar la plataforma), para evaluar el aprendizaje espacial. Las latencias de escape (seg) fueron determinadas para cada ensayo y los datos de ambos ensayos de cada rata en cada día de prueba fueron promediados. Con estos datos, se calculó la media de las latencias de escape de cada día, para cada condición experimental.

Al día siguiente (día 7) se realizó una prueba más (prueba de transferencia) en la que se retiró la plataforma y el animal debió nadar durante 60 seg. Se registró la trayectoria de nado del animal y a partir de ella, el número de veces que la rata pasó por el sitio previamente ocupado por la plataforma, para evaluar la memoria espacial. Con estos datos, se calculó la media del número de pases para cada condición experimental.

#### **VII.8. Técnica inmunohistoquímica para Nogo-A, Ng-R y Rho-A**

Para el estudio inmunohistoquímico del inhibidor del crecimiento de neuritas Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector Rho-A, los animales fueron perfundidos vía intracardiaca con solución lavadora seguida por paraformaldehído al 4% en PBS a las 24, 72 h, 7 o 14 d post-isquemia, tiempos similares a los descritos para el incremento de su expresión en la corteza cerebral luego de isquemia focal (Cheatwood et al., 2008; Jiang et al., 2009) y global (Zhou et al., 2003). El procesamiento de las muestras se realizó con la técnica descrita por esos autores, utilizando los siguientes anticuerpos primarios: anti-Nogo-A (2.5 µg/mL; Abcam Cambridge, MA, USA), anti-Ng-R (1:400; Abcam Cambridge, MA, USA) o anti-Rho-A (1:1000; Abcam Cambridge, MA, USA). Para la evaluación, bajo microscopía de luz (40x), de la extensión y de la intensidad de la inmunorreactividad a cada uno de los marcadores, se capturaron imágenes del hipocampo de cada corte; las imágenes de cada hipocampo se convirtieron a escala de grises de 8-bits (256 niveles de luminosidad) usando el software NIH Image J 1.61. Se ajustó automáticamente el umbral a fin de visualizar el área inmunoreactiva, la cual se delineó manualmente, midiéndose su extensión (mm<sup>2</sup>) y el valor de su densidad óptica (DO). Para ambos parámetros, las mediciones del hipocampo derecho e izquierdo de cada uno de los 2 cortes se promediaron para tener un solo valor por cada animal. Con estos datos, para cada marcador se calculó la media de la extensión del área inmunoreactiva y la media de la DO, para cada condición experimental.

## VII.9. Técnica inmunohistoquímica para GFAP

Para el estudio inmunohistoquímico del marcador de astrocitos GFAP, los animales fueron perfundidos vía intracardiaca con solución lavadora seguida por paraformaldehído al 4% en PBS a las 72 h, 7, 14, 28 y 97 d post-isquemia, tiempos similares a los descritos anteriormente donde se observa un incremento en su expresión luego de isquemia cerebral global (Petito et al., 1990; Tanaka et al., 1992; Ordly et al., 1993; Petito y Halaby, 1993; Martins y Chadi, 2001; Sugawara et al., 2002; Sulkowski et al., 2002). De esos cerebros, se obtuvieron rebanadas coronales conteniendo al hipocampo dorsal, de 4 mm de grosor, que fueron procesadas hasta su inclusión en parafina. A partir de los bloques de parafina, se obtuvieron 2 cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor por cada animal. Estos cortes se colocaron en un portaobjetos preparado con gelatina. Un día después, las laminillas se desparafinaron dentro de una estufa a 60° C por 15-30 min, se sumergieron en una caja Coplin con xilol y se hidrataron con alcoholes de concentración decreciente hasta llevarlos a agua destilada. Los portaobjetos se sumergieron en citrato de sodio 0.01M pH 6 para la recuperación de antígenos y se calentaron a baño maría en el horno de microondas durante 15 min, se enjuagaron con agua destilada 5 min y se dejaron secar al aire. Los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron en forma sucesiva con los siguientes reactivos: peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua destilada por 10 min, tritón X-100 al 0.3% en PBS por 10 min, albúmina sérica bovina al 5% en tritón durante 2 h, y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario anti-GFAP (1:200; Biomeda Co., CA, USA). Al día siguiente, se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector Labs., CA, USA) en PBS-tritón por 2 h, luego se agregó el complejo avidina-biotina/peroxidasa por 30 min (Vector Labs., CA, USA). Por último, los cortes se revelaron con 3-3'-diaminobencidina (DAKO, Carpinteria, CA, USA), se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y se montaron con medio permanente. Para su evaluación, bajo microscopía de luz (400x), se contó el número de astrocitos totales y de astrocitos hipertróficos positivos a GFAP presentes en un área de 70,000  $\mu\text{m}^2$  de la parte media de la región CA1. Además, se determinó el valor de densidad óptica (DO) de dichos astrocitos utilizando el software de NIH Image J 1.61. Para ambos parámetros, las mediciones del hipocampo derecho e izquierdo de cada uno de los 2 cortes se promediaron para tener un solo valor por cada animal. Con estos datos, se calculó la media del número de astrocitos totales e hipertróficos positivos a GFAP y la media de la DO de los astrocitos hipertróficos, para cada condición experimental.

## VII.10. Análisis estadístico

Los datos mostraron una distribución normal, de modo que se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) para cada condición experimental. Para la comparación entre grupos se utilizó un ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey. La diferencia se consideró significativa cuando  $p < 0.05$ .

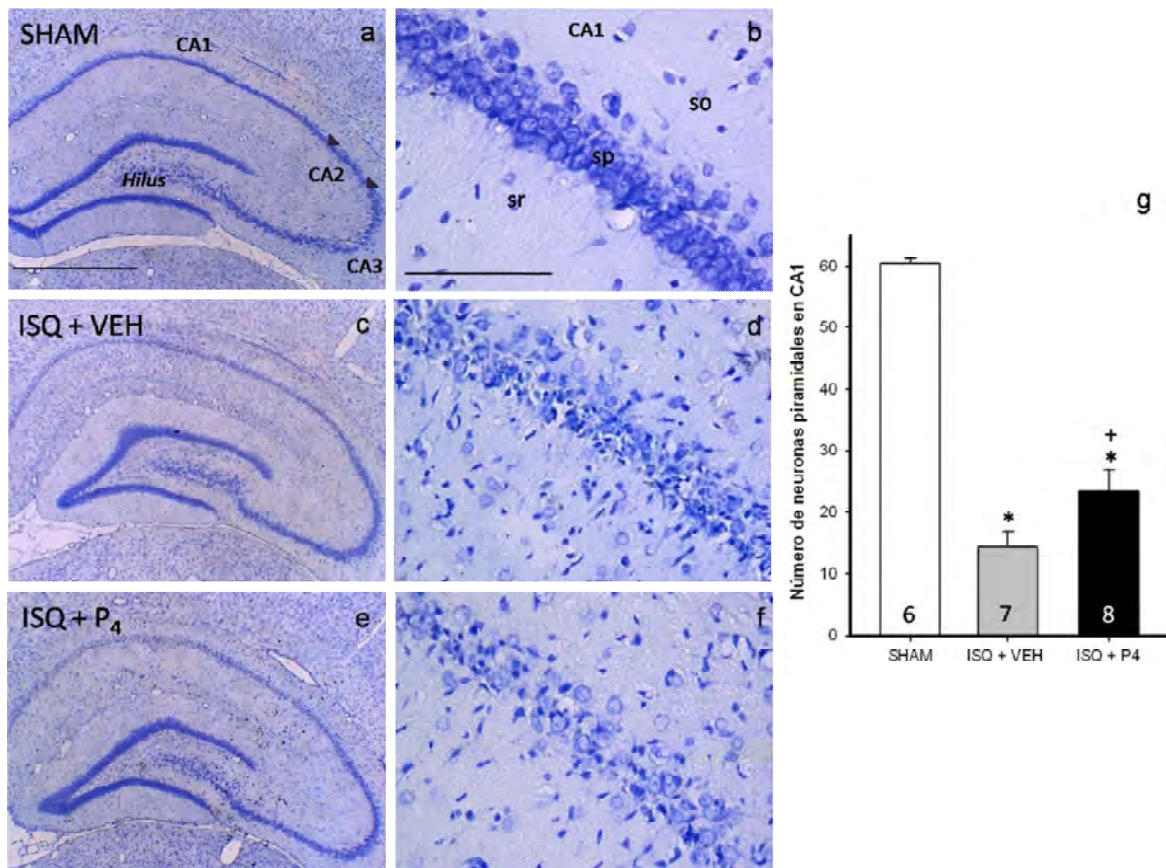
Particularmente, los parámetros conductuales, evaluados en el laberinto de Morris, fueron analizados de la siguiente manera: las diferencias entre los grupos en cuanto a latencias de escape, del primero hasta el sexto día de prueba, fueron analizadas utilizando un ANOVA de mediciones repetidas seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey. Los promedios del primer día de prueba, fueron comparados con los siguientes días (diferencias dentro de los grupos) utilizando un ANOVA seguido de la prueba *t*-pareada y un ANOVA seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey (diferencias entre los grupos). Los datos del número de veces que las ratas atravesaron el sitio en donde se localizaba la plataforma durante la prueba de memoria espacial, fueron comparados entre los grupos utilizando un ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

## VIII. RESULTADOS

**Parte 1: Efecto neuroprotector de la progesterona sobre mecanismos de muerte neuronal (activación de la caspasa-3 y fragmentación del DNA) inducidos por la isquemia cerebral global aguda**

### VIII.1. Efecto de la progesterona sobre la pérdida de neuronas piramidales de CA1 inducida por la isquemia

La isquemia cerebral global indujo una pérdida neuronal severa y selectiva que se observó en CA1, pero no en otras regiones del hipocampo, en el grupo ISQ + VEH, a los 7 d post-isquemia (Fig. 10c, d, g), con número de neuronas remanentes (Media  $\pm$  EEM;  $14.3 \pm 1.8$ ) significativamente menor ( $p < 0.001$ ) en comparación con la población neuronal de los animales del grupo Sham ( $60.5 \pm 0.7$ ) (Fig. 10a, b, g). Además, se observó la presencia de abundantes células gliales en los estratos oriens, piramidal y radiado en el grupo ISQ + VEH (Fig. 10d). El tratamiento con progesterona redujo parcialmente la pérdida neuronal en CA1 (Fig. 10e, f, g), de modo que el número de neuronas piramidales ( $23.9 \pm 2.5$ ) fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que en el grupo ISQ + VEH, aunque aún menor ( $p < 0.001$ ) que en el grupo Sham. En el grupo ISQ + P<sub>4</sub>, se observó una reacción glial menos intensa (Fig. 10f).

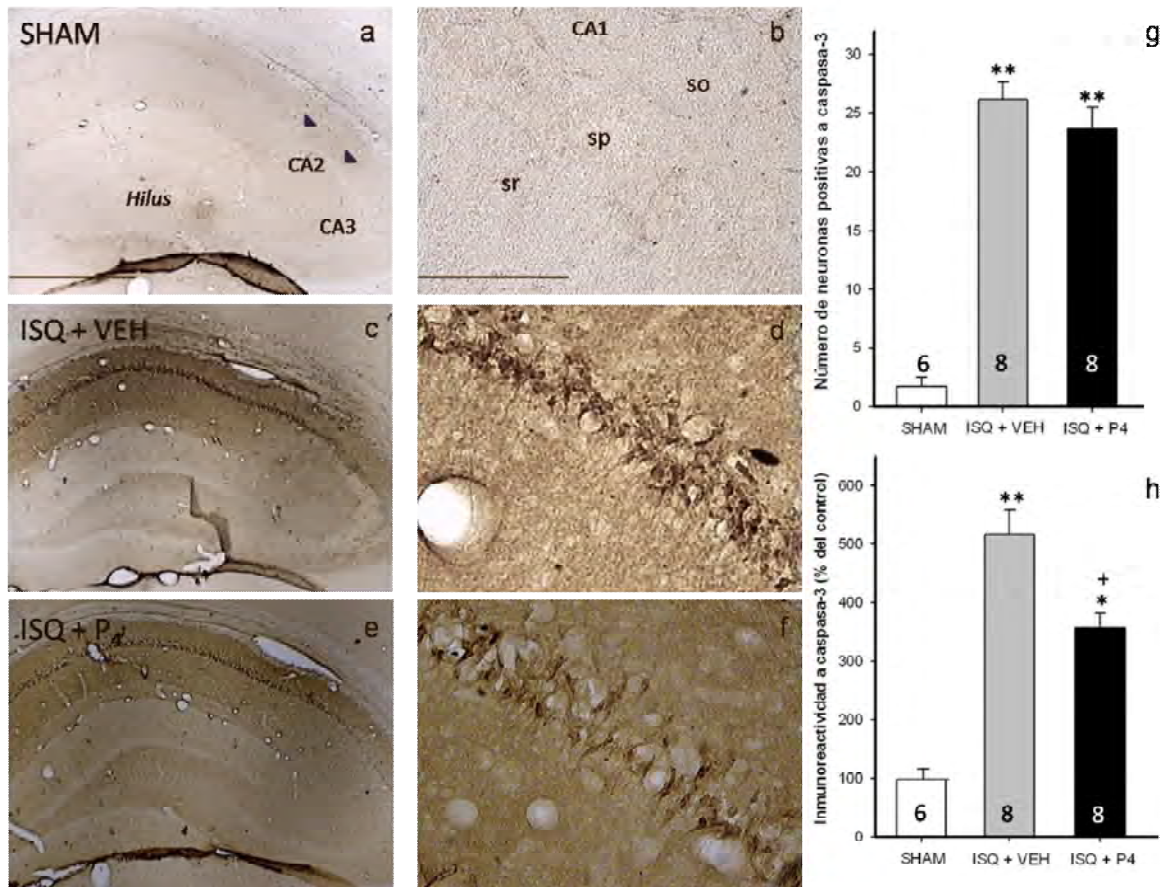


**Figura 10. Población neuronal del hipocampo.** Izquierda: Cortes coronales representativos, teñidos con la técnica de Nissl, del hipocampo dorsal de ratas sometidas a procedimientos

Sham (SHAM; a, b), o a isquemia global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH; c, d) o con progesterona (ISQ + P<sub>4</sub>; e, f), obtenidos a los 7 d de reperfusión. La isquemia global indujo una pérdida neuronal selectiva de la región CA1, que fue parcialmente reducida por el tratamiento con progesterona. Derecha: Número (media ± EEM) de neuronas piramidales en un área de 70,000 μm<sup>2</sup> en el estrato piramidal de CA1 bajo las tres condiciones experimentales (g). Los números en las barras representan la n de cada grupo. so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Barras de calibración: 1 mm (hipocampo); 100 μm (CA1). Prueba de Tukey: \**p* < 0.001 vs. Sham; †*p* < 0.05, ISQ + P<sub>4</sub> vs. ISQ + VEH.

## VIII.2. Efectos de la progesterona sobre el incremento de la caspasa-3 inducido por la isquemia

La isquemia cerebral global indujo un incremento significativo (*p*<0.001) en el número de neuronas positivas a caspasa-3 en CA1 (26.2 ± 1.5), pero no en otras regiones del hipocampo en el grupo ISQ + VEH (Fig. 11c, d, g), en comparación con el grupo Sham (1.7 ± 0.8), a las 72 h post-isquemia. De manera similar, la isquemia cerebral global indujo un incremento significativo (*p*<0.001) en la intensidad de la inmunorreactividad a caspasa-3 (Fig. 11c, d, h), siendo el valor de la DO promedio del grupo ISQ + VEH significativamente mayor (*p*<0.001) en comparación con el grupo Sham (Fig. 11a, b, h). El tratamiento con progesterona no modificó el número de neuronas positivas a caspasa-3 (23.7 ± 1.8) (Fig. 11e-g), pero atenuó el incremento en la intensidad de la inmunorreactividad a caspasa-3 inducido por la isquemia en CA1 (Fig. 11e, f, h), siendo el valor de la DO promedio del grupo ISQ + P<sub>4</sub> significativamente menor (*p*<0.01) en comparación con el del grupo ISQ + VEH, aunque aún mayor (*p*<0.01) al del grupo Sham considerado como 100% (Fig. 11 h).

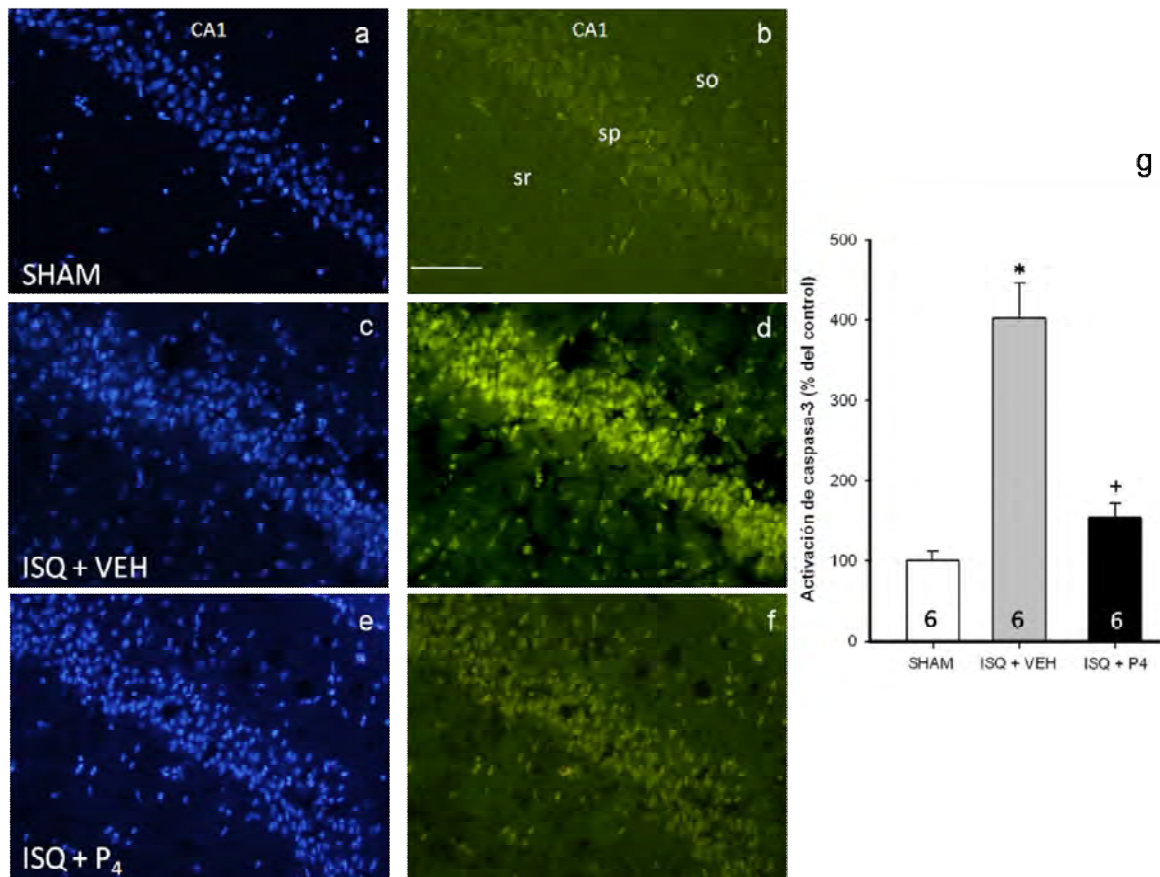


**Figura 12. Inmunorreactividad a caspasa-3 en el hipocampo.** Izquierda: Inmunorreactividad a caspasa-3 en cortes coronales del hipocampo dorsal de ratas sometidas a procedimientos Sham (SHAM; a, b), o a isquemia global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH; c, d) o con progesterona (ISQ + P<sub>4</sub>; e, f), obtenidos a las 72 h de reperusión. La isquemia global incrementó la inmunorreactividad a caspasa-3 en CA1, incremento que fue reducido por el tratamiento con progesterona. Derecha superior: Número (media ± EEM) de neuronas positivas a caspasa-3 en las tres condiciones experimentales (g). Derecha inferior: Valores de densidad óptica de la inmunorreactividad a caspase-3 en los animales isquémicos, en relación con los valores del grupo Sham tomados como 100 %. Los números en las barras representan la n de cada grupo. so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Barras de calibración: 1 mm (hipocampo); 100  $\mu$ m (CA1). Pruebas de Tukey: \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  vs. Sham; † $p < 0.05$ , ISQ + P<sub>4</sub> vs. ISQ + VEH.

### VIII.3. Efecto de la progesterona sobre la activación de la caspasa-3 inducida por la isquemia

La isquemia cerebral global indujo un incremento en la activación de la caspasa-3 en CA1 (Fig. 12d) a las 72 h post-isquemia. El promedio de la intensidad de la fluorescencia fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) en el grupo ISQ + VEH (Fig. 12d, g) que en el grupo Sham (Fig. 12b, g). El tratamiento con progesterona contrarrestó el incremento en la activación de la caspasa-3 inducido por la isquemia en CA1 (Fig. 12f, g), siendo el promedio de la intensidad de la fluorescencia en el grupo ISQ + P<sub>4</sub>

significativamente menor ( $p < 0.01$ ) que en el grupo ISQ + VEH y no diferente del grupo Sham considerado como 100% (Fig. 12g).

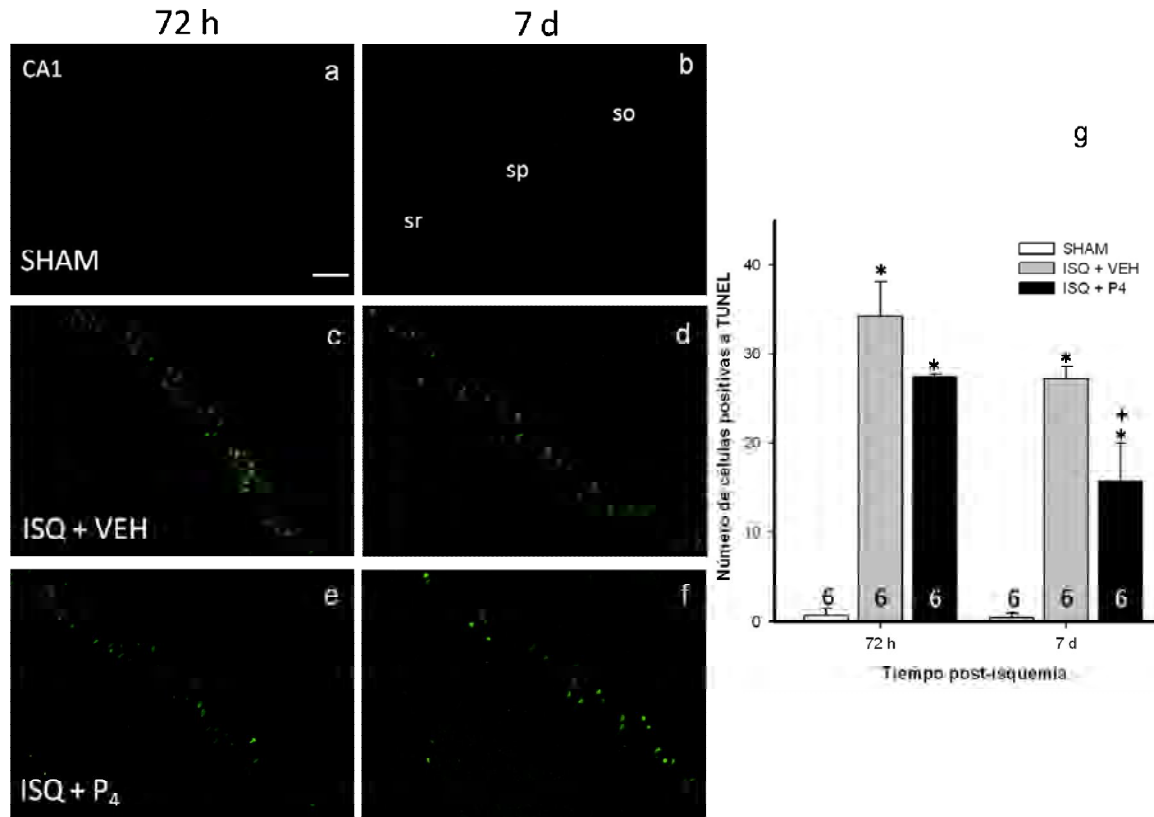


**Figura 12. Activación de la caspasa-3 en el hipocampo.** Izquierda: Fluorescencia correspondiente a la caspasa-3 activa (verde; b, d, f) en cortes coronales del hipocampo dorsal de ratas sometidas a procedimientos Sham (SHAM; a, b), o a isquemia global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH; c, d) o con progesterona (ISQ + P<sub>4</sub>; e, f), obtenidos a las 72 h de reperusión. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul; a, c, e). La isquemia global incrementó la activación de la caspasa-3 en CA1, incremento que fue reducido por el tratamiento con progesterona. Derecha: Valores de intensidad de la fluorescencia dada por la activación de la caspasa-3 en los animales isquémicos, en relación con los valores del grupo Sham tomados como 100 %. Los números en las barras representan la n de cada grupo. so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Barra de calibración: 100 μm. Prueba de Tukey \* $p < 0.001$  vs. Sham; + $p < 0.01$ , ISQ + P<sub>4</sub> vs. ISQ + VEH.

#### VIII.4. Efectos de la progesterona sobre la fragmentación del DNA inducida por la isquemia

A diferencia del grupo Sham, en el que se observaron escasas células positivas a TUNEL (Fig. 13a, b), en el grupo ISQ + VEH se observaron abundantes células positivas a TUNEL en CA1 tanto a las 72 h ( $34.2 \pm 3.8$ ), como a los 7 d ( $26.7 \pm 1.5$ ) post-isquemia (Fig. 13c, d, g). El tratamiento con progesterona redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) el número de células positivas a TUNEL en CA1,

particularmente a los 7 d post-isquemia ( $16.1 \pm 4.3$ ), en comparación con el grupo ISQ + VEH (Fig. 13e-g).



**Figura 13. Fragmentación del DNA en el hipocampo.** Izquierda: Marcaje de TUNEL en cortes coronales del hipocampo dorsal de ratas sometidas a procedimientos Sham (SHAM; a, b), o a isquemia global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH; c, d) o con progesterona (ISQ + P<sub>4</sub>; e, f), obtenidos a las 72 h y a los 7 d de reperusión. La isquemia global indujo la aparición de abundantes células positivas a TUNEL en CA1, con un número menor en el grupo ISQ + P<sub>4</sub> en comparación con el grupo ISQ + VEH. Derecha: Número (media  $\pm$  EEM) de células positivas a TUNEL en las tres condiciones experimentales (g). Los números en las barras representan la n de cada grupo. so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Barra de calibración: 100  $\mu$ m. Pruebas de Tukey \* $p < 0.001$  vs. Sham; † $p < 0.05$ , ISQ + P<sub>4</sub> vs. ISQ + VEH.

**Parte 2: Efecto neuroreparador de la progesterona sobre fenómenos restrictivos de la plasticidad (inhibidores del crecimiento de neuritas y reacción astrogliar) después de isquemia cerebral global aguda**

**VIII.5. Efectos de la progesterona sobre las alteraciones del aprendizaje y la memoria espaciales resultantes de la isquemia**

**VIII.5.1. Aprendizaje espacial**

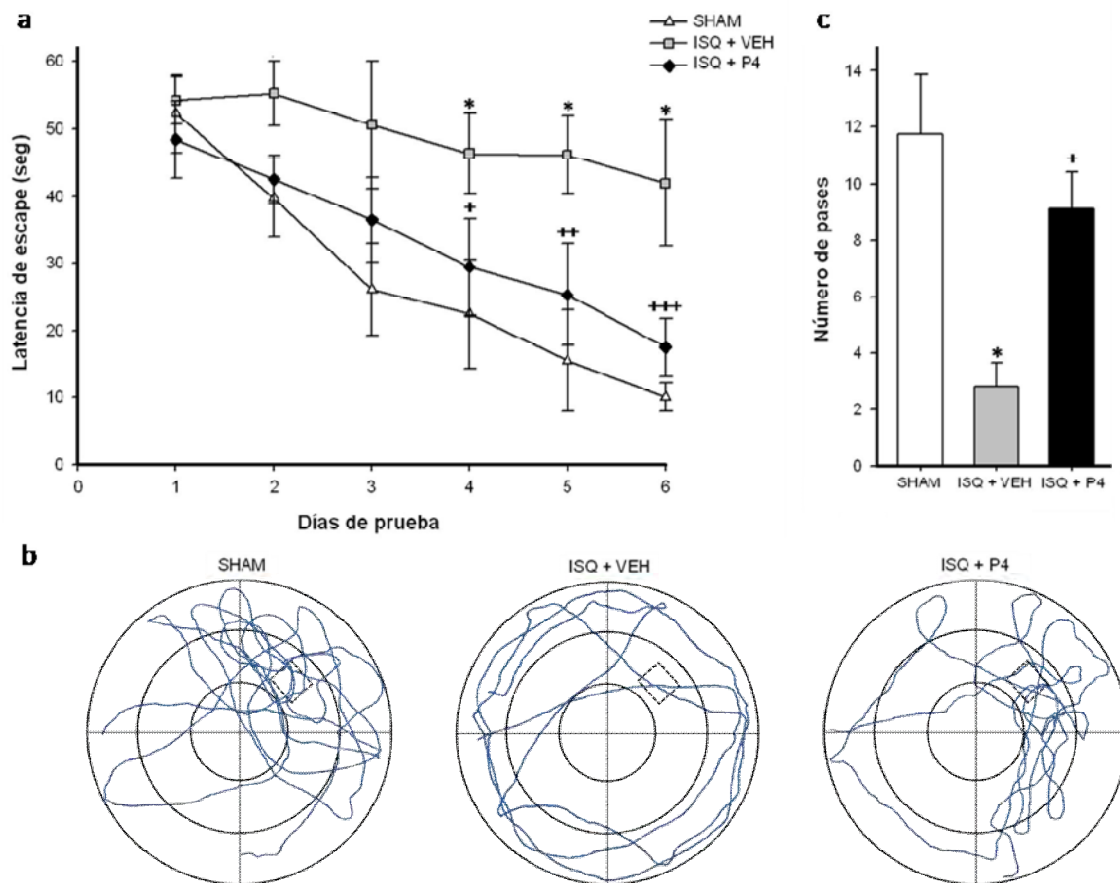
En el grupo Sham se observó una reducción progresiva de las latencias de escape en los días de prueba (Fig. 14a), con valores significativamente menores ( $p < 0.05$ ) desde



el día 3 al 6 en comparación con los del primer día de prueba. En el grupo ISQ + VEH (Fig. 14a) se observó sólo una ligera reducción de las latencias de escape, sin diferencias significativas con respecto al primer día de prueba. Sus latencias de escape fueron significativamente más largas desde el día 4 al 6 ( $p < 0.01$ ), en comparación con las del grupo Sham. Por otro lado, los animales sometidos a isquemia y tratados con progesterona, presentaron una reducción progresiva de las latencias de escape en los días sucesivos de prueba, similar a la del grupo Sham, con valores significativamente menores ( $p < 0.05$ ) en los días 4 al 6 en comparación con el primer día (Fig. 14a). Las latencias de escape en el grupo ISQ + P<sub>4</sub> fueron significativamente más cortas que las del grupo ISQ + VEH desde el día 4 al 6 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectivamente).

