



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM - CMN SIGLO XXI, IMSS

**NEUROGÉNESIS Y MODIFICACIONES DE LA
CITOARQUITECTURA DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES
DEL HIPOCAMPO LUEGO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL
AGUDA EN RATAS: EFECTOS DE LA PROGESTERONA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. PEDRO MONTES DEL CARMEN

DIRECTORA DE TESIS
DRA. GABRIELA MORALÍ DE LA BRENA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM - CMN SIGLO XXI, IMSS

COMITÉ TUTOR
DRA. MA. DE LOURDES MASSIEU TRIGO
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNAM
DR. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM - UNIVERSIDAD
MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

CDMX., SEPTIEMBRE DE 2019



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.

RECONOCIMIENTOS

A la Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (CMN) Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), donde se realizó el presente trabajo.

Al Servicio de Cirugía Experimental y Bioterio del CMN Siglo XXI, IMSS, por el apoyo otorgado para la realización de los procedimientos experimentales correspondientes.

Al IMSS por los fondos económicos para investigación (2005/1/I/042; 2006/1A/I/029; FIS/IMSS/PROT/196) otorgados a la Dra. Gabriela Morali de la Brena, así como por la beca de investigación (99091245) que recibí durante el programa de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca (172697) para mis estudios de posgrado, nivel Doctorado.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al IMSS por los apoyos económicos asignados para asistir a congresos nacionales e internacionales.

Al Comité Tutor conformado por la Dra. Gabriela Morali de la Brena, Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo y el Dr. José Miguel Cervantes Alfaro, por sus invaluable contribuciones académicas para mi formación científica durante los estudios del Doctorado.

A los integrantes del Jurado de Examen de Grado, Dra. Gabriela Morali de la Brena, Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, Dra. Sandra Adela Orozco Suárez, Dra. Hermelinda Salgado Ceballos y el Dr. Gabriel Roldán Roldán, por la revisión de la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa María Viguera, Dr. Julio César Rojas Castañeda y Pedro Granados del Instituto Nacional de Pediatría, por su colaboración en los procedimientos de inmunohistofluorescencia para analizar la neurogénesis.

Al Dr. Jorge Antonio Sosa Melgarejo por su asesoramiento en los procedimientos de microscopía láser confocal en el CMN Siglo XXI, IMSS.

Al Dr. Ignacio González Burgos del Centro de Investigación Biomédica de Occidente IMSS, por su invaluable colaboración para el análisis de la citoarquitectura neuronal.

A la Universidad Pública y Gratuita, donde la inclusión del talento diverso y uniformemente distribuido, favorece que prevalezca el pensamiento libre.

A la madre naturaleza que a través de una de las consecuencias de su proceso evolutivo, el cerebro humano, nos permite afrontar una gran diversidad de sensaciones incluyendo la consciencia de “existir”. Será un desafío fascinante continuar su estudio.

A mis compañeros y amigos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Elizabeth, Norma, Miguel, Evelyn, Yaset, Iktanil, Daniel, Orlando, Myr, Jesica, Lourdes, Valeria, Miriam, Simón, Itzel, Andrea, Victoria, Danira, Elisa, Nancy, Alejandra, Petra, Daniela, Edith, Juan Carlos, Iván, Francisca, Yessica, César, Dra. Aguirre, Dora, Citlali, Gustavo, Antonio, Hugo, Verónica, Martha, Rafael, Verónica e Isabel, por el aprendizaje continuo, académico y vivencial.

A mis compañeros y amigos de la UNAM, IMSS y de vida, Rosa, Itzel, Manuel, Paty, Irma, Abril, Mayra, Erik, Octavio, Miguel, Héctor, Javier, Carlos, Bernardo, Olga, Belén, Ivonne, Luis, Pablo, Blas, Mauricio, Leticia, Fernando, Sergio, Rosario, Marcia, Juan José, Lucia, Tomas, Alejandra, Claudia, Sandra, Hada, Vinnitsa, Edith, Benjamín, Maribel, Luz, Gerardo, Ana Lilia, Raúl y Octavio, por las experiencias vivenciales en las que hemos coincidido.

Agradezco de manera especial a la Dra. Gabriela Morali de la Brena, por su apoyo integral desde que me encaminó hacia la Neurociencia durante el servicio social, hasta la obtención del grado de Doctor.

A mis familiares, Everarda, Higinio, Leandra, Luis, Ignacio, Esperanza, Yadira, Francisco, Iván, Moisés Lola, Pompeyo, Fabiola, Felipa, Eduardo, Josefa, Felipe, Ana, Lidia, Marino, Casimiro, Heladio, Juana, Eulalia, José, Paula, Celia, Helena, Margarita, Silvino, Oliva, Aurea, Anatolia, Mario, Félix, Josefina, Marino y el maestro Miguel, por haber sentado y mantenido las bases de nuestros orígenes a través de las diferentes generaciones.

Un agradecimiento afectuoso al núcleo familiar más cercano por las vivencias en general, Lucia, Leticia, Guille, Mariano, Sra. Esperanza, Pavel y Martín. En particular, a los integrantes más recientes y a los que se sumen en el futuro, Hazel, Alejandro, Adael, Mariana, Emiliano y Óscar, para quienes esta tesis represente un aliciente para que desarrollen sus capacidades con base en la perseverancia.

DEDICATORIA

El agradecimiento más importante es para mi madre Nicolasa, quien con base en su entereza y resiliencia ha incidido en el desarrollo familiar. En este sentido y dado que la obtención del grado de Doctor también es el resultado de su esfuerzo, esta tesis se la dedico a ella. ¡Gracias Mamá Nico!

ÍNDICE

	pág.
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	11
Isquemia cerebral global	11
Fisiopatología de la isquemia cerebral global.....	12
Alteraciones funcionales asociadas al daño en el hipocampo, después de isquemia cerebral global.....	17
Plasticidad cerebral.....	20
Isquemia cerebral y cambios en la citoarquitectura neuronal.....	21
Isquemia cerebral y neurogénesis.....	25
Ventana de oportunidad terapéutica y recomendaciones para el estudio de posibles neuroprotectores en eventos isquémicos.....	29
La progesterona como esteroide neuroactivo y sus mecanismos de acción.....	31
ANTECEDENTES.....	36
Neuroprotección regulada por la progesterona.....	36
Efectos de la progesterona sobre la citoarquitectura neuronal pos-isquemia.....	38
Efectos de la progesterona sobre la neurogénesis pos-isquemia.....	39
Trabajos previos realizados en nuestro grupo de trabajo	40
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
1. MODIFICACIONES DE LA CITOARQUITECTURA DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO, LUEGO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS: EFECTOS DE LA PROGESTERONA.....	43
1.1 HIPÓTESIS.....	43
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	43
1.3 OBJETIVOS PARTICULARES.....	43

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1.5 RESULTADOS.....	50
1.6 DISCUSIÓN.....	53
1.7 CONCLUSIÓN.....	57
2. NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON EL DESEMPEÑO FUNCIONAL, LUEGO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS: EFECTOS DE LA PROGESTERONA.....	58
2.1 HIPÓTESIS.....	58
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	58
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES.....	58
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
2.5 RESULTADOS.....	66
2.6 DISCUSIÓN.....	71
2.7 CONCLUSIÓN.....	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

RESUMEN

En un trabajo previo se demostró que las ratas tratadas con progesterona pos-isquemia tienen una recuperación funcional exitosa, a pesar de una pérdida significativa de las neuronas piramidales del hipocampo. Esto sugirió que la progesterona habría favorecido un microambiente permisivo para el desarrollo de mecanismos de plasticidad cerebral pos-isquemia, compatibles con la recuperación funcional. En esta tesis se presenta la continuación del trabajo previo por lo que, en muestras de cerebro de éste, se analizó si la progesterona favorecía el desarrollo de modificaciones en la citoarquitectura pos-isquemia de las neuronas piramidales remanentes en la región 1 del cuerno de Ammon (CA1) del hipocampo, que pudieran explicar la recuperación funcional demostrada. Además, se presenta el estudio donde se analizó si el tratamiento con progesterona pos-isquemia promovía la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, y su relación con el rendimiento funcional.

MODIFICACIONES DE LA CITOARQUITECTURA DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO, LUEGO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS: EFECTOS DE LA PROGESTERONA

Objetivo: Analizar las características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales remanentes en la región CA1 del hipocampo de ratas, cuatro meses después de un episodio de isquemia cerebral global y tratamiento con progesterona. **Métodos:** En muestras procesadas con el método de Golgi modificado, se analizó la arborización dendrítica, la densidad y la forma de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo, en cerebros de ratas intactas o de ratas sometidas a isquemia global (20 minutos) tratadas con progesterona (8 mg/kg, i.v.) o su vehículo, a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h después del inicio de la reperfusión. **Resultados:** Se identificaron pocas neuronas piramidales de CA1 impregnadas en las ratas isquémicas tratadas con vehículo, estas neuronas tuvieron una dendrita apical corta sin bifurcaciones y sin

espinas dendríticas. En contraste, las neuronas piramidales de CA1, remanentes en las ratas isquémicas tratadas con progesterona, mostraron dendritas sinuosamente ramificadas con un número similar de bifurcaciones y de densidad total de espinas dendríticas, así como una mayor densidad proporcional de espinas tipo hongo que las del grupo de ratas intactas. Conclusión: Los hallazgos demuestran que el tratamiento con progesterona pos-isquemia favoreció el desarrollo de mecanismos de plasticidad cerebral, lo cual resultó en características citoarquitectónicas compensatorias de las neuronas piramidales remanentes de CA1 que pueden asociarse con el desempeño funcional exitoso demostrado previamente.

NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON EL DESEMPEÑO FUNCIONAL, LUEGO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS: EFECTOS DE LA PROGESTERONA

Objetivo: Evaluar la posibilidad de que el tratamiento con progesterona pos-isquemia promueva la sobrevivencia de neuronas nuevas en el giro dentado del hipocampo, en relación con el rendimiento funcional en una tarea de aprendizaje espacial. Métodos: Ratas macho adultas se sometieron a un episodio de isquemia cerebral global severa (30 minutos) y se trataron con progesterona (8 mg/kg, i.v.) o su vehículo, a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h de la reperusión. Del día 4 al 8 después de la isquemia, se administró 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU; 100mg/Kg, i.p. 2 x día) para marcar a las células en proliferación. Veintiún días después de la isquemia, las ratas fueron expuestas al laberinto acuático de Morris para evaluar parámetros conductuales de aprendizaje y memoria espacial. Posteriormente, el cerebro se fijó mediante perfusión, y se realizaron los procedimientos de inmunohistofluorescencia para cuantificar el número de nuevas neuronas maduras (BrdU⁺/NeuN⁺) en el giro dentado del hipocampo. Resultados: Las ratas sometidas a isquemia cerebral global severa y tratadas con progesterona tuvieron

un rendimiento significativamente mejor en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial, así como un número significativamente mayor de neuronas nuevas maduras (BrdU⁺/NeuN⁺) en el giro dentado, que las ratas tratadas con vehículo. Conclusión: Estos hallazgos demuestran que el tratamiento con progesterona pos-isquemia promueve la sobrevivencia de neuronas nuevas en el giro dentado, lo cual puede ser uno de los mecanismos de plasticidad cerebral inducido por la hormona que subyacen al desempeño funcional exitoso en las pruebas de aprendizaje y memoria.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, los accidentes o eventos cerebrovasculares constituyen la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardíacas isquémicas, y se encuentran entre las principales causas que pueden ocasionar incapacidad permanente (Feigin y cols., 2017; Sanganalmath y cols., 2017) y causar altos costos sociales-financieros. Por lo anterior, los eventos cerebrovasculares constituyen un problema prioritario a resolver para el sector salud nacional y mundial, por lo que diferentes grupos de investigación están interesados en aportar conocimiento sobre la fisiopatología de la isquemia cerebral y sobre los mecanismos de recuperación plástica incluyendo la neurogénesis, la sinaptogénesis y las modificaciones axonales y dendríticas. Mientras que en los estudios de neuroprotección es de interés la evaluación de tratamientos farmacológicos o no farmacológicos que disminuyan la muerte neuronal inducida por el daño isquémico y/o que promuevan los mecanismos de neuroplasticidad para favorecer la recuperación funcional. En este sentido, se ha propuesto que las hormonas de naturaleza endógena como la progesterona (P4) pudieran ser potenciales agentes farmacológicos en contra de la isquemia cerebral, con base en las diversas acciones que ejercen en el sistema nervioso central (SNC), desde el desarrollo hasta el envejecimiento (Guennoun y cols., 2015; Guennoun y cols., 2018).

Isquemia cerebral global

En un episodio de isquemia cerebral global se interrumpe temporalmente o se reduce el flujo sanguíneo por debajo del 10% (10 ml/min/100 g de tejido) de lo normal y con ello, el aporte de oxígeno y glucosa al cerebro (Roine, 1997; Sekhon y cols., 2017). Esta alteración cerebrovascular se presenta principalmente ante un paro cardíaco, pero existen otras condiciones que dan lugar a isquemia y/o a anoxia cerebral global

aguda como la hipotensión arterial severa, el estrangulamiento, el ahogamiento, la hipoxia, y el envenenamiento con cianuro o monóxido de carbono (Roine, 1997; Sanganalmath y cols., 2017). La isquemia cerebral global transitoria y la reperfusión subsecuente, como sucede por ejemplo cuando a un individuo se le reanima de un paro cardiaco, son clínicamente muy importantes (Koenig, 2014). En un episodio de isquemia global todo el cerebro se encuentra expuesto a la supresión o reducción del flujo sanguíneo y, por lo tanto, a los mecanismos fisiopatológicos de daño. Se ha descrito que un episodio de isquemia global puede causar daño irreversible a diversos grupos neuronales específicamente en algunas regiones cerebrales, cuya magnitud variará de acuerdo a la vulnerabilidad selectiva de estos grupos neuronales y a la severidad y duración de la isquemia. Entre las estructuras cerebrales particularmente vulnerables a la isquemia global se encuentran las neuronas piramidales del cuerno de Ammon (CA) del hipocampo, especialmente las del sector CA1, las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral, las neuronas espinosas de tamaño pequeño y mediano del núcleo caudado y las del putamen, así como las células de Purkinje del cerebelo (Pulsinelli y cols., 1982; Roine, 1997; Sekhon y cols., 2017). En particular, se ha demostrado tanto en observaciones clínicas como en modelos experimentales con animales que la muerte de las neuronas piramidales del CA en el hipocampo, causado por un episodio de isquemia global, produce alteraciones en las funciones cognoscitivas como orientación, aprendizaje-memoria espacial y memoria de trabajo (Block, 1999; O'Reilly y cols., 2003; Neumann y cols., 2013).