### **VIII.5.2. Memoria espacial**

En la prueba de transferencia, los animales del grupo Sham presentaron una búsqueda persistente de la plataforma, en el cuadrante donde se localizaba ésta en los días anteriores (Fig. 14b). Los del grupo ISQ + VEH mostraron un patrón de nado al azar, o con nado circular a través de los cuatro cuadrantes, cruzando ocasionalmente por el sitio donde se localizaba la plataforma. Por su parte, la mayor parte de las ratas del grupo ISQ + P<sub>4</sub> mostraron una búsqueda persistente en el cuadrante donde se localizaba la plataforma, similar a la del grupo Sham (Fig. 14b). De este modo, el número promedio de pases por el sitio donde se localizaba la plataforma, durante la prueba de transferencia, fue significativamente menor ( $p < 0.01$ ) en el grupo ISQ + VEH en relación al del grupo Sham, en tanto que las ratas del grupo ISQ + P<sub>4</sub> tuvieron un número de pases significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) al de las ratas del grupo ISQ + VEH, sin diferencias significativas con respecto al del grupo Sham (Fig. 14c).



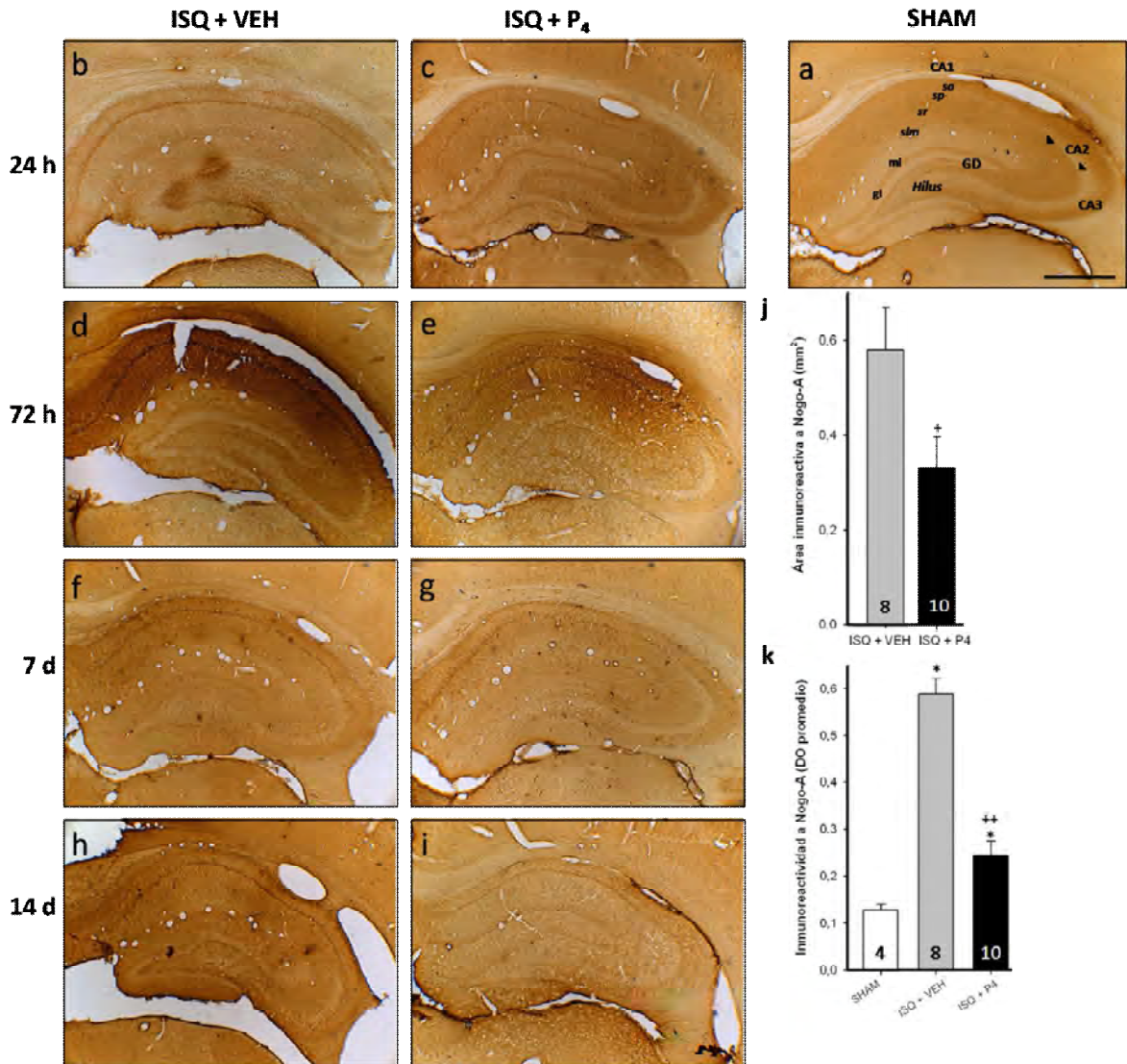
**Figura 14. Ejecución de las ratas de los tres condiciones experimentales, en las pruebas de aprendizaje y de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.** Panel a: Latencias de escape (media  $\pm$  EEM) mostradas en los días sucesivos de prueba. La isquemia cerebral global alteró el aprendizaje espacial, con latencias de escape más largas en el grupo ISQ + VEH que en el grupo Sham. El tratamiento con progesterona previno estas alteraciones mostrándose una reducción progresiva de las latencias de escape en el grupo ISQ + P<sub>4</sub>. Panel b: Trayectorias representativas del nado de las ratas de las tres condiciones experimentales en la prueba de transferencia. La isquemia alteró la memoria espacial de modo que las ratas del grupo ISQ + VEH mostraron un patrón de nado al azar, cruzando sólo ocasionalmente por el sitio de la plataforma. En cambio, en forma similar al grupo Sham, el grupo ISQ + P<sub>4</sub> mostró una búsqueda persistente de la plataforma en el sitio ocupado por ésta en los días anteriores. Panel c: Número de pases (media  $\pm$  EEM) por el sitio donde se localizaba la plataforma, en la prueba de transferencia. La isquemia global alteró la memoria espacial, presentándose un menor número de pases en el grupo ISQ + VEH en comparación con el grupo Sham. El tratamiento con progesterona previno esta alteración, de modo que el grupo ISQ + P<sub>4</sub> mostró un mayor número de pases por el sitio, similar al del grupo Sham. Pruebas de Tukey: \* $p < 0.01$  vs. Sham; <sup>†</sup> $p < 0.05$ , <sup>††</sup> $p < 0.01$ , <sup>†††</sup> $p < 0.001$  vs. ISQ + VEH.

### VIII.6. Efectos de la progesterona sobre el incremento de Nogo-A, Ng-R y Rho-A inducido por la isquemia

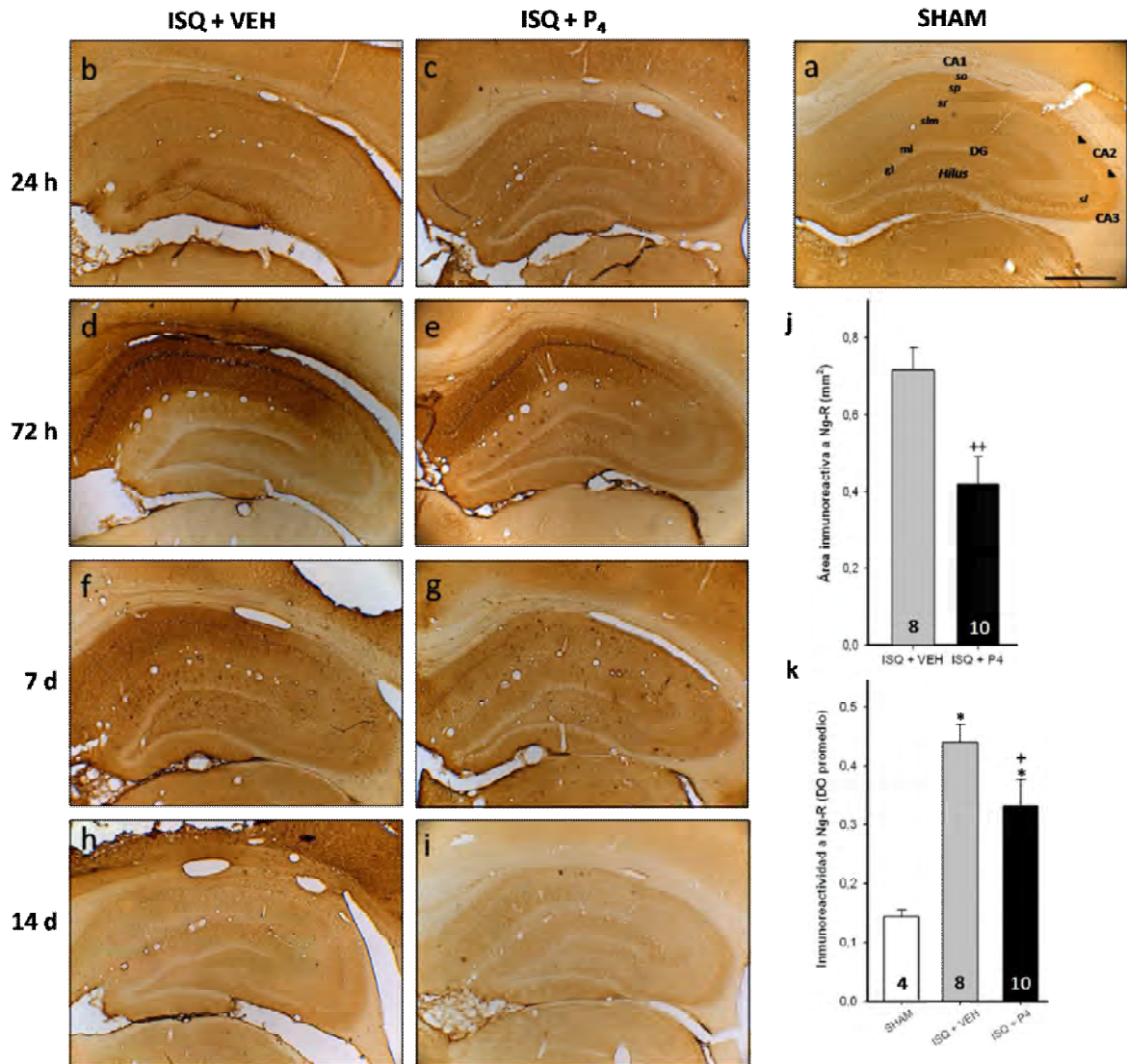
En el grupo Sham, se observó inmunorreactividad a Nogo-A (Fig. 15a) y a Ng-R (Fig. 16a), en los estratos oriens y radiado de las regiones CA1 a CA3 del hipocampo, así como en la capa molecular interna del giro dentado. Además, se observó también inmunorreactividad a Ng-R en el estrato lúcido de CA3 (Fig. 16a). No se observó inmunorreactividad a Nogo-A ni a Ng-R en el estrato piramidal del hipocampo (Figs. 15a, 16a). Por otro lado, se observó inmunoreactividad a Rho-A en los cuerpos celulares de las neuronas piramidales de las diferentes regiones del hipocampo y en las neuronas granulares del giro dentado (Fig. 17a).

A las 24 h post-isquemia, se observó inmunorreactividad a Nogo-A (Fig. 15b) y a Ng-R (Fig. 16b), así como un incremento de la inmunorreactividad a Rho-A (Fig. 17b), en los cuerpos celulares de las neuronas piramidales de las diferentes regiones del hipocampo, principalmente en la región CA1 y en el subículo. La inmunorreactividad en la región CA1 y en el subículo persistió hasta los 14 d post-isquemia (Fig. 15d, f, h; Fig. 16d, f, h; Fig. 17d, f, h). A las 72 h post-isquemia, se observó además una intensa inmunorreactividad a Nogo-A (Fig. 15d), a Ng-R (Fig. 16d) y a Rho-A (Fig. 17d), en un área más amplia de la región CA1 y del subículo, que abarcó los estratos oriens, piramidal y radiado, sin que este fenómeno se presentara a tiempos post-isquemia más tardíos (Figs. 15d, j; Fig. 16d, j; Figs. 17d, j). Los valores de DO promedio de cada marcador, fueron significativamente mayores ( $p < 0.001$ ) que los del grupo Sham (Fig. 15d, k; Fig. 16d, k; Fig. 17d, k).

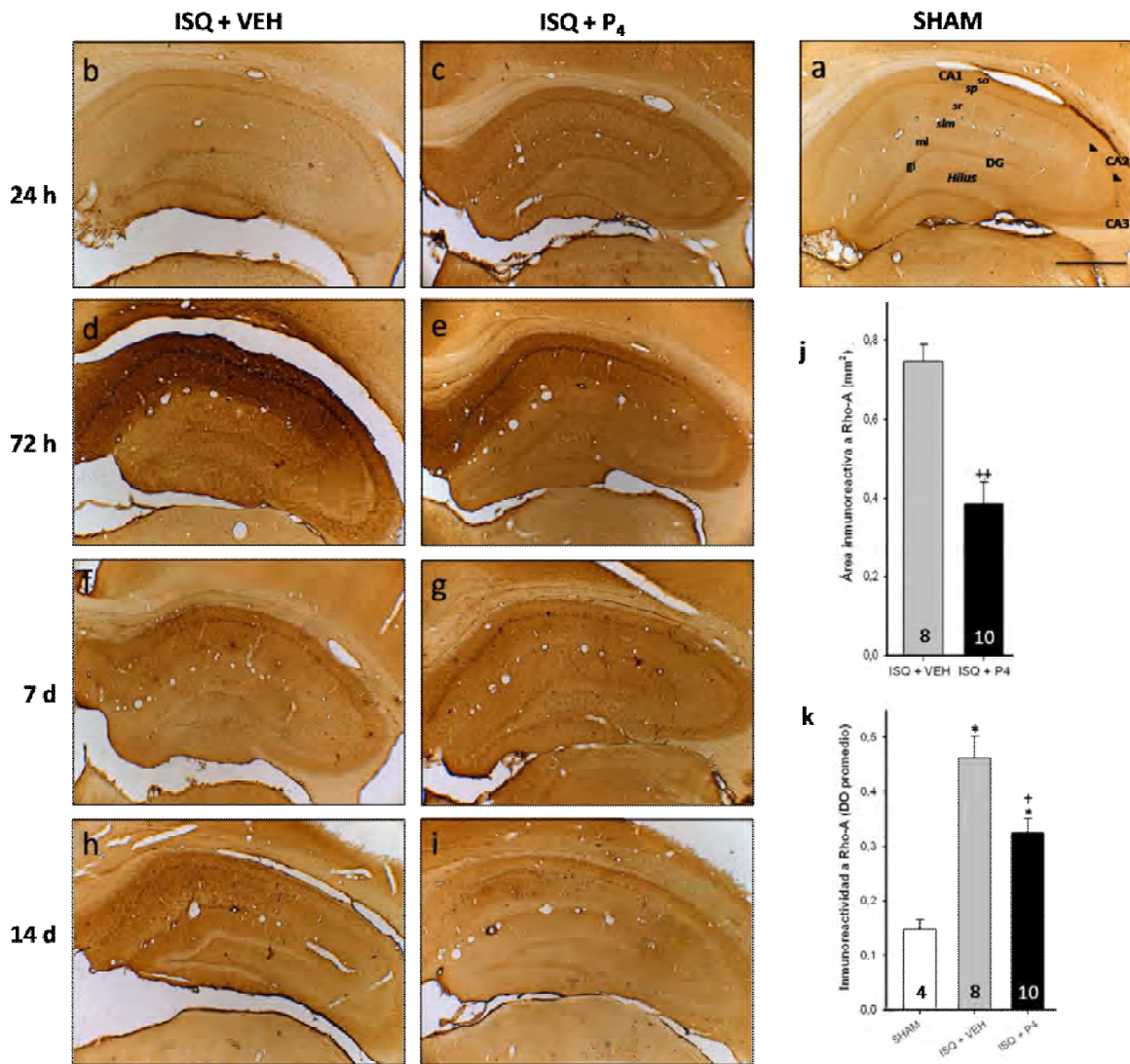
Las ratas isquémicas tratadas con progesterona mostraron un patrón de localización de la inmunorreactividad a Nogo-A (Fig. 15c, e, g, i), Ng-R (Fig. 16c, e, g, i) y Rho-A (Fig. 17c, e, g, i) similar al observado en las ratas isquémicas tratadas con vehículo, a los diferentes tiempos post-isquemia. Sin embargo, la extensión del área inmunorreactiva a cada una de las tres proteínas, observada a las 72 h post-isquemia, fue significativamente menor (Nogo-A:  $p < 0.001$ ; Ng-R:  $p < 0.05$ ; Rho-A:  $p < 0.01$ ) en el grupo ISQ + P<sub>4</sub> en comparación con el grupo ISQ + VEH (Figs. 15e, j; Figs. 16e, j; Figs. 17e, j). De manera similar, la intensidad de la inmunorreactividad a cada una de las proteínas, expresada como DO promedio, fue significativamente menor (Nogo-A:  $p < 0.001$ ; Ng-R:  $p < 0.05$ ; Rho-A:  $p < 0.01$ ) en las ratas tratadas con progesterona en comparación con las tratadas con vehículo (Figs. 15e, k; Figs. 16e, k; Figs. 17e, k), aunque aún mayor que la del grupo Sham ( $p < 0.001$  en los tres casos).



**Figura 15. Inmunorreactividad a Nogo-A en el hipocampo.** Cortes coronales representativos del hipocampo dorsal de ratas sometidas a procedimientos Sham (SHAM; a), o a isquemia global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH; b, d, f, h) o con progesterona (ISQ + P<sub>4</sub>; c, e, g, i), obtenidos a las 24 h, 72 h, 7 d o 14 d de reperusión. La isquemia global incrementó la inmunorreactividad a Nogo-A en el *stratum pyramidale* de CA1 y en el subículo desde las 24 h hasta los 14 d, así como en el *stratum oriens* y *radiatum* a las 72 h post-isquemia, incremento que fue atenuado por el tratamiento con progesterona. Las gráficas de barras representan la extensión (mm<sup>2</sup>; Media ± EEM) (j) y la intensidad (DO; Media ± EEM) (k) de la inmunorreactividad a Nogo-A en el subículo y CA1 de los grupos experimentales a las 72 h post-isquemia. Los números en las barras representan la n de cada grupo. DG, giro dentado; gl, capa granular; ml, capa molecular; slm, *stratum lacunosum moleculare*; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Barra de calibración: 1 mm. Pruebas de Tukey: \* $p < 0.001$  vs. Sham; + $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.001$  vs. ISQ + VEH.



**Figura 16. Inmunorreactividad a Ng-R en el hipocampo.** Cortes coronales representativos del hipocampo dorsal de ratas sometidas a procedimientos Sham (SHAM; a), o a isquemia global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH; b, d, f, h) o con progesterona (ISQ + P<sub>4</sub>; c, e, g, i), obtenidos a las 24 h, 72 h, 7 d o 14 d de reperusión. La isquemia global incrementó la inmunorreactividad a Ng-R en el *stratum pyramidale* de CA1 y en el subículo, desde las 24 h hasta los 14 d, así como en el *stratum oriens* y *radiatum* a las 72 h post-isquemia, incremento que fue atenuado por el tratamiento con progesterona. Las gráficas de barras representan la extensión (mm<sup>2</sup>; Media ± EEM) (j) y la intensidad (DO; Media ± EEM) (k) de la inmunorreactividad a Ng-R en el subículo y CA1 de los grupos experimentales a las 72 h post-isquemia. Los números en las barras representan la n de cada grupo. DG, giro dentado; gl, capa granular; ml, capa molecular; sl, *stratum lucidum*; slm, *stratum lacunosum moleculare*; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Barra de calibración: 1 mm. Pruebas de Tukey: \**p*<0.001 vs. Sham; +*p*<0.05, ++*p*<0.01 vs. ISQ +VEH.



**Figura 17. Inmunorreactividad a Rho-A en el hipocampo.** Cortes coronales representativos del hipocampo dorsal de ratas sometidas a procedimientos Sham (SHAM; a), o a isquemia global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH; b, d, f, h) o con progesterona (ISQ + P<sub>4</sub>; c, e, g, i), obtenidos a las 24 h, 72 h, 7 d y 14 d de reperusión. La isquemia global incrementó la inmunorreactividad a Rho-A en el *stratum pyramidale* y en el subículo de CA1 de las 24 h hasta los 14 d, así como en el *stratum oriens* y *radiatum* a las 72 h post-isquemia, incremento que fue atenuado por el tratamiento con progesterona. Las gráficas de barras representan la extensión (mm<sup>2</sup>; Media ± EEM) (j) y la intensidad (DO; Media ± EEM) (k) de la inmunorreactividad a Rho-A en el subículo y CA1 de los grupos experimentales a las 72 h post-isquemia. Los números en las barras representan la n de cada grupo. DG, giro dentado; gl, capa granular; ml, capa molecular; slm, *stratum lacunosum moleculare*; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Barra de calibración: 1 mm. Pruebas de Tukey: \* $p < 0.001$  vs. Sham; + $p < 0.01$ , ++ $p < 0.001$  vs. ISQ + VEH.

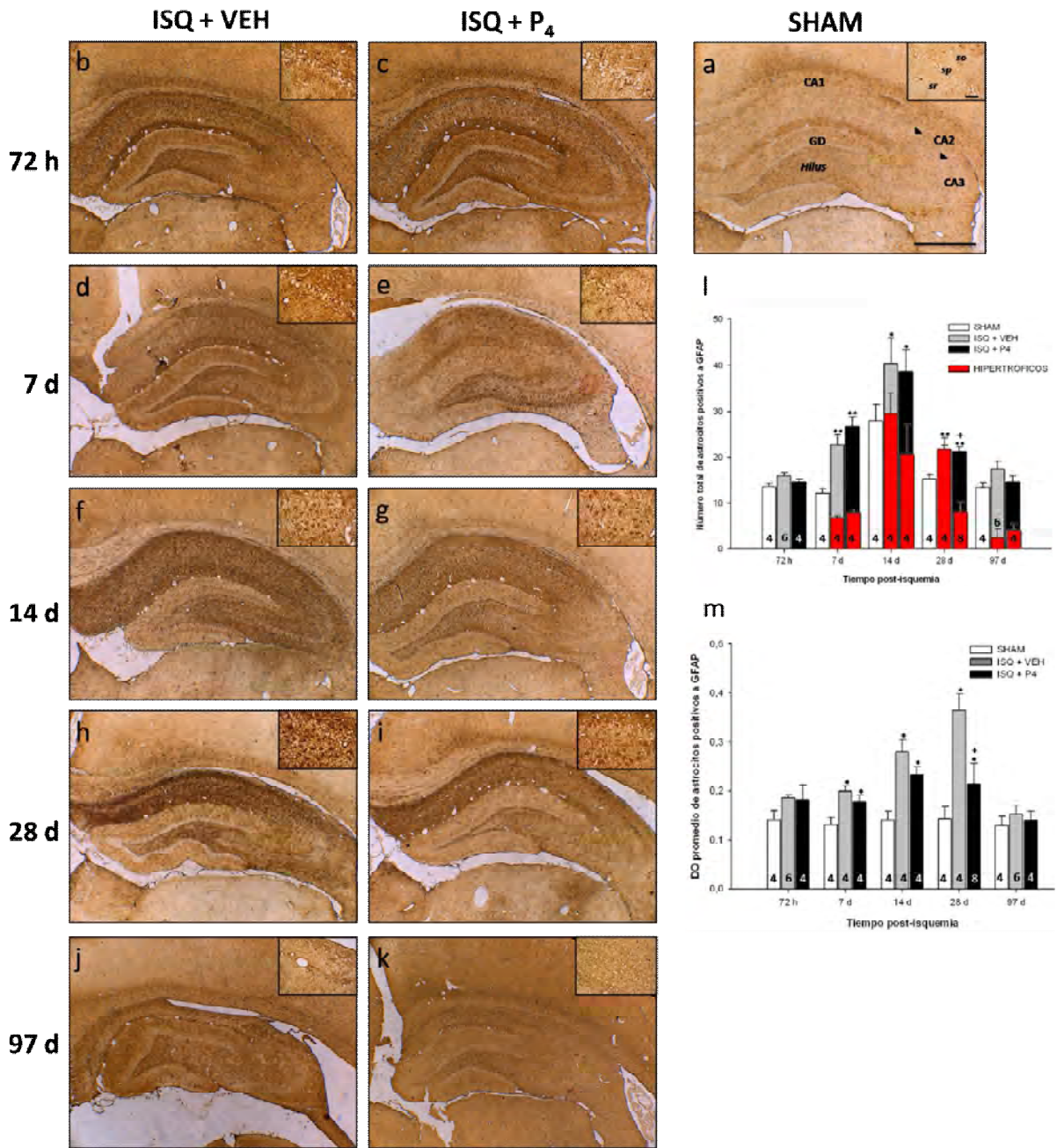
### VIII.7. Efectos de la progesterona sobre la activación astrogial inducida por la isquemia

En los animales del grupo Sham se encontraron astrocitos dispersos, con morfología que corresponde al estado quiescente de estas células (forma estrellada y con prolongaciones largas y delgadas) en las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo, a los diferentes tiempos post-manipulación (Fig. 18a).

La isquemia cerebral global indujo un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en el número de astrocitos positivos a GFAP en CA1, pero no en otras regiones del hipocampo, en el grupo ISQ + VEH (Fig. 18d, f, h, j, l), en comparación con el grupo Sham (Fig. 18a, l), a partir de los 7 d post- isquemia ( $22.7 \pm 9.7$ ), con un máximo a los 14 d ( $40.4 \pm 4.7$ ), disminuyendo a los 28 d ( $33.7 \pm 1.5$ ) y regresando a valores control a los 97 d ( $17.9 \pm 10.2$ ) (Fig. 18l). Además, se observaron astrocitos reactivos, hipertróficos, con cuerpo celular y procesos engrosados, desde las 72 h post-isquemia (Fig. 18b), mostrando un engrosamiento máximo a los 14 d (Fig. 18f) y persistiendo así hasta los 28 d post-isquemia (Fig. 18h). La mayor parte de los astrocitos hipertróficos se localizaron particularmente en los estratos radiado y lacunoso molecular, y en menor cantidad en el estrato piramidal (Fig. 18b, d, f, h, j).

De manera similar, la isquemia cerebral global indujo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la intensidad de la inmunorreactividad a GFAP (Fig. 18d, f, h, j, m), con valores de DO promedio en el grupo ISQ + VEH, significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo Sham (Fig. 18a, m) desde los 7 d post-isquemia ( $0.199 \pm 0.026$ ), con un máximo a los 28 d ( $0.365 \pm 0.032$ ).

El tratamiento con progesterona disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) la magnitud de la activación astrocítica inducida por la isquemia en CA1 (Fig. 18c, e, g, i, k), reduciendo el número de astrocitos positivos a GFAP ( $21.4 \pm 5.9$ ) y la intensidad de la inmunorreactividad a GFAP ( $0.213 \pm 0.042$ ), particularmente a los 28 d post-isquemia (Fig. 18l y m, respectivamente).



**Figura 18. Inmunorreactividad a GFAP en el hipocampo.** Cortes coronales representativos del hipocampo dorsal de ratas sometidas a procedimientos Sham (SHAM; a), o a isquemia global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH; b, d, f, h, j) o con progesterona (ISQ + P4; c, e, g, i, k), obtenidos a las 72 h, 7 d, 14 d, 28 d o 97 d de reperusión. La isquemia global incrementó la inmunorreactividad a GFAP en el *stratum oriens*, *pyramidale* y *radiatum* de CA1 desde los 7 d hasta los 28 d con un máximo a los 14 d, incremento que fue reducido por el tratamiento con progesterona. Los recuadros (área de 70,000  $\mu\text{m}^2$  en CA1), permiten observar la morfología de los astrocitos. Las gráficas de barras representan el número de astrocitos totales (Media  $\pm$  EEM) en esa área de CA1, mostrando el número de astrocitos hipertrofos en rojo (l) y los valores de densidad óptica (DO; Media  $\pm$  EEM) de los astrocitos inmunorreactivos a GFAP (m), en los grupos experimentales a los diferentes tiempos post-isquemia. Los números en las barras representan la n de cada grupo. GD, giro dentado; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Barras de calibración: 1 mm (hipocampo), 100  $\mu\text{m}$  (CA1). Pruebas de Tukey: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  vs. Sham; + $p < 0.001$  vs. ISQ + VEH.



## IX. DISCUSIÓN

### Parte 1: Efecto neuroprotector de la progesterona sobre mecanismos de muerte neuronal (activación de la caspasa-3 y fragmentación del DNA) inducidos por la isquemia cerebral global aguda

La isquemia cerebral global aguda y la reperfusión resultan en una muerte selectiva y tardía de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, proceso en el que la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA pueden ocurrir (Gillardon et al., 1997; Petito et al., 1997; Chen et al., 1998; Rami et al., 2003; Tanaka et al., 2004; Teschendorf et al., 2008). Los resultados del presente estudio demostraron la efectividad de la administración post-isquemia de progesterona para reducir estos marcadores de muerte neuronal, la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA, reduciendo parcialmente la pérdida de neuronas piramidales en CA1 inducida por la isquemia cerebral global aguda.

Además, los resultados del presente estudio demostraron que la isquemia cerebral global aguda indujo el incremento de fenómenos restrictivos del crecimiento de neuritas; particularmente, un incremento en los niveles del inhibidor del crecimiento de neuritas Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector Rho-A en la región CA1 del hipocampo, así como una intensa reacción astrogliar. Un hallazgo adicional y muy relevante de este estudio fue que la administración post-isquemia de progesterona redujo la inmunorreactividad a Nogo-A, Ng-R y Rho-A, así como el número de astrocitos positivos a GFAP, su hiperproliferación y la intensidad de su inmunorreactividad en el hipocampo. La reducción de estas proteínas puede ser una evidencia adicional de los efectos neuroprotectores/neurorreparadores de la progesterona, dado que se manifestó en ratas que mostraron una preservación de las funciones cognitivas dependientes del hipocampo.

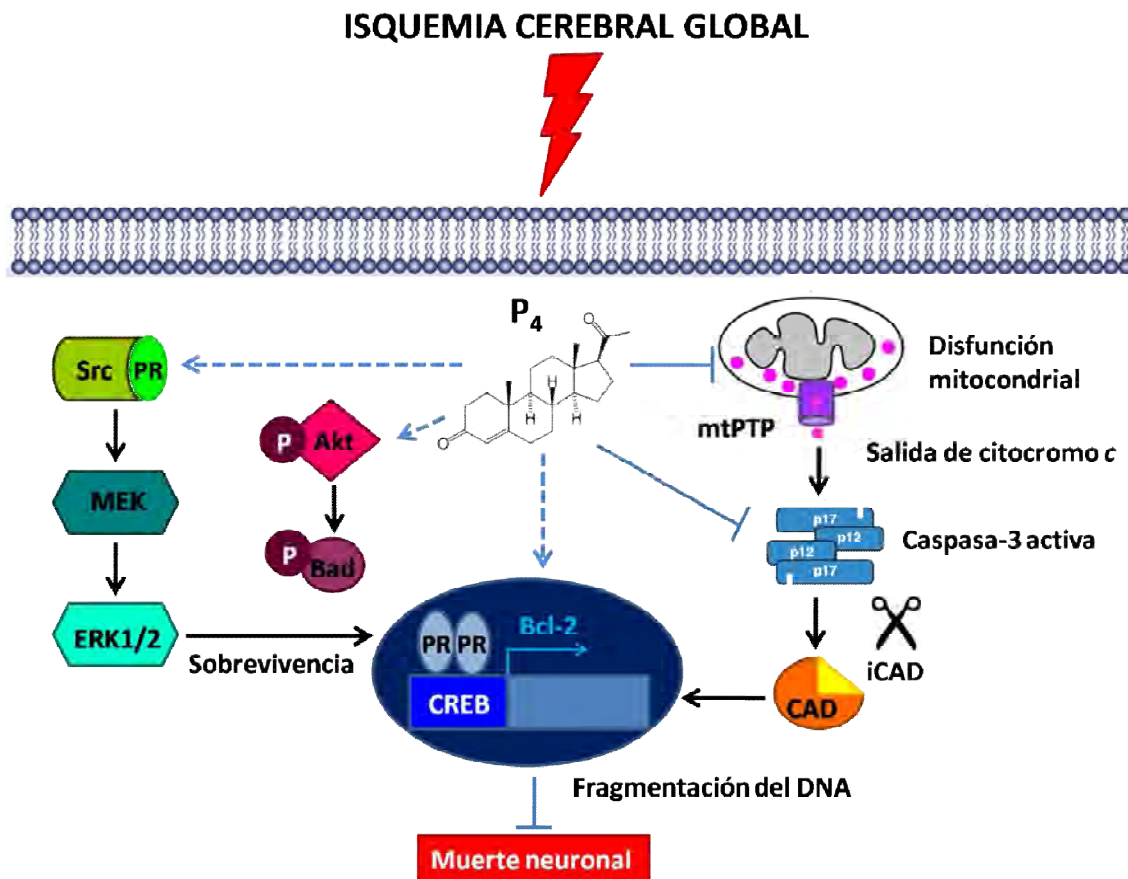
Entre los fenómenos fisiopatológicos inducidos por la isquemia y que persisten durante la reperfusión, se encuentra la pérdida de la homeostasis del calcio que desencadena una disfunción mitocondrial, induciendo la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mtPTP) (Sugawara et al., 2004; Mehta et al., 2007). El mtPTP está constituido por varias proteínas incluyendo la proteína pro-apoptótica Bcl-2 y las anti-apoptóticas Bax y Bad (Sugawara et al., 2004). Su apertura permite la salida del citocromo *c* hacia el citoplasma (Sugawara et al., 1999; Zhan et al., 2001), donde puede interactuar con otras proteínas pro-apoptóticas y activar a la caspasa-3 que induce daño estructural en el citoesqueleto y la fragmentación del DNA (Tanaka et al., 2004), dando lugar a la muerte neuronal (Fig. 19).

Dado su curso temporal, varios de estos fenómenos fisiopatológicos pueden ser contrarrestados por progesterona, posiblemente a través de varios de sus mecanismos celulares y moleculares de acción (Gibson et al., 2009; Sayeed et al., 2009), puesto que nuestros resultados demostraron que el tratamiento post-isquemia con progesterona redujo la inmunorreactividad y la activación de la caspasa-3 a las 72 h, así como la fragmentación del DNA y la pérdida neuronal a los 7 d post-isquemia (Fig. 19). Se ha demostrado, en otros modelos de daño, que la progesterona es capaz de reducir los fenómenos que inducen la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA (Fig. 19). A este respecto, se ha demostrado que progesterona incrementa los niveles de RNAm y de proteína de Bcl-2 y reduce los de Bax y Bad luego de TBI (Djebaili et al., 2004; Yao et al., 2005). En modelos experimentales de isquemia focal por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), progesterona activa Akt la cual fosforila la proteína pro-apoptótica Bad, bloqueando su traslocación a la membrana mitocondrial (Ishrat et al., 2012). Progesterona y particularmente su metabolito activo ALO, inhiben la apertura del mtPTP reduciendo la salida de citocromo c (Fig. 19) en ratas sometidas a TBI o MCAO (Sayeed et al., 2009). Por otra parte, la progesterona reduce los niveles y la activación de la caspasa-3, así como la fragmentación del DNA (Fig. 19) inducidas por TBI y MCAO (Djebaili et al., 2004; 2005; O'Connor et al., 2007; Ishrat et al., 2012), y por la privación de oxígeno y glucosa (Ardeshiri et al., 2006). Los efectos de la progesterona sobre estos fenómenos celulares se asocian con una reducción de la muerte neuronal y una mejor recuperación funcional (Djebaili et al., 2004; 2005; Ardeshiri et al., 2006; O'Connor et al., 2007; Ishrat et al., 2012).

Además, otros fenómenos fisiopatológicos relacionados con el restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral, como son la exacerbación del daño oxidativo por el incremento en la producción de ROS y NOS, el edema, la activación microglial, la liberación de citocinas pro-inflamatorias, juegan un papel clave en el daño neuronal por reperfusión (Kuroda et al., 1997; Mehta et al., 2007) y se sabe que son atenuados por la progesterona en modelos experimentales de isquemia global, focal y TBI (Revisión en Gibson et al., 2009; Sayeed et al., 2009).

El momento de la administración de la progesterona en relación con el episodio de isquemia cerebral global aguda parecer ser relevante para que esta hormona ejerza sus efectos neuroprotectores. Cuando la progesterona se administra antes del episodio de isquemia global, es capaz de contrarrestar algunos de los fenómenos fisiopatológicos inmediatos desencadenados por la isquemia y previene la pérdida de las neuronas vulnerables (González-Vidal et al., 1998; Cervantes et al., 2002). Por otro lado, la administración post-isquemia de progesterona puede reducir el daño adicional al provocado por los fenómenos fisiopatológicos inmediatos, interfiriendo con su

progresión y reduciendo el impacto de los eventos relacionados con el daño por reperfusión. Así, la administración de progesterona en la misma dosis y esquema de tratamiento que el utilizado en estos estudios, ha demostrado tener efectos neuroprotectores después de isquemia cerebral global aguda, dado que a pesar de una preservación limitada (20-40%) de neuronas piramidales en CA1 (Moralí et al., 2005; 2011), la integridad funcional del hipocampo se preservó, mostrándose una mejor ejecución en las pruebas de aprendizaje y memoria espaciales en los animales tratados con progesterona en comparación con los tratados con vehículo y similar a la de los animales Sham (Moralí et al., 2011). El hecho de que las neuronas remanentes de CA1 mostraron características citoarquitectónicas similares a las de los animales Sham pudo haber contribuido a la preservación de la función del hipocampo (Moralí et al., 2012).



**Figura 19. Diagrama que representa los efectos neuroprotectores de la progesterona en contra de la muerte neuronal inducida por la isquemia.** Se ha demostrado que la progesterona ( $P_4$ ) tiene varios efectos neuroprotectores en contra de la muerte neuronal: (1)  $P_4$  inhibe la formación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mtPTP), reduciendo la salida de citocromo  $c$ ; (2)  $P_4$  induce la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 vía genómica que implica que el receptor de progesterona actúe como factor de transcripción o vía no genómica que involucra la activación de cinasas MEK/Erk1/2; (3)  $P_4$  incrementa la fosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad que impide su traslocación a la membrana mitocondrial y su participación en la formación del mtPTP; (4)  $P_4$  reduce la activación de la caspasa-3, con ello se reduce la proteólisis del inhibidor (iCAD) de la DNAsa activada por

caspasas (CAD) y la traslocación de la CAD al núcleo disminuyendo la fragmentación del DNA. Las flechas punteadas simbolizan los hallazgos de otros autores en otros modelos de daño como el daño traumático al cerebro y la isquemia cerebral focal.

**Parte 2: Efecto neuroreparador de la progesterona sobre fenómenos restrictivos de la plasticidad (inhibidores del crecimiento de neuritas y reacción astrogial) después de isquemia cerebral global aguda**

Por otro lado, se ha demostrado que luego de un episodio de isquemia cerebral global aguda, las pocas neuronas sobrevivientes de CA1, muestran alteraciones en la distribución de sus dendritas, reducciones tanto de la extensión de sus neuritas, como de la densidad sináptica (Mudrick y Baimbridge, 1989; Onodera et al., 1990; Neigh et al., 2004; Kovalenco et al., 2006; Ruan et al., 2006; 2009; 2012; Revisión en Cervantes et al., 2012), que están usualmente asociadas con alteraciones de las funciones cognitivas, como son los déficits permanentes en el aprendizaje y la memoria espaciales (Zola-Morgan et al., 1986; Block, 1999; Neigh et al., 2004; Hartman et al., 2005).

En contraste, algunos cambios estructurales que también ocurren pueden contribuir al remodelamiento de los circuitos neuronales, tales como la reestructuración sináptica y de las neuritas (Onodera et al., 1990; Ruan et al., 2006; 2009), y pueden ser interpretados como respuestas plásticas compensatorias de las neuronas sobrevivientes de las estructuras cerebrales vulnerables a la isquemia.

Sin embargo, la recuperación funcional espontánea luego de isquemia está limitada por un medio ambiente restrictivo de la plasticidad en el SNC adulto, el cual incluye la presencia de proteínas inhibitoras del crecimiento de neuritas y la barrera física y química que representa la cicatriz glial (Sanvig et al., 2004). El inhibidor del crecimiento de neuritas Nogo-A controla la estabilidad de las arborizaciones dendríticas y la plasticidad sináptica fisiológica de las neuronas adultas del hipocampo (Zagrebelsky et al., 2010; Delekate et al., 2011). Nogo-A se une a su receptor Ng-R y activa a la GTPasa Rho-A que previene la polimerización del citoesqueleto de actina, bloqueando la extensión de las neuritas (Fig. 19) (Revisión en Akbik et al., 2012; Pernet y Schwab, 2012; Overman y Carmichael, 2013).

Se ha descrito que Nogo-A, Ng-R y Rho-A se localizan en las arborizaciones dendríticas y los cuerpos celulares de las neuronas piramidales del cuerno de Ammón y de las granulares del giro dentado del hipocampo adulto (Huber et al., 2002; Wang et al., 2002; O’Kane et al., 2003; Mingorance et al., 2004; Zagrebelsky et al., 2010; VanGuilder et al., 2012). Los datos del presente estudio coinciden con dichas descripciones.

Se ha demostrado que ocurre un incremento de Nogo-A, Ng-R y Rho-A en las neuronas piramidales de la corteza cerebral luego de isquemia cerebral global (Zhou et al., 2003) y focal (Cheatwood et al., 2008; Jiang et al., 2009), así como en las dendritas luego de daño traumático de la médula espinal (Huber et al., 2003). De hecho, se ha descrito un incremento transitorio en la expresión de Nogo-A a nivel de proteína y de RNAm en el área de lesión de la corteza cerebral desde las 12 h, con un máximo a las 24 h, que luego disminuye a las 96 h y 7 d después de MCAO (Jiang et al., 2009). En un estudio a largo plazo, el incremento en los niveles de Nogo-A se mantuvo desde 1, 3, 7, 14 d, hasta los 28 d cuando fue máximo en las áreas corticales ipsi- y contra-laterales a la lesión luego de MCAO (Cheatwood et al., 2008). De manera similar, se ha descrito que ocurre un incremento de Nogo-A en la corteza cerebral a las 12, 24 y 48 h después de isquemia cerebral global, mientras que Ng-R y Rho-A aumentaron a las 6 h y permanecieron así hasta los 7 d post-isquemia (Zhou et al., 2003). Por otro lado, se ha demostrado un incremento en la inmunorreactividad a Nogo-A en las fibras de las columnas dorsales de los bordes de la lesión a los 8 y 16 d después de la transección de la médula espinal (Hunt et al., 2003). En estos estudios no se analizaron parámetros funcionales de las estructuras lesionadas.

No existían datos sobre los efectos de la isquemia cerebral global sobre la vía de señalización de Nogo-A en el hipocampo. Los resultados del presente estudio mostraron un incremento de la inmunorreactividad a Nogo-A, Ng-R y Rho-A en los cuerpos celulares de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo a las 24 h, con un máximo a las 72 h, persistiendo hasta los 14 d post-isquemia. Además, se observó una intensa inmunorreactividad a las 72 h post-isquemia en las capas del hipocampo donde se localizan las arborizaciones dendríticas de las neuronas piramidales de CA1. El incremento de estas proteínas en las áreas vulnerables del hipocampo coincide con descripciones previas en las neuronas piramidales de la corteza cerebral luego de isquemia cerebral focal y global (Zhou et al., 2003; Cheatwood et al., 2008; Jiang et al., 2009).

Existen varias evidencias experimentales que apoyan la contribución de estas proteínas inhibitorias al medio ambiente restrictivo de la plasticidad en el SNC, el cual interfiere con los procesos de reparación y con la recuperación funcional después de una lesión. Así, se ha demostrado que el bloqueo de los efectos inhibitorios de Nogo-A y Ng-R con anticuerpos específicos (IN-1 y NEP1-40, respectivamente), incrementa la formación de circuitos compensatorios y la recuperación funcional luego de una lesión en el SNC (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Weissner et al., 2003; Seymour et al., 2005; Wang et al., 2010; Tsai et al., 2011). De hecho, la inmunoterapia anti-Nogo-A y anti-Ng-R administrada ya sea inmediatamente, o 24 h, 7 d o incluso 9 semanas

después de la isquemia focal induce crecimiento axonal compensatorio (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Weissner et al., 2003; Seymour et al., 2005; Wang et al., 2010; Tsai et al., 2011) e incrementa las arborizaciones dendríticas y la densidad de espinas (Papadopoulos et al., 2006). Estos cambios compensatorios fueron correlacionados con la recuperación funcional evaluada en la caja con escaleras (staircase test) y la prueba de alcanzar alimento con la pata anterior (forelimb reaching test) (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Weissner et al., 2003; Fang et al., 2010; Tsai et al., 2011).

Además de la inmunoterapia, existen algunas estrategias no-farmacológicas para modular la vía de señalización inhibitoria de Nogo-A. Entre ellas, la terapia con oxígeno hiperbárico administrada durante 2 h comenzando 1 h después de un episodio de isquemia cerebral global, reduce los niveles de Nogo-A, Ng-R y Rho-A en la corteza cerebral desde las 6 h hasta los 7 d post-isquemia (Zhou et al., 2003). De manera similar, 1 semana de ejercicio físico voluntario comenzando 3 h después de un daño cerebral por percusión con fluido, previene el incremento en los niveles de Nogo-A en el hipocampo mediante un mecanismo mediado por BDNF (Chytrova et al., 2008).

En cuanto a los efectos de fármacos utilizados como agentes neuroprotectores o neurorreparadores, sobre la vía de señalización inhibitoria de la plasticidad de Nogo-A, la información que existe es escasa. La efedrina, un agente simpatomimético indirecto, administrada inmediatamente después de isquemia neonatal y una vez al día durante 7 d, atenúa la inmunorreactividad a Nogo-A en la corteza cerebral y reduce las alteraciones en el aprendizaje y la memoria espaciales evaluados 4 semanas luego del episodio de hipoxia-isquemia (Chen et al., 2009). La indometacina, un fármaco no esteroideo con potente actividad anti-inflamatoria, administrada inmediatamente después de TBI, suprime el incremento en la expresión de Nogo-A (RNAm y proteína) en el hipocampo a las 8 h, efecto asociado con una menor producción de IL-1 $\beta$  (Chao et al., 2012). El  $\alpha$ -tocoferol, un antioxidante natural, administrado 6 h después de TBI y una vez al día, reduce la expresión de Nogo-A (RNAm y proteína) en la corteza cerebral desde 1 d hasta 21 d y la de Ng-R a los 14 y 21 d, así como los déficits neurológicos desde los 3 hasta los 14 d post-lesión (Yang et al., 2013).

La progesterona, a través de sus diversos mecanismos celulares y moleculares de acción, se sabe que ejerce efectos neuroprotectores y neurorreparadores en varios modelos de daño al SNC, interfiriendo con algunos fenómenos fisiopatológicos y promoviendo procesos de reparación. Esta hormona reduce el edema cerebral (Roof et al., 1996; Guo et al., 2006), la lipoperoxidación (Roof et al., 1997; Ozacmak et al., 2009), la disfunción mitocondrial (Sayeed et al., 2009a), la apoptosis (Djebaili et al., 2004; 2005; Yao et al., 2005; Ishrat et al., 2012) y la respuesta inflamatoria (Gibson et

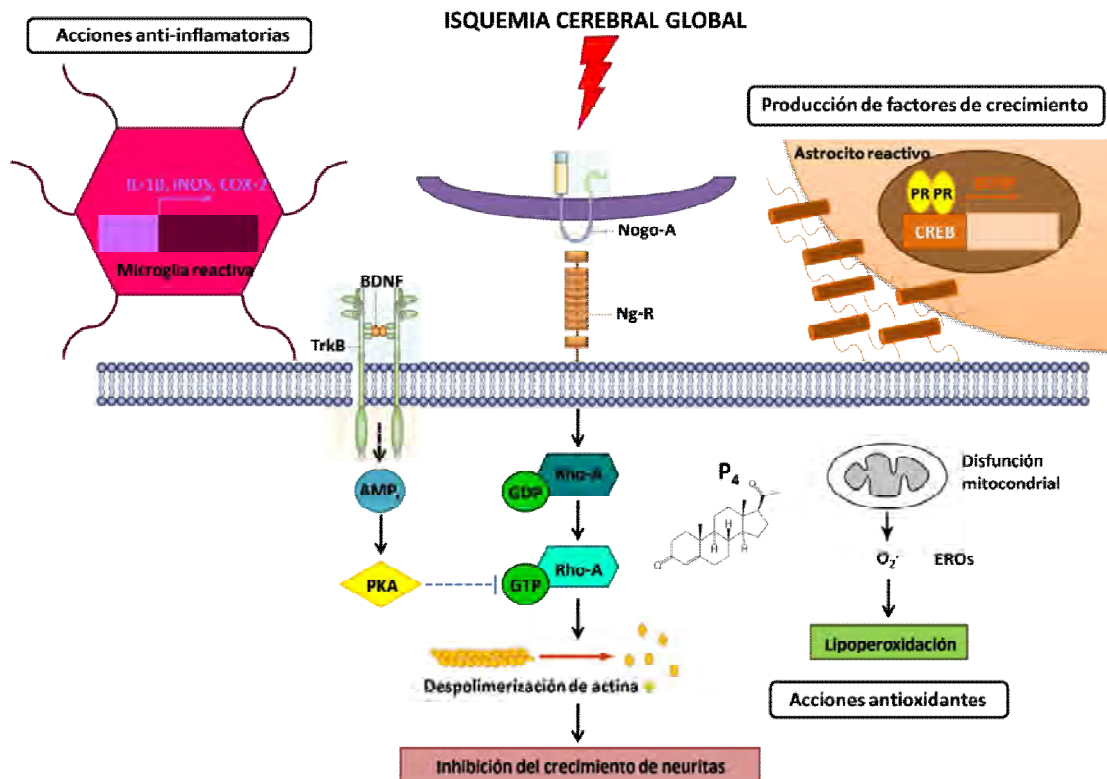
al., 2005; Aggarwal et al., 2008) provocados por isquemia y TBI. Además, la progesterona promueve la remielinización (Labombarda et al., 2009), la sinaptogénesis (Zhao et al., 2011), la neurogénesis (Zhang et al., 2010; Barha et al., 2011) y la expresión de factores de crecimiento como el BDNF (González et al., 2004; Cekic et al., 2012) después de TBI, lesión traumática de médula espinal o isquemia cerebral global.

Los resultados del presente estudio demostraron que la administración post-isquemia de progesterona atenuó el incremento en la inmunorreactividad a Nogo-A, Ng-R y Rho-A en el hipocampo (Fig. 19). Estos resultados pueden ser interpretados como un nuevo efecto reparador de la progesterona, a través de la reducción de una vía de señalización relevante para la inhibición del crecimiento de neuritas.

Varios mecanismos celulares y moleculares de acción de progesterona pueden estar involucrados en la reducción de Nogo-A y su vía de señalización (Fig. 19). Así, sus acciones antioxidantes y anti-inflamatorias, o bien la estimulación de la producción de BDNF, similares a las de la indometacina, el  $\alpha$ -tocoferol y el ejercicio respectivamente, descritos anteriormente, pudieran haber contrarrestado el incremento de esta vía inhibitoria del crecimiento de neuritas luego de isquemia.

La reducción de la vía de señalización de Nogo-A por progesterona, evidenciada en el presente estudio, pudo haber contribuido a la preservación del sustrato neural del aprendizaje y memoria espaciales dependientes del hipocampo observada en un estudio previo, 4 meses post-isquemia, a pesar de una pérdida severa de neuronas piramidales en CA1 (Moralí et al., 2011). Ese efecto de progesterona pudo haber promovido la plasticidad neuronal, favoreciendo así la preservación de la citoarquitectura de las neuronas piramidales remanentes en CA1, incluyendo un aumento en la proporción de espinas dendríticas de tipo hongo, como cambios plásticos compensatorios que no se presentaron en los animales isquémicos tratados con vehículo (Moralí et al., 2012). Estos datos sugieren que la progesterona pudo haber proveído a las neuronas sobrevivientes, un medio ambiente menos restrictivo para participar en los fenómenos de reparación del SNC incluyendo la reestructuración sináptica y estructural, que se sabe que ocurren aunque de manera limitada luego de isquemia y que son relevantes para la preservación funcional.

Se requieren estudios que exploren los mecanismos celulares y/o moleculares de acción mediante los cuales la progesterona reduce el incremento de Nogo-A, Ng-R y Rho-A inducido por la isquemia cerebral global.



**Figura 20. Diagrama que representa los efectos neuroreparadores de la progesterona en contra de los fenómenos de inhibición del crecimiento de neuritas inducidos por la isquemia.** Diversas estrategias neuroprotectoras y otras no-farmacológicas reducen Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector Rho-A vía sus acciones antioxidantes, anti-inflamatorias o bien a través de los efectos del factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) que se une a su receptor TrkB incrementando los niveles de AMPc, activando a la proteína cinasa A (PKA) que inhibe a Rho-A. Dado lo anterior, proponemos que la progesterona ( $P_4$ ) puede tener efectos neuroreparadores similares en contra de estos fenómenos inhibidores del crecimiento de neuritas, habiéndose demostrado en otros modelos de daño que (1)  $P_4$  reduce la expresión de la citocina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$ , la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2); (2)  $P_4$  reduce la lipoperoxidación y (3)  $P_4$  incrementa los niveles de BDNF.



## X. CONCLUSIONES

1. Los resultados del presente estudio confirman que el aumento y la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA contribuyen a la pérdida selectiva de neuronas piramidales observada en la región CA1 del hipocampo.
2. Los resultados del presente estudio sugieren que la reducción de los niveles y de la activación de la caspasa-3, así como de la fragmentación del DNA pueden formar parte de los efectos neuroprotectores de la progesterona en contra del daño por isquemia cerebral global/reperfusión. Estos efectos pudieron influir en la preservación de una población neuronal, que de otro modo se habría dañado por estos mecanismos, y que pudo ser relevante en la preservación funcional del hipocampo luego de isquemia cerebral global.
3. Los resultados del presente estudio sugieren que la reducción de los inhibidores del crecimiento de neuritas Nogo-A, Ng-R y Rho-A, y de la magnitud de la reacción astrogliar, puede formar parte de los efectos neurorreparadores de la progesterona en contra de la inhibición del crecimiento de neuritas después de un episodio de isquemia cerebral global/reperfusión. Estos efectos posiblemente permitieron que ocurrieran fenómenos de plasticidad, que también influyeron en la preservación funcional del hipocampo luego de isquemia cerebral global.
4. Estos hallazgos sobre la inhibición de la activación de la caspasa-3, de la fragmentación del DNA, de la vía de señalización de Nogo-A y de la reacción astrogliar por progesterona señalan la relevancia de continuar la investigación sobre los efectos de esta hormona, en vista de su potencial uso clínico como agente terapéutico para el manejo de la isquemia cerebral global y otras patologías del SNC con mecanismos de daño neuronal similares.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal R**, Medhi B, Pathak A, Dhawan V, Chakrabarti A. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60(6):731-7.
- Akbik F**, Cafferty WB, Strittmatter SM. Myelin associated inhibitors: a link between injury-induced and experience-dependent plasticity. *Exp Neurol*. 2012; 235(1):43-52.
- Araki T**, Kato H, Kogure K. Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. *Acta Neurol Scand*. 1989; 80(6):548-53.
- Ardeshiri A**, Kelley MH, Korner IP, Hurn PD, Herson PS. Mechanism of progesterone neuroprotection of rat cerebellar Purkinje cells following oxygen-glucose deprivation. *Eur J Neurosci*. 2006; 24(9):2567-74.
- Arrich J**, Holzer M, Havel C, Müllner M, Herkner H. Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; 9:CD004128.
- Atif F**, Sayeed I, Ishrat T, Stein DG. Progesterone with vitamin D affords better neuroprotection against excitotoxicity in cultured cortical neurons than progesterone alone. *Mol Med*. 2009; 15(9-10):328-36.
- Barha CK**, Ishrat T, Epp JR, Galea LA, Stein DG. Progesterone treatment normalizes the levels of cell proliferation and cell death in the dentate gyrus of the hippocampus after traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2011; 231(1):72-81.
- Barone FC**, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999; 19(8):819-34.
- Barrette B**, Vallières N, Dubé M, Lacroix S. Expression profile of receptors for myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the intact and injured mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 2007; 34(4):519-38.
- Belelli D**, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA (A) receptor. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6(7):565-75.
- Benarroch EE**. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc*. 2005; 80(10):1326-38.
- Benquet P**, Gee CE, Gerber U. Transient brain ischemia: NMDA receptor modulation and delayed neuronal death. *Med Sci (Paris)*. 2008; 24(2):185-90.
- Betz AL**, Coester HC. Effect of steroids on edema and sodium uptake of the brain during focal ischemia in rats. *Stroke*. 1990; 21(8):1199-204.
- Block F**. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol*. 1999; 58(3):279-95.

- Brinton RD**, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol.* 2008; 29(2):313-39.
- Buffo A**, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Arch Ital Biol.* 2010; 148(2):119-36.
- 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(2):127-38.
- Cao G**, Minami M, Pei W, Yan C, Chen D, O'Horo C, Graham SH, Chen J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21(4):321-33.
- Cao Z**, Gao Y, Deng K, Williams G, Doherty P, Walsh FS. Receptors for myelin inhibitors: Structures and therapeutic opportunities. *Mol Cell Neurosci.* 2010; 43(1):1-14.
- Caroni P**, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol.* 1988; 106(4):1281-8.
- Caroni P**, Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron.* 1988; 1(1):85-96.
- 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(1):6-14.
- Cervantes M**, González-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, Olvera-Cortés ME, Morali G. Neuroprotection in Animal Models of Global Cerebral Ischemia. En: Balestrino, M. (Ed.), *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke.* 2012, InTech. doi: 10.5772/32322.
- Chang H**, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(4):821-46.
- Chao PK**, Lu KT, Jhu JY, Wo YY, Huang TC, Ro LS, Yang YL. Indomethacin protects rats from neuronal damage induced by traumatic brain injury and suppresses hippocampal IL-1 $\beta$  release through the inhibition of Nogo-A expression. *J Neuroinflammation.* 2012; 9:121.
- Cheatwood JL**, Emerick AJ, Schwab ME, Kartje GL. Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat. *Stroke.* 2008; 39(7):2091-8.

- Chen J**, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler RA, Simon RP, Graham SH. Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem.* 1996; 67(1):64-71.
- Chen J**, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu R, Graham SH, Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1998; 18(13):4914–28.
- Chen MS**, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* 2000; 403(6768):434-9.
- Chen Y**, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003; 23(2):137-49.
- Chen S**, Xiao N, Zhang X. Effect of combined therapy with ephedrine and hyperbaric oxygen on neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurosci Lett.* 2009; 465(2):171-6.
- Choi DW**. Excitotoxicity, Apoptosis, and Ischemic Stroke. *J Biochem Mol Biol.* 2001; 34(1):8-14.
- Choi HA**, Badjatia N, Mayer SA. Hypothermia for acute brain injury--mechanisms and practical aspects. *Nat Rev Neurol.* 2012; 8(4):214-22.
- Chowdhury I**, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008; 151(1):10-27.
- Chytrova G**, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Exercise normalizes levels of MAG and Nogo-A growth inhibitors after brain trauma. *Eur J Neurosci.* 2008; 27(1):1-11.
- Ciriza I**, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Reduced progesterone metabolites protect rat hippocampal neurones from kainic acid excitotoxicity in vivo. *J Neuroendocrinol.* 2004; 16(1):58-63.
- Christophe M**, Nicolas S. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des.* 2006; 12(6):739-57.
- Colbourne F**, Sutherland GR, Auer RN. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci.* 1999; 19(11):4200–10.
- Coughlan T**, Gibson C, Murphy S. Modulatory effects of progesterone on inducible nitric oxide synthase expression in vivo and in vitro. *J Neurochem.* 2005; 93(4):932-42.
- Crompton M**. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999; 341(Pt 2):233-49.

- Di Filippo M**, Tozzi A, Costa C, Belcastro V, Tantucci M, Picconi B, Calabresi P. Plasticity and repair in the post-ischemic brain. *Neuropharmacology*. 2008; 55(3):353-62.
- Dirección General de Información en Salud**. Estadísticas de mortalidad en México: Muertes registradas en el año 2002. *Salud Pública de México*. 2004; 46:169-85.
- Dirnagl U**, Meisel A. Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? *Neuropharmacology*. 2008; 55(3):334-44.
- Djebaili M**, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience*. 2004; 123(2):349-59.
- 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(1):106-18.
- Elmore S**. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4):495-516.
- Enari M**, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998; 391(6662):43-50.
- Fang PC**, Barbay S, Plautz EJ, Hoover E, Strittmatter SM, Nudo RJ. Combination of NEP 1-40 treatment and motor training enhances behavioral recovery after a focal cortical infarct in rats. *Stroke*. 2010; 41(3):544-9.
- Fawcett JW**, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999; 49(6):377-91.
- Ferrer I**, Tortosa A, Macaya A, Sierra A, Moreno D, Munell F, Blanco R, Squier W. Evidence of nuclear DNA fragmentation following hypoxia-ischemia in the infant rat brain, and transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *Brain Pathol*. 1994; 4(2):115-22.
- Filbin MT**. Myelin-associated glycoprotein: a role in myelination and in the inhibition of axonal regeneration? *Curr Opin Neurobiol*. 1995; 5(5):588-95.
- Filbin MT**. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(9):703-13.
- Fitch MT**, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol*. 2008; 209(2):294-301.
- Fournier AE**, GrandPré T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*. 2001; 409(6818):341-6.
- Fournier AE**, GrandPré T, Gould G, Wang X, Strittmatter SM. Nogo and the Nogo-66 receptor. *Prog Brain Res*. 2002; 137:361-9.