Fisiopatología de la isquemia cerebral global

En los primeros segundos después de haberse iniciado un episodio de isquemia cerebral global, el individuo que la padece puede perder la consciencia (Sanganalmath y

cols., 2017). Una vez que el episodio termina e inicia la recirculación sanguínea, se manifiestan fenómenos debidos a disturbios hemodinámicos del sistema cerebrovascular como el fenómeno de hiperemia-hipoperfusión, y el fenómeno de no-reflujo (Lipton, 1999; Sekhon y cols., 2017). Simultáneamente con las alteraciones sistémicas y hemodinámicas, se activan diversos mecanismos celulares/moleculares en secuencia o en cascada responsables de la fisiopatología característica de la isquemia (Figura 1) (Sarraf-Yazdi y cols., 1999; Gwag y cols., 2002).

La depleción del ATP durante un episodio de isquemia cerebral global, se debe a la supresión transitoria del suministro de oxígeno y de glucosa al cerebro, lo cual provoca disfunción de las bombas iónicas de la membrana celular y, por lo tanto, alteración de la homeostasis iónica celular. El incremento rápido en la concentración intersticial de K^+ , la despolarización de la membrana; y un gran influjo de Na^+ , Cl^- y agua en las células, ocasionan edema citotóxico (Neumann y cols., 2013; Sanganalmath y cols., 2017). Las bombas de eflujo de Ca^{2+} fallan y los canales de Ca^{2+} activados por voltaje se abren, lo que contribuye a la acumulación masiva de Ca^{2+} en el citosol, seguido de la liberación de aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato por las terminales presinápticas. La activación por el glutamato de los receptores al ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolopropiónico (AMPA) activa canales iónicos de Na^+ que permiten el influjo de dicho ion, mientras que la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) induce la apertura de canales iónicos de Ca^{2+} , con lo que aumenta aún más la conductancia de este ion hacia el espacio intracelular (Chalkias y Xanthos, 2012; Mayor y Tymianski, 2018). La concentración incrementada de Ca^{2+} intracelular induce múltiples efectos citotóxicos; por ejemplo, ocasiona disfunción mitocondrial y producción de radicales libres, así como lipólisis y producción de ácidos grasos libres debida a la activación de fosfolipasas (Chalkias y Xanthos, 2012; Reis y

cols., 2017). Además, la sobrecarga de Ca^{2+} a nivel mitocondrial provoca alteraciones en el poro de transición mitocondrial; a su vez, esto ocasiona alteraciones en la integridad de la membrana mitocondrial, daño oxidativo irreversible y pérdida de la producción de ATP, lo que resulta finalmente en muerte celular (Chalkias y Xanthos, 2012; Sanganalmath y cols., 2017). Los episodios de isquemia cerebral global largos y severos pueden ocasionar que las mitocondrias sean completamente disfuncionales para la producción de ATP, por lo que se han relacionado con la muerte celular de tipo necrótico (Reis y cols., 2017).

Al terminar el episodio de isquemia cerebral global, durante la reperfusión sanguínea, se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de oxígeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), lo cuales se originan principalmente en los complejos mitocondriales I y III de la cadena transportadora de electrones. Estas especies reactivas ocasionan daño oxidativo a las mitocondrias y, en consecuencia, a la célula (Bakthavachalam y Shanmugam, 2017). Por otra parte, también ocurre desregulación de la homeostasis celular debido al incremento de especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cuales se producen por nitrosilación de proteínas ocasionada por la reacción del óxido nítrico (NO) y del anión O_2^- . Conjuntamente, además del daño proteico, el daño celular por ROS/RNS implica la alteración de los lípidos y los ácidos nucleicos, la inactivación de enzimas metabólicas clave que regulan el metabolismo de la glucosa y la activación de vías de señalización relacionadas con la muerte celular apoptótica (Bakthavachalam y Shanmugam, 2017; Li y cols., 2018).

La muerte neuronal vía apoptótica generalmente ocurre días después del episodio de isquemia, particularmente en la región CA1 y CA3 del hipocampo, pero también ocurre en otras áreas cerebrales como el estriado y en las capas 2 y 5 de la corteza

cerebral (Reis y cols., 2017). En el mecanismo principal intracelular de la apoptosis, debido a las alteraciones de la membrana mitocondrial, se liberan proteínas proapoptóticas como el citocromo *c* y la proteína mitocondrial que promueve la activación de caspasas dependientes de citocromo *c* (Smac). El citocromo *c* interactúa con la proteína 4 de muerte celular (CED-4), con el factor 1 activador de proteasas apoptótica (Apaf-1) y con el ATP; integralmente estas moléculas conforman el apoptosoma que activa a la caspasa 9. Ésta, activa a la caspasa 3, seguida de la activación corriente abajo de las caspasas 2, 6, 8 y 10. Smac se une a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), por lo que promueve la activación de la caspasa-3. Las caspasas corriente abajo pueden escindir muchas proteínas sustrato, incluida la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), lo que lleva a daño severo en el DNA y posteriormente a la muerte celular vía apoptótica (Reis y cols., 2017; Sanganalmath y cols., 2017). La apoptosis neuronal también puede ser activada por otro mecanismo intracelular, independiente de caspasas, en el que se liberan de los poros de transición mitocondrial proteínas proapoptóticas como el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G y la proteína 3 de interacción con Bcl-2 (BNIP3) (Bakthavachalam y Shanmugam, 2017; Reis y cols., 2017). Además, la señalización apoptótica se puede activar de forma extracelular a través de miembros de la familia de receptores de muerte como Fas y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). La unión del ligando Fas (FasL) extracelular al dominio de la proteína de muerte asociada a Fas (FADD) puede activar la procaspasa 8 y posteriormente la vía de la caspasa-3. La caspasa-8 también es capaz de truncar y activar el dominio de interacción de Bcl-2 (BID), un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, por lo que también inicia la liberación del citocromo *c* y de la apoptosis (Reis y cols., 2017; Sanganalmath y cols., 2017).

Los mecanismos proinflamatorios también son importantes inductores de daño isquémico, debido a que en respuesta a un episodio de isquemia cerebral global es activado el factor nuclear kappa B (NF- κ B). Este complejo proteico ejerce su función como factor de transcripción al inducir la expresión de genes que codifican moléculas de adhesión celular, receptores de superficie celular, y citocinas proinflamatorias (Clemens y cols., 1997; Reis y cols., 2017). Además, se ha reportado que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 β (IL-1 β) incrementan su expresión después de un episodio de isquemia global (Clemens y cols., 1997). Estas citocinas proinflamatorias tienen capacidades quimiotáctiles para los leucocitos, lo cual ocasiona que los leucocitos atraviesen la barrera hematoencefálica. La presencia excesiva de estas células proinflamatorias puede ocasionar, por una parte, la oclusión de la microvasculatura local después de la reperfusión y, por otra parte, puede desencadenar mecanismos de daño neuronal como la activación de la nicotinamida adenina difosfato (NADH) oxidasa con la subsecuente producción de radicales libres y de ácido hipocloroso, lo que provoca daño membranal y activación de proteasas (Lipton, 1999; Kawabori y Yenari, 2015). Aunado a lo anterior, después de un periodo de isquemia global existe proliferación de la microglía en las regiones dañadas (Espinosa-Garcia y cols., 2017). La microglía activa contribuye a la inducción de mecanismos de daño ya que, por ejemplo, se incrementa la producción de NOS y de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), por lo que la excesiva activación microglial se ha asociado con procesos de muerte neuronal isquémica (Xiong y cols., 2016; Surinkaew y cols., 2018).

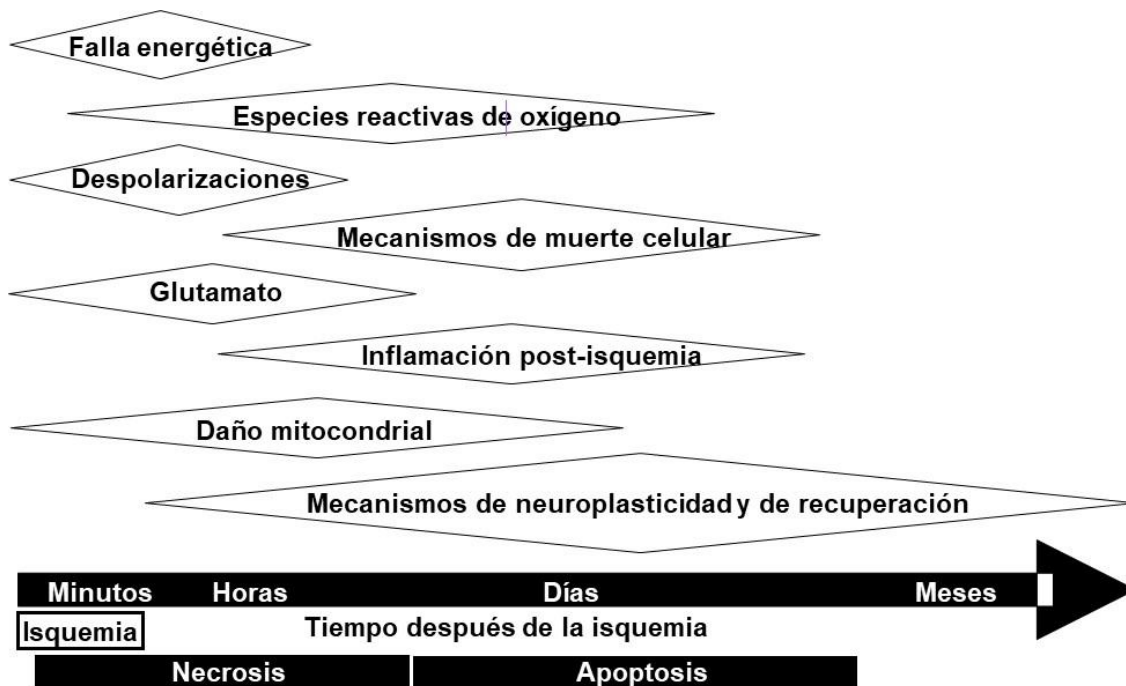


Figura 1. Curso temporal de los principales mecanismos fisiopatológicos activados por la isquemia cerebral que pueden inducir muerte neuronal, así como mecanismos de plasticidad cerebral que podrían estar relacionados con los procesos de recuperación. Modificada a partir de (Iadecola y cols., 1999).

Alteraciones funcionales asociadas al daño en el hipocampo, después de isquemia cerebral global

En roedores, el hipocampo se distribuye dorsoventralmente en un eje denominado septo-temporal. En ambos extremos presenta un “enrollamiento” de sí mismo en el que se distinguen 2 regiones: el CA y el giro dentado (GD). La estructura del hipocampo se dispone en capas o estratos, de manera que en las regiones CA1 a CA3 se encuentran filas de neuronas piramidales glutamatérgicas (estrato piramidal) cuyas dendritas basales se localizan en una zona llamada estrato oriens; a su vez, las dendritas apicales de estas neuronas se ramifican en el estrato radiado. Enseguida de esta capa se halla el estrato más profundo llamado lacunoso-moleculare, donde se encuentran las ramificaciones terminales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Las neuronas piramidales de las regiones CA1 a CA3 difieren sináptica y morfológicamente, de manera que las neuronas de CA2 tienen el soma más grande que

las de CA1, y el soma de las neuronas de CA3 es más grande que las de CA1 y CA2. Aunado a lo anterior, se han identificado interneuronas denominadas células “en canasta”, entre el estrato piramidal y el estrato oriens; en la interfase del estrato oriens y el alveus se localiza otro grupo de interneuronas denominadas “oriens-alveus”, mientras que un tercer grupo de interneuronas llamadas “lacunoso-moleculares”, se localiza en el borde de los estratos radiado y lacunoso-molecular. Los tres grupos de interneuronas presentan neurotransmisión inducida por el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Teyler and Discenna, 1984; El-Falougy Y Benuska, 2006; Schultz y Engelhardt, 2014).

El GD o fascia dentada también presenta una estructura laminar, está formado por un estrato curvado de neuronas granulares que utilizan glutamato como neurotransmisor y se dividen topográficamente en dos bordes: el borde suprapiramidal y el borde infrapiramidal. A la región intermedia que separa ambos bordes se le denomina cresta, y a la región entre ambos bordes se le denomina región hilar (hilus). Las dendritas de las neuronas granulares se hallan en la siguiente capa que conforma el GD, la capa molecular. En la región hilar se hallan neuronas piramidales polimórficas glutamatérgicas que se dispersan en el interior del GD, a partir del área terminal de CA3, por lo que se les conoce como neuronas del hilus dentado (Teyler and Discenna, 1984; Kandel y cols., 2001; El-Falougy Y Benuska, 2006).

El hipocampo recibe información procedente de varias regiones cerebrales, por ejemplo, recibe fibras colinérgicas de la región septal, aferencias noradrenérgicas del locus coeruleus, información serotoninérgica del núcleo del rañé medial, y una vía histaminérgica proveniente de la región supramamilar (Teyler and Discenna, 1984; Kandel y cols., 2001). Las conexiones al interior del hipocampo conforman un circuito cerrado de 3 sinapsis (circuito trisináptico) (Figura 2). Cabe señalar que las 3 sinapsis

que conforman este circuito presentan principalmente neurotransmisión glutamatergica (Teyler and Discenna, 1984; Kandel y cols., 2001; Schultz y Engelhardt, 2014).