- Frye CA**, Scalise TJ. Anti-seizure effects of progesterone and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP in kainic acid and perforant pathway models of epilepsy. *Psychoneuroendocrinology*. 2000; 25(4):407-20.
- Frye CA**. Effects and mechanisms of progestogens and androgens in ictal activity. *Epilepsia*. 2010; 51 Suppl 3:135-40.
- Galluzzi L**, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*. 2007; 14(7):1237-43.
- Garay L**, Tüngler V, Deniselle MC, Lima A, Roig P, De Nicola AF. Progesterone attenuates demyelination and microglial reaction in the lysolecithin-injured spinal cord. *Neuroscience*. 2011; 192:588-97.
- Garcia-Estrada J**, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, Garcia-Segura LM. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res*. 1993; 628(1-2):271-8.
- García-Estrada J**, Luquín S, Fernández AM, Garcia-Segura LM. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Dev Neurosci*. 1999; 17(2):145-51.
- Gibson CL**, Constantin D, Prior MJ, Bath PM, Murphy SP. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2005; 193(2):522-30.
- Gibson CL**, Coomber B, Rathbone J. Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke? *Neuroscientist*. 2009; 15(4):324-32.
- Gillardon F**, Böttiger B, Schmitz B, Zimmermann M, Hossmann KA. Activation of CPP-32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997; 50(1-2):16-22.
- Ginsberg MD**. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke*. 2009; 40(3 Suppl):S111-4.
- González-Guzmán R**, Alcalá-Ramírez J. Enfermedad isquémica del corazón, epidemiología y prevención. *Rev FM UNAM* 2010; 53(5): 35-43.
- 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(2):117-24.
- Goss CW**, Hoffman SW, Stein DG. Behavioral effects and anatomic correlates after brain injury: a progesterone dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003; 76(2):231-42.

- Grados-Munro EM**, Fournier AE. Myelin-associated inhibitors of axon regeneration. *J Neurosci Res.* 2003; 74(4):479-85.
- Graham SH**, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21(2):99-109.
- GrandPré T**, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature.* 2000; 403(6768):439-44.
- Grossman KJ**, Goss CW, Stein DG. Effects of progesterone on the inflammatory response to brain injury in the rat. *Brain Res.* 2004; 1008(1):29-39.
- Guo Q**, Sayeed I, Baronne LM, Hoffman SW, Guennoun R, Stein DG. Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats. *Exp Neurol.* 2006; 198(2):469-78.
- 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, 2002, Pp. 79-111.
- Hartman RE**, Lee JM, Zipfel GJ, Wozniak DF. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2005; 1043(1-2):48-56.
- Harukuni I**, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin.* 2006; 24(1):1-21.
- Hayat MA**. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. Cambridge University Press, 2000; Pp. 254-60.
- Hazell AS**. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int.* 2007; 50(7-8):941-53.
- He J**, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2004; 189(2):404-12.
- Héron A**, Pollard H, Dessi F, Moreau J, Lasbennes F, Ben-Ari Y, Charriaud-Marlangue C. Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. *J Neurochem.* 1993; 61(5):1973-6.
- Hertz L**. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology.* 2008; 55(3):289-309.
- Himi T**, Ishizaki Y, Murota S. A caspase inhibitor blocks ischaemia-induced delayed neuronal death in the gerbil. *Eur J Neurosci.* 1998; 10(2):777-81.
- Horner PJ**, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature.* 2000; 407(6807):963-70.

- Huber AB**, Weinmann O, Brösamle C, Oertle T, Schwab ME. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci.* 2002; 22(9):3553-67.
- Hunt D**, Coffin RS, Prinjha RK, Campbell G, Anderson PN. Nogo-A expression in the intact and injured nervous system. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24(4):1083-102.
- Hurtado O**, Pradillo JM, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2006; 21 Suppl 2:54-63.
- INEGI**, 2009. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/corazon09.asp>
- Ishrat T**, Sayeed I, Atif F, Hua F, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Exp Neurol.* 2010; 226(1):183-90.
- 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. *Neuroscience.* 2012; 210:442-50.
- Iwai T**, Hara A, Niwa M, Nozaki M, Uematsu T, Sakai N, Yamada H. Temporal profile of nuclear DNA fragmentation in situ in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1995; 671(2):305-8.
- Jiang W**, Xia F, Han J, Wang J. Patterns of Nogo-A, NgR, and RhoA expression in the brain tissues of rats with focal cerebral infarction. *Transl Res.* 2009; 154(1):40-8.
- Jiang C**, Cui K, Wang J, He Y. Microglia and cyclooxygenase-2: possible therapeutic targets of progesterone for stroke. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(11):1925-31.
- Johansson BB**. Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture. *Stroke.* 2000; 31(1):223-30.
- Johansson BB**. Regeneration and plasticity in the brain and spinal cord. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27(8):1417-30.
- Josephson A**, Trifunovski A, Widmer HR, Widenfalk J, Olson L, Spenger C. Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *J Comp Neurol.* 2002; 453(3):292-304.
- Kahle KT**, Simard JM, Staley KJ, Nahed BV, Jones PS, Sun D. Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda).* 2009; 24:257-65.
- Kálmán M**. Glial reaction and reactive glia. *Adv Mol Cell Biol.* 2004; 31: 787-835.
- Kalra SP**, Kalra PS. Temporal interrelationships among circulating levels of estradiol, progesterone and LH during the rat estrous cycle: effects of exogenous progesterone. *Endocrinology.* 1974; 95(6):1711-8.



- Karanjia N**, Geocadin RG. Post-cardiac arrest syndrome: update on brain injury management and prognostication. *Curr Treat Options Neurol.* 2011; 13(2):191-203.
- Kasturi BS**, Stein DG. Progesterone decreases cortical and sub-cortical edema in young and aged ovariectomized rats with brain injury. *Restor Neurol Neurosci.* 2009; 27(4):265-75.
- Kelley BG**, Mermelstein PG. Progesterone blocks multiple routes of ion flux. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 48(2):137-41.
- Keyvani K**, Schallert T. Plasticity-associated molecular and structural events in the injured brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61(10):831-40.
- Kipp M**, Berger K, Clarner T, Dang J, Beyer C. Sex steroids control neuroinflammatory processes in the brain: relevance for acute ischaemia and degenerative demyelination. *J Neuroendocrinol.* 2012; 24(1):62-70.
- Kirino T**. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982; 239(1):57-69.
- Kirino T**, Tamura A, Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropath.* 1984; 64(2):139-47.
- Kobayashi NR**, Fan DP, Ghil KM, Bedard AM, Wiegand SJ, Tetzlaff W. BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and  $\alpha$ -tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci* 1997; 17:9583-95.
- Kogure K**, Tanaka J, Araki T. The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. *Neurochem Pathos.* 1988; 9:145-70.
- Kokaia Z**, Nawa H, Uchino H, Elmér E, Kokaia M, Carnahan J, Smith ML, Siesjö BK, Lindvall O. Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996; 38(1):139-44.
- Labombarda F**, Gonzalez S, Roig P, Lima A, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Modulation of NADPH-diaphorase and glial fibrillary acidic protein by progesterone in astrocytes from normal and injured rat spinal cord. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 73(3-4):159-69.
- Labombarda F**, Gonzalez SL, Gonzalez DM, Guennoun R, Schumacher M, de Nicola AF. Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *J Neurotrauma.* 2002; 19(3):343-55.
- Labombarda F**, Gonzalez S, Gonzalez Deniselle MC, Garay L, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone increases the expression of myelin

basic protein and the number of cells showing NG2 immunostaining in the lesioned spinal cord. *J Neurotrauma*. 2006; 23(2):181-92.

**Labombarda F**, González SL, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, de Nicola AF. Effects of progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *Glia*. 2009; 57(8):884-97.

**Labombarda F**, González Deniselle MC, De Nicola AF, González SL. Progesterone and the spinal cord: good friends in bad times. *Neuroimmunomodulation*. 2010; 17(3):146-9.

**Labombarda F**, González S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2011; 231(1):135-46.

**Lambert JJ**, Belleli D, Shepherd SE, Pistis M, Peters JA. The selective interaction of neurosteroids with the GABA A receptor. En: *Neurosteroids. A New Regulatory Function in the Nervous System*. (Ed. por Baulieu EE, Robel P, Schumacher M.) Totowa, NJ, Humana Press. 1999, Pp.125-142.

**Lee JK**, Kim JE, Sivula M, Strittmatter SM. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci*. 2004; 24(27):6209-17.

**Leker RR**, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev*. 2002; 39(1):55-73.

**Li S**, Carmichael ST. Growth-associated gene and protein expression in the region of axonal sprouting in the aged brain after stroke. *Neurobiol Dis*. 2006; 23(2):362-73.

**Lindvall O**, Kokaia Z, Bengzon J, Elmér E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci*. 1994; 17(11):490-6.

**Lipton P**. Ischemic cell death. *Physiol Rev*. 1999; 79(4):1431-1568.

**Liu BP**, Cafferty WB, Budel SO, Strittmatter SM. Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361(1473):1593-610.

**Liu L**, Wang J, Zhao L, Nilsen J, McClure K, Wong K, Brinton RD. Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2. *Endocrinology*. 2009; 150(7):3186-96.

**Lockhart EM**, Warner DS, Pearlstein RD, Penning DH, Mehrabani S, Boustany RM. Allopregnanolone attenuates N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture. *Neurosci Lett*. 2002; 328(1):33-6.

- Los M**, Walczak H. (2003) Caspases: Their Role in Cell Death and Cell Survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 260 pp.
- Lösel R**, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(1):46-56.
- Love S**. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003; 27(2):267-82.
- Lu B**. Acute and long-term synaptic modulation by neurotrophins. *Prog Brain Res.* 2004; 146:137-50.
- Luoma JI**, Kelley BG, Mermelstein PG. Progesterone inhibition of voltage-gated calcium channels is a potential neuroprotective mechanism against excitotoxicity. *Steroids.* 2011; 76(9):845-55.
- Luoma JI**, Stern CM, Mermelstein PG. Progesterone inhibition of neuronal calcium signaling underlies aspects of progesterone-mediated neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 131(1-2):30-6.
- MacManus JP**, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett.* 1993; 164(1-2):89-92.
- McCreeedy DA**, Sakiyama-Elbert SE. Combination therapies in the CNS: engineering the environment. *Neurosci Lett.* 2012; 519(2):115-21.
- Mahesh VB**, Brann DW, Hendry LB. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996; 56(1-6):209-19.
- Majewska MD**. Steroid regulation of the GABAA receptor: ligand binding, chloride transport and behaviour. *Ciba Found Symp.* 1990; 153:83-97.
- Matchett GA**, Martin RD, Zhang JH. Hyperbaric oxygen therapy and cerebral ischemia: neuroprotective mechanisms. *Neurol Res.* 2009; 31(2):114-21.
- Markgraf CG**, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N. Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 1992; 575(2):238-46.
- Martins EF**, Chadi G. Glial reaction in the hippocampus after global cardiogenic ischemia. *Acta Cir Bras.* 2001; 16(1):5-14.
- McKerracher L**, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron.* 1994; 13(4):805-11.
- Mehta SL**, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 2007; 54(1):34-66.
- Mingorance A**, Fontana X, Solé M, Burgaya F, Ureña JM, Teng FY, Tang BL, Hunt D, Anderson PN, Bethea JR, Schwab ME, Soriano E, del Río JA. Regulation of Nogo

and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol Cell Neurosci*. 2004; 26(1):34-49.

**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(3):286-90.

**Moralí G**, Montes P, Hernández-Morales L, Monfil T, Espinosa-García C, Cervantes M. Neuroprotective effects of progesterone and allopregnanolone on long-term cognitive outcome after global cerebral ischemia. *Restor Neurol Neurosci*. 2011, 29(1):1-15.

**Moralí G**, Montes P, González-Burgos I, Velázquez-Zamora DA, Cervantes M. Cytoarchitectural characteristics of hippocampal CA1 pyramidal neurons of rats, four months after global cerebral ischemia and progesterone treatment. *Restor Neurol Neurosci*. 2012; 30(1):1-8.

**Moro MA**, Cárdenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium*. 2004; 36(3-4):265-75.

**Morris R**. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984; 11(1):47-60.

**Müller GJ**, Stadelmann C, Bastholm L, Elling F, Lassmann H, Johansen FF. Ischemia leads to apoptosis and necrosis-like neuron death in the ischemic rat hippocampus. *Brain Pathol*. 2004; 14(4):415-24.

**Muralikrishna Adibhatla R**, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40(3):376-87.

**Nagata S**. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000; 256(1):12-8.

**Neigh GN**, Glasper ER, Kofler J, Traystman RJ, Mervis RF, Bachstetter A, DeVries AC. Cardiac arrest with cardiopulmonary resuscitation reduces dendritic spine density in CA1 pyramidal cells and selectively alters acquisition of spatial memory. *Eur J Neurosci*. 2004; 20(7):1865-72.

**Ni B**, Wu X, Su Y, Stephenson D, Smalstig EB, Clemens J, Paul S. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998; 18(3):248-56.

**Nicholson DW**, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995; 376(6535):37-43.

- Niizuma K**, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M, Okami N, Chan PH. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802(1):92-9.
- Nilsen J**, Brinton RD. Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology*. 2002; 143(1):205-12.
- Nitatori T**, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibanaï K, Kominami E, Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci*. 1995; 15(2):1001-11.
- Niwa M**, Hara A, Iwai T, Wang S, Hotta K, Mori H, Uematsu T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 2001; 300(2):103-6.
- Nunn JA**, LePeillet E, Netto CA, Hodges H, Gray JA, Meldrum BS. Global ischaemia: hippocampal pathology and spatial deficits in the water maze. *Behav Brain Res*. 1994; 62(1):41-54.
- Oertle T**, Schwab ME. Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol*. 2003; 13(4):187-94.
- Oertle T**, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, Huber AB, Simonen M, Schnell L, Brösamle C, Kaupmann K, Vallon R, Schwab ME. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci*. 2003; 23(13):5393-406.
- Okano H**, Sakaguchi M, Ohki K, Suzuki N, Sawamoto K. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. *J Neurochem*. 2007; 102(5):1459-65.
- Onodera H**, Aoki H, Yae T, Kogure K. Post-ischemic synaptic plasticity in the rat hippocampus after long-term survival: histochemical and autoradiographic study. *Neuroscience*. 1990; 38(1):125-36.
- Ordly JM**, Wengenack TM, Bialobok P, Coleman PD, Rodier P, Baggs RB, Dunlap WP, Kates B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Exp Neurol*. 1993; 119(1):128-39.
- Ouyang YB**, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci*. 2007; 27(16):4253-60.

- 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(6):909-12.
- Pan DS**, Liu WG, Yang XF, Cao F. Inhibitory effect of progesterone on inflammatory factors after experimental traumatic brain injury. *Biomed Environ Sci.* 2007; 20(5):432-8.
- Papadopoulos CM**, Tsai SY, Alsbiei T, O'Brien TE, Schwab ME, Kartje GL. Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. *Ann Neurol.* 2002; 51(4):433-41.
- Papadopoulos CM**, Tsai SY, Cheatwood JL, Bollnow MR, Kolb BE, Schwab ME, Kartje GL. Dendritic plasticity in the adult rat following middle cerebral artery occlusion and Nogo-a neutralization. *Cereb Cortex.* 2006;16(4):529-36.
- Papadopoulos MC**, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22(6):778-84.
- Paul SM**, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J.* 1992; 6(6):2311-22.
- Pernet V**, Schwab ME. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell Tissue Res.* 2012; 349(1):97-104.
- Petito CK**, Morgello S, Felix JC, Lesser ML. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990; 10(6):850-9.
- Petito CK**, Halaby IA. Relationship between ischemia and ischemic neuronal necrosis to astrocyte expression of glial fibrillary acidic protein. *Int J Dev Neurosci.* 1993; 11(2):239-47.
- Petito CK**, Torres-Munoz J, Roberts B, Olarte JP, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA. DNA fragmentation follows delayed neuronal death in CA1 neurons exposed to transient global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17(9):967-76.
- Pfriegeer FW**. Roles of glial cells in synapse development. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(13):2037-47.
- Piva F**, Gagliano P, Motta M, Martini L. Adrenal progesterone: factors controlling its secretion. *Endocrinology.* 1973; 93(5):1178-84.
- Prinjha R**, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature.* 2000; 403(6768):383-4.
- Proskuryakov SY**, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 2003; 283(1):1-16.
- Pulsinelli WA**. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res.* 1985; 63:29-37.

- Pulsinelli WA**, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979; 10(3):267-72.
- 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(7):913-4.
- Radenonović L**, Selaković V, Bajić A, Andjus PR. Use of confocal microscopy in the study of ischemia-induced hippocampal neuronal damage. *Arch. Biol. Sci (Belgrade)*. 2008; 60(4):561-5.
- Radley E**, Akram A, Grubb BD, Gibson CL. Investigation of the mechanisms of progesterone protection following oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett*. 2012; 506(1):131-5.
- Rami A**. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiol Dis*. 2003; 13(2):75-88.
- Reinecke S**, Dinse HR, Reinke H, Witte OW. Induction of bilateral plasticity in sensory cortical maps by small unilateral cortical infarcts in rats. *Eur J Neurosci*. 2003; 17(3):623-7.
- Roine RO**. Global Cerebral Ischemia. En: Fisher M, Bogouslavsky J (Eds.). *Current Review of Cerebrovascular Disease*. Current Medicine, Philadelphia, 1997; Pp. 159-77.
- Roof RL**, Duvdevani R, Stein DG. Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Res*. 1993; 607(1-2):333-6.
- Roof RL**, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol*. 1997; 31(1):1-11.
- Rosenberg GA**. Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis*. 1999; 42(3):209-16.
- Ruan YW**, Zou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, Gao TM, Yao Z, Xu ZC. Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*. 2006; 140(1):191-201.
- Ruan YW**, Lei Z, Fan Y, Zou B, Xu ZC. Diversity and fluctuation of spine morphology in CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *J Neurosci Res*. 2009; 87(1):61-8.
- Ruan YW**, Han XJ, Shi ZS, Lei ZG, Xu ZC. Remodeling of synapses in the CA1 area of the hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience*. 2012; 218:268-77.
- Sandvig A**, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*. 2004; 46(3):225-51.

- Sarraf-Yazdi S**, Laskowitz D, Warner DS. Pathophysiology of brain damage. En: Schuaib A, Goldstein LB. Eds. Management of acute stroke. New York: Marcel Dekker; 1999. Pp. 243-277.
- Sayed I**, Parvez S, Wali B, Siemen D, Stein DG. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone. *Brain Res.* 2009; 1263:165-73.
- Schmidt-Kastner R**, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience.* 1991; 40(3):599-636.
- Schneider A**, Böttiger BW, Popp E. Cerebral resuscitation after cardiocirculatory arrest. *Anesth Analg.* 2009; 108(3):971-9.
- Schumacher M**, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghomari A, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Ibanez C, Labombarda F, Coirini H, Baulieu EE, De Nicola AF. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res.* 2004; 14 Suppl A:S18-33.
- Schumacher M**, Guennoun R, Stein DG, De Nicola AF. Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. *Pharmacol Ther.* 2007; 116(1):77-106.
- Schumacher M**, Sitruk-Ware R, De Nicola AF. Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair. *Curr Opin Pharmacol.* 2008; 8(6):740-6
- Schumacher M**, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghomari AM. Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci.* 2012; 6:10.
- Schwab ME**. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2004; 14(1):118-24.
- Sei Y**, Von Lubitz KJ, Basile AS, Borner MM, Lin RC, Skolnick P, Fossom LH. Internucleosomal DNA fragmentation in gerbil hippocampus following forebrain ischemia. *Neurosci Lett.* 1994; 171(1-2):179-82.
- Seymour AB**, Andrews EM, Tsai SY, Markus TM, Bollnow MR, Brenneman MM, O'Brien TE, Castro AJ, Schwab ME, Kartje GL. Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25(10):1366-75.
- Shahrokh N**, Haddad MK, Joukar S, Shabani M, Keshavarzi Z, Shahozehi B. Neuroprotective antioxidant effect of sex steroid hormones in traumatic brain injury. *Pak J Pharm Sci.* 2012; 25(1):219-25.
- Shimizu H**, Ohgoh M, Ikeda M, Nishizawa Y, Ogura H. Caspase-3-like protease activity-independent apoptosis at the onset of neuronal cell death in the gerbil hippocampus after global ischemia. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30 (10):1950-3.



- Siesjö BK**, Katsura K, Kristian T. The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1995; 7(1):47-52.
- Silver J**, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5(2):146-56.
- Singh M**, Su C. Progesterone and neuroprotection. *Horm Behav.* 2013; 63(2):284-90.
- Sofroniew MV**. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009; 32(12):638-47.
- Sofroniew MV**, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1):7-35.
- Stein DG**. Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res Rev.* 2008; 57(2):386-97.
- Stein DG**. Is progesterone a worthy candidate as a novel therapy for traumatic brain injury? *Dialogues Clin Neurosci.* 2011; 13(3):352-9.
- Stein DG**. A clinical/translational perspective: can a developmental hormone play a role in the treatment of traumatic brain injury? *Horm Behav.* 2013; 63(2):291-300.
- Sugawara T**, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1999; 19(22):RC39.
- Sugawara T**, Lewén A, Noshita N, Gasche Y, Chan PH. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. *J Neurotrauma.* 2002; 19(1):85-98.
- Sugawara T**, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx.* 2004; 1(1):17-25.
- Sulkowski G**, Bubko I, Struzyńska L, Januszewski S, Walski M, Rafałowska U. Astrocytic response in the rodent model of global cerebral ischemia and during reperfusion. *Exp Toxicol Pathol.* 2002; 54(1):31-8.
- Syntichaki P**, Tavernarakis N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(8):672-84.
- Szydlowska K**, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010; 47(2):122-9.
- Tanaka H**, Araki M, Masuzawa T. Reaction of astrocytes in the gerbil hippocampus following transient ischemia: immunohistochemical observations with antibodies against glial fibrillary acidic protein, glutamine synthetase, and S-100 protein. *Exp Neurol.* 1992; 116(3):264-74.

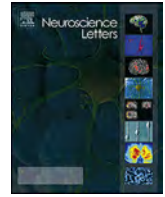
- Tanaka H**, Yokota H, Jover T, Cappuccio I, Calderone A, Simionescu M, Bennett MV, Zukin RS. Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J Neurosci*. 2004; 24(11):2750-9.
- Tang H**, Hua F, Wang J, Sayeed I, Wang X, Chen Z, Yousuf S, Atif F, Stein DG. Progesterone and vitamin D: Improvement after traumatic brain injury in middle-aged rats. *Horm Behav*. 2013; 64(3):527-38.
- Teschendorf P**, Padosch SA, Spöhr F, Albertsmeier M, Schneider A, Vogel P, Choi YH, Böttiger BW, Popp E. Time course of caspase activation in selectively vulnerable brain areas following global cerebral ischemia due to cardiac arrest in rats. *Neurosci Lett*. 2008; 448(2):194-9.
- Thoenen H**. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 1995; 270(5236):593-8.
- Tournell CE**, Bergstrom RA, Ferreira A. Progesterone-induced agrin expression in astrocytes modulates glia-neuron interactions leading to synapse formation. *Neuroscience*. 2006; 141(3):1327-38.
- Tsai SY**, Papadopoulos CM, Schwab ME, Kartje GL. Delayed anti-nogo-a therapy improves function after chronic stroke in adult rats. *Stroke*. 2011; 42(1):186-90.
- Velázquez-Monroy O**, Barinagarrementeria-Aldatz FS, Rubio-Guerra AF, Verdejo J, Méndez-Bello MA, Violante R, Pavía A, Alvarado-Ruiz R, Lara-Esqueda A. Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México 2005. *Arch Cardiol Mex*. 2007; 77(1):31-39.
- Vicario-Abejón C**, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(12):965-74.
- Volpe BT**, Wessel TC, Mukherjee B, Federoff HJ. Temporal pattern of internucleosomal DNA fragmentation in the striatum and hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 1995;186(2-3):157-60.
- von Euler M**, Bendel O, Bueters T, Sandin J, von Euler G. Profound but transient deficits in learning and memory after global ischemia using a novel water maze test. *Behav Brain Res*. 2006; 166(2):204-10.
- Wahl F**, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1992; 23(2):267-72.
- Wang KC**, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*. 2002; 417(6892):941-4.
- Wang JM**, Johnston PB, Ball BG, Brinton RD. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J Neurosci*. 2005; 25(19):4706-18.

- Wang T**, Wang J, Yin C, Liu R, Zhang JH, Qin X. Down-regulation of Nogo receptor promotes functional recovery by enhancing axonal connectivity after experimental stroke in rats. *Brain Res.* 2010; 1360:147-58.
- Wang M**. Neurosteroids and GABA-A Receptor Function. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011; 2:44.
- Wiessner C**, Bareyre FM, Allegrini PR, Mir AK, Frentzel S, Zurini M, Schnell L, Oertle T, Schwab ME. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003; 23(2):154-65.
- 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(5):588-94.
- Wieloch T**. Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *Prog Brain Res.* 1985; 63:69-85.
- Won SJ**, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35(1):67-86.
- Wright DW**, Bauer ME, Hoffman SW, Stein DG. Serum progesterone levels correlate with decreased cerebral edema after traumatic brain injury in male rats. *J Neurotrauma.* 2001; 18(9):901-9.
- Xiang S**, Pan W, Kastin AJ. Strategies to create a regenerating environment for the injured spinal cord. *Curr Pharm Des.* 2005; 11(10):1267-77.
- Xie F**, Zheng B. White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008; 209(2):302-12.
- Yang J**, Han Y, Ye W, Liu F, Zhuang K, Wu G. Alpha tocopherol treatment reduces the expression of Nogo-A and NgR in rat brain after traumatic brain injury. *J Surg Res.* 2013; 182(2):e69-77.
- Yao XL**, Liu J, Lee E, Ling GS, McCabe JT. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2005; 22(6):656-68.
- Yiu G**, He Z. Signaling mechanisms of the myelin inhibitors of axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2003; 13(5):545-51.
- Yiu G**, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(8):617-27.
- Zhan RZ**, Wu C, Fujihara H, Taga K, Qi S, Naito M, Shimoji K. Both caspase-dependent and caspase-Independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21(5): 529-40.

- Zhang Z**, Yang R, Cai W, Bai Y, Sokabe M, Chen L. Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice. *Neuropharmacology*. 2010a; 58(6):930-9.
- Zhang Z**, Yang R, Zhou R, Li L, Sokabe M, Chen L. Progesterone promotes the survival of newborn neurons in the dentate gyrus of adult male mice. *Hippocampus*. 2010b; 20(3):402-12.
- Zhao Y**, Wang J, Liu C, Jiang C, Zhao C, Zhu Z. Progesterone influences postischemic synaptogenesis in the CA1 region of the hippocampus in rats. *Synapse*. 2011; 65(9):880-91.
- Zhou C**, Li Y, Nanda A, Zhang JH. HBO suppresses Nogo-A, Ng-R, or RhoA expression in the cerebral cortex after global ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 309(2):368-76.
- Zola-Morgan S**, Squire L, Amaral D. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*. 1986; 6(10):2950-67.

## **XII. ANEXO 1**

Espinosa-García C, Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Aguilar-Hernández A, Monfil T, Cervantes M, Morali G. **Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia.** *Neurosci Lett.* 2013. doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.023



## Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia



Claudia Espinosa-García<sup>a</sup>, Rosa María Viguera-Villaseñor<sup>b</sup>, Julio César Rojas-Castañeda<sup>b</sup>, Alejandra Aguilar-Hernández<sup>a</sup>, Tomas Monfil<sup>a</sup>, Miguel Cervantes<sup>c</sup>, Gabriela Morali<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Investigación Médica en Farmacología, CMN Siglo XXI, IMSS, México, DF, México

<sup>b</sup> Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, México, DF, México

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", UMSNH, Morelia, Michoacán, México

### HIGHLIGHTS

- Global ischemia resulted in a severe neuronal loss in CA1.
- Global ischemia induced an increase in caspase-3 and DNA fragmentation in CA1.
- Progesterone partially prevented CA1 pyramidal neuron loss induced by ischemia.
- Progesterone reduced caspase-3 expression/activation in CA1 at 72 h after ischemia.
- Progesterone reduced DNA fragmentation in CA1 at 7 days after ischemia.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 March 2013

Received in revised form 20 May 2013

Accepted 13 June 2013

#### Keywords:

Global cerebral ischemia

Progesterone

Neuroprotection

Caspase-3

DNA fragmentation

### ABSTRACT

Delayed death of hippocampal CA1 pyramidal neurons following global cerebral ischemia/reperfusion may be mediated, in part, by caspase-3 activation resulting in DNA fragmentation. Progesterone (P<sub>4</sub>) is known to exert neuroprotective effects in several models of brain injury. This study was designed to assess the effect of P<sub>4</sub> on caspase-3 levels and activation, and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia/reperfusion. Adult male Sprague-Dawley rats were subjected to global ischemia by the four-vessel occlusion model. P<sub>4</sub> (8 mg/kg), or its vehicle were administered i.v. at 15 min, 2, 6, 24, 48 and 70 h of reperfusion. Remaining pyramidal neurons were assessed by the Nissl staining technique, caspase-3 levels and activation by immunohistochemistry and an in situ activity assay, and DNA fragmentation by the TUNEL method. Post-ischemic progesterone treatment significantly reduced the ischemia/reperfusion-induced increase in caspase-3 levels and activation at 72 h, and DNA fragmentation and CA1 neuronal loss at 7 days. Present results suggest the reduction of caspase-3 levels/activation, and DNA fragmentation, as a part of the neuroprotective effects of progesterone against global cerebral ischemia/reperfusion injury.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

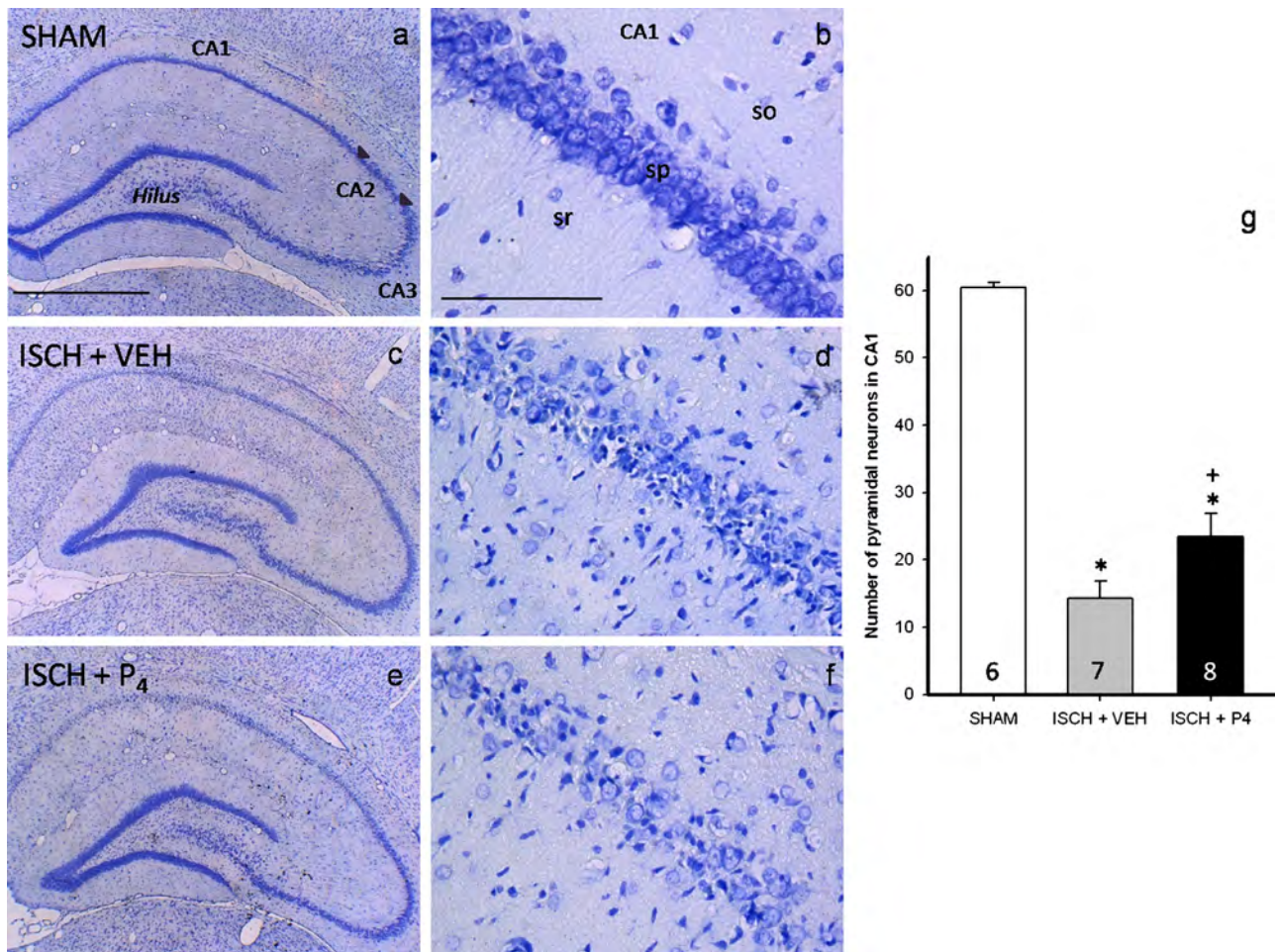
### 1. Introduction

Transient global cerebral ischemia arises during cardiac failure under diverse situations, mostly cardiac arrest, that affect both middle-aged and aged individuals, and is a common cause of mortality and permanent impairment of cognitive and executive functions in survivors, around the world [11].