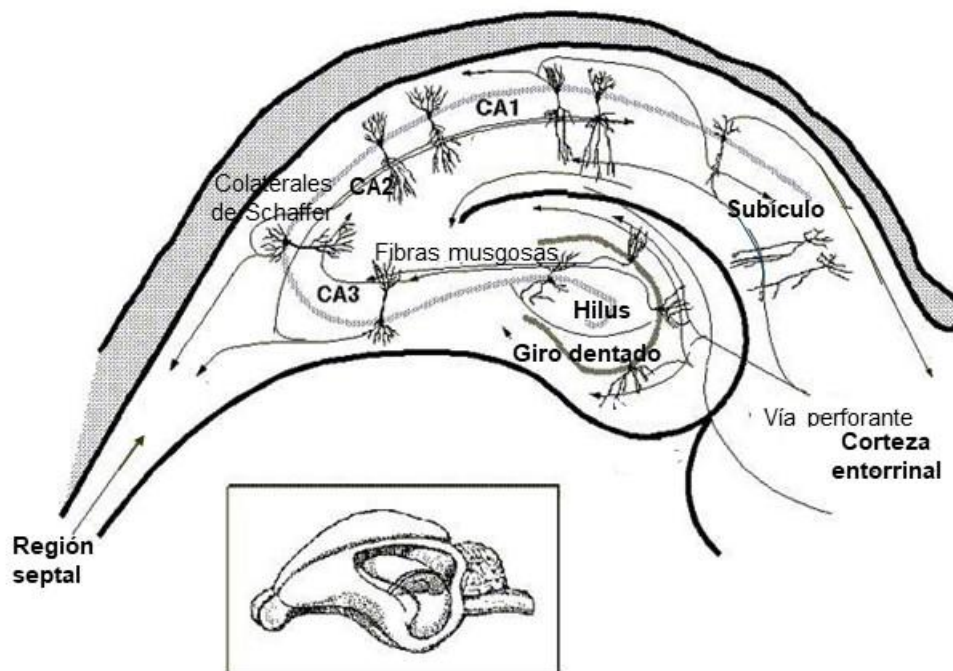


Figura 2. Circuito trisináptico del hipocampo de rata. Este circuito está conformado por las fibras que provienen de la corteza entorrinal (vía perforante) y hacen sinapsis con las neuronas granulares del GD. Éstas, proyectan sus axones (vía fibras musgosas) y hacen sinapsis con las neuronas piramidales de CA3. Los axones de estas neuronas (vía colaterales de Schaffer) proyectan hacia las neuronas piramidales de CA1, las cuales proyectan nuevamente hacia la corteza entorrinal y cierran el circuito trisináptico.

En el humano, se han reportado alteraciones de la memoria, después de un periodo de isquemia global con daño al hipocampo (Stamenova y cols., 2018). En estudios realizados en roedores, también se ha demostrado que la muerte neuronal en el hipocampo, particularmente de las neuronas piramidales en la región CA1, inducido por un episodio de isquemia global, se asocia con alteraciones del aprendizaje y de la memoria espacial, evaluadas en laberintos como el acuático de Morris (Block y Schwarz, 1998; Block, 1999; Hartman y cols., 2005; Wang y cols., 2017).

La pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo puede variar desde el 10 % hasta el 100%, en función a la duración del episodio de isquemia y del modelo de

isquemia global utilizado (Block, 1999). En particular, con el modelo de isquemia global en ratas por “oclusión de los cuatro vasos” (4-VO), la despoblación de neuronas piramidales en CA1 es severa cuando la duración del episodio isquémico es mayor a 15 minutos (Pulsinelli y cols., 1982; Nunn y cols., 1994; Morali y cols., 2011). En periodos de isquemia global de 15 min o mayores, también se produce muerte neuronal en las regiones CA2, CA3, e hilus; y el daño puede extenderse a otras regiones cerebrales como la corteza cerebral y el estriado dorsolateral (Pulsinelli y cols., 1982; Traystman, 2003; Morali y cols., 2011). El daño morfológico al hipocampo inducido por un episodio de isquemia severo ha sido relacionado con diversas alteraciones funcionales, las cuales han sido consistentemente evidenciadas en modelos conductuales como el laberinto acuático de Morris (aprendizaje-memoria espacial) y el laberinto radial de Olton (memoria de referencia y memoria de trabajo) (Block, 1999; Langdon y cols., 2008; Morali y cols., 2011).

Plasticidad cerebral

La comprensión del sistema nervioso (SN) ha cambiado considerablemente. El esquema rígido de circuitos invariables tanto en el número de sus neuronas como en las conexiones entre ellas ha sido sustituido por un sistema en el que ocurren modificaciones dinámicas constantes de sus propiedades estructurales y funcionales, en respuesta a cambios ambientales, y a la integración de nuevas neuronas (neurogénesis) (Frisén, 2016; Karpova y cols., 2017). Esta perspectiva da origen al concepto de plasticidad cerebral y constituye un elemento unificador esencial para comprender procesos aparentemente diferentes como el aprendizaje-memoria y la recuperación de funciones después de una lesión (Cohen y cols., 2017). De manera general, la plasticidad cerebral se define como “cambios en estructuras, conexiones o funciones en

un sistema neural en respuesta a diversas situaciones fisiológicas, al aprendizaje, a las manipulaciones experimentales o al daño, durante el desarrollo o en el adulto; así también como a cambios que ocurren como resultado de la vejez y de la enfermedad (Nieto-Sampedro, 2005; Cohen y cols., 2017). En otras palabras, la plasticidad cerebral es una constante a lo largo de la vida (Karpova y cols., 2017; Kolb y cols., 2017).

Actualmente, se conoce que un episodio de isquemia, además de activar mecanismos fisiopatológicos de daño neuronal, induce procesos de plasticidad cerebral (Figura 1) que implican cambios en la citoarquitectura de las neuronas incluyendo las modificaciones de la arborización dendrítica, la espinogénesis, la sinaptogénesis y el crecimiento axonal que, en conjunto con la activación de procesos de neurogénesis, favorecen la reorganización de los circuitos alterados y, por lo tanto, la posible recuperación funcional (Caleo, 2015; Lindvall y Kokaia, 2015; Alia y cols., 2017).

Isquemia cerebral y cambios en la citoarquitectura neuronal

Se conoce que las dendritas y las espinas dendritas, que son los sitios postsinápticos de las neuronas, cambian dinámicamente en respuesta al aprendizaje y la memoria. Dado que la potenciación a largo plazo (LTP) es uno de los principales mecanismos de plasticidad sináptica que subyace al aprendizaje y la memoria, se ha demostrado que este mecanismo induce los cambios morfológicos en las espinas dendríticas a través de la activación de los receptores AMPA y NMDA (Segal, 2017). Por otra parte, se sabe que las dendritas, así como la densidad y la forma de sus espinas, presentan alteraciones que se asocian con enfermedades neurodegenerativas o con daño cerebral agudo (Maiti y cols., 2015). No obstante lo anterior, la reorganización dendrítica, incluyendo cambios en la densidad y forma de sus espinas después de daño cerebral, se ha relacionado con procesos de recuperación funcional (Corbett y cols.,

2006; Maiti y cols., 2015).

Se ha descrito que episodios breves de isquemia *in vitro* inducen cambios citoarquitectónicos en las neuronas del hipocampo que se relacionan con un incremento en la capacidad sináptica; por ejemplo, se ha observado aumento transitorio en el número de sinapsis perforadas (densidad postsináptica discontinua) seguido por un incremento de botones sinápticos múltiples, crecimiento de filopodios, agrandamiento de espinas existentes y formación de nuevas espinas dendríticas (Piccini y Malinow, 2001; Jourdain y cols., 2002). Esta remodelación estructural es dependiente de la LTP, del Ca^{2+} , y de la activación de los receptores NMDA, por lo que se ha sugerido que reproducen los cambios asociados con la plasticidad sináptica que subyace al aprendizaje (Calabresi y cols., 2003; Maiti y cols., 2015).

La citoarquitectura en el hipocampo también se modifica significativamente después de un episodio de isquemia cerebral *in vivo*. En modelos de isquemia focal, se ha demostrado que en la zona de penumbra de la corteza cerebral dañada, el número de sinapsis, de vesículas sinápticas, de espinas y el volumen total tanto de las terminales axónicas como las de las espinas, disminuyen a corto plazo pos-isquemia. No obstante lo anterior, a largo plazo estas estructuras se recuperan hasta valores similares a los controles o incluso superiores (Ito y cols., 2006). De forma similar, otros autores encontraron una disminución de espinas dendríticas de las neuronas corticales en la zona de penumbra a un tiempo corto pos-isquemia (Brown y cols., 2008), mientras que a mediano plazo (una o dos semanas después del episodio de isquemia) observaron un incremento significativo en el número de nuevas espinas dendríticas, además de una remodelación vascular, que sugiere procesos de recuperación plástica (Brown y cols., 2007).

En modelos de isquemia cerebral global, se han demostrado alteraciones ultraestructurales degenerativas de las densidades postsinápticas en las neuronas de CA1 y del GD; dichas densidades son más gruesas y con un patrón irregular en el hipocampo de los animales sometidos a isquemia (Martone y cols., 1999). Aunado a lo anterior, se ha observado que estas alteraciones postsinápticas son más severas y persistentes en CA1 que en el GD, lo que sugiere que pueden estar relacionadas con la vulnerabilidad diferencial que presentan estas regiones cerebrales ante la isquemia (Martone y cols., 2000). También se ha reportado que, después de un episodio de isquemia global, la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de CA1 disminuye a corto plazo, mientras que a largo plazo la densidad de espinas dendríticas incrementa y se relaciona con la recuperación funcional (Corbett y cols., 2006; Ruan y cols., 2006; Ruan y cols., 2009). Similares respuestas de plasticidad cerebral pos-isquemia se han encontrado en las neuronas de la corteza cerebral (Zhu y cols., 2017; Ju y cols., 2018). Estos hallazgos sugieren que aunque un episodio de isquemia ocasiona daño estructural en la arborización dendrítica de las neuronas sobrevivientes, esta arborización puede mantener capacidad plástica y, por lo tanto, puede ser una de las bases para la reorganización cerebral, la cual puede relacionarse con una adecuada recuperación funcional (Zhu y cols., 2017). En este sentido, cuando se suma algún tratamiento farmacológico o alguna estrategia de neurorehabilitación conductual (por ejemplo, la exposición a un ambiente enriquecido), después de un episodio de isquemia global, se incrementa el número de sinapsis y el número de procesos dendríticos en las neuronas del hipocampo; y estos cambios estructurales se correlacionan con una mejor recuperación funcional (Briones y cols., 2006; Zhang y cols., 2019).

La recuperación parcial después de una lesión cerebral, puede ser el resultado de la incapacidad de las neuronas para formar conexiones axonales y dendríticas que

generen respuestas funcionales apropiadas. Dicha incapacidad de las neuronas para establecer nuevas conexiones funcionales después de una lesión, no se puede atribuir solo a las posibles alteraciones intrínsecas celulares, sino también al efecto adverso de un microambiente no permisivo. Al respecto, se ha demostrado que la mielina puede jugar un papel no permisivo en estas circunstancias debido a que es un substrato importante para la presencia de proteínas inhibitoras del crecimiento neurítico, con lo que estaría limitando la plasticidad de las neuronas dañadas (Schwab y Caroni, 1988). Es así que, se han caracterizado varias proteínas y proteoglicanos asociados a la mielina como inhibidores del crecimiento neurítico, entre los que destacan la glicoproteína de mielina de los oligodendrocitos (OMgp) (Wang y cols., 2002), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (McKerracher y cols., 1994), y la proteína llamada Nogo-A (GrandPré y cols., 2000). En particular, se conoce que Nogo-A es un potente inhibidor del crecimiento axonal y de la arborización dendrítica (Kempf y Schwab, 2013). De hecho, cuando se administra el anticuerpo monoclonal IN-1 para bloquear a Nogo-A inmediatamente después de un episodio de isquemia, se presentan nuevas proyecciones eferentes corticales que se originan en el hemisferio contralateral a la lesión (Papadopoulos y cols., 2002). Más aún, estos autores demostraron que el tratamiento con IN-1 pos-isquemia permite un incremento de la arborización y de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas de la capa V cortical del hemisferio contralateral a la lesión (Papadopoulos y cols., 2006). En ambos estudios, la reorganización del hemisferio contralateral a la lesión isquémica favorecida por el bloqueo de Nogo-A, se relacionó con una recuperación funcional significativa. Cabe destacar que cuando el anticuerpo que neutraliza a Nogo-A se administra una semana después de la isquemia, aún favorece la plasticidad cerebral en relación con la recuperación funcional de los animales (Seymour y cols., 2005). Otros tratamientos dirigidos para regular Nogo-A

después de un episodio de isquemia global, también han favorecido una mejor recuperación conductual, una disminución de la muerte neuronal y un mayor crecimiento neurítico, en comparación a lo que se observa sin dichos tratamientos (Zhou y cols., 2003; Li y cols., 2016).

Por otra parte, se sabe que la alta proliferación de la microglía y de la astrología después de un episodio de isquemia, pueden conformar la llamada cicatriz glial en el sitio de la lesión (Fawcett y Asher, 1999). Si bien la reacción microglial, astrocítica y la formación de la cicatriz glial en sí se relacionan con la regulación de la respuesta inmune, con la reparación de la barrera hematoencefálica y con la sobrevivencia neuronal; una respuesta inflamatoria descontrolada, aunada a la formación de la cicatriz glial, puede limitar el potencial plástico reorganizador pos-isquemia del SN (Fawcett y Asher, 1999; Magaki y cols., 2018). En este sentido, se ha reportado que los tratamientos enfocados en disminuir la astrogliosis reactiva pos-isquemia, pueden regular la formación de la cicatriz glial, promover la plasticidad de la citoarquitectura neuronal y favorecer la recuperación funcional (Li y cols., 2015; Sims y Yew, 2017).

Isquemia cerebral y neurogénesis

En las últimas décadas se ha demostrado la presencia de neurogénesis en el cerebro adulto de algunos mamíferos (Ming y Song, 2005; Ming y Song, 2011), aunque en el humano sigue siendo controversial su demostración (Paredes y cols., 2018; Sorrells y cols., 2018). Anatómicamente, se ha descrito que la neurogénesis ocurre en el hipocampo y en el bulbo olfatorio de mamíferos adultos. Los precursores primarios se han identificado en zonas especializadas denominadas ‘nichos neurogénicos’, ubicadas en la zona subgranular (ZSG) del GD en el hipocampo y en la zona subventricular (ZSV). En particular, se sabe que en la ZSG existe una población de células

troncales/progenitoras neurales que mantienen su capacidad de autorrenovación a lo largo de la vida y que pueden originar, una vez que se diferencian, nuevas neuronas granulares que se integran a las redes neuronales preexistentes en el GD del hipocampo (Figura 3) (Abrous y cols., 2005; Gonçalves y cols., 2016).