Global cerebral ischemia, occurring in a limited period and followed by reperfusion, leads to selective and delayed death of hippocampal CA1 pyramidal neurons [12,21], a process usually following the activation of caspases, in particular of caspase-3 [3,7,23,28,29], and DNA fragmentation [7,19,28,29]. Global ischemia/reperfusion also leads to short- and long-term behavioral deficits that are associated with the reduction of the number of hippocampal pyramidal neurons [9]. Hence, a major goal in the field is to develop therapeutic maneuvers aimed at preventing neuronal death and lasting functional neurological deficits. In this context, previous work has shown that the administration of progesterone (P<sub>4</sub>) either before or at early stages of the post-injury event attenuates the severity of excitotoxicity, calcium influx, peroxidation,

\* Corresponding author at: Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Eugenia 626-Girasol-302, Col. Del Valle, México 03100, DF, México. Tel.: +52 555 687 8606.

E-mail address: [gmorali@hotmail.com](mailto:gmorali@hotmail.com) (G. Morali).



**Fig. 1.** Progesterone partially reduced the CA1 pyramidal neuron loss induced by ischemia. Left: Nissl stained coronal sections of the dorsal hippocampus of rats subjected either to sham procedures (SHAM; a and b), or to global ischemia and receiving vehicle (ISCH+VEH; c and d) or progesterone (ISCH+P<sub>4</sub>; e and f), obtained at 7 days of reperfusion. Right: Number (mean ± SEM) of pyramidal neurons in the CA1 *stratum pyramidale* in the three experimental groups (g). so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Scale bars: 1 mm (hippocampus); 100 μm (CA1). Tukey test: \**p* < 0.001 vs. Sham; +*p* < 0.05, ISCH + P<sub>4</sub> vs. ISCH + VEH.

brain edema, inflammation, mitochondrial dysfunction, caspase-3 levels and activation, and DNA fragmentation and thus, apoptosis [6,24], after traumatic brain injury (TBI) [4,5,18], middle cerebral artery occlusion (MCAO) [10], or in vitro oxygen–glucose deprivation [1]. To the best of our knowledge, no evidence has been obtained on the effects of P<sub>4</sub> on caspase-3 activation and DNA fragmentation after global ischemia/reperfusion.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate whether the neuroprotective effects of P<sub>4</sub> against global ischemia include a reduction of caspase-3 levels and activation and DNA fragmentation.

## 2. Materials and methods

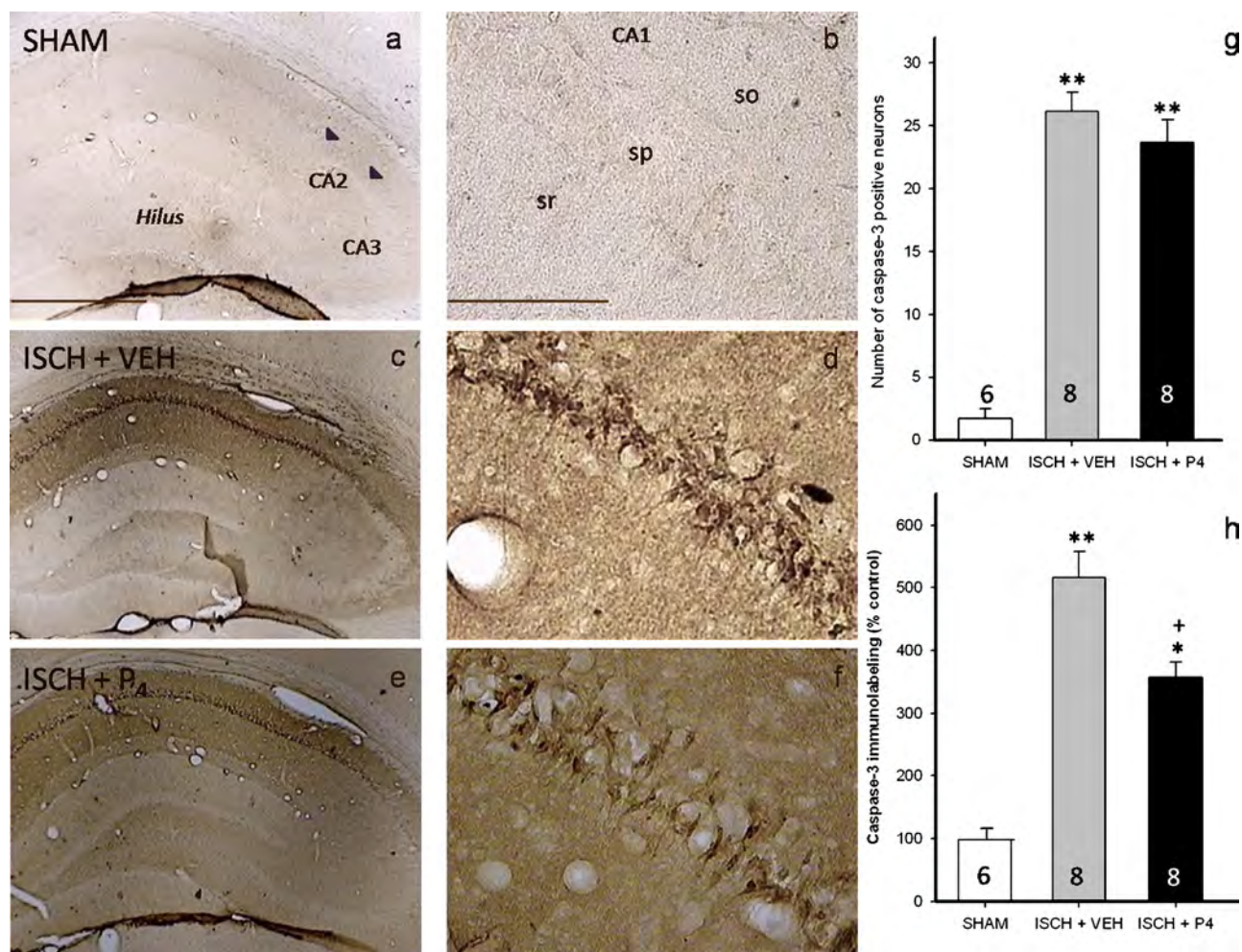
Experimental procedures were performed in accordance with the NIH guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996, and approved by the Research Ethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

Adult male Sprague-Dawley rats (400–500 g b.w.) were randomly assigned to groups under the following experimental conditions: (1) Sham, non-ischemic controls; (2) ISCH+VEH, animals subjected to global cerebral ischemia and reperfusion by the four-vessel occlusion model (4-VO) and receiving the vehicle of progesterone (20% 2-hydroxypropyl β-cyclodextrin in sterile water, 0.5 ml, i.v.; Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA); and (3)

ISCH + P<sub>4</sub>, animals subjected to 4-VO and receiving progesterone (8 mg/kg, i.v.; Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) at various times after the onset of reperfusion: 15 min, 2, 6, 24, 48, and 70 h. Intravenous administration of progesterone allows its rapid delivery to the brain.

For administration of P<sub>4</sub> or vehicle, a catheter (Clay Adams, PE-50) was inserted into the right internal jugular vein. Rats were subjected to sham procedures, or to global ischemia during 13 min by a 4-VO model [20–22] routinely used in our laboratory [15–17]. Only rats remaining unconscious, with complete loss of the righting reflex during ischemia and for 20–50 min afterwards, as a neurological sign of having suffered a severe ischemia [19,21,28], were included in the study. Sixty-eight rats were subjected to global ischemia. Mortality rates, mainly due to respiratory arrest were 7/33 in the ISCH + VEH group, and 7/35 in the ISCH + P<sub>4</sub> group. Subgroups of 6–8 rats in each experimental group were subjected to the different procedures as described below.

For histological assessment of hippocampal damage, animals were perfused with 4% paraformaldehyde in PBS at 7 days after ischemia. Brain slices containing the dorsal hippocampus were processed for paraffin embedding and coronal sections (10 μm) were stained with the Nissl technique. The number of remaining pyramidal neurons showing normal morphology, distinct cytoplasmic and nuclear outlines, and visible nucleolus, per 385-μm length in the middle part of the CA1 pyramidal cell layer (*stratum pyramidale*), was counted bilaterally in 2 sections per animal



**Fig. 2.** Progesterone reduced the increase in caspase-3 immunolabeling induced by ischemia. Left: caspase-3 immunolabeling in coronal sections of the dorsal hippocampus of rats subjected either to sham procedures (SHAM; a and b), or to global ischemia and receiving vehicle (ISCH + VEH; c and d) or progesterone (ISCH + P<sub>4</sub>; e and f), obtained at 72 h of reperfusion. Upper right: Number (mean ± SEM) of caspase-3-positive neurons in the CA1 *stratum pyramidale* in the three experimental groups; lower right: optical density values for caspase-3 immunolabeling in the ischemic animals, normalized to the corresponding values for the Sham group taken as 100% (g). so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Scale bars: 1 mm (hippocampus); 100 μm (CA1). Tukey test: \**p* < 0.01, \*\**p* < 0.001 vs. Sham; \**p* < 0.01, ISCH + P<sub>4</sub> vs. ISCH + VEH.

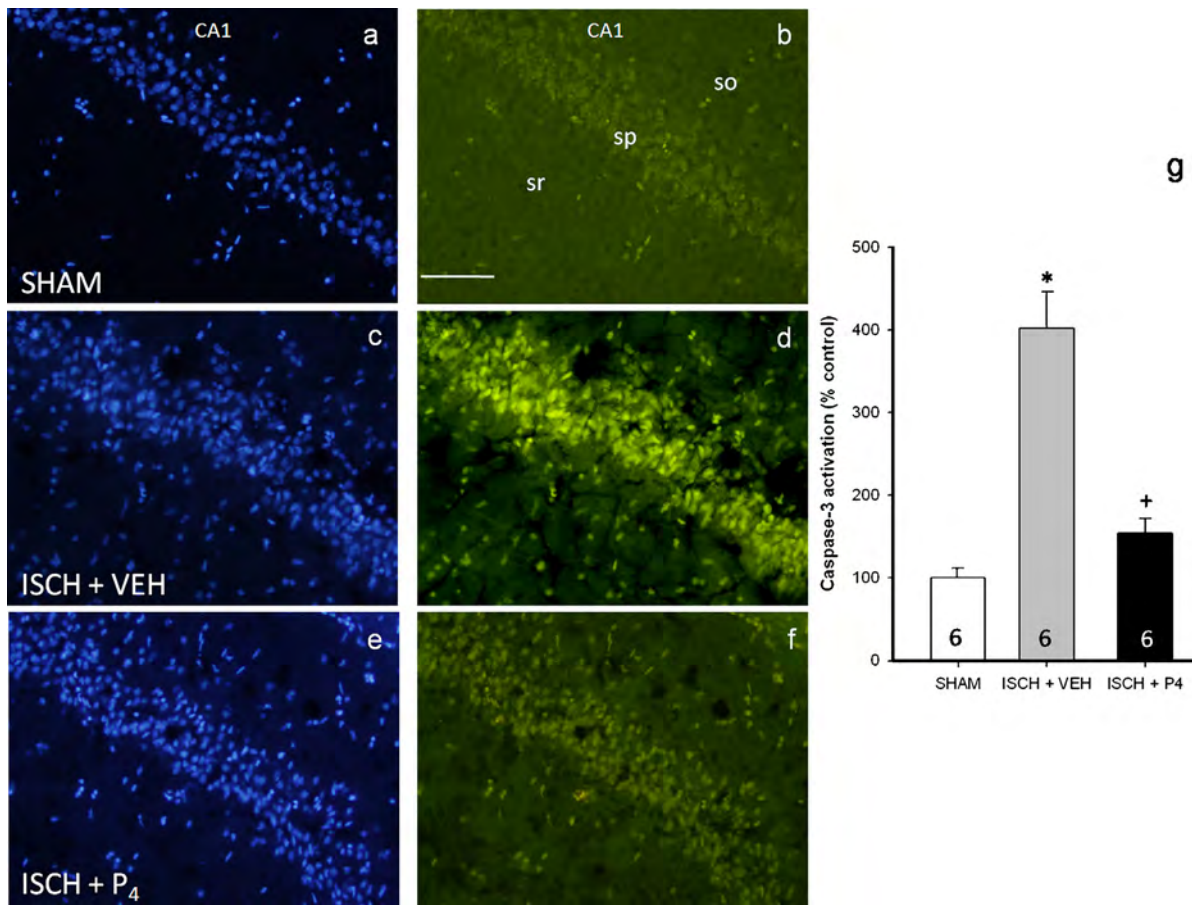
under a light microscope (magnification, 400×). Cell counts from the right and left hippocampus on each of the two sections were averaged to provide a single value for each animal. From these data, mean numbers of remaining neurons were calculated for each experimental group.

Caspase-3 levels were determined by immunohistochemical analysis [3,7,23,28], at 72 h after ischemia, time at which it has been reported to be maximal. Animals were perfused with 4% paraformaldehyde in PBS. Brain slices containing the dorsal hippocampus were immersed in gradually increasing concentrations of sucrose in PBS and frozen. Free-floating coronal sections (40-μm) were blocked and processed for labeling with the primary antibody anti-caspase-3p20 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) at 4°C for 48 h. Then, sections were incubated with a biotinylated secondary antibody and a peroxidase-labeled streptavidin reagent (LSAB kit, DAKO, Carpinteria, CA, USA), followed by 3-3'-diaminobenzidine (DAKO, Carpinteria, CA, USA). The number of caspase-3-positive neurons was counted and averaged using the same procedure as mentioned above. From these data, mean numbers of these labeled neurons were calculated for each experimental group. In addition, optical density (OD) values of each caspase-3-positive neuron per 385-μm length in the middle part of the CA1 *stratum pyramidale* were measured using the NIH 1.61 Image J software and averaged. Values from the right and left

hippocampus on each of two sections per animal were averaged to give the mean OD value for each rat. From these data, mean OD values were obtained for each group.

Caspase-3 activation assays were performed using an APOLOGIX detection kit (Cell Technology, Inc., Mountain View, CA, USA), containing an carboxyfluorescein-labeled inhibitor of activated caspase-3 (FAM-DEVD-FMK) [28,29], at 72 h after ischemia, time at which it has been reported to be maximal [3,7,23,28]. Animals were decapitated and brain slices containing the dorsal hippocampus were rapidly frozen. Fresh-frozen coronal sections (40-μm) were obtained, slide-mounted and counterstained with DAPI, and then labeled with FAM-DEVD-FMK. Brain sections (two per animal) were viewed under an Olympus BX51 fluorescent microscope (magnification, 200X; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) using bandpass filters for DAPI (excitation 358 nm, emission 461 nm) and FITC (excitation 490 nm, emission 520 nm) and images were acquired with a digital camera. For quantification of caspase-3 activation, fluorescence intensity in a 770-μm length in the middle part of the CA1 *stratum pyramidale* was measured using the NIH 1.61 Image J software. Mean fluorescence intensity of CA1 in the right and left hemisphere from each of the two sections was averaged to provide a single value for each animal. From these data, mean fluorescence intensity was calculated for each group.





**Fig. 3.** Progesterone reduced caspase-3 activation induced by ischemia. Left: Activated caspase-3 fluorescence (green; b, d and f) in coronal sections of the dorsal hippocampus of rats subjected either to sham procedures (SHAM; a and b), or to global ischemia and receiving vehicle (ISCH + VEH; c and d) or progesterone (ISCH + P<sub>4</sub>; e and f) at 72 h of reperfusion. Nuclei were counterstained with DAPI (blue; a, c and e). Right: fluorescence intensity values for caspase-3 activation in the ischemic animals, normalized to the corresponding values for the Sham group taken as 100% (g). so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Scale bar: 100  $\mu$ m. Tukey test: \* $p < 0.001$  vs. Sham; + $p < 0.01$ , ISCH + P<sub>4</sub> vs. ISCH + VEH. (For interpretation of the references to color in the artwork, the reader is referred to the web version of the article.)

DNA fragmentation was determined by the Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) method using the in situ cell death detection kit (Roche, Mannheim, Germany), at 72 h and 7 days after global ischemia, times at which it has been previously observed [7,19,29]. Animals were perfused with 4% paraformaldehyde in PBS. Brain slices containing the dorsal hippocampus were processed for paraffin embedding. Coronal sections (4  $\mu$ m) were processed with TUNEL reaction according to the manufacturer's instructions. Images were obtained under a fluorescent microscope (magnification, 200 $\times$ ) using the same procedure as mentioned above. TUNEL-positive cells per 770- $\mu$ m length in the middle part of the CA1 *stratum pyramidale* were counted bilaterally in 2 sections per animal. Cell counts from the right and left hippocampus on each of the two sections were averaged to provide a single value per animal. From these data, mean numbers of TUNEL-positive cells were calculated in each experimental group.

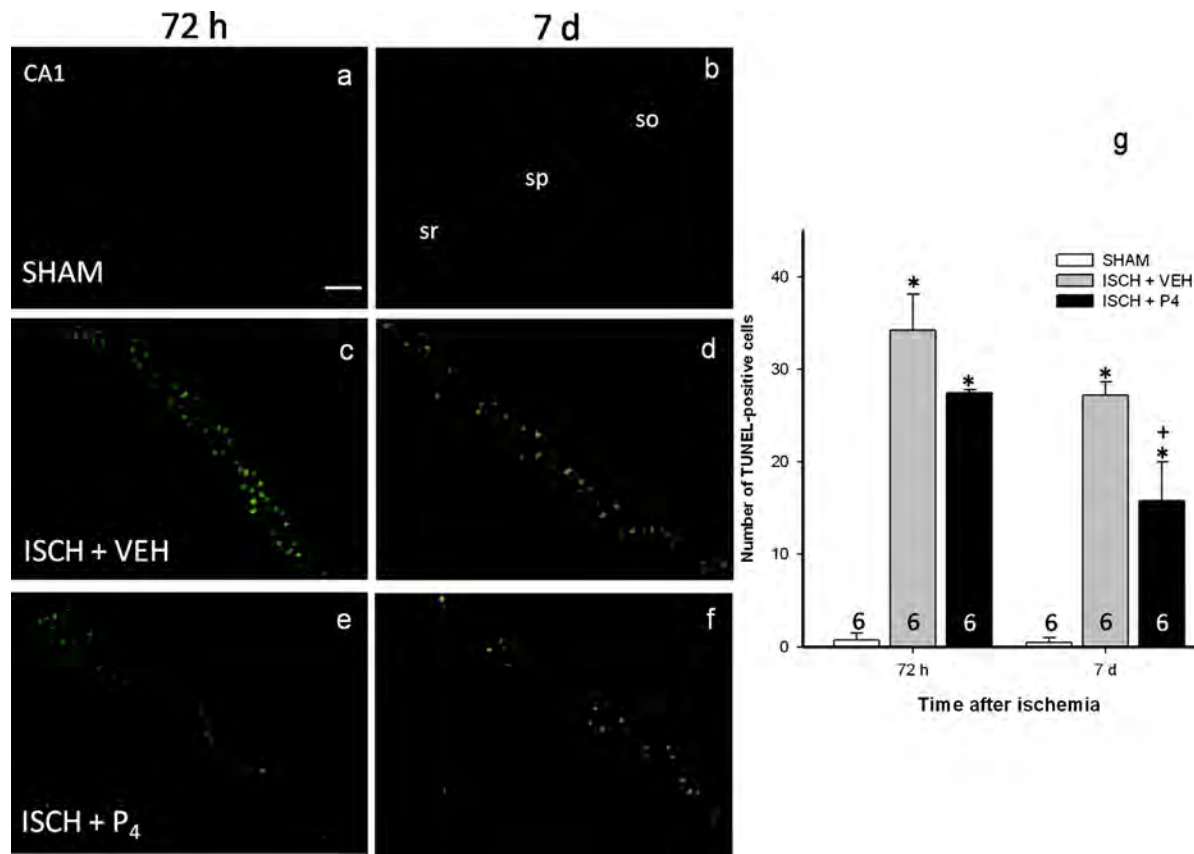
Researchers performing the counting of remaining pyramidal neurons, and caspase-3 or TUNEL-positive neurons, and measurements of OD and fluorescence intensity, were blind to group identity.

All data showed a normal distribution; they were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for each experimental group, and were compared among groups using an ANOVA followed by post hoc Tukey tests. A  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

### 3. Results

A severe and selective loss of pyramidal neurons was observed in CA1, but not in other regions of the hippocampus in the ISCH + VEH group, seven days after global ischemia (Fig. 1c, d and g), the number of remaining neurons (mean  $\pm$  SEM) ( $14.3 \pm 1.8$ ) being significantly lower ( $p < 0.001$ ) as compared to animals subjected to sham procedures ( $60.5 \pm 0.7$ ) (Fig. 1a, b and g). Abundant glial cells in the *stratum pyramidale* and *radiatum* were observed in the ISCH + VEH group (Fig. 1d). Treatment with progesterone partially reduced the pyramidal neuron loss in CA1 (Fig. 1e, f and g), the number of pyramidal neurons ( $24.0 \pm 2.5$ ) being significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in vehicle-treated rats, although still lower ( $p < 0.001$ ) than in the control group. A milder glial reaction was observed in the ISCH + P<sub>4</sub> group (Fig. 1f).

Global ischemia induced at 72 h, a significant increase ( $p < 0.001$ ) in the number of caspase-3-positive neurons in CA1, but not in the other subfields, in the ISCH + VEH group ( $26.2 \pm 1.5$ ) (Fig. 2c, d and g) as compared to the control group ( $1.7 \pm 0.8$ ) (Fig. 2a, b and g). Similarly, global ischemia induced an increase in the intensity of caspase-3 immunolabeling (Fig. 2c, d and h), mean OD values in the ISCH + VEH group being significantly higher ( $p < 0.001$ ) than those of the Sham group (Fig. 2a, b and h). Treatment with progesterone did not modify the number of caspase-3 positive neurons ( $23.7 \pm 1.8$ ) (Fig. 2e–g), but attenuated the ischemia-induced increase in the intensity of caspase-3 immunolabeling in CA1 (Fig. 2e, f and h),



**Fig. 4.** Progesterone reduced DNA fragmentation induced by ischemia. Left: TUNEL-labeling in coronal sections of the dorsal hippocampus of rats subjected either to sham procedures (SHAM; a and b), or to global ischemia and receiving vehicle (ISCH + VEH; c and d) or progesterone (ISCH + P<sub>4</sub>; e and f) at 72 h and 7 d of reperfusion. Right: numbers (mean ± SEM) of TUNEL-positive cells in CA1 *stratum pyramidale* in the three experimental groups (g). so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Scale bar: 100 μm. Tukey test: \* $p < 0.001$  vs Sham; + $p < 0.05$ , ISCH + P<sub>4</sub> vs. ISCH + VEH.

mean OD values being significantly lower ( $p < 0.01$ ) than those of vehicle-treated rats, though still higher ( $p < 0.01$ ) than in the control group.

For illustrating differences among groups in caspase-3 immunolabeling, mean OD values were normalized to percentages in relation to the control group taken as 100% (Fig. 2h).

Global ischemia induced at 72 h, an increase in caspase-3 activation in the ISCH + VEH group restricted to CA1 (Fig. 3d and g), mean fluorescence intensity values, being significantly higher ( $p < 0.001$ ) than in the control group (Fig. 3b and g). Treatment with progesterone diminished the ischemia-induced increase in caspase-3 activation in CA1 (Fig. 3f and g), mean fluorescence values in the ISCH + P<sub>4</sub> group being significantly lower ( $p < 0.01$ ) than in the ISCH + VEH group and not differing from those of the control group. For illustrating differences among groups, mean fluorescence intensity values were normalized to percentages in relation to the control group taken as 100% (Fig. 3g).

Scarce TUNEL-positive cells were observed in the Sham group (Fig. 4a and b), while abundant TUNEL-positive cells were observed in the CA1 subfield of the ISCH + VEH group both at 72 h ( $34.2 \pm 3.8$ ) and 7 days ( $26.7 \pm 1.5$ ) after global ischemia (Fig. 4c, d and g). Treatment with progesterone significantly reduced ( $p < 0.05$ ) the numbers of TUNEL-positive cells in CA1, particularly at 7 days after global ischemia ( $16.1 \pm 4.3$ ), in comparison with vehicle-treated rats (Fig. 4e–g).

#### 4. Discussion

Global cerebral ischemia results in selective and delayed death of hippocampal CA1 pyramidal neurons, a process in

which caspase-3 activation and DNA fragmentation may occur [3,7,19,23,28,29]. Results of the present study demonstrated the effectiveness of post-ischemic administration of progesterone in reducing caspase-3 levels and activation as well as DNA fragmentation, and partially reducing the loss of CA1 pyramidal neurons occurring after global cerebral ischemia.

Among the pathophysiological phenomena induced by ischemia and persisting during reperfusion, mitochondrial dysfunction mainly triggered by loss of Ca<sup>2+</sup> homeostasis occurs, and induces the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mtPTP) [14,27]. The mtPTP is constituted by several proteins including the anti-apoptotic Bcl-2 and the pro-apoptotic Bax and Bad [27]. Its opening allows the release of cytochrome c to the cytoplasm [26,31] where may interact with other pro-apoptotic proteins and activate caspase-3, inducing structural damage and DNA fragmentation [28] leading to neuronal death.

Given their temporal course, several of these phenomena may have been counteracted by post-ischemic P<sub>4</sub> treatment, possibly through a variety of cellular and molecular mechanisms of action [6,24], since post-ischemic progesterone treatment, in the present study, reduced caspase-3 levels and activation at 72 h, as well as DNA fragmentation and neuronal loss at 7 days following global cerebral ischemia in hippocampal CA1.

Phenomena leading to caspase-3 activation and DNA fragmentation are known to be reduced by P<sub>4</sub> in other models of damage. Thus, P<sub>4</sub> increases the mRNA and protein levels of the anti-apoptotic Bcl-2 and reduces those of the pro-apoptotic Bax and Bad following TBI [5,30]. In experimental MCAO, P<sub>4</sub> activates Akt which phosphorylates the pro-apoptotic protein Bad, blocking its translocation into the mitochondrial membrane [10]. P<sub>4</sub> and particularly

its active metabolite allopregnanolone, inhibit the mtPTP opening and reduce the release of cytochrome *c* in rats subjected to TBI or MCAO [25]. Moreover, P<sub>4</sub> reduces caspase-3 levels and activation, and DNA fragmentation after TBI and MCAO [4,5,10,18], and under oxygen-glucose deprivation [1]. Effects of P<sub>4</sub> on these cellular phenomena correlate with reductions of neuronal death and improvements of functional outcome [1,4,5,10,18].

In addition, other phenomena associated with the restoration of the blood flow, such as exacerbation of oxidative damage by increase in the production of reactive oxygen and nitrogen species, edema, microglial activation, and release of inflammatory cytokines, which play a key role in reperfusion injury [13,14], are known to be attenuated by P<sub>4</sub> in experimental models of global and focal ischemia, and TBI [reviewed in 6,24].

Timing of progesterone administration in relation to the global cerebral ischemic episode seems to be relevant for this hormone to exert neuroprotective effects. When P<sub>4</sub> is administered before global cerebral ischemia it is able to counteract some of the immediate pathophysiological phenomena triggered by ischemia and to prevent vulnerable neuron loss [2,8]. On the other hand, post-ischemic administration of progesterone may reduce additional damage to that elicited by the immediate harmful processes by interfering with its progression and reducing the impact of reperfusion injury-related events. Thus, P<sub>4</sub> administration in the same dose and treatment schedule as used in this study has been shown to be neuroprotective after global ischemia since, in spite of a limited preservation (20–40%) of CA1 pyramidal neurons [15,16], the functional integrity of the hippocampus was preserved, as shown by a better performance of spatial learning and memory in progesterone- than in non-treated animals, and similar to that of control rats [16]. Similar cytoarchitectural characteristics of remaining CA1 pyramidal neurons as those of intact rats [17] may have contributed to functional preservation.

In conclusion, the present study shows that reduction of caspase-3 levels and activation, as well as DNA fragmentation may be a part of the neuroprotective effects of post-ischemic P<sub>4</sub> administration against brain damage elicited by global cerebral ischemia/reperfusion. These effects could account for preservation of a neuronal population, otherwise being damaged by these mechanisms, which could be relevant for hippocampal functions after ischemia.