Las diferentes etapas de la neurogénesis en el GD del hipocampo son reguladas tanto por factores extrínsecos (o extracelulares) como intrínsecos (o intracelulares). Entre los factores extrínsecos se encuentran diversos morfógenos como Notch, Sonic hedgehog (Shh), Wnts y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs); los neurotransmisores clásicos como el glutamato, el GABA y la acetilcolina; así como los factores neurotróficos, las citocinas y las hormonas (Ming y Song, 2011; Gonçalves y cols., 2016). Los diferentes factores extrínsecos activan su respectiva vía de señalización a nivel de la membrana celular, e inducen la acción de los factores intrínsecos, los cuales regulan la proliferación de los progenitores neurales, la migración, la diferenciación, la integración, y la sobrevivencia de las nuevas neuronas granulares del GD. Entre los principales factores intrínsecos que se han asociado con los procesos mencionados se incluyen reguladores del ciclo celular como p16, p21 y p53; factores de transcripción como Sox2, el cual es el principal mediador de la señalización intracelular inducida por Notch, el receptor nuclear huérfano TLX a través de la regulación de la vía intracelular Wnt/beta catenina; los factores transcripcionales NeuroD1 y el homeobox Prox1, cuya expresión es regulada por la vía de señalización canónica Wnt; factores reguladores de la expresión genética como los miRNAs y los mecanismos epigenéticos (Ming y Song, 2011; Gonçalves y cols., 2016; Toda y Gage, 2018).

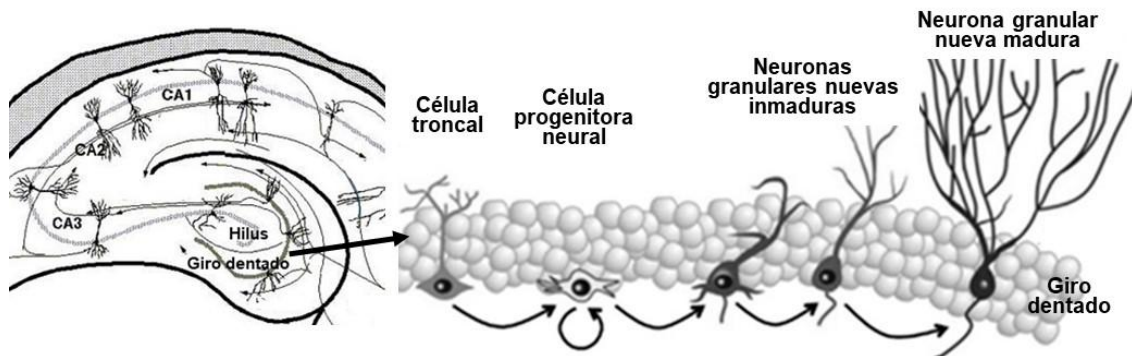


Figura 3. Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. La zona subgranular del giro dentado constituye un nicho neurogénico donde se encuentran células troncales/progenitoras que mantienen su capacidad autorrenovación. En respuesta a ciertos estímulos estas células proliferan y posteriormente pueden diferenciarse-madurar en neuronas granulares nuevas que se integran a las redes neuronales preexistentes.

La neurogénesis es modulada tanto por estímulos fisiológicos como la adquisición de un nuevo aprendizaje, el ejercicio físico y la exposición a un ambiente enriquecido, como por condiciones fisiopatológicas incluyendo la actividad epileptoide y la isquemia cerebral, debido a lo cual se ha propuesto que tiene el potencial de compensar el daño asociado con la muerte neuronal (Kokaia y Lindvall, 2003; Jessberger y Parent, 2015; Lindvall y Kokaia, 2015; Liu y Nusslock, 2018). Actualmente, es de interés terapéutico estudiar el efecto de alguno de los moduladores o la convergencia de varios de éstos sobre la neurogénesis. Se ha reportado que después de un episodio de isquemia focal, la experiencia en un ambiente enriquecido en conjunto con un estímulo de aprendizaje espacial, incrementa la neurogénesis en el GD del hipocampo (Matsumori y cols., 2006). No obstante lo anterior, se ha descrito que la exposición a un ambiente enriquecido, previo a un episodio de isquemia global, no incrementa la neurogénesis pos-isquemia en esta región cerebral (Kato y cols., 2014). Particularmente, aunque en condiciones basales el ejercicio físico (componente de un ambiente enriquecido) incrementa la neurogénesis en el GD, lo cual se relaciona con una mejor ejecución de las pruebas de memoria. (Seo y cols., 2014; Ahn y cols., 2016); después de un episodio de isquemia global no se encontró un efecto significativo del ejercicio físico terapéutico

sobre la neurogénesis del hipocampo (Briones y cols., 2005).

Uno de los principales mecanismos de acción que se han relacionado con la regulación de la neurogénesis es el que ejercen los factores neurotróficos como el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Vilar y Mira, 2016). En este sentido, cuando en la recuperación de los animales sometidos a isquemia se incluye el ejercicio físico, se incrementa el BDNF (Ploughman y cols., 2007; Ahn y cols., 2016) y, a su vez, la administración del BDNF pos-isquemia se relaciona con un incremento de la neurogénesis en el hipocampo y con una recuperación funcional en roedores (LinksSchäbitz y cols., 2007). Asimismo, se ha demostrado que la infusión intracerebroventricular del FGF-2 en combinación con el EGF, después de daño isquémico, incrementa la neurogénesis tanto en el GD como en la ZSV (Türeyen y cols., 2005). El tratamiento con VEGF pos-isquemia también estimula la neurogénesis en ambas regiones cerebrales, así como la recuperación de las funciones neurológicas afectadas (Sun y cols., 2003).

Además de la neurogénesis en el GD, se ha demostrado que la isquemia global induce la proliferación celular de progenitores neurales en la zona periventricular posterior adyacente al hipocampo; y que estas células migran hacia el área dañada en CA1, donde se diferencian en neuronas piramidales y favorecen la recuperación funcional (Nakatomi y cols., 2002; Bendel y cols., 2005). Sin embargo, en un estudio realizado a un tiempo pos-isquemia mayor que los anteriores, se sugiere que la mayoría de las nuevas neuronas piramidales de CA1 se degeneran y que esta neurodegeneración se asocia con la presencia de alteraciones funcionales (Bueters y cols., 2008).

Por otra parte, se ha descrito que varios factores pueden limitar la capacidad de reparación del SNC, donde los procesos proinflamatorios constituyen uno de los

principales factores que, dependiendo de su intensidad, pueden regular negativamente la neurogénesis en el adulto (Ek Dahl y cols., 2003; Kohman y Rhodes, 2013; Borsini y cols., 2015). Entre ellos, la activación microglial incrementada se ha relacionado con una disminución en la neurogénesis del hipocampo de roedores adultos (Belarbi y Rosi, 2013; Sato, 2015). En respuesta a un episodio de isquemia, la reacción proinflamatoria, la subsecuente activación microglial y la liberación de citocinas proinflamatorias, regulan negativamente la generación de nuevas neuronas en las diferentes regiones cerebrales neurogénicas (Tobin y cols., 2014; Xiong y cols., 2016). De esta manera, cuando la reacción proinflamatoria, observada luego de un proceso isquémico, es reducida con tratamientos antiinflamatorios, se observa una disminución de la microglía, un incremento de la neurogénesis en el GD del hipocampo y una mejor recuperación funcional (Liu y cols., 2007; Tobin y cols., 2014).

En conjunto, la información descrita sugiere que un tratamiento que tenga la capacidad de incrementar la expresión de factores neurotróficos y que tenga propiedades antiinflamatorias después de un evento isquémico, favorecerá la activación de procesos de neuroplasticidad como la neurogénesis.

Ventana de oportunidad terapéutica y recomendaciones para el estudio de posibles neuroprotectores en eventos isquémicos

En el curso temporal de los mecanismos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia que originan daño neuronal, existe una “ventana de oportunidad terapéutica” en la que se pueden contrarrestar dichos mecanismos de daño, de manera que se pueda impedir la muerte neuronal ocasionada por los mecanismos secundarios de daño desencadenados por la isquemia. En el humano, se considera que el periodo que comprende la “ventana de oportunidad terapéutica” luego del episodio isquémico, es de

únicamente las seis primeras horas (Finklestein y cols., 1999; Cheng y cols., 2004). De este modo, la aplicación previa o inmediata (dentro de las seis horas a partir del episodio isquémico) de fármacos o de maniobras no farmacológicas que disminuyan o contrarresten uno o varios de los mecanismos fisiopatológicos activados por la isquemia, podría reducir el daño neuronal. En modelos experimentales de isquemia algunos agentes farmacológicos han tenido efectos neuroprotectores, por ejemplo los bloqueadores de canales de Ca^{+2} , anticonvulsivos, fármacos que reducen la liberación de neurotransmisores excitadores, antagonistas de los receptores de glutamato, agonistas del receptor A sensible al GABA ($GABA_{AR}$), agentes antioxidantes, y fármacos antiapoptóticos. Sin embargo, en los ensayos clínicos se han observado escasos o nulos efectos neuroprotectores en contra de los efectos de la isquemia (Cheng y cols., 2004; Wahlgren y cols., 2004; Ginsberg y cols., 2008; Xiong y cols., 2018).

Para superar las discrepancias entre los estudios básicos y los clínicos se ha sugerido considerar algunas recomendaciones en el diseño experimental de las investigaciones (Finklestein y cols., 1999; Ginsberg y cols., 2008), incluyendo que el tratamiento neuroprotector sea administrado pos-isquemia y dentro de la ventana de oportunidad terapéutica (Finklestein y cols., 1999). Con respecto al potencial del tratamiento, se ha sugerido que el agente neuroprotector a estudiar tenga la capacidad de contrarrestar varios de los mecanismos desencadenados por la isquemia, o que se utilice una combinación con otros fármacos en contra de diferentes mecanismos de daño (Finklestein y cols., 1999; Wahlgren y cols., 2004). También, se ha planteado que los agentes a estudiar tengan la capacidad de estimular a uno o varios de los mecanismos de plasticidad pos-isquemia y, en el caso ideal, que el posible neuroprotector tenga el potencial tanto de oponerse a los mecanismos de daño como de favorecer los mecanismos de recuperación plástica (Finklestein y cols., 1999; Wahlgren y cols., 2004;

Schmidt y Minnerup, 2016). Con respecto al factor tiempo, se ha recomendado que la evaluación del tratamiento neuroprotector se realice a largo plazo a fin de descartar la posibilidad de que el neuroprotector sólo retrase el daño final (Finklestein y cols., 1999; Leker y Shohami, 2002). Además, el efecto neuroprotector de un fármaco debería manifestarse como una reducción de las alteraciones morfo-funcionales a largo plazo, provocadas por la isquemia, que no pudieron ser compensadas por los procesos de plasticidad espontánea pos-isquemia “*per se*” (Corbett y Nurse, 1998).

En la búsqueda de potenciales sustancias neuroprotectoras para el tratamiento de la isquemia, se han identificado compuestos originalmente endógenos como posibles candidatos incluyendo hormonas como la melatonina, los estrógenos y la P4. La diversidad de acciones moleculares/celulares de estas hormonas en el SN sustenta su potencial neuroprotector, debido a que pueden regular diferentes mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y los procesos de plasticidad (Cervantes y cols., 2008; Céspedes y cols., 2018).

La progesterona como esteroide neuroactivo y sus mecanismos de acción

Actualmente, se conoce que las hormonas esteroideas (andrógenos, estrógenos y progestágenos) originadas en las glándulas periféricas, además de regular funciones reproductoras, regulan diversos procesos en el SN tanto en el desarrollo como en la fase adulta, de ahí que se les denomine esteroides neuroactivos (Giatti y cols., 2018). Dentro de los que también se incluyen las hormonas esteroideas sintetizadas localmente en el cerebro (neuroesteroides) y los esteroides sintéticos administrados exógenamente que llegan al cerebro, algunos de los cuales son utilizados en la práctica clínica (Rupprecht, 2003; Giatti y cols., 2018). Durante el desarrollo, las hormonas esteroideas actúan sobre las neuronas y las células gliales regulando la supervivencia, la diferenciación y la

conectividad de grupos neuronales específicos, tanto en el cerebro como en la médula espinal. En la etapa adulta, estos esteroides neuroactivos influyen sobre la morfología y funcionalidad neuronal al promover el crecimiento de sus proyecciones, la sinaptogénesis, la síntesis de neurotransmisores y la expresión de receptores para neurotransmisores, regulando así la transmisión sináptica (Rudolph y cols., 2016; Giatti y cols., 2018).

En particular, la P4 puede ser sintetizada en varias estructuras cerebrales incluyendo al hipocampo. Además de los oligodendrocitos y los astrocitos, las neuronas presentan enzimas esteroidogénicas (Figura 4); de hecho, la síntesis de P4 puede ocurrir en los tres tipos celulares referidos debido a que el citocromo P450_{scc}, responsable de la formación de pregnenolona a partir de colesterol y la 3 β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), responsable de la producción de P4 y androstenediona, se expresan en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Melcangi y cols., 2014).

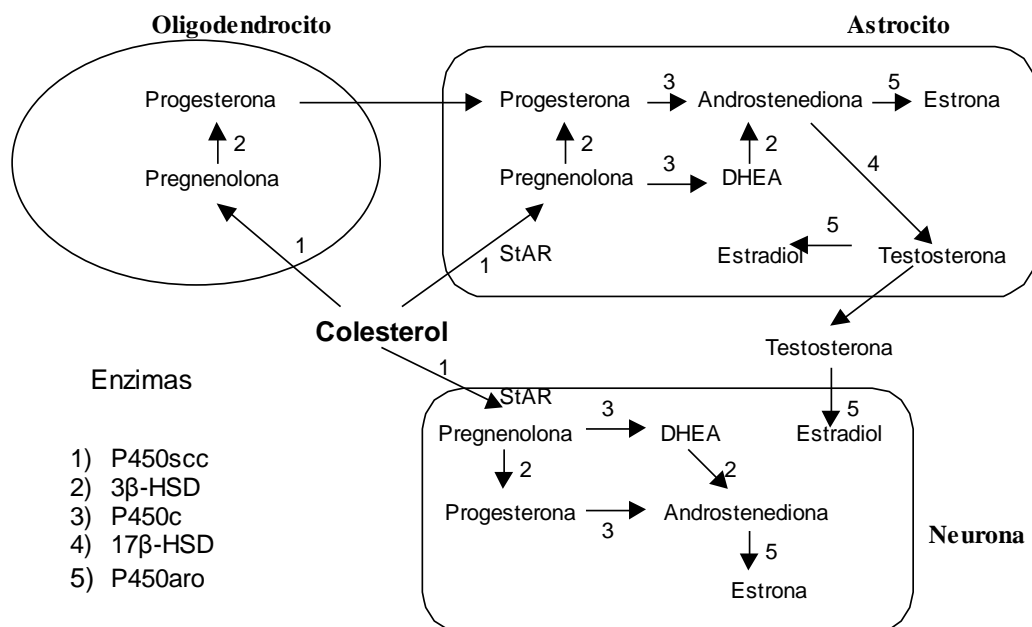


Figura 4. Síntesis de neuroesteroides (incluyendo la progesterona) en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas en el cerebro de rata. Tomado de Veiga y cols. (Veiga y cols., 2004). DHEA, dehidroepiandrosterona; StAR, proteína reguladora aguda esteroidogénica.