## Acknowledgements

This paper constitutes a partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. of CEG at the PDCB, UNAM. This study was partially supported by Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/G11-2/1029, and CEG fellowship 2010020); Secretaría de Educación Pública (PROMEP/103.5/09/4106); and CONACYT (CEG fellowship 229241). Authors thank Mr. Pedro Medina and Ms. Patricia Quintanar for their skillful technical assistance.

## References

- [1] A. Ardeshiri, M.H. Kelley, I.P. Korner, P.D. Hum, P.S. Herson, Mechanism of progesterone neuroprotection of rat cerebellar Purkinje cells following oxygen–glucose deprivation, *Eur. J. Neurosci.* 24 (2006) 2567–2574.
- [2] M. Cervantes, M.D. González-Vidal, R. Ruelas, A. Escobar, G. Morali, Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus, *Arch. Med. Res.* 33 (2002) 6–14.
- [3] J. Chen, T. Nagayama, K. Jin, R.A. Stetler, R.L. Zhu, S.H. Graham, R.P. Simon, Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia, *J. Neurosci.* 18 (1998) 4914–4928.
- [4] M. Djebaili, S.W. Hoffman, D.G. Stein, Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex, *Neuroscience* 123 (2004) 349–359.
- [5] M. Djebaili, Q. Guo, E.H. Pettus, S.W. Hoffman, D.G. Stein, The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats, *J. Neurotrauma* 22 (2005) 106–118.
- [6] C.L. Gibson, B. Coomber, J. Rathbone, Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke, *Neuroscientist* 15 (2009) 324–332.
- [7] F. Gillardon, B. Böttiger, B. Schmitz, M. Zimmermann, K.A. Hossmann, Activation of CPP-32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 50 (1997) 16–22.
- [8] M.D. González-Vidal, M. Cervera-Gaviria, R. Ruelas, A. Escobar, G. Morali, M. Cervantes, Progesterone: protective effects on the rat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia, *Arch. Med. Res.* 29 (1998) 117–124.
- [9] R.E. Hartman, J.M. Lee, G.J. Zipfel, D.F. Wozniak, Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats, *Brain Res.* 1043 (2005) 48–56.
- [10] T. Ishrat, I. Sayeed, F. Atif, F. Hua, D.G. Stein, Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway, *Neuroscience* 210 (2012) 442–450.
- [11] N. Karanjia, R.G. Geocadin, Post-cardiac arrest syndrome: update on brain injury management and prognostication, *Curr. Treat. Options Neurol.* 13 (2011) 191–203.
- [12] T. Kirino, Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia, *Brain Res.* 239 (1982) 57–69.
- [13] S. Kuroda, B.K. Siesjö, Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows, *Clin. Neurosci.* 4 (1997) 199–212.
- [14] S.L. Mehta, N. Manhas, R. Raghuraj, Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics, *Brain Res. Rev.* 54 (2007) 34–66.
- [15] G. Morali, G. Letichepía-Vallejo, E. López-Loeza, P. Montes, L. Hernández-Morales, M. Cervantes, Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus, *Neurosci. Lett.* 382 (2005) 286–290.
- [16] G. Morali, P. Montes, L. Hernández-Morales, T. Monfil, C. Espinosa-García, M. Cervantes, Neuroprotective effects of progesterone and allopregnanolone on long-term cognitive outcome after global cerebral ischemia, *Restor. Neurol. Neurosci.* 29 (2011) 1–15.
- [17] G. Morali, P. Montes, I. González-Burgos, D.A. Velázquez-Zamora, M. Cervantes, Cytoarchitectural characteristics of hippocampal CA1 pyramidal neurons of rats, four months after global cerebral ischemia and progesterone treatment, *Restor. Neurol. Neurosci.* 30 (2012) 1–8.
- [18] C.A. O'Connor, I. Cernak, F. Johnson, R. Vink, Effects of progesterone on neurologic and morphologic outcome following diffuse traumatic brain injury in rats, *Exp. Neurol.* 205 (2007) 145–153.
- [19] C.K. Petito, J. Torres-Munoz, B. Roberts, J.P. Olarte, T.S. Nowak, W.A. Pulsinelli, DNA fragmentation follows delayed neuronal death in CA1 neurons exposed to transient global ischemia in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (1997) 967–976.
- [20] W.A. Pulsinelli, J.B. Brierley, A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat, *Stroke* 10 (1979) 267–272.
- [21] W.A. Pulsinelli, J.B. Brierley, F. Plum, Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia, *Ann. Neurol.* 11 (1982) 491–498.
- [22] W.A. Pulsinelli, A.M. Buchan, The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation, *Stroke* 19 (1988) 913–914.
- [23] A. Rami, S. Jansen, I. Giesser, J. Winckler, Post-ischemic activation of caspase-3 in the rat hippocampus: evidence of an axonal and dendritic localisation, *Neurochem. Int.* 43 (2003) 211–223.
- [24] I. Sayeed, D.G. Stein, Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury, *Prog. Brain Res.* 175 (2009) 219–237.
- [25] I. Sayeed, S. Parvez, B. Wali, D. Siemen, D.G. Stein, Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone, *Brain Res.* 1263 (2009) 165–173.
- [26] T. Sugawara, M. Fujimura, Y. Morita-Fujimura, M. Kawase, P.H. Chan, Mitochondrial release of cytochrome *c* corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia, *J. Neurosci.* 19 (1999) RC39.
- [27] T. Sugawara, M. Fujimura, N. Noshita, G.W. Kim, A. Saito, T. Hayashi, P. Narasimhan, C.M. Maier, P.H. Chan, Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia, *NeuroRx* 1 (2004) 17–25.
- [28] H. Tanaka, H. Yokota, T. Jover, I. Cappuccio, A. Calderone, M. Simionescu, M.V. Bennett, R.S. Zukin, Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation, *J. Neurosci.* 24 (2004) 2750–2759.
- [29] P. Teschendorf, S.A. Padosch, F. Spöhr, M. Albertsmeier, A. Schneider, P. Vogel, Y.H. Choi, B.W. Böttiger, E. Popp, Time course of caspase activation in selectively vulnerable brain areas following global cerebral ischemia due to cardiac arrest in rats, *Neurosci. Lett.* 448 (2008) 194–199.
- [30] X.L. Yao, J. Liu, E. Lee, G.S. Ling, J.T. McCabe, Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats, *J. Neurotrauma* 22 (2005) 656–668.
- [31] R.Z. Zhan, C. Wu, H. Fujihara, K. Taga, S. Qi, M. Naito, K. Shimoji, Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome *c* from mitochondria in a rat forebrain ischemia model, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21 (2001) 529–540.

### **XIII. ANEXO 2**

Espinosa-García C, Aguilar-Hernández A, Cervantes M, Morali G. **Effects of progesterone on neurite growth inhibitors in the hippocampus following global cerebral ischemia.** Brain Res. 2013. BRES-D-13-01004

Manuscript Number: BRES-D-13-01004R1

Title: Effects of progesterone on neurite growth inhibitors in the hippocampus following global cerebral ischemia

Article Type: Research Report

Section/Category: Neurobiology of Disease

Keywords: Global cerebral ischemia; Progesterone; Neuroprotection; Nogo-A; Neurite growth inhibitors

Corresponding Author: Dr. Gabriela Morali, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto Mexicano del Seguro Social

First Author: Claudia Espinosa-García, M Sc

Order of Authors: Claudia Espinosa-García, M Sc; Alejandra Aguilar-Hernández, M Sc; Miguel Cervantes, Ph D; Gabriela Morali, PhD

Manuscript Region of Origin: MEXICO

**Abstract:** In this study, the effects of progesterone (P4) on the immunoreactivity to the neurite growth inhibitor Nogo-A, its receptor (Ng-R), and its effector Rho-A in the rat hippocampus, in association with parameters of spatial learning and memory following global cerebral ischemia, were assessed. Adult male rats were subjected to global cerebral ischemia (15 min), and treated with P4 or its vehicle, at 15 min, 2, 6, 24, 48 and 72 h of reperfusion. Immunoreactivity to Nogo-A, Ng-R, and Rho-A was evaluated at 24 h, 72 h or 7 days, or at 14 days of reperfusion after rats were tested in the Morris Water Maze (MWM). Global cerebral ischemia induced an increase in Nogo-A, Ng-R, and Rho-A immunoreactivities in the cell bodies of CA1 pyramidal neurons at 24 h after global cerebral ischemia, peaking at 72 h, and persisting 14 d later. In addition, at 72 h, a strong immunoreactivity was observed in the hippocampal layers where dendritic arborizations of CA1 pyramidal neurons are located. Treatment with P4 reduced Nogo-A, Ng-R, and Rho-A immunoreactivities in CA1, particularly at 72 h of reperfusion. These effects of P4 were consistent with parameters of a more efficient spatial learning and memory in the MWM, as compared to vehicle-treated rats. Overall results suggest the reduction of neurite growth inhibitory molecules Nogo-A, Ng-R, and Rho-A, as a part of the restorative effects of progesterone possibly allowing plastic phenomena to occur, able to support the functional preservation of the hippocampus following global cerebral ischemia.



**Dirección de Prestaciones Médicas**

Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud

Coordinación de Investigación en Salud

Unidad de Investigación Médica en Farmacología



November 19, 2013.

DR. IRWIN B. LEVITAN  
EDITOR-IN-CHIEF  
BRAIN RESEARCH

Dear Dr. Levitan,

We are pleased to send the revised version of our manuscript entitled «Effects of progesterone on neurite growth inhibitors in the hippocampus following global cerebral ischemia». We tried to follow all the suggestions given by the reviewer and to give support to those aspects being questioned. We hope having satisfied the observations. We think all comments were very constructive and helped to substantially improve our manuscript.

We hope this new version is now adequate to be published in Brain Research.

Hoping to hear from you at your earliest convenience, we remain,

Sincerely yours,

Gabriela Morali, Ph. D.  
Unidad de Investigación Médica en Farmacología,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI,  
Instituto Mexicano del Seguro Social,  
México, DF, MEXICO.

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

We appreciate all your comments, which have improved the manuscript in terms of its content and clarity. We tried to follow all the suggestions and give support to those aspects being questioned. We hope having satisfied most observations. In the following paragraphs, we are presenting every comment to the original phrasing, in italics, followed by our response in normal text.

## INTRODUCTION

1. Global cerebral ischemia/reperfusion results in a selective delayed death of CA1 hippocampal pyramidal neurons ..., that is associated both in human beings and experimental animals, with impairment of cognitive functions particularly spatial orientation, learning, and memory...

*Comment: But this is just one part of the story-global ischemia is a systemic disease, not just limited to a section of the hippocampus-and the authors need to address this issue in the Discussion, especially if growth inhibitors also play a role in the body's response to inflammation and the introduction of inflammatory factors into the brain through a compromised blood-brain-barrier. The authors may wish to reference or discuss this and also whether injury-induced regulation of glia play a role in the inhibition and/or the repair, as well as the potential effects of progesterone on these processes.*

### Response:

We agree with you that the effects of global cerebral ischemia are not just limited to a section of the hippocampus but also affect other vulnerable neural regions. We also agree that these effects may include the activation of resident microglia, the production of molecular mediators of both a peripheral and local inflammatory response, and the introduction of inflammatory factors into the brain, assuming a compromised blood-brain-barrier.

On the other hand, there is indeed evidence that a relation exists between pro-inflammatory mediators and Nogo-A expression. In fact, an increase of IL-1 $\beta$  release has been shown to be modulated by Nogo-A after traumatic brain injury in rats, and the neuroprotective effect of indomethacin after traumatic brain injury in rats was shown to be due to a reduction of Nogo-A expression which resulted in a decline of IL-1 $\beta$  release (Chao et al., 2012). Besides, blocking the IL-6 receptor results in a reduction of Nogo-A expression and increased axonal regeneration and/or sprouting in mice after spinal cord injury (Mukai et al., 2010). Thus, phrases have been added in the Introduction and in the Discussion, mentioning this. We also included some phrases on the possible role of glia on the inhibition and/or the repair, as well as the potential effects of progesterone on these processes.

Changes are as follows:

#### Introduction:

Global cerebral ischemia/reperfusion results in a selective neuronal death in particularly vulnerable regions, mainly affecting pyramidal neurons of the CA1 hippocampal subfield and layers III and V of the cerebral cortex, spiny neurons of the striatum, and Purkinje cells of the cerebellum (Kirino, 1982; Pulsinelli et al., 1982). In addition, the effects of global cerebral ischemia may include the activation of resident microglia, the production of molecular mediators of both a peripheral and local inflammatory response, and the up-regulation of adhesion molecules in endothelial cells that contribute to the infiltration of leukocytes into the brain (Barone and Kilgore, 2006; Lakhan et al., 2009; Denes et al., 2010). In particular, hippocampal CA1 pyramidal neuron damage is associated both in human beings and experimental animals, with impairment of cognitive functions particularly spatial orientation, learning, and memory (Block, 1999; Hartman et al., 2005; Zola-Morgan et al., 1986).

#### Discussion:

In response to the possibility that growth inhibitors also play a role in the body's response to inflammation, and to whether injury-induced regulation of glia play a role in the inhibition and/or the repair:

Growth inhibitors, in particular Nogo-A could play a role in the inflammatory response to ischemia, as has been evidenced in other acute CNS injuries. In fact, an increase of IL-1 $\beta$  release has been shown to be modulated by Nogo-A after traumatic brain injury in rats, since a Nogo-A antisense oligonucleotide counteracts the expected rise in IL-1 $\beta$  (Chao et al., 2012). On the other hand, blocking the IL-6 receptor results in a reduction of Nogo-A expression and increased axonal regeneration and/or sprouting in mice after spinal cord injury (Mukaino et al., 2010). Glial reaction occurring after global cerebral ischemia (Reviewed in Stoll et al., 1998; Hamill et al., 2005) may, under certain conditions, contribute to neurorepair by releasing trophic factors that favor neuronal survival and structural plasticity (Miyazaki et al., 2001; Himeda et al., 2006). However, glial cells are known to secrete pro-inflammatory cytokines including IL-6 and IL-1 $\beta$  (Sairanen et al., 1997; Orzylowska et al., 1999; Yasuda et al., 2011), existing the possibility that glia, through Nogo-A up-regulation, may contribute to neurite growth inhibition.

In relation to the potential effects of progesterone on these processes:

Several cellular and molecular mechanisms of action of progesterone could be involved in the reduction of Nogo-A and its signaling pathway. Thus, progesterone is known to reduce glial reaction (Djebaili et al., 2005; Jiang et al., 2011; Labombarda et al., 2011; Tang et al., 2013), and to attenuate glial-dependent pro-inflammatory processes accounting for neuronal damage, after TBI, spinal cord injury, and focal and global cerebral ischemia (Aggarwal et al., 2008; Gibson et al., 2005; He et al., 2004). Besides, progesterone exerts antioxidant and anti-inflammatory actions including reduction of IL-1 $\beta$ , and stimulates the production of BDNF, as alpha-tocopherol, indomethacin, and exercise respectively, described above.

2. Neither the increase of neurite growth inhibitory proteins nor the effect of neuroprotective strategies have been explored in the hippocampus after global cerebral ischemia.

***Comment:** This statement seems a little bit strong, but I suppose it depends on what they think constitutes global ischemia. The authors ought to modify their remark or at least provide an operational definition of global ischemia for more general readers.*

**Response:** With this statement, we meant that, though information already exists about the effect of other CNS injuries on the neurite growth inhibitors Nogo-A, Ng-R or Rho-A, to our knowledge, there was no information either about the effect of global cerebral ischemia on the Nogo-A signaling pathway in the hippocampus, or about the effect of any neuroprotective strategy on this pathway in the hippocampus following global cerebral ischemia. Phrasing was modified in the Introduction as follows: However, the increase of neurite growth inhibitory proteins and the effect of neuroprotective strategies on their expression have not been previously evaluated in the hippocampus after global cerebral ischemia.

An operational definition of global cerebral ischemia has been provided at the beginning of the Introduction, where the following phrase was added: Transient global cerebral ischemia is a cerebrovascular condition in which the cerebral blood flow is acutely reduced to less than 10%, as occurs in humans during cardiac failure under diverse situations, mostly cardiac arrest (Roine, 1997). It leads to high rates of mortality and permanent disability in survivors, around the world (Karanjia and Geocadin, 2011; Schneider et al., 2009).

3. These findings could be interpreted as progesterone modifying the presence of inhibitory components therefore creating a permissive environment allowing plastic repair phenomena to occur after ischemic damage.

***Comment:** What about the possibility of progesterone stimulating neurogenesis in this area of the brain? There have been papers on that (see Barha et al., for example). Is this phenomenon related to their hypothesis? Is this worth more attention in the discussion section?*

**Response:** Multiple plastic repair phenomena occur after global cerebral ischemia. Though neurogenesis is considered as one of them, and it may be stimulated in the dentate gyrus by progesterone (Liu et al., 2009; Zhang et al., 2010; Barha et al., 2011), previous data of our laboratory showing a partial preservation (20 –



40% as compared to control rats) of the pyramidal neuron population in CA1 at 7, 21, and 120 days of reperfusion, by post-ischemic progesterone treatment (Moralí et al., 2005; 2011; Espinosa-García et al., 2013) does not support neurogenesis in CA1 as the main plastic response associated with the observed hippocampal cognitive preservation. Thus, our interpretation about progesterone creating a permissive environment allowing plastic repair phenomena to occur after ischemic damage, rather focus on the reduction of physical or chemical barriers to neurite outgrowth or remodeling, and/or the increase of structural and synaptic plasticity, based on our previous data on cytoarchitectural adjustments of the remaining CA1 pyramidal neurons and the functional preservation in spite of the severe loss observed in this hippocampal region four months after ischemia (Moralí et al., 2012).

Phrasing in the Introduction was modified as follows, by including the percentages of remaining CA1 pyramidal neurons in progesterone-treated rats (20 – 40% as compared to control rats), that make us not to consider neurogenesis in CA1 as the main plastic response, within our hypothesis; and referring to the inhibitory components as constituting part of the physical or chemical barriers to neurite outgrowth or remodeling:

In particular, when P<sub>4</sub> is administered at early stages of reperfusion after global cerebral ischemia, only a low percentage (20 - 40% as compared to control rats) of CA1 pyramidal neurons is preserved (Espinosa-García et al., 2013; Moralí et al., 2005; 2011), but cognitive hippocampal-dependent functions are comparable to those of control, non-ischemic rats (Moralí et al., 2011). ... These findings could be interpreted as progesterone modifying the presence of inhibitory components that constitute part of the physical or chemical barriers to neurite outgrowth or remodeling, therefore creating a permissive environment allowing structural and synaptic plastic repair phenomena to occur after ischemic damage.

## DISCUSSION

4. From these novel findings, it seems clear that the Nogo-A neurite growth inhibitory pathway deserves further investigation in view of the potential clinical use of progesterone as a therapeutic approach in the management of global cerebral ischemia and CNS injuries having in common Nogo-A-dependent pathophysiological mechanisms of neural damage.

*Comment: The Discussion is excellent, but it would be nice if the authors would speculate on why/whether, given the others agents also available to reduce Nogo activiti(ies), progesterone might be a better alternative, or whether it is simply another drug in the medicine cabinet that could be useful. Why not discuss this a bit more?*

**Response:** We agree with your comment. A general paragraph concerning the advantages of progesterone over other agents also available to reduce Nogo activities has been added in the final part of the Discussion:

In view of the multiple pathophysiological phenomena occurring both sequentially and simultaneously after global cerebral ischemia and reperfusion, including activation of the Nogo-A signaling pathway, it is an advantage for progesterone over Nogo-A immunotherapy, for its potential clinical use, to have multiple cellular and molecular mechanisms of action capable to counteract them and to enhance morphological and functional outcomes after this condition. Effectiveness of progesterone has been demonstrated in clinical trials for traumatic brain injury (Wright et al., 2007; Xiao et al., 2008; Reviewed in Stein, 2013), an acute damage with a similar pathophysiology as ischemia, in which Nogo-A is also involved. Results of other pharmacological agents known to reduce Nogo-A inhibitory effects in experimental models, have not yet been reported in clinical trials.

## METHODS

*Comment: It can be argued that the method used for semi-quantitative measurement of Nogo-A, Ng-R and Rho-A in brain sections is not that accurate. The authors measured the area of immunoreactive (dark brown) portion of slices in hippocampal region. A better way of doing this would be to count the exact number of*

*immunopositive cells using their Image J software. The color intensity in hippocampal region could simply be the result of inadequate washing of the sections between immunoprobings with different antibodies. So, instead of measuring the dark area (OD) of the section, the authors should count the immunopositive cells. Or at least provide clear and unambiguous rationale for not doing so.*

**Response:** We measured the extension and intensity of the immunoreactive area (dark brown) to Nogo-A, Ng-R, and Rho-A in the vulnerable CA1 and subiculum hippocampal regions, as parameters of the effects of global cerebral ischemia and progesterone treatment on these proteins. This area, comprising not only the cell bodies but also the *oriens* and *radiatum strata*, was particularly observed in samples at 72 h after ischemia but not at other time periods, as shown in Figures 2, 3, and 4, with a different extension and intensity between the P4-treated and vehicle-treated animals. For this reason, we consider it is a specific reaction and not the result of inadequate washing of the sections between immunoprobings with different antibodies. However, following your suggestion, counting of positive-staining CA1 hippocampal pyramidal neurons was done, and data were included in the text of the Results section.

*Comment: The authors used polyclonal antibodies for Nogo-A, Ng-R and Rho-A proteins that are likely to give false staining, because polyclonal antibodies show a high range of non-specific binding. So it is possible that the dark brown area in brain slice could be due to the non-specific binding of polyclonal antibodies. To more accurate, it may be better if the authors had used monoclonal antibodies. Again, at the very least, they should provide clear and unambiguous rationale for not doing so.*

**Response:** We agree that polyclonal antibodies are able to recognize multiple epitopes of an antigen. We also agree that monoclonal antibodies usually produce less background staining than polyclonal ones. However, in the specific case of Nogo-A, with the exception of the monoclonal antibody 11C7 (Novartis Pharma) used by Oertle et al., 2003; Cheatwood et al., 2008; Zagrebelsky et al., 2010, most commercially available monoclonal anti-Nogo-A antibodies have only been tested in Western blot and ELISA (MyBioSource, Millipore), while for immunohistochemistry, several polyclonal antibodies have also been effective (Abcam, Santa Cruz Biotechnology). In this regard, several groups have performed immunohistochemistry for Nogo-A, Ng-R and Rho-A using polyclonal antibodies (Zhou et al., 2003; Mingorance et al., 2004; Jiang et al., 2009; Chao et al., 2012; VanGuilder et al., 2012), including the same Nogo-A antibody used in our study (Chen et al., 2009). We consider difficult that the dark brown area in brain slice could be due to the non-specific binding of polyclonal antibodies, since this staining was specifically observed in the subiculum and CA1, at 72 h after ischemia.

*Comment: How many animals were used in each treatment group and for each time point (24h, 72h, 7 and 14 days) within the group for immunostaining? It seems that very few rats (2-3) were euthanized for each time point, which makes the findings weak.*

**Response:** We apologize for this lack of clarity. Four to ten subjects were included in each treatment group for each time point, so that a total of 21 rats were included in the vehicle-treated group and 24 in the P<sub>4</sub>-treated group; four animals were used as controls in Sham groups at each time point. We have included the numbers of animals studied at the different time points after ischemia, in the Methods section, and for 72 h, in Figures 2, 3, and 4.

## HIGHLIGHTS

- Global cerebral ischemia increased Nogo-A, Ng-R, and Rho-A in CA1 pyramidal neurons
- Progesterone reduced immunoreactivity to Nogo-A, Ng-R and Rho-A induced by ischemia
- This reduction occurred in rats with preserved hippocampal-dependent functions

## **Effects of progesterone on neurite growth inhibitors in the hippocampus following global cerebral ischemia**

Claudia Espinosa-García<sup>1</sup>, Alejandra Aguilar-Hernández<sup>1</sup>, Miguel Cervantes<sup>2</sup>, Gabriela Morali<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS. México DF. México.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Univ. Michoacana de SNH, Morelia, Michoacán, México.

\*Send correspondence to:

Gabriela Morali, Ph.D.

Unidad de Investigación Médica en Farmacología

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Eugenia 626-Girasol-302, Col. Del Valle

México 03100 DF, MEXICO

Phone: 52 (555) 687-8606

E-mail: [gmorali@hotmail.com](mailto:gmorali@hotmail.com)

## ABSTRACT

In this study, the effects of progesterone (P<sub>4</sub>) on the immunoreactivity to the neurite growth inhibitor Nogo-A, its receptor (Ng-R), and its effector Rho-A in the rat hippocampus, in association with parameters of spatial learning and memory following global cerebral ischemia, were assessed. Adult male rats were subjected to global cerebral ischemia (15 min), and treated with P<sub>4</sub> or its vehicle, at 15 min, 2, 6, 24, 48 and 72 h of reperfusion. Immunoreactivity to Nogo-A, Ng-R, and Rho-A was evaluated at 24 h, 72 h or 7 days, or at 14 days of reperfusion after rats were tested in the Morris Water Maze (MWM). Global cerebral ischemia induced an increase in Nogo-A, Ng-R, and Rho-A immunoreactivities in the cell bodies of CA1 pyramidal neurons at 24 h after global cerebral ischemia, peaking at 72 h, and persisting 14 d later. In addition, at 72 h, a strong immunoreactivity was observed in the hippocampal layers where dendritic arborizations of CA1 pyramidal neurons are located. Treatment with P<sub>4</sub> reduced Nogo-A, Ng-R, and Rho-A immunoreactivities in CA1, particularly at 72 h of reperfusion. These effects of P<sub>4</sub> were consistent with parameters of a more efficient spatial learning and memory in the MWM, as compared to vehicle-treated rats. Overall results suggest the reduction of neurite growth inhibitory molecules Nogo-A, Ng-R, and Rho-A, as a part of the restorative effects of progesterone possibly allowing plastic phenomena to occur, able to support the functional preservation of the hippocampus following global cerebral ischemia.

### *Keywords:*

Global cerebral ischemia; Progesterone; Neuroprotection; Nogo-A; Neurite growth inhibitors

## **1. Introduction**

Transient global cerebral ischemia is a cerebrovascular condition in which the cerebral blood flow is acutely reduced to less than 10%, as occurs in humans during cardiac failure under diverse situations, mostly cardiac arrest (Roine, 1997). It leads to high rates of mortality and permanent disability in survivors, around the world (Karanjia and Geocadin, 2011; Schneider et al., 2009).

Global cerebral ischemia/reperfusion results in a selective neuronal death in particularly vulnerable regions, mainly affecting pyramidal neurons of the CA1 hippocampal subfield and layers III and V of the cerebral cortex, spiny neurons of the striatum, and Purkinje cells of the cerebellum (Kirino, 1982; Pulsinelli et al., 1982). In addition, the effects of global cerebral ischemia may include the activation of resident microglia, the production of molecular mediators of both a peripheral and local inflammatory response, and the up-regulation of adhesion molecules in endothelial cells that contribute to the infiltration of leukocytes into the brain (Barone and Kilgore, 2006; Lakhan et al., 2009; Denes et al., 2010). In particular, hippocampal CA1 pyramidal neuron damage is associated both in human beings and experimental animals, with impairment of cognitive functions particularly spatial orientation, learning, and memory (Block, 1999; Hartman et al., 2005; Zola-Morgan et al., 1986).

In the remaining CA1 pyramidal neurons, short- and long-term axonal and dendritic anatomical signs of damage but also of compensatory plastic responses occur after global cerebral ischemia (Briones et al., 2006; Mudrick and Baimbridge, 1989; Neigh et al., 2004; Ruan et al., 2006; 2009; 2012; Skibo and Nikonenko, 2010). Plasticity, however, is limited in part due to the presence of inhibitory components that create a non-permissive environment (Sandvig et al., 2004). Among them, myelin-associated proteins that regulate neurite growth such as Nogo-A are known to restrict anatomical plasticity and functional recovery (Pernet and Schwab, 2012). Nogo-A exerts its effects through the Nogo-receptor (Ng-R), which activates the Rho-A GTPase, mediating neurite growth inhibition (Akbik et al., 2012; Overman and Carmichael, 2013; Pernet and Schwab, 2012). An up-regulation of Nogo-A, Ng-R, and Rho-A, has been demonstrated to occur in pyramidal neurons of the cerebral cortex after global (Zhou et al.,

2003), as well as focal (Cheatwood et al., 2008; Jiang et al., 2009) cerebral ischemia. Its inhibition with specific antibodies anti-Nogo-A (IN-1) and anti-Ng-R (NEP1-40), has been demonstrated to promote plastic changes including increases of dendritic arborizations and spine density (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Seymour et al., 2005), as well as functional recovery after middle cerebral artery occlusion (MCAO) (Cheatwood et al., 2008; Fang et al., 2010; Lee et al., 2004; Tsai et al., 2007; 2011; Weissner et al., 2003). In this respect, there are two ongoing studies with Nogo-A antibodies phase I/II clinical trials for patients with spinal cord injury ([www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00406016](http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00406016)) and with amyotrophic lateral sclerosis ([www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00875446](http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00875446)).

However, the increase of neurite growth inhibitory proteins and the effect of neuroprotective strategies on their expression have not been previously evaluated in the hippocampus after global cerebral ischemia.

Progesterone ( $P_4$ ) exerts neuroprotective and neurorestorative effects in several models of brain injury (Gibson et al., 2009; Sayeed and Stein, 2009b; Schumacher et al., 2012). In particular, when  $P_4$  is administered at early stages of reperfusion after global cerebral ischemia, only a low percentage (20 - 40% as compared to control rats) of CA1 pyramidal neurons is preserved (Espinosa-García et al., 2013; Morali et al., 2005; 2011), but cognitive hippocampal-dependent functions are comparable to those of control, non-ischemic rats (Morali et al., 2011). In addition, CA1 pyramidal neurons of  $P_4$ -treated animals show similar cytoarchitectonic characteristics to those of intact rats, in terms of dendritic arborizations and spine density, but with a compensatory increase in the proportion of mushroom-type dendritic spines, conditions not shown by ischemic non-treated rats (Morali et al., 2012). These findings could be interpreted as progesterone modifying the presence of inhibitory components that constitute part of the physical or chemical barriers to neurite outgrowth or remodeling, therefore creating a permissive environment allowing structural and synaptic plastic repair phenomena to occur after ischemic damage.

The aim of the present study was to assess the effects of progesterone on the immunoreactivity to Nogo-A, Ng-R, and Rho-A in the hippocampus of rats subjected to global cerebral ischemia/reperfusion, in relation to their performance of a spatial learning and memory task.

## **2. Results**

### 2.1 Effects of progesterone on spatial learning and memory impairments induced by ischemia

#### 2.1.1 Spatial learning

In the Sham group, escape latencies showed a progressive reduction over the successive trials (Fig. 1a), the values being significantly lower ( $p < 0.05$ ) from the third to the sixth day of testing in comparison to those on the first day.

ISCH+VEH rats only showed a slight, non significant reduction of the escape latencies on the successive days of testing as compared to values on the first day. Their escape latencies on days 4 to 6 were significantly longer ( $p < 0.01$ ) than those of the Sham group (Fig. 1a).