La P4 sintetizada en el cerebro (incluyendo el hipocampo), o que llega a él vía torrente sanguíneo, es biotransformada a sus metabolitos reducidos 5 α - y 5 β -dihidroprogesterona (DHP o pregnandiona) por la acción de la 5 α - o de la 5 β -reductasa respectivamente, y a los cuatro tetrahydroderivados correspondientes: 3 α ,5 α -, 3 β ,5 α -, 3 α ,5 β - y 3 β ,5 β -tetrahydroprogesterona (pregnanolonas) por la 3 α - o la 3 β -hidroxiesteroide oxidoreductasa respectivamente. El principal producto de biotransformación de la P4 (Figura 5), y con mayores efectos en el SNC, es la 3 α ,5 α -tetrahydroprogesterona (THP o alopregnanolona) (Melcangi y cols., 2014; Schumacher y cols., 2014)

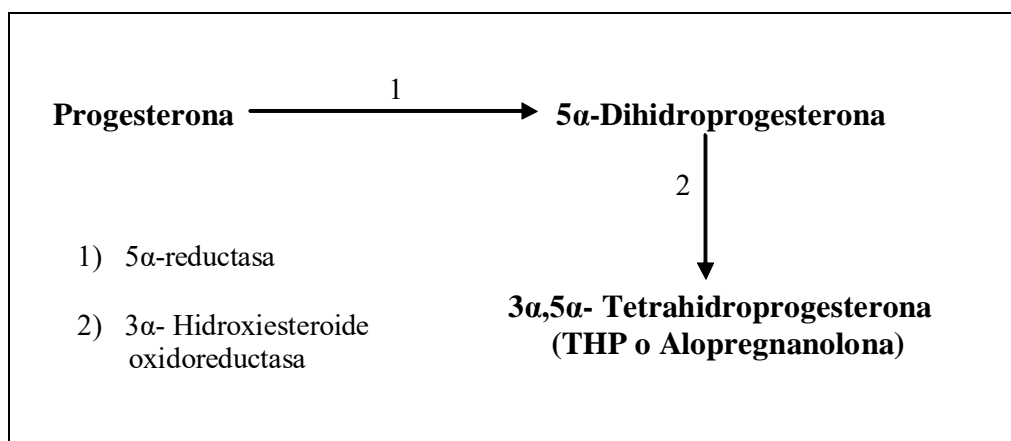


Figura 5. Biotransformación de la progesterona a alopregnanolona (THP).

Una vez que atraviesan la membrana celular, el mecanismo clásico de acción de los esteroides en el SNC se realiza a través de la interacción con sus receptores intracelulares. Los receptores de P4 (PR) que se han caracterizado principalmente son las isoformas PR-A y PR-B, los cuales tienen la capacidad de unirse al DNA y, por lo tanto, constituyen factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos (mecanismo genómico) (Camacho-Arroyo y cols., 1998; Rupprecht, 2003; Schumacher y cols., 2014). Por otra parte, se ha identificado un sitio de unión en la membrana celular de las células nerviosas para la P4 (Brinton y cols., 2008). A los efectos desencadenados por estos receptores membranales se les conoce como “no

transcripcionales o no genómicos”, debido a que la unión del esteroide con su receptor no ocasiona una modificación directa en la expresión genética, sino que induce una respuesta más rápida que implica la activación de vías de señalización intracelular a través de segundos mensajeros (Schumacher y cols., 2014; Rudolph y cols., 2016).

Otro mecanismo de la P4 y de la alopregnanolona muy importante en el SNC, es la modulación alostérica de receptores ionotrópicos, la cual genera inicialmente respuestas independientes de la síntesis de RNA o de proteínas, por lo que sus efectos también son considerados “no genómicos”. La alopregnanolona es un modulador positivo del receptor GABA_AR debido a que ocasiona un incremento en la frecuencia y/o duración de la activación de este canal iónico, lo cual incrementa el influjo de Cl⁻ (Majewska y cols., 1986; Guennoun y cols., 2015). También se ha descrito que la P4 modula receptores ionotrópicos de varios neurotransmisores como los tipo 3 de la 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina); los NMDA, AMPA y kaínato del glutamato; los nicotínicos de la acetilcolina; así como al receptor sigma 1 (σ 1) (Rupprecht, 2003; Guennoun y cols., 2015). La modulación alostérica de los receptores para neurotransmisores activa respuestas que van desde milisegundos a segundos, por lo que constituye un mecanismo de acción muy rápido de los esteroides. No obstante lo anterior, también puede existir regulación genética a través de la modulación de canales iónicos operados por ligando, o a través de receptores acoplados a proteínas G, debido a que la interacción de los esteroides como la P4 y la alopregnanolona con estos receptores, puede alterar la actividad intracelular de cinasas que consecuentemente afectan la expresión de genes a través de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Rupprecht, 2003; Schumacher y cols., 2014). Por otra parte, se conoce que la P4 y la alopregnanolona pueden tener efectos antioxidantes en el SN, debido a que presentan un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A que les

permite neutralizar a moléculas con electrones desapareados, como es el caso de los radicales libres (Veiga y cols., 2004).

Los mecanismos descritos a través de los cuales la P4 y/o la alopregnanona ejercen diversas funciones en el SN explican, al menos en parte, sus propiedades neuroprotectoras ante el daño cerebral, incluyendo el ocasionado por isquemia (Guennoun y cols., 2015; Céspedes y cols., 2018).

ANTECEDENTES

Las diferencias de género en la recuperación ante el daño cerebral ocasionado por lesión traumática o por accidentes cerebrovasculares, sugirió que los niveles de las hormonas sexuales (estrógenos y P4) están involucrados en la mejor recuperación que presentan los individuos del género femenino (Roof y Hall, 2000). Asimismo, algunos estudios clínicos han confirmado que las variaciones en los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales se asocian con el grado de riesgo a padecer un infarto cerebral; de esta manera, las mujeres premenopáusicas presentan una menor incidencia de infarto cerebral que los hombres de la misma edad. Esta protección se pierde cuando las mujeres entran en la menopausia, y el riesgo de padecer un infarto cerebral es similar al de los hombres (Roof y Hall, 2000; Chauhan y cols., 2017). En este sentido, actualmente se ha dilucidado evidencia experimental de que la administración terapéutica de las hormonas sexuales tiene efectos neuroprotectores. Además, se ha sugerido que, a diferencia de los estrógenos, la P4 tiene el potencial de ser un neuroprotector eficaz tanto en el género femenino como en el masculino (Stein, 2001; Sayeed and Stein, 2009).

Neuroprotección regulada por la progesterona

Las primeras evidencias de los efectos neuroprotectores de la P4 mostraron que esta hormona disminuía el edema cerebral en modelos de isquemia focal (Attella y cols., 1987; Betz y Coester, 1990) y en modelos de daño traumático (Roof y cols., 1992; Roof y cols., 1993). En particular, en estos últimos se observó que las ratas hembra presentaban menor edema cerebral que las ratas macho; además, se demostró que tanto en ratas hembra (incluyendo aquellas que fueron ovariectomizadas) como en machos, el tratamiento con P4 disminuye el edema cerebral traumático (Roof y cols., 1992; Roof y cols., 1993). En estudios posteriores, se probó que el tratamiento con P4, además de disminuir el edema cerebral (Roof

y cols., 1996; Wright y cols., 2001), disminuye el tamaño de la lesión y las alteraciones en el aprendizaje y la memoria ocasionadas por daño traumático (Roof y cols., 1994; Goss y cols., 2003; Djebaili y cols., 2004; Brotfain y cols., 2016). Asimismo, el tratamiento con alopregnanolona ha demostrado su capacidad para reducir tanto las alteraciones histopatológicas como las funcionales ocasionadas por daño traumático a nivel cortical (Djebaili y cols., 2004). Más aún, en animales sometidos a una lesión traumática de la médula espinal, patología que presenta eventos fisiopatológicos similares a los observados en la isquemia cerebral, el tratamiento con P4 disminuye el tamaño de la lesión y promueve la recuperación motriz de los animales de experimentación (Thomas y cols., 1999; González y cols., 2004; Brotfain y cols., 2016). En modelos de epilepsia, tanto la P4 como la alopregnanolona tienen efectos anticonvulsivos, además de que reducen el daño cerebral ocasionado por las crisis convulsivas (Frye y cols., 2000; Hoffman Y cols., 2003; Wu y Burnham, 2018). Asimismo, en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), también se ha demostrado que la P4 y la alopregnanolona reducen la magnitud del daño en los nervios periféricos lesionados (Koenig y cols., 1995; Azcoitia y cols., 2003; Giatti y cols., 2015).

De manera similar, varios estudios han demostrado que la P4 ejerce efectos neuroprotectores en los animales sometidos a isquemia focal, entre estos reduce la magnitud del volumen del infarto cerebral y las deficiencias neurológicas de los sujetos (Jiang y cols., 1996; Chen y cols., 1999; Alkayed y cols., 2000; Kumon y cols., 2000; Murphy y cols., 2002; Gibson y Murphy, 2004; Guennoun y cols., 2018). En modelos de isquemia global, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la P4 favorece la protección de las estructuras cerebrales vulnerables a este tipo de isquemia como el hipocampo, lo cual se ha asociado con una adecuada ejecución funcional (González-Vidal y cols., 1998; Morali y cols., 2005; Morali y cols., 2011; Espinosa-García y cols., 2013; Espinosa-García y cols., 2014).

Como se describió anteriormente, la P4 es un esteroide neuroactivo que ejerce diversas funciones en el SN a través de varios mecanismos de acción. Algunos de estos mecanismos activados por la P4, se oponen a los mecanismos fisiopatológicos desencadenados por un episodio isquémico, lo que sustenta sus efectos neuroprotectores en esta alteración cerebral. La alopregnanolona (metabolito de la P4) incrementa la neurotransmisión GABAérgica (Majewska y cols., 1986; Rupprecht, 2003) y en consecuencia inhibe la excitabilidad neuronal (Smith, 1991; Rupprecht, 2003). La P4 atenúa la concentración de Ca^{2+} intracelular inducida por NMDA (Cai y cols., 2008), ejerce efectos antioxidantes (Ozacmak y cols., 2009), protege la integridad de la barrera hematoencefálica (Ishrat y cols., 2010), disminuye el edema cerebral (Betz y Coester, 1990), reduce la respuesta proinflamatoria (Gibson y cols., 2005; Espinosa-García y cols., 2017), regula factores neurotróficos como el BDNF (Singh y Su, 2013), y disminuye los mecanismos relacionados con la muerte celular por apoptosis (Yao y cols., 2005; Espinosa-García y cols., 2013). Lo anterior podría favorecer un microambiente permisivo para el desarrollo de los procesos de recuperación a través de los mecanismos de plasticidad cerebral pos-isquemia como la reorganización de la citoarquitectura neuronal de las neuronas sobrevivientes y como la neurogénesis.

Efectos de la progesterona sobre la citoarquitectura neuronal pos-isquemia

La recuperación funcional pos-isquemia se relaciona con la activación de procesos de plasticidad como la reestructuración dendrítica, la sinaptogénesis y el crecimiento axonal de las neuronas sobrevivientes en las regiones cerebrales vulnerables a la isquemia (Crepel y cols., 2003; Briones y cols., 2006; Kovalenko y cols., 2006; Murphy y Corbett, 2009; Caleo, 2015; Sandvig y cols., 2018). Por lo tanto, los fármacos que favorezcan los procesos de plasticidad cerebral, asociados con una mejor recuperación funcional, son de interés para el tratamiento de la isquemia cerebral. Al respecto, se ha reportado que la P4 incrementa la

sinaptogénesis en la región CA1 del hipocampo, después de un periodo isquemia global (Zhao y cols., 2011). En nuestro grupo de trabajo demostramos que el tratamiento con P4, administrada también después de un episodio de isquemia global, disminuye la vía de señalización inhibitoria del crecimiento neurítico Nogo-A en la región CA1 del hipocampo (Espinosa-García y cols., 2014). Lo relevante es que en ambos estudios, los cambios inducidos por la P4 en CA1 se relacionaron con una mejor recuperación funcional pos-isquemia (Zhao y cols., 2011; Espinosa-García y cols., 2014). No obstante lo anterior, los efectos de la P4 sobre la estructura citoarquitectónica neuronal pos-isquemia aún no ha sido analizada, aunque se conoce que los esteroides neuroactivos como la P4 regulan características de la citoarquitectura neuronal tales como la arborización dendrítica, la densidad y la forma de las espinas dendríticas y la sinaptogénesis neuronal de diversas áreas cerebrales incluyendo al hipocampo, con lo que se favorece la conectividad y funcionalidad de los circuitos neuronales involucrados en las funciones cognitivas (Gould y cols., 1990; Woolley y McEwen, 1993; Hansberg-Pastor y cols., 2015; Hojo y cols., 2018).