On the other hand, rats in the ISCH+P<sub>4</sub> group showed a reduction of the escape latencies in the successive days of testing, similar as those of the Sham group, the values being significantly lower ( $p < 0.05$ ) on days 3 to 6 as compared to the first day (Fig. 1a). Values of escape latencies were significantly lower than those in the ISCH+VEH group on days 4 to 6 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ , respectively).

#### 2.1.2 Spatial memory

Number of crossings over the former platform location during the probe trial, was lower in the ISCH+VEH group ( $p < 0.01$ ) in relation to that in the Sham group; rats in the ISCH+P<sub>4</sub> group had a significantly higher number of crossings ( $p < 0.05$ ) than rats in the ISCH+VEH group, not differing from that of the Sham group (Fig. 1b). This parameter is illustrated in Fig. 1c, where the persistent search for the platform through the target quadrant during the probe trial is displayed by rats in the Sham group. Those in the ISCH+VEH group showed a random pattern, sometimes with circular swimming through the four quadrants and occasionally crossing over the platform location. Rats in the ISCH+P<sub>4</sub> group also showed a persistent search for the platform in the target quadrant, as those in the Sham group (Fig. 1c).



## 2.2 Effects of global cerebral ischemia and of progesterone treatment on immunoreactivity to Nogo-A, Ng-R, and Rho-A in the hippocampus

In the Sham group, Nogo-A (Fig. 2a) and Ng-R (Fig.3a) immunoreactivities were observed in the *strata radiatum* and *oriens* of the CA1 to CA3 hippocampal subfields, as well as in the inner molecular layer of the dentate gyrus. In addition, Ng-R immunoreactivity was also observed in the *stratum lucidum* of CA3. Weak immunoreactivity to Nogo-A and Ng-R was observed in very scarce cell bodies in the *stratum pyramidale*. On the other hand, Rho-A immunoreactivity was observed in the cell bodies of the pyramidal neurons in the various subfields of the hippocampus and in the granular neurons of the dentate gyrus (Fig. 4a).

Twenty-four hours after global cerebral ischemia, immunoreactivity to Nogo-A (Fig. 2b) and Ng-R (Fig. 3b), as well as an increase of immunoreactivity to Rho-A (Fig. 4b), were observed in the cell bodies of pyramidal neurons in the various subfields of the Ammon's horn, mainly in the subiculum and CA1. Immunoreactivity in the subiculum and CA1 persisted until 14 d after ischemia (Figs. 2d, f, h; 3d, f, h; 4d, f, h). A strong immunoreactivity to Nogo-A (Fig 2d), Ng-R (Fig 3d), and Rho-A (Fig 4d) was observed in a wide area encompassing the *strata radiatum*, *oriens*, and *pyramidale* of both the subiculum and CA1, at 72 h after ischemia (Figs. 2d, j; 3d, j; 4d, j), but not at later periods, mean OD values being significantly higher ( $p < 0.001$ ) than those of the Sham group (Figs. 2d, k; 3d, k; 4d, k). In addition, at the same time period, a significant increase (Nogo-A:  $p < 0.01$ ; Ng-R:  $p < 0.001$ ) in the mean number of Nogo-A- and Ng-R-positive neurons was observed in CA1 in the ISCH+VEH group (Mean  $\pm$  SEM; Nogo-A:  $15.8 \pm 1.0$ ; Ng-R:  $24.0 \pm 1.4$ ) (Figs. 2d; 3d) as compared to the Sham group (Nogo-A:  $0.8 \pm 0.5$ ; Ng-R:  $1.0 \pm 0.3$ ) (Figs. 2a; 3a). No differences were found in the number of Rho-A-positive neurons between the ISCH+VEH and the Sham group.

Ischemic rats treated with progesterone showed a similar pattern of localization of immunoreactivity to Nogo-A (Fig. 2c, e, g, i), Ng-R (Fig. 3c, e, g, i), and Rho-A (Fig. 4c, e, g, i) at the various periods after ischemia. However, the extension of the immunoreactive areas to each of the three proteins observed at 72 h in the hippocampus was significantly smaller (Nogo-

A and Ng-R:  $p < 0.05$ ; Rho-A:  $p < 0.01$ ) than that of vehicle-treated rats (Figs. 2e, j; 3e, j; 4e, j). Similarly, intensity of the immunoreactivity to each of these proteins, i.e., mean OD, was significantly lower (Nogo-A:  $p < 0.001$ ; Ng-R:  $p < 0.05$ ; Rho-A:  $p < 0.01$ ) in progesterone-treated as compared to vehicle-treated rats (Figs. 2e, k; 3e, k; 4e, k), though still higher than in the Sham group ( $p < 0.001$  in the three cases). In the ISCH+P<sub>4</sub> group, mean numbers of Nogo-A- and Rho-A-positive neurons (Nogo-A:  $17.8 \pm 1.7$ ; Rho-A:  $17.2 \pm 1.5$ ) (Figs. 2e; 4e) were similar to those of the ISCH+VEH group, while that of Ng-R-positive neurons ( $15.9 \pm 1.7$ ) was significantly lower than those of the ISCH+VEH group ( $p < 0.01$ ) in CA1 (Fig. 3e).

### **3. Discussion**

We demonstrate here the up-regulation of the neurite growth inhibitor Nogo-A, its receptor Ng-R and its effector Rho-A in the hippocampal CA1 subfield of rats subjected to global cerebral ischemia/reperfusion. An additional, very relevant finding of this study is that post-ischemic administration of progesterone reduced Nogo-A, Ng-R and Rho-A immunoreactivities in the hippocampus. Reduction of these proteins could be an additional evidence of the neuroprotective/neurorestorative effects of progesterone, since it occurred in rats showing a preservation of cognitive hippocampal-dependent functions.

Global cerebral ischemia is known to result in a selective death of CA1 hippocampal pyramidal neurons, and the few surviving neurons often show alterations in dendritic distribution, and reductions of both neurite extension and synaptic density (Kovalenko et al., 2006; Mudrick and Baimbridge, 1989; Neigh et al., 2004; Onodera et al., 1990; Ruan et al., 2006; 2009; 2012; Reviewed in Cervantes et al., 2012), usually associated with impairment of cognitive functions, such as permanent deficits in spatial learning and memory (Block 1999; Hartman et al., 2005; Neigh et al., 2004; Zola-Morgan et al., 1986).

By contrast, some structural changes also occur contributing to neuronal circuit remodeling such as neurite and synaptic restructuring (Onodera et al., 1990; Ruan et al., 2006; 2009), interpreted as compensatory plastic responses of surviving neurons in vulnerable brain structures.

Spontaneous recovery of function after ischemia, however, is limited by a restrictive environment for plasticity in the adult CNS which includes the neurite growth inhibitors, such as Nogo-A. Nogo-A has been shown to control the stability of dendritic arborizations and the physiological synaptic plasticity of adult hippocampal neurons (Delekate et al., 2011; Zagrebelsky et al., 2010). Nogo-A binds to the receptor Ng-R and activates the Rho-A GTPase that prevents actin cytoskeleton polymerization and thereby blocks neurite extension (Reviewed in Akbik et al., 2012; Overman and Carmichael, 2013; Pernet and Schwab, 2012).

The pattern of localization of Nogo-A, Ng-R and Rho-A in dendritic arborizations and cell bodies of pyramidal and granular neurons of the adult hippocampus has been previously described (VanGuilder et al., 2012; Huber et al., 2002; O'Kane et al., 2003; Mingorance et al., 2004; Wang et al., 2002; Zagrebelsky et al., 2010). Data of the present study are consistent with those descriptions.

An up-regulation of Nogo-A, Ng-R and Rho-A has been demonstrated to occur in pyramidal neurons of the cerebral cortex after global (Zhou et al., 2003) and focal (Cheatwood et al., 2008; Jiang et al., 2009) cerebral ischemia, as well as in perilesional neurites after spinal cord injury (Hunt et al., 2003). In fact, a transient increase in the expression of Nogo-A at the level of mRNA and protein occurs in the lesion area of the cerebral cortex as early as 12 h, peaking at 24 h, and then declining at 96 h and 7 d after middle cerebral artery occlusion (MCAO) (Jiang et al., 2009). In a long-term study, a prolonged increase in the levels of Nogo-A has been observed at days 1, 3, 7, 14, and being higher at 28 d both in the ipsi- and contralesional cortical areas following MCAO (Cheatwood et al., 2008). Similarly, an increase of Nogo-A has been shown to occur in the cerebral cortex at 12, 24, and 48 h after global cerebral ischemia, while Ng-R and Rho-A are increased at 6 h and remain high at 7 d after ischemia (Zhou et al., 2003). On the other hand, it has been reported an increase of Nogo-A immunoreactive injured dorsal column fibers at the borders of the lesion at days 8 and 16 after spinal transection injury (Hunt et al., 2003). Parameters of functioning of the lesioned structures were not evaluated in these studies. No data existed on the effects of global cerebral ischemia on the inhibitory Nogo-A signaling pathway in the hippocampus. Results of the present study showed an increase of Nogo-A, Ng-R

and Rho-A immunoreactivities in the cell bodies of pyramidal neurons of the hippocampal CA1 subfield at 24 h after global cerebral ischemia, peaking at 72 h, and persisting 14 d later. In addition, a strong immunoreactivity was observed at 72 h after ischemia in the hippocampal layers where dendritic arborizations of CA1 pyramidal neurons are located. Up-regulation of these proteins in vulnerable areas of the hippocampus is consistent with that previously described in pyramidal neurons of the cerebral cortex after focal and global cerebral ischemia (Cheatwood et al., 2008; Jiang et al., 2009; Zhou et al., 2003).

Contribution of these inhibitory proteins to a restrictive environment for plasticity in the CNS, which interferes with repair processes and functional improvement after injury, has been supported by various experimental evidences. Thus, blocking Nogo-A or Ng-R inhibitory effects with specific antibodies (IN-1 and NEP1-40, respectively), has been demonstrated to enhance the formation of compensatory circuits, and functional recovery after CNS injury. In fact, anti-Nogo-A and anti-Ng-R immunotherapy administered either immediately, 24 h, 7 d, or even 9 wk after focal cerebral ischemia leads to axonal compensatory growth (Papadopoulos et al., 2002; 2006; Seymour et al., 2005; Tsai et al., 2011; Wang et al., 2010; Weissner et al., 2003), and to increases in dendritic arborizations and spine density (Papadopoulos et al., 2006). These compensatory changes were correlated with functional recovery as evaluated in the staircase test and the forelimb reaching task (Fang et al., 2010; Papadopoulos et al., 2002; 2006; Tsai et al., 2007; 2011; Weissner et al., 2003).

Growth inhibitors, in particular Nogo-A, could play a role in the inflammatory response to ischemia, as has been evidenced in other acute CNS injuries. In fact, an increase of IL-1 $\beta$  release has been shown to be modulated by Nogo-A after traumatic brain injury in rats, since a Nogo-A antisense oligonucleotide counteracts the expected rise in IL-1 $\beta$  (Chao et al., 2012). On the other hand, blocking the IL-6 receptor results in a reduction of Nogo-A expression and increased axonal regeneration and/or sprouting in mice after spinal cord injury (Mukaino et al., 2010). Glial reaction occurring after global cerebral ischemia (Reviewed in Stoll et al., 1998; Hamill et al., 2005) may, under certain conditions, contribute to neurorepair by releasing trophic factors that favor neuronal survival and structural plasticity (Miyazaki et al., 2001; Himeda et

al., 2006). However, glial cells are known to secrete pro-inflammatory cytokines including IL-6 and IL-1  $\beta$  (Sairanen et al., 1997; Orzylowska et al., 1999; Yasuda et al., 2011), existing the possibility that glia, through Nogo-A up-regulation, may contribute to neurite growth inhibition. Besides immunotherapy, some non-pharmacological experimental strategies modulate the Nogo-A signaling pathway. Among them, hyperbaric oxygen therapy administered for 2 h starting at 1 h after global cerebral ischemia, has been shown to reduce Nogo-A, Ng-R, and Rho-A protein levels in the cerebral cortex from 6 h to 7 d after ischemia (Zhou et al., 2003). Similarly, 1 wk of voluntary running wheel exercise starting 3 d after fluid-percussion injury to the brain, has been demonstrated to prevent the increase of Nogo-A levels in the hippocampus, through a mechanism mediated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Chytrova et al., 2008).

Scarce information exists on the effects of drugs commonly used as neuroprotective or neurorestorative agents, on the plasticity-inhibitory Nogo-A signaling pathway. Ephedrine, an indirect sympathomimetic agent, administered immediately after neonatal ischemia and once a day for 7 d, attenuates the immunoreactivity to Nogo-A in the cerebral cortex and to caspase-3 in the hippocampus at 7 d, and reduces spatial learning and memory deficits evaluated at 4 wk following the hypoxia-ischemia episode (Chen et al., 2009). Alpha-tocopherol, a natural antioxidant, administered 6 h after TBI and once a day, attenuates the expression (mRNA and protein) of Nogo-A in the cerebral cortex from day 1 to 21, and of Ng-R at days 14 and 21, and reduces the neurological deficits from day 3 to 14 after injury (Yang et al., 2013). Indomethacin, a potent non-steroidal anti-inflammatory drug, administered immediately after TBI, suppresses the increase in Nogo-A expression (mRNA and protein) in the hippocampus at 8 h, correlating with a reduced production of IL-1 $\beta$  (Chao et al., 2012).

Progesterone, having several cellular and molecular mechanisms of action, is known to exert neuroprotective and neurorestorative effects in several experimental models of CNS injury, by interfering with several pathophysiological phenomena, and promoting repair processes. This hormone reduces cerebral edema (Guo et al., 2006; Roof et al., 1996), lipoperoxidation (Ozacmac et al., 2009; Roof et al., 1997), mitochondrial dysfunction (Sayeed et al., 2009a),

apoptosis (Djebaili et al., 2004; 2005; Espinosa-García et al., 2013; Ishrat et al., 2012; Yao et al., 2005), and the inflammatory response (Aggarwal et al., 2008; Gibson et al., 2005) after ischemic and traumatic brain injury. Besides, progesterone promotes remyelination (Labombarda et al., 2009), synaptogenesis (Zhao et al., 2011), neurogenesis (Barha et al., 2011; Zhang et al., 2010), and the expression of growth factors as BDNF (Cekic et al., 2012; González et al., 2004), after TBI, spinal cord injury, or global cerebral ischemia.

Results of the present study showed that administration of progesterone after global cerebral ischemia attenuated the increased immunoreactivity to Nogo-A, Ng-R and Rho-A in the hippocampus. These results may be interpreted as a novel restorative effect of progesterone, through reduction of a relevant inhibitory neurite growth pathway.

Several cellular and molecular mechanisms of action of progesterone could be involved in the reduction of Nogo-A and its signaling pathway. Thus, progesterone is known to reduce glial reaction (Djebaili et al., 2005; Jiang et al., 2011; Labombarda et al., 2011; Tang et al., 2013), and to attenuate glial-dependent pro-inflammatory processes accounting for neuronal damage, after TBI, spinal cord injury, and focal and global cerebral ischemia (Aggarwal et al., 2008; Gibson et al., 2005; He et al., 2004). Besides, progesterone exerts antioxidant and anti-inflammatory actions including reduction of IL-1 $\beta$ , and stimulates the production of BDNF, as alpha-tocopherol, indomethacin, and exercise respectively, described above.

The reduction of the Nogo-A signaling pathway by progesterone, evidenced in the present study, may have contributed to the preservation of the neural substrate of hippocampal-dependent spatial learning and memory previously observed to occur four months after global cerebral ischemia, in spite of a severe CA1 pyramidal neurons loss in the hippocampus (Moralí et al., 2011). This effect of progesterone may have enhanced neuronal plasticity, thus favoring the preservation of CA1 pyramidal neurons cytoarchitecture, including an increase in the proportion of mushroom-type dendritic spines, as compensatory plastic changes, not observed in ischemic non-treated rats (Moralí et al., 2012). These data suggest that progesterone may have provided the surviving neurons with a less restrictive environment to participate in the CNS

repair phenomena including neurite and synaptic restructuring, known to occur though at a limited degree after ischemic damage, and relevant for functional preservation.

In view of the multiple pathophysiological phenomena occurring both sequentially and simultaneously after global cerebral ischemia and reperfusion, including activation of the Nogo-A signaling pathway, it is an advantage for progesterone over Nogo-A immunotherapy, for its potential clinical use, to have multiple cellular and molecular mechanisms of action capable to counteract them and to enhance morphological and functional outcomes after this condition.

Effectiveness of progesterone has been demonstrated in clinical trials for traumatic brain injury (Wright et al., 2007; Xiao et al., 2008; Reviewed in Stein, 2013), an acute damage with a similar pathophysiology as ischemia, in which Nogo-A is also involved. Results of other pharmacological agents known to reduce the Nogo-A inhibitory effects in experimental models, have not yet been reported in clinical trials.

In conclusion, our data demonstrate that progesterone attenuated the ischemia-induced increase of the neurite growth inhibitors Nogo-A, Ng-R and Rho-A, consistent with a more efficient performance of spatial learning and memory. This could be interpreted as a restorative effect of progesterone possibly allowing plastic phenomena to occur, able to support the functional preservation of the hippocampus following global cerebral ischemia.

From these novel findings, it seems clear that the Nogo-A neurite growth inhibitory pathway deserves further investigation in view of the potential clinical use of progesterone as a therapeutic approach in the management of global cerebral ischemia and CNS injuries having in common Nogo-A-dependent pathophysiological mechanisms of neural damage.

#### **4. Experimental Procedures**

Experimental procedures were performed in accordance with the NIH guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996 and approved by the Research Ethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

##### **4.1 Animal groups and treatments**

Adult male Sprague-Dawley rats weighting 400-500 g were used. Animals were housed individually in standard rat cages under room temperature and a light controlled environment with a 12/12 h light/dark cycle, with free access to food and water. Rats were randomly assigned to groups that were subjected to one of the following experimental conditions: Sham, animals were subjected to the anesthetic and surgical procedures without interruption of cerebral blood flow; ISCH+VEH, animals were subjected to global cerebral ischemia by the four-vessel occlusion model (4VO) and received the vehicle of progesterone (20% 2-hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, in sterile water, 0.5 ml, i.v.); and ISCH+P<sub>4</sub>, animals were subjected to 4VO and received progesterone (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, 8 mg/kg, i.v.) at various times after the onset of reperfusion: 15 min, 2, 6, 24, 48, and 72 h. For administration of P<sub>4</sub> or vehicle, a catheter (Clay Adams, PE-50) was inserted into the right internal jugular vein. Subgroups of four to ten rats in each experimental condition were studied at different time points of reperfusion or sham procedures (24 h, 72 h, or 7 d, or at 14 d after being tested for spatial learning and memory), as described below. A total of 21 rats (24 h: 4; 72 h: 8; 7 d: 5; 14 d: 4) were included in the vehicle-treated group, and 24 (24 h: 4; 72 h: 10; 7 d: 4; 14 d: 6) in the P<sub>4</sub>-treated group; four animals were used as controls in Sham groups at each time point.

#### **4.2 Global cerebral ischemia model**

Animals were subjected to global cerebral ischemia by the 4VO model (Pulsinelli and Brierley, 1979; Pulsinelli and Buchan, 1988), routinely used in our laboratory (Espinosa-García et al., 2013; Morali et al., 2005; 2011; 2012). Briefly, under anesthesia with xylazine (10 mg/kg i.m.) and ketamine (90 mg/kg i.m.), the vertebral arteries were permanently occluded by electrocauterization. Forty eight hours later, under sevoflurane anesthesia (2% sevoflurane in oxygen), common carotid arteries were exposed, anesthesia was discontinued, and the arteries were transiently occluded for 15 min using microvascular clamps. Body temperature was monitored and maintained at 36-37°C throughout the entire procedure. Only rats remaining unconscious, with complete loss of the righting reflex both during ischemia and for 20 to 50 min



afterwards, as a neurological sign of having suffered a severe ischemia, were included in the study.

### **4.3 Spatial learning and memory**

For animals in which the brain was studied at 14 days, spatial learning and memory tests were performed starting at seven days of reperfusion or sham procedures, by using the Morris water maze test (MWM) (Morris, 1984), as previously described (Moralí et al., 2011). A black circular pool (140 cm in diameter, 50 cm height) filled with violet-stained water (27°C, 25 cm depth), and located in a room with a variety of extra maze stationary clues, was used. The maze was conceptually divided into four quadrants and three concentric annuli. An escape platform (13 x 13 cm) was hidden 2 cm below the surface of the water in a fixed location in the center of one of the four quadrants (target quadrant). Rats were required to find the platform using distal spatial clues, which were maintained constant throughout testing. Each rat performed two escape trials with a 20 min interval, in each of six days of testing. For each trial, the rat was placed into the water facing the wall at one of four starting points that varied every day. Each trial was ended when the rat found the platform (escape latency) within 60 sec; otherwise, the rat was guided to it by the experimenter and a score of 60 sec was assigned as escape latency. The rat was allowed to stay on the platform for 15 sec to learn its location. The animal's performance on each trial was recorded by using an overhead video camera. The escape latencies (sec) were determined for each trial, and data of both trials for each rat in each daily session were averaged. From these individual data, mean values were calculated for each experimental group. On the day after completion of the tests, each rat was subjected to a probe trial (60 sec) to assess their spatial memory, in which the platform was removed. The number of crossings over the former platform location in the target quadrant was recorded. Mean values were calculated for each experimental group.

### **4.4 Immunohistochemistry for Nogo-A, Ng-R and Rho-A**

At the selected time points of reperfusion or sham procedures (24 h, 72 h, 7 d, and 14 d), rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (35 mg/kg, i.p.), and intracardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer solution (PBS). Brains were removed and

immersed in the same fixative (4°C) for 18 h. Coronal slices (3-mm thick) from each brain containing the dorsal hippocampus were washed and immersed in gradually increasing concentrations of sucrose in PBS (10%, 20% and 30% for 24 hours each), and then frozen. Rabbit polyclonal antibodies, anti-Nogo-A (2.5 µg/mL; Abcam Cambridge, MA, USA), anti-Ng-R (1:400; Abcam Cambridge, MA, USA), and anti-Rho-A (1:1000; Abcam Cambridge, MA, USA) were used. Free-floating coronal sections (40-µm) were treated with a peroxidase blocking reagent (DAKO, CA, USA), permeabilized with PBS containing 1% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), blocked with 5% bovine serum albumin (GE Health Care, UK) diluted in PBS containing 1% Triton X-100, and incubated with the primary antibody at 4°C for 48 h. Then, sections were washed and incubated both with a biotinylated secondary antibody and a peroxidase-labeled streptavidin reagent (LSAB+ System-HRP Kit; DAKO, CA, USA) for 30 min each, followed by 3-3'-diaminobenzidine (DAKO, CA, USA). Omission of primary or secondary antibodies, as negative controls, resulted in absence of immunolabeling.

For semiquantitative analysis of the extension and the intensity of immunoreactivity, images of the hippocampus were captured under a light microscope (magnification, 40X) and converted into an 8-bit 256 grey-scale image using the NIH 1.61 Image J software. The immunoreactive area of the hippocampus was outlined in the digital image after automatic adjustment of the threshold and its extension (mm<sup>2</sup>) was measured. Mean optical density (OD) of the immunoreactive area was measured and OD values of the *corpus callosum* as background were subtracted for the respective hippocampus. In images of the CA1 hippocampal subfield, captured at a 400X magnification, the number of Nogo-A, Ng-R and Rho-A-positive neurons per 540-µm length in the middle part of the CA1 pyramidal cell layer (*stratum pyramidale*), were counted. For the three parameters, values of the right and left hippocampus on two sections per animal were averaged to have a mean individual value. From these data, mean values were calculated for each experimental group.

## **5. Statistical analysis**

All data showed a normal distribution; they were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for each experimental group.

Parameters of performance in the Morris water maze were analyzed as follows: Group differences in escape latencies over the 6-day testing period were analyzed by repeated-measures ANOVA followed by Tukey tests. Daily averages of this parameter were analyzed by ANOVA followed by paired-samples *t* test (within-group differences) and by ANOVA followed by Tukey tests (between-group differences). Numbers of crossings over the former platform location in the target quadrant during the probe trial were analyzed among groups by ANOVA followed by Tukey tests. Extension and OD values for the immunoreactive area to each protein, and numbers of positive-neurons, were compared among groups by ANOVA followed by Tukey tests. A  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This paper constitutes a partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. of CEG at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. This study was partially supported by Instituto Mexicano del Seguro Social (Grant Nr. FIS/IMSS/PROT/G10/827; CEG fellowship 2010020), and CONACYT (Grant Nr. CB-2009-01/134199; CEG fellowship 229241). The authors thank Ms. María del Carmen Baltazar for her skillful technical assistance.

## **REFERENCES**

- Aggarwal, R., Medhi, B., Pathak, A., Dhawan, V., Chakrabarti, A., 2008. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 60, 731-737.
- Akbik, F., Cafferty, W.B., Strittmatter, S.M., 2012. Myelin associated inhibitors: a link between injury-induced and experience-dependent plasticity. *Exp. Neurol.* 235, 43-52.
- Barha, C.K., Ishrat, T., Epp, J.R., Galea, L.A., Stein, D.G., 2011. Progesterone treatment normalizes the levels of cell proliferation and cell death in the dentate gyrus of the hippocampus after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 231, 72-81.

- Barone, F.C., Kilgore, K.S., 2006. Role of inflammation and cellular stress in brain injury and central nervous system diseases. *Clin. Neurosci. Res.* 6, 329–356.
- Block, F., 1999. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol.* 58, 279-295.
- Briones, T.L., Suh, E., Jozsa, L., Woods, J., 2006. Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning. *Exp. Neurol.* 198, 530-538.
- Cekic, M., Johnson, S.J., Bhatt, V.H., Stein, D.G., 2012. Progesterone treatment alters neurotrophin/proneurotrophin balance and receptor expression in rats with traumatic brain injury. *Restor. Neurol. Neurosci.* 30, 115-126.
- Cervantes, M., González-Burgos, I., Letechipía-Vallejo, G., Olvera-Cortés, M.E., Morali G., 2012. Neuroprotection in Animal Models of Global Cerebral Ischemia, in: Balestrino, M. (Ed.), *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke*. InTech. doi: 10.5772/32322.
- Chao, P.K., Lu, K.T., Jhu, J.Y., Wo, Y.Y., Huang, T.C., Ro, L.S., Yang, Y.L., 2012. Indomethacin protects rats from neuronal damage induced by traumatic brain injury and suppresses hippocampal IL-1 $\beta$  release through the inhibition of Nogo-A expression. *J. Neuroinflammation* 9, 121.
- Cheatwood, J.L., Emerick, A.J., Kartje, G.L., 2008. Neuronal plasticity and functional recovery after ischemic stroke. *Top Stroke Rehabil.* 15, 42-50.
- Chen, S., Xiao, N., Zhang, X., 2009. Effect of combined therapy with ephedrine and hyperbaric oxygen on neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurosci. Lett.* 465, 171-176.
- Chytrova, G., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2008. Exercise normalizes levels of MAG and Nogo-A growth inhibitors after brain trauma. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1-11.
- Delekate, A., Zagrebelsky, M., Kramer, S., Schwab, M.E., Korte, M., 2011. NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2569-2574.
- Denes, A., Thornton, P., Rothwell, N.J., Allan, S.M., 2010. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav. Immun.* 24, 708-723.

- Djebaili, M., Hoffman, S.W., Stein, D.G., 2004. Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience* 123, 349-359.
- Djebaili, M., Guo, Q., Pettus, E.H., Hoffman, S.W., Stein, D.G., 2005. The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* 22, 106-118.
- Espinosa-García, C., Viguera-Villaseñor, R.M., Rojas-Castañeda, J.C., Aguilar-Hernández, A., Monfil, T., Cervantes, M., Morali, G., 2013. Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.023.
- Fang, P.C., Barbay, S., Plautz, E.J., Hoover, E., Strittmatter, S.M., Nudo, R.J., 2010. Combination of NEP 1-40 treatment and motor training enhances behavioral recovery after a focal cortical infarct in rats. *Stroke* 41, 544-549.
- Gibson, C.L., Constantin, D., Prior, M.J., Bath, P.M., Murphy, S.P., 2005. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp. Neurol.* 193, 522-530.
- Gibson, C.L., Coomber, B., Rathbone, J., 2009. Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke? *Neuroscientist* 15, 324-332.
- González, S.L., Labombarda, F., González-Deniselle, M.C., Guennoun, R., Schumacher, M., De Nicola, A.F., 2004. Progesterone up-regulates neuronal brain-derived neurotrophic factor expression in the injured spinal cord. *Neuroscience* 125, 605-614.
- VanGuilder, H.D., Bixler, G.V., Sonntag, W.E., Freeman, W.M., 2012. Hippocampal expression of myelin-associated inhibitors is induced with age-related cognitive decline and correlates with deficits of spatial learning and memory. *J. Neurochem.* 121, 77-98.
- Guo, Q., Sayeed, I., Baronne, L.M., Hoffman, S.W., Guennoun, R., Stein, D.G., 2006. Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats. *Exp. Neurol.* 198, 469-478.

- Hamill, C.E., Goldshmidt, A., Nicole, O., McKeon, R.J., Brat, D.J., Traynelis, S.F., 2005. Special lecture: glial reactivity after damage: implications for scar formation and neuronal recovery. *Clin. Neurosurg.* 52, 29-44.
- Hartman, R.E., Lee, J.M., Zipfel, G.J., Wozniak, D.F., 2005. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1043, 48-56.
- He, J., Evans, C.O., Hoffman, S.W., Oyesiku, N.M., Stein, D.G., 2004. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 189, 404-412.
- Himeda, T., Tounai, H., Hayakawa, N., Araki, T., 2007. Post ischemic alterations of BDNF, NGF, HSP 70 and ubiquitin immunoreactivity in the gerbil hippocampus: pharmacological approach. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 229-250.
- Huber, A.B., Weinmann, O., Brösamle, C., Oertle, T., Schwab, M.E., 2002. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J. Neurosci.* 22, 3553-3567.
- Hunt, D., Coffin, R.S., Prinjha, R.K., Campbell, G., Anderson, P.N., 2003. Nogo-A expression in the intact and injured nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 1083-1102.
- Ishrat, T., Sayeed, I., Atif, F., Hua, F., Stein, D.G., 2012. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience* 210, 442-450.
- Jiang, W., Xia, F., Han, J., Wang, J., 2009. Patterns of Nogo-A, NgR, and RhoA expression in the brain tissues of rats with focal cerebral infarction. *Transl. Res.* 154, 40-48.
- Jiang, C., Cui, K., Wang, J., He, Y., 2011. Microglia and cyclooxygenase-2: possible therapeutic targets of progesterone for stroke. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1925-1931.
- O'Kane, E.M., Stone, T.W., Morris, B.J., 2003. Distribution of Rho family GTPases in the adult rat hippocampus and cerebellum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 114, 1-8.
- Karanjia, N., Geocadin R.G., 2011. Post-cardiac arrest syndrome: update on brain injury management and prognostication. *Curr. Treat. Options Neurol.* 13, 191-203.