Efectos de la progesterona sobre la neurogénesis pos-isquemia

La neurogénesis en el GD del hipocampo se ha reportado tanto en modelos de isquemia focal (Jin y cols., 2001) como en modelos de isquemia global (Kawai y cols., 2004; Kato y cols., 2014). Sin embargo, la neurogénesis pos-isquemia *per se* no induce necesariamente la recuperación de las funciones afectadas (Sadelli y cols., 2017; Marques y cols., 2019). Por esta razón, es importante la búsqueda de agentes terapéuticos que favorezcan el proceso de neurogénesis pos-isquemia, en relación con la recuperación de las funciones (Marques y cols., 2019). En este sentido, se ha reportado que la P4 incrementa la sobrevivencia de las neuronas nuevas en el GD del hipocampo, a pesar de que suprime la proliferación de células progenitoras, después de un episodio de isquemia focal (Zhang y cols., 2010a). Esta mayor

sobrevivencia de las nuevas neuronas granulares inducida por la P4, se asoció con una mejor ejecución funcional (Zhang y cols., 2010a; Zhang y cols., 2010b). El tratamiento con P4 también incrementa la neurogénesis en la ZSV después de un evento cerebrovascular isquémico, lo cual se ha relacionado con la mejoría de las funciones neurológicas (Jiang y cols., 2017). Sin embargo, en un estudio realizado con un modelo similar de isquemia focal, la P4 no promovió la neurogénesis ni en el GD del hipocampo ni en la ZSV (Lee y cols., 2015). En resumen, la neurogénesis promovida por la P4 como un mecanismo plástico de regeneración después de un episodio de isquemia focal (relacionada con el accidente cerebrovascular) aún es controversial, por lo que se requiere de más estudios para esclarecer este punto y aunado a lo anterior, no se ha abordado esta posibilidad después de un episodio de isquemia global (relacionada con un paro cardíaco).

Trabajos previos realizados en nuestro grupo de trabajo

El estudio de hormonas esteroides de naturaleza endógena, incluyendo a la P4, como posibles agentes terapéuticos aplicables en eventos isquémicos ha sido de interés para nuestro grupo de trabajo durante varios años. En un primer trabajo realizado en gatas ovariectomizadas, y sometidas a un episodio de isquemia cerebral global durante 15 minutos, el tratamiento con P4 (7 días pre-isquemia y 7 días pos-isquemia) disminuyó las alteraciones neurológicas pos-isquemia y preservó significativamente tanto la población de neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 e hilus del hipocampo, como la población de neuronas pequeñas del núcleo caudado (González-Vidal y cols., 1998; Cervantes y cols., 2002). En otro estudio realizado en ratas macho sometidas a un episodio de isquemia global de 15 minutos, el tratamiento con P4 en el periodo pos-isquemia, también preservó significativamente la población de neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA2 del hipocampo, 21 días pos-isquemia (Moralí y cols., 2005). Posteriormente, en otro diseño

experimental de isquemia más severo (20 minutos), se analizó el efecto del tratamiento con P4 y atendiendo a las recomendaciones para el estudio de agentes neuroprotectores (Corbett y Nurse, 1998; Finklestein y cols., 1999; Leker y Shohami, 2002), el análisis morfofuncional fue realizado 90 días después del episodio de daño. Los resultados mostraron que las ratas tratadas con P4 tuvieron una mejor ejecución funcional en pruebas de aprendizaje y memoria espacial, en comparación con las ratas tratadas con el vehículo, a pesar de que la pérdida de neuronas piramidales en las regiones CA1, CA2, CA3 e hilus del hipocampo fue similar en ambos grupos experimentales (Moralí y cols., 2011). Dicha falta de correlación morfofuncional en las ratas tratadas con P4, también se ha descrito en otros estudios (Gobbo y O'Mara, 2004; Plamondon y Roberge, 2008; Roberge y cols., 2008), lo cual sugiere que las funciones reguladas por el hipocampo no solo dependen del número de neuronas sobrevivientes en esta estructura, sino de la manera en que se hayan reorganizado después del evento isquémico. Es decir, el tratamiento con P4 podría favorecer una reorganización neuronal a través de mecanismos de plasticidad compatibles con una adecuada ejecución funcional, además de otros mecanismos de plasticidad cerebral como la neurogénesis en el GD del hipocampo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las evidencias presentadas muestran que después de un episodio de isquemia cerebral se activan mecanismos de plasticidad que inducen la reorganización de los circuitos neuronales dañados. No obstante lo anterior, estos mecanismos de plasticidad usualmente no son suficientes por sí mismos para lograr restablecer las funciones afectadas, de tal manera que el daño cerebral isquémico es causa de discapacidad permanente o incluso de muerte en el humano. En este sentido, en el presente trabajo se plantea la posibilidad de que el tratamiento con P4 pos-isquemia favorezca mecanismos de plasticidad cerebral que se asocien con una mejor recuperación funcional con base en el siguiente planteamiento:

¿Los efectos neuroprotectores de la P4, después de un episodio de un episodio de isquemia cerebral global, implican la inducción de mecanismos de plasticidad cerebral tales como cambios en la citoarquitectura de las neuronas piramidales del CA1 y/o un incremento de la neurogénesis en el GD del hipocampo, que se relacionen con una mejor ejecución en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial?

1. MODIFICACIONES DE LA CITOARQUITECTURA DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO, LUEGO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS: EFECTOS DE LA PROGESTERONA

1.1 HIPÓTESIS

El tratamiento con P4 pos-isquemia, a largo plazo inducirá procesos de plasticidad cerebral tales como un número mayor de arborizaciones dendríticas y mayor densidad de espinas dendríticas en las neuronas remanentes de la región CA1 del hipocampo, los cuales se relacionarán con el desempeño funcional demostrado previamente.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos del tratamiento con P4 sobre la citoarquitectura de las neuronas piramidales remanentes del área CA1 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global.

1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

En muestras de cerebro obtenidas de nuestro estudio previo (Moralí y cols., 2011), de ratas tratadas con P4 o con su vehículo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda (20 minutos), o en muestras de cerebro de ratas intactas:

1) Evaluar la arborización dendrítica (número de bifurcaciones dendríticas) en las neuronas piramidales remanentes en la región CA1 del hipocampo utilizando la técnica de Golgi.

2) Cuantificar la densidad total y la proporción de los diferentes tipos de espinas dendríticas en neuronas piramidales remanentes en la región CA1 del hipocampo mediante la técnica de Golgi.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la guía del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH Publicaciones No. 80-23) revisada en 1996 y fueron aprobados por los Comités de Ética e Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley con un peso corporal entre 350 y 400 g al inicio del experimento. Las ratas fueron alojadas en un cuarto de bioterio, con ciclos controlados de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (luz de 6:00 a 18:00 h), en cajas de policarbonato con tapa de metal y cama de aserrín. En ellas tuvieron acceso al alimento (Purina) y al agua a voluntad. Antes de los experimentos, los animales se alojaron en cajas colectivas (5 ratas por caja) y una vez iniciados los procedimientos experimentales, en cajas individuales.

Las ratas fueron asignadas al azar a uno de los siguientes grupos: (1) Intacto, animales que permanecieron en sus cajas de alojamiento en el bioterio; (2) animales sometidos a isquemia cerebral global aguda por oclusión permanente de las arterias vertebrales y oclusión transitoria de las carótidas comunes (4-VO) durante 20 minutos, y que recibieron la administración del vehículo (ISQ + VEH) de la P4 (20% 2-hidroxipropil β -ciclodextrina en agua estéril, 0.5 ml, i.v., Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA) a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h después del episodio de isquemia; (3) ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda por 4-VO durante 20 minutos y que fueron tratadas con P4 (ISQ + P4) (8 mg/kg en 0.5 ml de agua estéril, i.v., Sigma Chemical Co, St Louis MO, EEUU) a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h pos-isquemia, debido a que en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, este esquema de tratamiento ha mostrado tener efectos neuroprotectores (Moralí y cols., 2005; Moralí y cols., 2011). La administración de la P4 o su vehículo, se

realizó a través de un catéter insertado en la vena yugular interna derecha como se describe más adelante.

Modelo de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos (4-VO)

El episodio de isquemia cerebral global aguda fue inducido de acuerdo al procedimiento descrito previamente (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988), e implementado y utilizado rutinariamente por nuestro grupo de investigación. Bajo anestesia con clorhidrato de xilacina (10 mg/kg, i.m.) y clorhidrato de ketamina (90 mg/kg, i.m.), se practicó una incisión en la piel de la nuca y se separaron los músculos en la línea media, por disección, hasta lograr el acceso a la primera vértebra cervical (atlas). Se localizó a cada lado, en el foramen alar del atlas, la arteria vertebral y, bajo microscopio de cirugía, se cauterizó con un electrocauterio manual dejándola ocluida permanentemente. A través de un acceso en la parte ventral del cuello, se localizaron las arterias carótidas comunes, se disecaron y se dejaron referidas mediante hilos de seda (calibre 3-0) para su acceso 48 h después. Se introdujo un hilo de seda quirúrgica gruesa (calibre cero) por detrás de la tráquea, esófago, carótidas y nervios vagos, pero por delante de la musculatura cervical-paravertebral y sus cabos se pasaron por debajo de la piel hasta salir por la incisión de la nuca donde se anudaron para evitar su retracción. Además, se canuló la vena yugular interna del lado derecho con un catéter de polietileno de 10 cm de largo (Clay Adams, PE-50), lleno de solución salina heparinizada (100 UI/ml) que se insertó a permanencia y se hizo emerger por la incisión de la nuca. Se suturaron las heridas, se administró solución salina fisiológica (2 ml/100 g de peso corporal, s.c.) para evitar la deshidratación y se vigiló la recuperación total del animal.

Dos días después, bajo anestesia con halotano, se retrajeron y torcieron a manera de torniquete los cabos de la seda gruesa a fin de comprimir la musculatura cervical y paravertebral y limitar en lo posible el flujo sanguíneo al cerebro por la circulación colateral;

se abrió la incisión ventral para tener acceso a las carótidas, se separaron éstas del tejido adyacente y se suspendió la administración de halotano para permitir que el animal se recuperara parcialmente de la anestesia. Cuando la rata se encontraba semiinconsciente, se ocluyeron ambas carótidas en forma simultánea mediante clips microvasculares y se mantuvo la oclusión durante 20 minutos. Al terminar este periodo se retiraron los clips y se suspendió la compresión de la musculatura paravertebral. Tanto la interrupción del flujo sanguíneo como la reperusión a través de las carótidas comunes, fueron verificadas bajo microscopio. Se registró en forma continua la temperatura corporal durante todo el procedimiento manteniéndose entre 35.5 y 37.5° C mediante un cojín eléctrico. Durante el periodo de isquemia cerebral y al inicio de la reperusión, las ratas se encontraban inconscientes en posición supina. La recuperación de la consciencia se manifestó por la presencia de movimientos voluntarios espontáneos y/o del reflejo de enderezamiento. La ausencia de ambos se considera un criterio válido de pérdida de la consciencia, por lo que fue así que sólo aquellos animales que permanecieron inconscientes durante la oclusión de las carótidas comunes y durante 30-60 minutos después de terminar este periodo, como un signo de haber tenido una isquemia severa (Pulsinelli y Brierley, 1979; Herguido y cols., 1999), se incluyeron en el estudio. Al terminar los procedimientos se suturó la herida bajo anestesia con halotano, permitiéndose la recuperación total del animal.

Todas las ratas del grupo Intacto (n = 8) sobrevivieron. La tasa de mortalidad de los animales sometidos a isquemia global, principalmente por paro respiratorio o por convulsiones pos-isquémicas, fueron de 39/51 en el grupo ISQ + VEH y de 9/22 en el grupo ISQ + P4. Por lo tanto, los grupos de 8, 12, y 13 ratas que sobrevivieron en cada grupo experimental se sometieron a los diferentes procedimientos para realizar el trabajo que antecede a este estudio. (Moralí y cols., 2011). A partir de éste, una muestra de cinco ratas por grupo fue sometida a los procedimientos experimentales que se describen a continuación.

Análisis de las características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo mediante la técnica de Golgi

Cuatro meses pos-isquemia, las ratas fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital (35 mg/kg, i.p.) y perfundidas por vía intracardíaca con 200 ml de solución salina en amortiguador de fosfatos (PBS), seguida de una solución fijadora de formaldehído al 10% en buffer de fosfatos; ambas soluciones fluyeron a una velocidad de 11,5 ml / min). Después de la perfusión, los cerebros fueron removidos del cráneo y se posfijaron por inmersión en 100 ml de la solución de fijación, durante al menos 2 días antes del procesamiento histológico.

De cada cerebro, se obtuvo una rebanada de 3 mm de grosor correspondiente a las coordenadas coronales -3.14 a -4.52 con respecto a bregma (Paxinos y Watson, 1986), donde se localiza el hipocampo dorsal. Cinco rebanadas de cerebro por grupo fueron procesadas de acuerdo con una modificación del método de Golgi (González-Burgos y cols., 1992; González-Burgos y cols., 2007), para lo cual las rebanadas fueron incubadas en una solución indurante (formaldehído al 40% + dicromato de potasio al 2% en agua desmineralizada) durante 48 horas a 25 °C. Posteriormente, se incubaron en una solución impregnadora (nitrato de plata al 0.75% en 50ml de agua desmineralizada) durante 24 horas a 25 °C y finalmente, se incluyeron superficialmente en parafina.

A partir de cada una de las muestras de cerebro, se obtuvieron varios cortes coronales de 75 µm de grosor y se analizaron al azar seis neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo por rata. La arborización dendrítica en cada neurona fue evaluada a través del conteo del número de bifurcaciones dendríticas en el estrato oriens-alveus (dendritas basales) y en el estrato radiado (dendrita apical). Para la cuantificación de la densidad de espinas dendríticas y de la proporción de las diferentes formas de espinas dendríticas en cada neurona, se seleccionó un segmento de 50 µm de longitud de una dendrita oblicua que emerge de su

dendrita apical primaria, ya que se ha reportado que en éstas se localizan una alta proporción de todas las espinas dendríticas de CA1 (Spruston y McBain, 2007). Las espinas dendríticas fueron clasificadas y contadas de acuerdo a su forma (Figura 6) considerando los siguientes tipos: delgada (protuberancias largas y estrechas que terminan en una pequeña cabeza bulbosa, diámetro del cuello mucho menor que la longitud total y el diámetro de la cabeza sólo ligeramente mayor que el diámetro del cuello); gorda (pequeñas protuberancias que carecen de un cuello y cabeza claramente distinguible, diámetro del cuello mayor o igual que la longitud de la espina); hongo (protuberancias con un cuello estrecho y una cabeza bulbosa grande, tanto el diámetro como la longitud del cuello mucho menor que el diámetro de la cabeza y la longitud del cuello menor que la de las espinas delgadas); ancha (protuberancias muy similares a las gordas, pero su longitud es mayor que el diámetro del cuello); doble (un cuello que sobresale de la dendrita principal y se conecta con un bulbo que a su vez se conecta a otro bulbo por un segundo cuello); y ramificada (protuberancias con un solo cuello corto que se ramifica en dos cuellos oblicuos que terminan como cabezas bulbosas) (Harris y cols., 1989; Spruston y McBain, 2007; Velázquez-Zamora y cols., 2011).

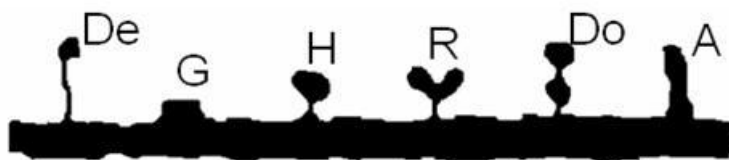


Figura 6. Tipos de espinas evaluados: Delgadas (De), gorda (G), en hongo (H), ramificada (R), doble (Do), ancha (A).

Tanto el conteo como la clasificación de espinas fueron hechas en un microscopio de luz a un aumento de 2000x; lo cual se logró con la ayuda de un dispositivo que duplica el aumento del objetivo de 1000x. (Perception Analysis System by Human-Computer Interface, Cambridge, UK).

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron mediante la prueba *t* de Student. Adicionalmente, se utilizó la corrección de Bonferroni para analizar las variaciones en la densidad proporcional de los diferentes tipos de espinas dendríticas. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ (Siegel, 1970; Downie y Heath, 1983).

1.5 RESULTADOS

En el análisis de todas las muestras, de las ratas sometidas a isquemia y tratadas con vehículo, sólo se identificaron dos neuronas piramidales impregnadas de la región CA1 del hipocampo. Estas neuronas mostraron una dendrita apical muy corta y gruesa, casi desprovista de arborizaciones (3 y cero, respectivamente), y sin ninguna espina dendrítica (Figuras 7 y 8).

Las neuronas piramidales remanentes en CA1 encontradas en las muestras de ratas sometidas a isquemia y tratadas con P4, tuvieron dendritas ramificadas sinuosamente con un número similar de bifurcaciones y similar densidad de espinas dendríticas en los segmentos analizados, que las de las neuronas de las ratas del grupo control intactas (Tabla 1 y Figuras 8 y 9). Sin embargo, se encontró una mayor densidad proporcional de espinas dendríticas tipo hongo en el grupo de ratas sometidas a isquemia tratadas con P4 con respecto al grupo de ratas control intactas ($t = 2.97$; $p = 0.021$; Tabla 1). Los valores de densidad proporcional de las espinas delgadas, gordas, anchas, dobles y ramificadas, no fueron diferentes entre el grupo sometido a isquemia tratado con P4 y el grupo control intacto (Tabla 1).

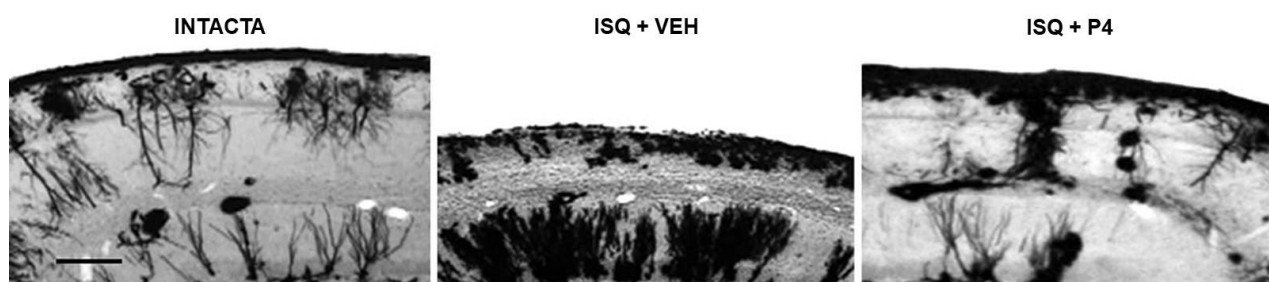


Figura 7. Imágenes representativas de la región CA1 en cortes coronales del hipocampo de una rata intacta, de una rata sometida a isquemia tratada con Veh y de una sometida a isquemia tratada con P4. Nótese el estrechamiento del estrato radial como resultado de la falta de neuronas piramidales en la rata ISQ + VEH, que difiere de lo observado en las ratas tanto Intacta como ISQ + P4. Barra: 250 μm .

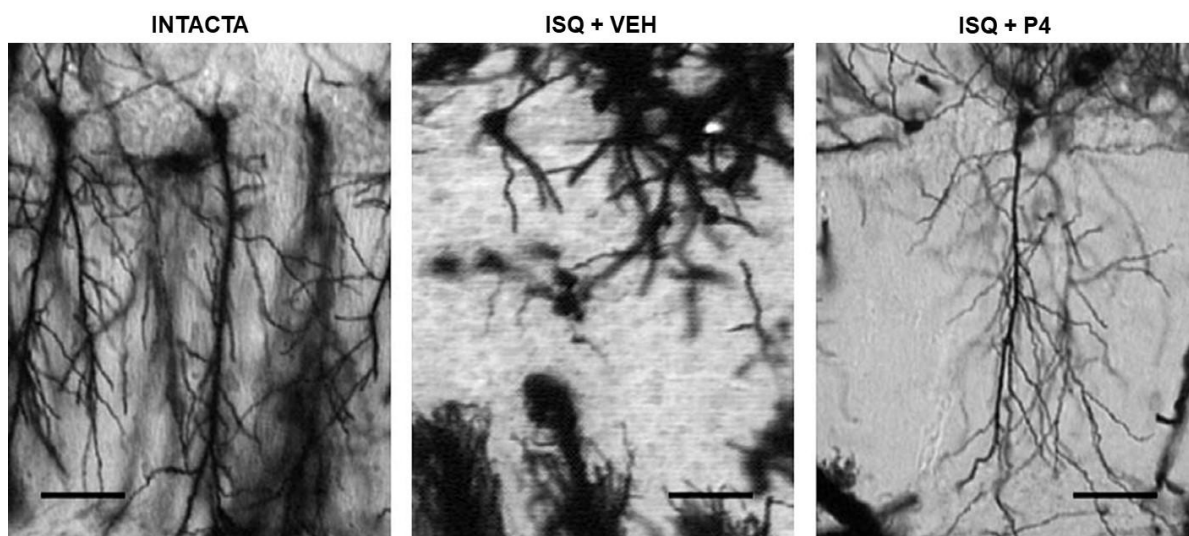


Figura 8. Imágenes representativas de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo de una rata intacta, una rata sometida a isquemia y tratada con Veh (ISQ + VEH) y una isquémica tratada con P4 (ISQ + P4). Las neuronas piramidales de la rata Intacta y de la rata ISQ + P4 mostraron un número promedio similar de bifurcaciones dendríticas, mientras que en la rata ISQ + VEH se observa una sola neurona prácticamente desprovista de bifurcaciones dendríticas. Barra: 100 μ m.

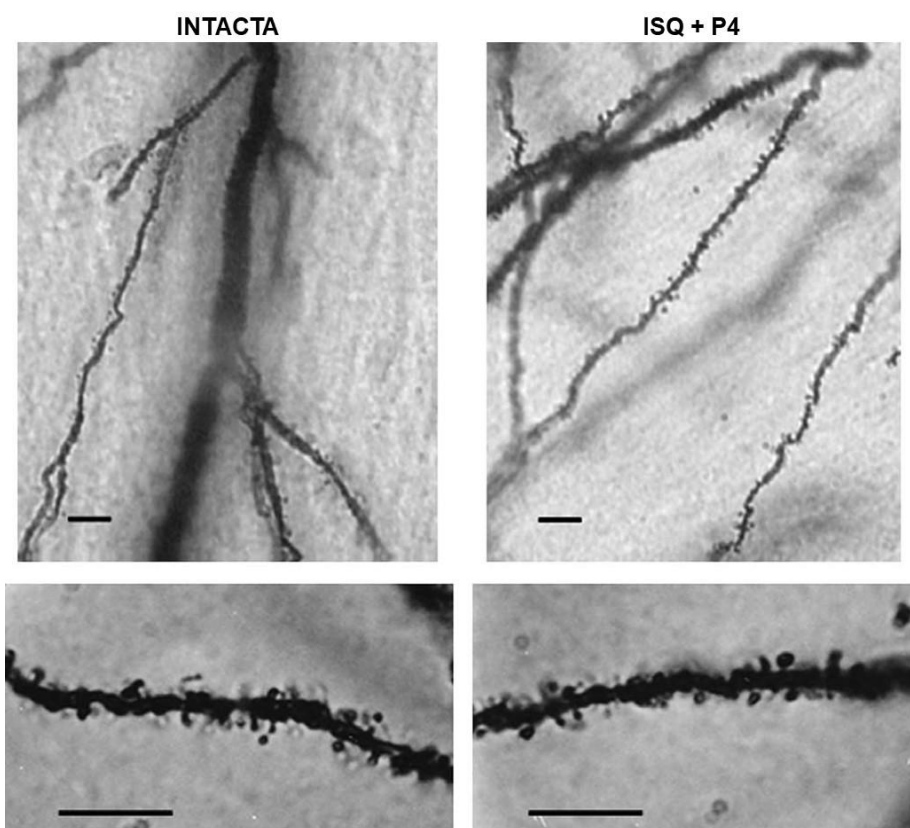


Figura 9. Imágenes representativas, a dos aumentos, de segmentos dendríticos oblicuos en neuronas piramidales de CA1 del hipocampo de ratas Intactas y de las que fueron sometidas a isquemia y tratadas con P4 (ISQ + P4). Nótese que la densidad de espinas dendríticas es similar en ambos grupos. No se incluye ninguna imagen de las ratas del grupo ISQ + VEH debido a la ausencia de bifurcaciones y de espinas dendríticas en estos animales. Barra: 10 μ m.

Tabla 1. Número total de bifurcaciones dendríticas, densidad y porcentaje de los diferentes tipos de espinas dendríticas en neuronas piramidales del grupo Intacto y del grupo sometido a isquemia tratado con P4.

Parámetro (Media \pm EE)	Grupo	
	Intacto	Isquemia + P4
Bifurcaciones	30.3 \pm 1.9	25.6 \pm 0.4
Densidad de espinas (Número de espinas por 50 μ m)	110.9 \pm 1.9	111.4 \pm 2.1
Porcentaje del tipo de espinas		
Delgada	38.8 \pm 2.0	38.8 \pm 1.9
Gorda	22.4 \pm 1.6	18.5 \pm 1.8
Hongo	38.7 \pm 2.0	42.2 \pm 1.9*
Ancha	1.9 \pm 0.6	1.5 \pm 0.3
Doble	0.4 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1
Ramificada	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1

* $p < 0.05$ en comparación con el grupo control Intacto. No se incluyen datos del grupo ISQ + VEH debido al número insuficiente de neuronas y a la ausencia de espinas dendríticas. Prueba t de Student para las comparaciones intergrupales y la corrección de Bonferroni para las variaciones en la densidad proporcional de los diferentes tipos de espinas.

1.6 DISCUSIÓN

Los principales hallazgos del presente trabajo fueron que algunos parámetros citoarquitectónicos de las neuronas piramidales preservadas en la región CA1 en el hipocampo de ratas sometidas a isquemia global y tratadas con P4 (ISQ + P4), tuvieron valores similares a los de las neuronas piramidales de las ratas intactas. Los parámetros citoarquitectónicos similares fueron el número de bifurcaciones dendríticas y la densidad de espinas dendríticas; aunque con una proporción diferente de espinas tipo hongo. Estos resultados son importantes debido a que pudieran explicar la recuperación funcional observada en las ratas isquémicas tratadas con la P4, en el estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación. En él, reportamos que las ratas sometidas a isquemia y tratadas con P4 tuvieron un desempeño exitoso en tareas de aprendizaje y memoria espacial, a pesar de la pérdida significativa de neuronas piramidales en CA1 (sólo se preservó el 20%), en comparación con las ratas intactas (Moralí y cols., 2011).

Se conoce que una pérdida severa (> 70%) de las neuronas piramidales en CA1 después de un episodio de isquemia global en animales de experimentación, se relaciona con alteraciones permanentes en el aprendizaje y memoria espacial al evaluarlos en el laberinto acuático de Morris (Olsen y cols., 1994; Block, 1999; Hartman y cols., 2005; Letechipía-Vallejo y cols., 2007). Por lo que en las ratas isquémicas tratadas con P4, una funcionalidad suficiente de las neuronas remanentes puede explicar la preservación de estas habilidades cognitivas (Moralí y cols., 2011) como se ha demostrado también con otros procedimientos destinados a favorecer la recuperación funcional después de un episodio de isquemia, como el someter a los animales a una dieta especial o a un ambiente enriquecido (Gobbo y O'Mara, 2004; Plamondon y Roberge, 2008; Roberge y cols., 2008).

Las alteraciones estructurales a corto y largo plazo, que ocurren en las neuronas piramidales remanentes del hipocampo después de isquemia como la degeneración axonal, la

disminución de la longitud y arborización dendrítica, la disminución en el número y forma de las espinas dendríticas y la reducción del número de sinapsis, usualmente se relacionan con alteraciones de las funciones cognitivas y se reconocen como cambios neurodegenerativos. En contraste, la preservación de las funciones cognitivas después de la isquemia se ha asociado con cambios citoarquitectónicos de las neuronas sobrevivientes tales como el rebrote axonal y dendrítico, el incremento en el número de espinas dendríticas y de las sinapsis y con los cambios en la proporción relativa del tipo de espinas; por lo que dichos cambios se han interpretado como respuestas plásticas compensatorias que contribuyen a la reorganización de los circuitos neuronales y a la recuperación funcional (Mudrick y Baimbridge, 1989; Onodera y cols., 1990; Jourdain y cols., 2002; Neigh y cols., 2004; Briones y cols., 2006; Ruan y cols., 2006; Skivo y Nikonenko, 2010).