- Kirino, T., 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239, 57-69.
- Kovalenko, T., Osadchenko, I., Nikonenko, A., Lushnikova, I., Voronin, K., Nikonenko, I., Muller, D., Skibo, G., 2006. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus* 16, 814-825.
- Labombarda, F., González, S.L., Lima, A., Roig, P., Guennoun, R., Schumacher, M., de Nicola, A.F., 2009. Effects of progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *Glia* 57, 884-897.
- Labombarda, F., González, S., Lima, A., Roig, P., Guennoun, R., Schumacher, M., De Nicola, A.F., 2011. Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 231, 135-146.
- Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., Hofer, M., 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J. Transl. Med.* 7, 97.
- Lee, J.K., Kim, J.E., Sivula, M., Strittmatter, S.M., 2004. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J. Neurosci.* 24, 6209-6217.
- Mingorance, A., Fontana, X., Solé, M., Burgaya, F., Ureña, J.M., Teng, F.Y., Tang, B.L., Hunt, D., Anderson, P.N., Bethea, J.R., Schwab, M.E., Soriano, E., del Río, J.A., 2004. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 34-49.
- Miyazaki, H., Nagashima, K., Okuma, Y., Nomura, Y., 2001. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 922, 165-172.
- Moralí, G., Letechipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Montes, P., Hernández-Morales, L., Cervantes, M., 2005. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neurosci. Lett.* 382, 286-290.
- Moralí, G., Montes, P., Hernández-Morales, L., Monfil, T., Espinosa-García, C., Cervantes, M., 2011. Neuroprotective effects of progesterone and allopregnanolone on long-term cognitive outcome after global cerebral ischemia. *Restor. Neurol. Neurosci.* 29, 1-15.

- Moralí, G., Montes, P., González-Burgos, I., Velázquez-Zamora, D.A., Cervantes, M., 2012. Cytoarchitectural characteristics of hippocampal CA1 pyramidal neurons of rats, four months after global cerebral ischemia and progesterone treatment. *Restor. Neurol. Neurosci.* 30, 1-8.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47-60.
- Mudrick, L.A., Baimbridge, K.G., 1989. Long-term structural changes in the rat hippocampal formation following cerebral ischemia. *Brain Res.* 493, 179-184.
- Mukaino, M., Nakamura, M., Yamada, O., Okada, S., Morikawa, S., Renault-Mihara, F., Iwanami, A., Ikegami, T., Ohsugi, Y., Tsuji, O., Katoh, H., Matsuzaki, Y., Toyama, Y., Liu, M., Okano, H., 2010. Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. *Exp. Neurol.* 224, 403-414.
- Neigh, G.N., Glasper, E.R., Kofler, J., Traystman, R.J., Mervis, R.F., Bachstetter, A., DeVries, A.C., 2004. Cardiac arrest with cardiopulmonary resuscitation reduces dendritic spine density in CA1 pyramidal cells and selectively alters acquisition of spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1865-1872.
- Onodera, H., Aoki, H., Yae, T., Kogure, K., 1990. Post-ischemic synaptic plasticity in the rat hippocampus after long-term survival: histochemical and autoradiographic study. *Neuroscience* 38, 125-136.
- Orzyłowska, O., Oderfeld-Nowak, B., Zaremba, M., Januszewski, S., Mossakowski, M., 1999. Prolonged and concomitant induction of astroglial immunoreactivity of interleukin-1beta and interleukin-6 in the rat hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci. Lett.* 263, 72-76.
- Overman, J.J., Carmichael, S.T., 2013. Plasticity in the Injured Brain: More than Molecules Matter. *Neuroscientist*. doi: 10.1177/1073858413491146
- Ozacmak, V.H., Sayan, H., 2009. 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.* 58, 909-912.



- Papadopoulos, C.M., Tsai, S.Y., Alsbieci, T., O'Brien, T.E., Schwab, M.E., Kartje, G.L., 2002. Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. *Ann. Neurol.* 51, 433-441.
- Papadopoulos, C.M., Tsai, S.Y., Cheatwood, J.L., Bollnow, M.R., Kolb, B.E., Schwab, M.E., Kartje, G.L., 2006. Dendritic plasticity in the adult rat following middle cerebral artery occlusion and Nogo-a neutralization. *Cereb. Cortex* 16, 529-536.
- Pernet, V., Schwab, M.E., 2012. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell Tissue Res.* 349, 97-104.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10, 267-272.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., Plum, F., 1982. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* 11, 491-498.
- Pulsinelli, W.A., Buchan, A.M., 1988. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19, 913-914.
- Roine, R.O., 1997. Global Cerebral Ischemia, in: Fisher, M., Bogouslavsky, J. (Eds.), *Current Review of Cerebrovascular Disease. Current Medicine, Philadelphia*, pp. 159-77.
- Roof, R.L., Duvdevani, R., Heyburn, J.W., Stein, D.G., 1996. Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp. Neurol.* 138, 246-251.
- Roof, R.L., Hoffman, S.W., Stein, D.G., 1997. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31, 1-11.
- Ruan, Y.W., Zou, B., Fan, Y., Li, Y., Lin, N., Zeng, Y.S., Gao, T.M., Yao, Z., Xu, Z.C., 2006. Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *Neuroscience* 140, 191-201.
- Ruan, Y.W., Lei, Z., Fan, Y., Zou, B., Xu, Z.C., 2009. Diversity and fluctuation of spine morphology in CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *J. Neurosci. Res.* 87, 61-68.

- Ruan, Y.W., Han, X.J., Shi, Z.S., Lei, Z.G., Xu, Z.C., 2012. Remodeling of synapses in the CA1 area of the hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience* 218, 268-277.
- Sairanen, T.R., Lindsberg, P.J., Brenner, M., Sirén, A.L., 1997. Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1beta (IL-1beta) and its receptor at mRNA and protein level. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 17, 1107-1120.
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L.B., Butt, A., Logan, A., 2004. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 46, 225-251.
- Sayed, I., Parvez, S., Wali, B., Siemen, D., Stein, D.G., 2009a. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone. *Brain Res.* 1263, 165-173.
- Sayed, I., Stein, D.G., 2009b. Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury. *Prog. Brain Res.* 175, 219-237.
- Schneider, A., Böttiger, B.W., Popp, E., 2009. Cerebral resuscitation after cardiocirculatory arrest. *Anesth. Analg.* 108, 971-979.
- Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J.P., Mattern, C., Ghomari, A.M., 2012. Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front. Neurosci.* 6, 10.
- Seymour, A.B., Andrews, E.M., Tsai, S.Y., Markus, T.M., Bollnow, M.R., Brenneman, M.M., O'Brien, T.E., Castro, A.J., Schwab, M.E., Kartje, G.L., 2005. Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 1366-1375.
- Skibo, G.G., Nikonenko, A.G., 2010. Brain plasticity after ischemic episode. *Vitam. Horm.* 82, 107-127.
- Stein, D.G., 2013. A clinical/translational perspective: can a developmental hormone play a role in the treatment of traumatic brain injury? *Horm. Behav.* 63, 291-300.
- Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M., 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog. Neurobiol.* 56, 149-171.

- Tang, H., Hua, F., Wang, J., Sayeed, I., Wang, X., Chen, Z., Yousuf, S., Atif, F., Stein, D.G., 2013. Progesterone and vitamin D: Improvement after traumatic brain injury in middle-aged rats. *Horm. Behav.* 64, 527-538.
- Tsai, S.Y., Markus, T.M., Andrews, E.M., Cheatwood, J.L., Emerick, A.J., Mir, A.K., Schwab, M.E., Kartje, G.L., 2007. Intrathecal treatment with anti-Nogo-A antibody improves functional recovery in adult rats after stroke. *Exp. Brain Res.* 182, 261-266.
- Tsai, S.Y., Papadopoulos, C.M., Schwab, M.E., Kartje, G.L., 2011. Delayed anti-nogo-a therapy improves function after chronic stroke in adult rats. *Stroke* 42, 186-190.
- Wang, T., Wang, J., Yin, C., Liu, R., Zhang, J.H., Qin, X., 2010. Down-regulation of Nogo receptor promotes functional recovery by enhancing axonal connectivity after experimental stroke in rats. *Brain Res.* 1360, 147-158.
- Wang, X., Chun, S.J., Treloar, H., Vartanian, T., Greer, C.A., Strittmatter, S.M., 2002. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J. Neurosci.* 22, 5505-5515.
- Wiessner, C., Bareyre, F.M., Allegrini, P.R., Mir, A.K., Frenzel, S., Zurini, M., Schnell, L., Oertle, T., Schwab, M.E., 2003. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 154-165.
- Wright, D.W., Kellermann, A.L., Hertzberg, V.S., Clark, P.L., Frankel, M., Goldstein, F.C., Salomone, J.P., Dent, L.L., Harris, O.A., Ander, D.S., Lowery, D.W., Patel, M.M., Denson, D.D., Gordon, A.B., Wald, M.M., Gupta, S., Hoffman, S.W., Stein, D.G., 2007. ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Ann. Emerg. Med.* 49, 391-402.
- Xiao, G., Wei, J., Yan, W., Wang, W., Lu, Z., 2008. Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Crit. Care* 12, R61.

- Yang, J., Han, Y., Ye, W., Liu, F., Zhuang, K., Wu, G., 2013. Alpha tocopherol treatment reduces the expression of Nogo-A and NgR in rat brain after traumatic brain injury. *J. Surg. Res.* 182, e69-e77.
- Yao, X.L., Liu, J., Lee, E., Ling, G.S., McCabe, J.T., 2005. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* 22, 656-668.
- Yasuda, Y., Shimoda, T., Uno, K., Tateishi, N., Furuya, S., Tsuchihashi, Y., Kawai, Y., Naruse, S., Fujita, S., 2011. Temporal and sequential changes of glial cells and cytokine expression during neuronal degeneration after transient global ischemia in rats. *J. Neuroinflammation* 8, 70.
- Zagrebelsky, M., Schweigreiter, R., Bandtlow, C.E., Schwab, M.E., Korte, M., 2010. Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 30, 13220-13234.
- Zhang, Z., Yang, R., Zhou, R., Li, L., Sokabe, M., Chen, L., 2010. Progesterone promotes the survival of newborn neurons in the dentate gyrus of adult male mice. *Hippocampus* 20, 402-412.
- Zhao, Y., Wang, J., Liu, C., Jiang, C., Zhao, C., Zhu, Z., 2011. Progesterone influences postischemic synaptogenesis in the CA1 region of the hippocampus in rats. *Synapse* 65, 880-891.
- Zhou, C., Li, Y., Nanda, A., Zhang, J.H., 2003. HBO suppresses Nogo-A, Ng-R, or RhoA expression in the cerebral cortex after global ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 368-376.
- Zola-Morgan, S., Squire, L., Amaral, D., 1986. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* 6, 2950-2967.

[www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00406016](http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00406016)

[www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00875446](http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00875446)

## FIGURE CAPTIONS

### **Figure 1. Performance of spatial learning and memory by rats of the three experimental groups in the Morris water maze.**

Panel A: Escape latencies (Mean  $\pm$  SEM) shown on the successive days of testing. Global cerebral ischemia impaired the spatial learning, as evidenced by longer escape latencies in the ISCH+VEH group as compared to the Sham group.

Progesterone treatment prevented this impairment as shown by the progressively shorter escape latencies in the ISCH+P<sub>4</sub> group, similar to those of the Sham group. Panel B: Number of crossings (Mean  $\pm$  SEM) through the former platform location in the probe trial. Global cerebral ischemia impaired spatial memory, as evidenced by fewer crossings through the former platform location in rats of the ISCH+VEH group as compared to the Sham group. Progesterone treatment prevented this impairment, since the ISCH+P<sub>4</sub> group showed higher number of crossings, similar to those of the Sham group. Panel C: Representative swimming paths displayed by rats of the three experimental groups in the probe trial. In contrast to the persistent search for the platform through the target quadrant displayed by rats in the Sham and the ISCH+P<sub>4</sub> group, the ISCH+VEH group showed a random swimming pattern, occasionally crossing over the platform location. Tukey tests: \* $p$ <0.01, as compared vs. Sham; + $p$ <0.05, ++ $p$ <0.01, +++ $p$ <0.001, as compared vs. ISCH+VEH.

### **Figure 2. Immunoreactivity to Nogo-A in the hippocampus.**

Representative coronal sections of the dorsal hippocampus of rats subjected to sham procedures (a), and subjected to global cerebral ischemia and receiving vehicle (ISCH + VEH; b, d, f, h) or progesterone (ISCH + P<sub>4</sub>; c, e, g, i) at 24 h, 72 h, 7 d and 14 d after reperfusion. Global cerebral ischemia increased the immunoreactivity to Nogo-A in the *stratum pyramidale* of subiculum and CA1 from 24 h to 14 d, as well as in the *strata oriens* and *radiatum* at 72 h, which was reduced by progesterone treatment. Bars represent the extension (mm<sup>2</sup>; Mean  $\pm$  SEM) (j) and the intensity (O.D.; Mean  $\pm$  SEM) (k) of the immunoreactivity to Nogo-A in the subiculum and CA1 of experimental groups at 72 h after ischemia. Progesterone reduced the ischemia-induced increase of both parameters (j, k). DG, dentate gyrus; gl, granular layer; ml, molecular layer; slm, *stratum lacunosum*

*moleculare*; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Scale bar: 1 mm. Tukey tests: \* $p < 0.001$  as compared vs. Sham; + $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.001$ , as compared vs. ISCH+VEH.

**Figure 3. Immunoreactivity to Ng-R in the hippocampus.** Representative coronal sections of the dorsal hippocampus of rats subjected to sham procedures (a), and subjected to global cerebral ischemia and receiving vehicle (ISCH + VEH; b, d, f, h) or progesterone (ISCH + P<sub>4</sub>; c, e, g, i) at 24 h, 72 h, 7 d and 14 d after reperfusion. Global cerebral ischemia increased the immunoreactivity to Ng-R in the *stratum pyramidale* of subiculum and CA1, which was reduced by progesterone treatment. Bars represent the extension (mm<sup>2</sup>; Mean ± SEM) (j) and the intensity (O.D.; Mean ± SEM) (k) of the immunoreactivity to Ng-R in the subiculum and CA1 of experimental groups at 72 h after ischemia. Progesterone reduced the ischemia-induced increase of both parameters (j, k). DG, dentate gyrus; gl, granular layer; ml, molecular layer; sl, *stratum lucidum*; slm, *stratum lacunosum moleculare*; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Scale bar: 1 mm. Tukey tests: \* $p < 0.001$ , as compared vs. Sham; + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  as compared vs. ISCH+VEH.

**Figure 4. Immunoreactivity to Rho-A in the hippocampus.** Representative coronal sections of the dorsal hippocampus of rats subjected to sham procedures (a), and subjected to global cerebral ischemia and receiving vehicle (ISCH + VEH; b, d, f, h) or progesterone (ISCH + P<sub>4</sub>; c, e, g, i) at 24 h, 72 h, 7 d and 14 d after reperfusion. Global cerebral ischemia increased the immunoreactivity to Rho-A in the *stratum pyramidale* of subiculum and CA1, which was reduced by progesterone treatment. Bars represent the extension (mm<sup>2</sup>; Mean ± SEM) (j) and the intensity (O.D.; Mean ± SEM) (k) of the immunoreactivity to Rho-A in the subiculum and CA1 of experimental groups at 72 h after ischemia. Progesterone reduced the ischemia-induced increase of both parameters (j, k). DG, dentate gyrus; gl, granular layer; ml, molecular layer; slm, *stratum lacunosum moleculare*; so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*. Scale bar: 1 mm. Tukey tests: \* $p < 0.001$ , as compared vs. Sham; + $p < 0.01$ , ++ $p < 0.001$  as compared vs. ISCH+VEH.

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

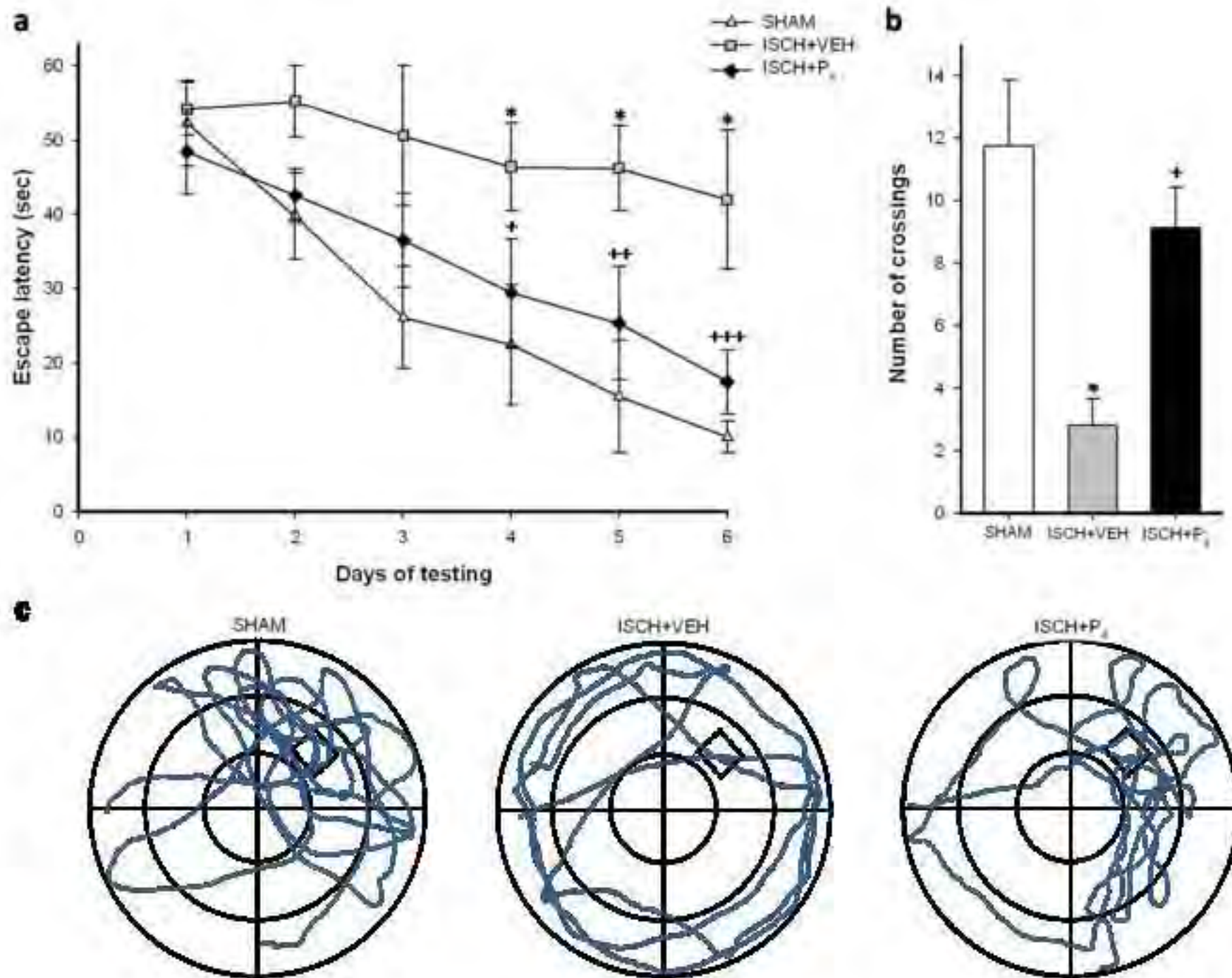


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

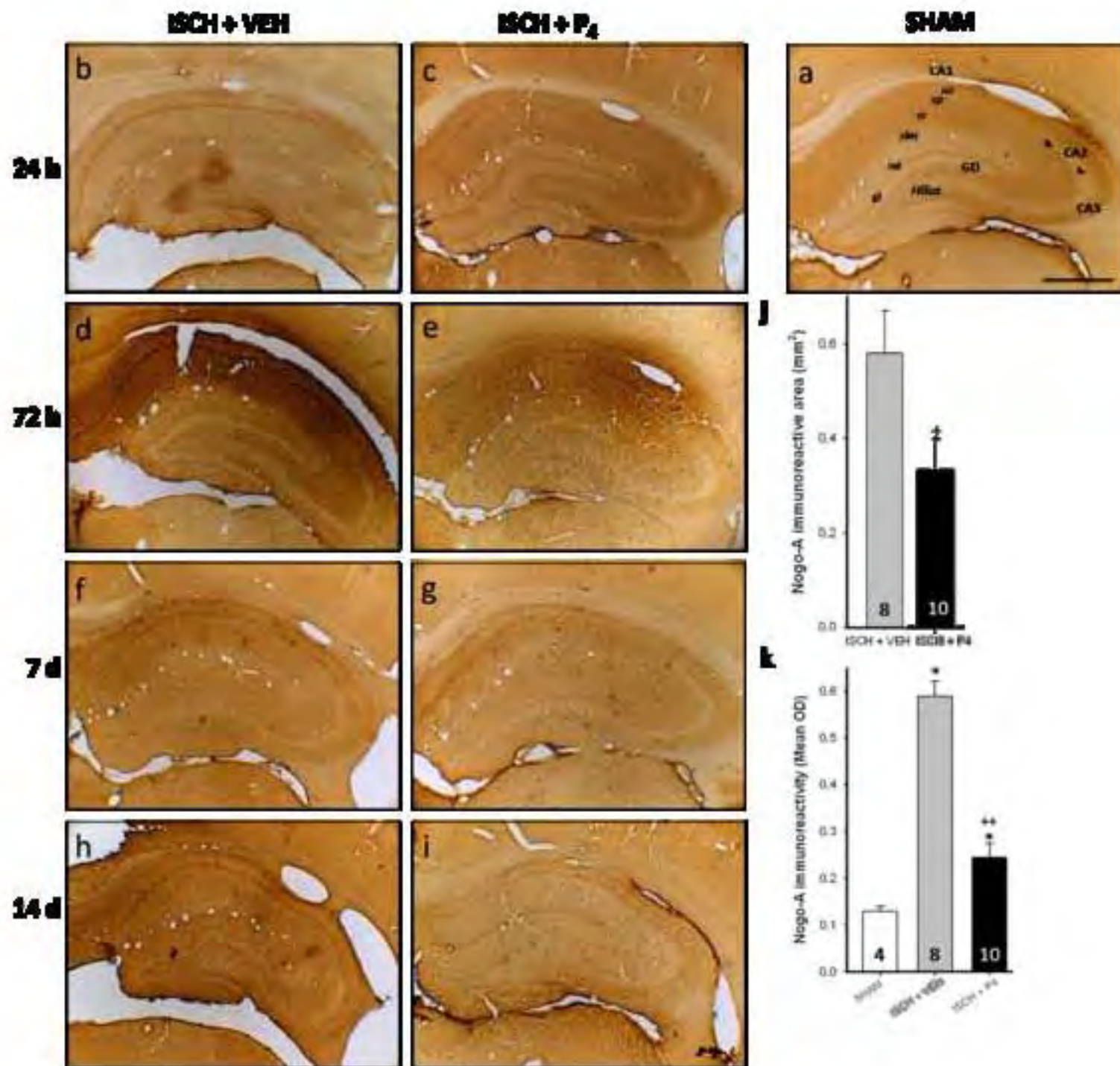




Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

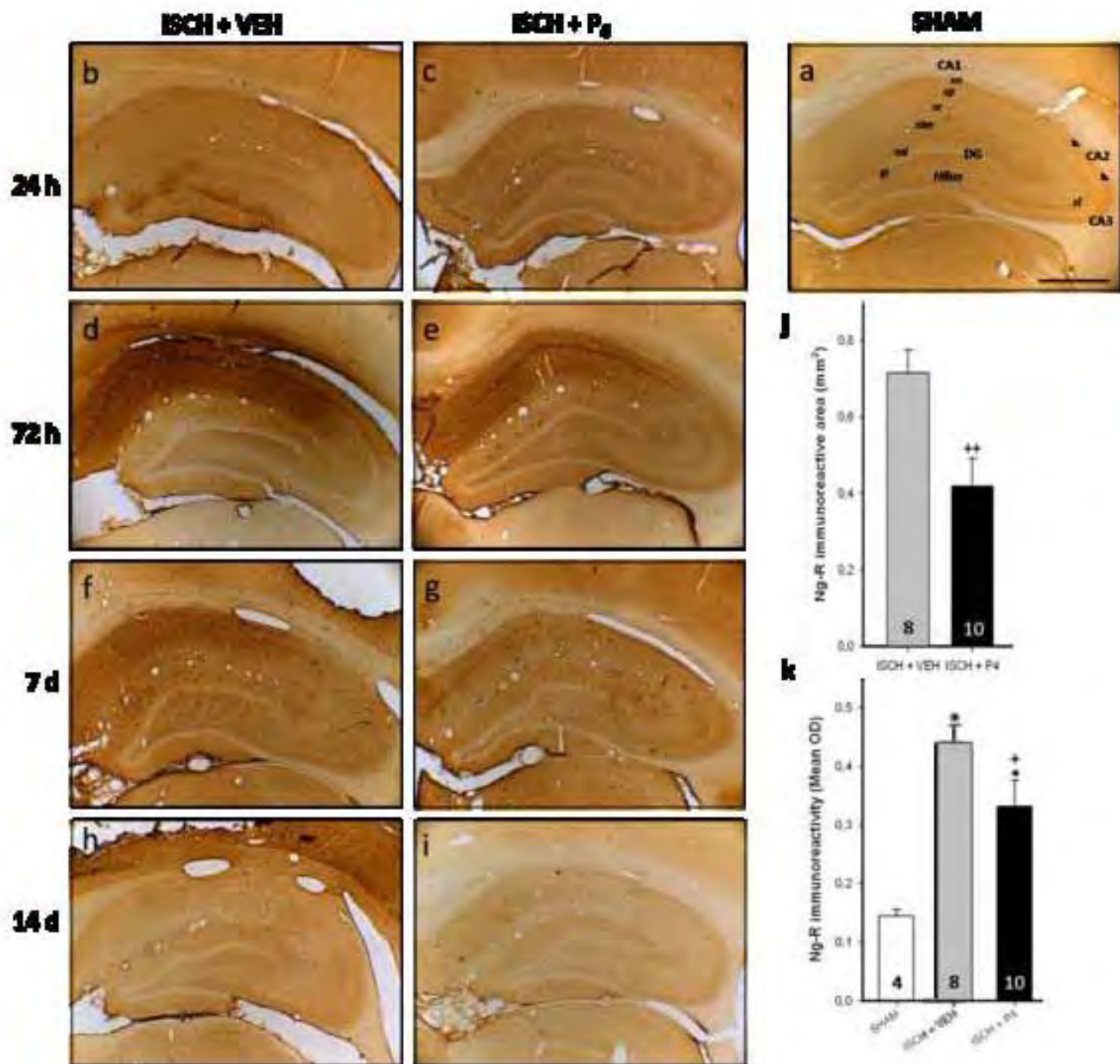
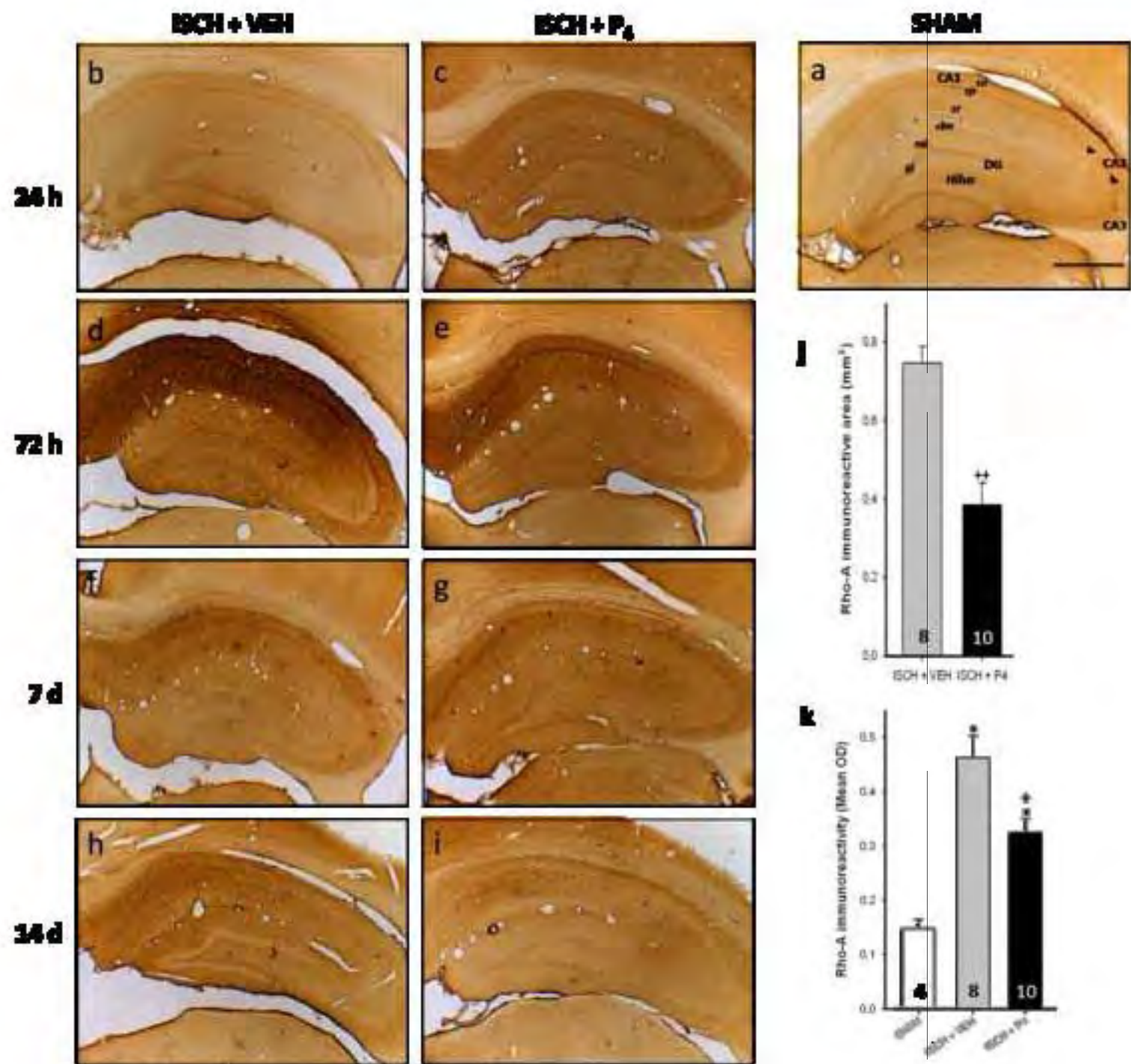


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)



#### **XIV. ARTICULOS EN PREPARACIÓN**

1. Espinosa-García C, Cervantes M, Morali G. **Mechanisms of neurorepair following global cerebral ischemia.** Para ser enviado a Neurosci Lett Rev.
2. Aguilar-Hernández A, Espinosa-García C, Cervantes M, Morali G. **Effects of progesterone and allopregnanolone on astro- and microglial reaction in the hippocampus following global cerebral ischemia.** Para ser enviado a Restor Neurol Neurosci.