Previamente, se encontró que las ratas sometidas a isquemia y tratadas con vehículo (ISQ + VEH) tenían un número de neuronas piramidales preservadas en la región CA1 del hipocampo (casi 20% en relación con las ratas intactas), similar a la de las ratas ISQ + P4 como lo reveló la tinción de Nissl; pero no fueron capaces de ejecutar exitosamente las pruebas de aprendizaje y memoria espacial como si lo hicieron los animales ISQ + P4 (Moralí y cols., 2011). En el presente estudio, sólo muy pocas neuronas piramidales de CA1, casi desprovistas de cualquier arborización dendrítica, se observaron impregnadas como para ser identificadas en las muestras procesadas con la técnica de Golgi en las ratas ISQ + VEH. No hay información clara sobre las características bioquímicas particulares de las neuronas dañadas por la isquemia que explique la menor impregnación encontrada en este grupo. Una posibilidad es que las características citoarquitectónicas alteradas por la isquemia de estas neuronas, carentes de arborizaciones dendríticas, provocó que morfológicamente no pudieran ser identificadas como neuronas piramidales, en contraste con las neuronas piramidales impregnadas, arborizadas identificadas plenamente en las ratas isquémicas tratadas con P4.

Además, las diferencias estructurales observadas entre las neuronas piramidales de estos grupos, coinciden con sus diferencias en el ancho de la formación hipocampal, particularmente en CA1, debido principalmente a un encogimiento significativo del *stratum radiatum* en las ratas del grupo ISQ + VEH (Morali y cols., 2011).

El número similar de bifurcaciones dendríticas de las neuronas piramidales en CA1, observado en los grupos ISQ + P4 e intacto, puede indicar que el tratamiento con P4 durante 72 h después de la isquemia permitió la preservación a largo plazo de la estructura citoarquitectónica general de las neuronas piramidales remanentes, o que favoreció su capacidad de reparación a través de mecanismos de plasticidad. Además, la similar densidad total de espinas dendríticas en las neuronas piramidales observada en los grupos ISQ + P4 e Intacto, sugiere un recambio similar de estas estructuras después de la isquemia, a largo plazo, posiblemente asociado con el procesamiento adecuado que tuvieron ambos grupos de la información implicada en las pruebas de aprendizaje y memoria que se les realizaron previamente (Morali y cols., 2011). Mas aún, la proporción similar de espinas delgadas en las neuronas piramidales de dichos grupos sugiere una capacidad semejante para procesar información a corto plazo, y el incremento en la proporción de espinas tipo hongo observado en las muestras de las ratas del grupo ISQ + P4 puede representar, como en las ratas del grupo Intacto, conexiones sinápticas estables y duraderas, posiblemente asociadas con la consolidación y almacenamiento de la memoria (Kasai y cols., 2010; González-Burgos, 2012).

Se ha demostrado que las espinas dendríticas son estructuras dinámicas cuya rápida creación, retracción y variabilidad de su forma, son la base para la plasticidad a corto y a largo plazo en las sinapsis excitadoras de las neuronas piramidales tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral, entre otras estructuras cerebrales del SNC; por lo que, también son consideradas como substratos para la formación de la memoria estable (Brown y cols., 2007;

Kasai y cols., 2010). En las espinas pequeñas y delgadas predomina el receptor NMDA, son altamente móviles y capaces de expandirse y estabilizarse o retraerse; mientras que en las espinas grandes de cabeza grande, predomina el receptor AMPA y son altamente estables (Matsuzaki y cols., 2001; Kasai y cols., 2003; Bourne y Harris, 2007). Estas observaciones sustentan la hipótesis de que las espinas pequeñas son necesarias para el aprendizaje de nueva información, mientras que las espinas grandes estables, regulan los circuitos asociados con la memoria (Kasai y cols., 2010).

Los resultados del presente estudio pueden indicar que la P4, a la dosis y en el esquema temporal de administración utilizado después del episodio de isquemia global, aunque sólo tuvo un efecto neuroprotector en una pequeña proporción de la población de neuronas piramidales en CA1, posiblemente preservó en las neuronas remanentes su estructura citoarquitectónica y/o su capacidad para responder a los procesos de reparación cerebral que son inducidos por el daño isquémico (Mudrick y Baimbridge, 1989; Onodera y cols., 1990; Schmidt-Kastner y cols., 2001; Jourdain y cols., 2002; Ruan y cols., 2006; Skivo y Nikonenko, 2010).

En diferentes trabajos se han analizado los mecanismos de acción celulares y moleculares de la P4, posiblemente involucrados con sus efectos neuroprotectores y restauradores (Stein, 2008; De Nicola y cols., 2009; Sayeed and Stein, 2009); entre ellos, la regulación de la síntesis de factores neurotróficos y la preservación de los componentes del citoesqueleto pueden ser importantes para la preservación o inducción del crecimiento de neuritas y de espinas dendríticas, con sus correspondientes implicaciones para la conectividad y el mantenimiento de las funciones cerebrales. Al respecto, se ha reportado que la P4 incrementa tanto los niveles del RNAm como los de proteína del BDNF en distintos modelos de daño cerebral *in vivo* (González y cols., 2004; Cutler y cols., 2006; González-Deniselle y cols., 2007), asociados con parámetros de recuperación funcional.

1.7 CONCLUSIÓN

Los hallazgos sugieren que el tratamiento con P4 después del episodio de isquemia global puede haber preservado la estructura citoarquitectónica de las neuronas remanentes en la región CA1 del hipocampo, o haber favorecido los mecanismos de plasticidad cerebral pos-isquemia en estas neuronas, que resultaron en la formación de arborizaciones y de espinas dendríticas, dándoles características citoarquitectónicas que pueden ser la base de la ejecución funcional exitosa en las pruebas de aprendizaje y memoria, a pesar del porcentaje reducido de neuronas piramidales en CA1 que fueron preservadas.

2. NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON EL DESEMPEÑO FUNCIONAL, LUEGO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS: EFECTOS DE LA PROGESTERONA

2.1 HIPÓTESIS

El tratamiento con P4 pos-isquemia inducirá un incremento de la neurogénesis en el GD del hipocampo, lo cual se relacionará con el desempeño funcional.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos del tratamiento con P4 sobre la neurogénesis en el GD del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global severo, y relacionar estos efectos con la ejecución funcional cognitiva en pruebas de aprendizaje y memoria espacial.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES:

En ratas tratadas con P4 o su vehículo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda severa (30 minutos):

- 1) Analizar el desempeño funcional en pruebas de aprendizaje y memoria espacial, del día 21 al día 27 pos-isquemia empleando el laberinto acuático de Morris.
- 2) Identificar y cuantificar la presencia de neuronas nuevas maduras en el GD del hipocampo a los 28 días pos-isquemia mediante inmunohistofluorescencia para identificar a las neuronas BrdU⁺/NeuN⁺.
- 3) Cuantificar la población de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo a los 28 días pos-isquemia utilizando la técnica de Nissl.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH Publicaciones No. 80-23) revisada en 1996 y fueron aprobados por los Comités de Ética e Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley con un peso corporal entre 350 y 400 g al inicio del experimento. Las ratas fueron alojadas en un cuarto de bioterio, con ciclos controlados de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (luz de 6:00 a 18:00 h), en cajas de policarbonato con tapa de metal y cama de aserrín. En ellas tuvieron acceso al alimento (Purina) y al agua, a voluntad. Antes de los experimentos, los animales se alojaron en cajas colectivas (5 ratas por caja) y una vez iniciados los procedimientos experimentales, en cajas individuales.

Las ratas fueron asignadas al azar a uno de los siguientes grupos, y sometidas a una de las siguientes condiciones experimentales: (1) SHAM, animales sometidos a las maniobras quirúrgicas simuladas correspondientes al modelo de isquemia cerebral global aguda por 4-VO, sin interrumpir el flujo sanguíneo cerebral; (2) ISQ + VEH, animales sometidos a isquemia cerebral global aguda por 4-VO durante 30 minutos, debido a que episodios de isquemia severos se han asociado con la inducción de la neurogénesis (Kawai y cols., 2004), y que recibieron la administración del vehículo de la P4 (20% 2-hidroxipropil β -ciclodextrina en agua estéril, 0.5 ml, i.v., Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA), a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h después del episodio de isquemia; (3) ISQ + P4, ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda por 4-VO durante 30 minutos y que fueron tratadas con P4 (8 mg/kg en 0.5 ml de agua estéril, i.v., Sigma Chemical Co, St Louis MO, EEUU) a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 h pos-isquemia, debido a que este esquema de tratamiento ha mostrado tener efectos neuroprotectores (Moralí y cols., 2005; Moralí y cols., 2011).

El episodio de isquemia cerebral global en estos animales fue inducido por el modelo 4-VO, de manera similar a como se describió anteriormente. La administración de la P4 o su vehículo, se realizó a través de un catéter insertado (similarmente a como ya se describió) en la vena yugular interna derecha. Sólo aquellos animales que permanecieron inconscientes durante la oclusión de las carótidas comunes y durante 30-60 minutos después de terminar este periodo, como un signo de haber tenido una isquemia severa (Pulsinelli y Brierley, 1979; Herguido y cols., 1999), se incluyeron en el estudio.

Todas las ratas del grupo SHAM (n = 9) sobrevivieron. La tasa de mortalidad de los animales sometidos a isquemia global, principalmente por paro respiratorio o por convulsiones postisquémicas, fueron de 5/13 en el grupo de ratas con ISQ + VEH y de 4/14 en las ratas del grupo ISQ + P4. Por lo tanto, los grupos de 9, 8 y 10 ratas que sobrevivieron en cada grupo experimental se sometieron a los diferentes procedimientos que se describen a continuación.

Marcaje de células proliferantes mediante administración de BrdU

La 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timidina que se incorpora a las cadenas del DNA que se encuentran en replicación, en las células en mitosis (Kawai y cols., 2004). Por lo anterior, para marcar a las células proliferantes se administró BrdU (100 mg/kg en 10 ml de solución salina, i.p.; Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA), a las ratas de los tres grupos experimentales. La administración se realizó dos veces por día durante 5 días consecutivos, del día 4 al día 8 después del episodio de isquemia cerebral o de los procedimientos sham (Kawai y cols., 2004).

Evaluaciones funcionales utilizando el laberinto acuático de Morris

Veintiún días después del episodio de isquemia o de los procedimientos sham, cada una de las ratas fue sometida a pruebas conductuales de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Morris y cols., 1982) para evaluar la capacidad de integración funcional del hipocampo. El laberinto acuático de Morris consiste de una tina circular de fibra de vidrio de 140 cm de diámetro y 50 cm de altura, pintada en su parte interior de negro y llena hasta una altura de 25 cm con agua teñida de azul con violeta de genciana, a 26 °C de temperatura. Dentro de la tina se colocó una plataforma de acrílico transparente cuya superficie de 13x13 cm quedó 2 cm por debajo del nivel del agua de modo que la rata no pudiera verla. La tina se dividió conceptualmente en 4 cuadrantes con respecto a los puntos cardinales y en 3 anillos concéntricos a intervalos de 23 cm a partir del centro de la tina, de manera que la plataforma oculta se colocó en la parte central del cuadrante Norte-Este en el segundo anillo concéntrico.

El punto cardinal de donde iniciaría el recorrido cada animal se eligió al azar para los diferentes días de prueba; realizándose dos ensayos por día, uno de los cuales fue cercano y el otro lejano con respecto a la ubicación de la plataforma. Además, se determinó que el punto cardinal para cada uno de los ensayos fuera el mismo para todos los animales, que el punto cardinal no se repitiera en los dos ensayos del mismo día y que los cuatro puntos cardinales estuvieran representados el mismo número de veces a través de los diferentes días. La ubicación permanente de los objetos del cuarto de experimentación y de la posición del experimentador con respecto a la tina constituyeron las señales disponibles para la orientación espacial del animal. Bajo estas condiciones, cada rata fue sometida a 2 ensayos diarios durante 6 días consecutivos para evaluar su aprendizaje espacial de la siguiente manera: se colocó a la rata dentro del agua en uno de los puntos cardinales, de frente a la pared del laberinto y se le permitió nadar hasta localizar la plataforma oculta o hasta que transcurrieran

60 segundos, luego de los cuales la rata fue guiada hacia la plataforma. En ambos casos, se le permitió al animal permanecer en la plataforma por 15 segundos. Al término del primer ensayo la rata fue retirada de la plataforma y colocada en una caja de mantenimiento por 20 minutos antes del segundo ensayo. Las pruebas fueron grabadas con una cámara de video localizada en un punto central, 2 m por encima de la tina. De la reproducción de las grabaciones se obtuvieron los valores de la latencia de escape de los 6 días de aprendizaje (segundos que tardó el animal en localizar la plataforma), de cada uno de los dos ensayos realizados por día. Éstos, se promediaron para tener un valor por día para cada rata y a partir de estos datos individuales, se calcularon los valores promedio para cada grupo experimental.

Al séptimo día (27 días pos-isquemia) las ratas fueron expuestas a un ensayo adicional de 60 segundos, el cual también fue videograbado, en el que se retiró la plataforma de escape (prueba de transferencia). Se evaluó la memoria espacial a través del análisis de parámetros conductuales que indicaran que el animal recordaba la ubicación de dicha plataforma. Para cada rata, se contó el número de cruces sobre el sitio exacto donde se encontraba la plataforma. Posteriormente, se calcularon los valores promedio para cada grupo experimental.

Análisis de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo mediante inmunohistofluorescencia para identificar a las neuronas BrdU⁺/NeuN⁺

Después de las pruebas de aprendizaje y memoria espacial (28 días pos-isquemia), las ratas fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital (35 mg/kg, i.p.) y fueron perfundidas por vía intracardíaca con 200 ml de PBS, seguida de una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos. Se extrajo el cerebro del cráneo y se postfijó por inmersión en el mismo fijador por un mínimo de 24 horas. De cada cerebro, se obtuvo una rebanada de 3 mm de grosor correspondiente a las coordenadas coronales -3.14 a -4.52 con respecto a bregma (Paxinos y Watson, 1986), sitio donde se localiza el hipocampo

dorsal y, se realizó el procesamiento histológico de deshidratación en alcoholes de grado creciente, inmersión en xilol y su inclusión en parafina.

A partir de los bloques en parafina se realizaron cortes coronales de 10 μm de grosor espaciados a 100 μm , los cuales se adhirieron a portaobjetos. Los cortes histológicos fueron procesados para realizar doble marcaje doble con anticuerpos específicos de inmunofluorescencia para la detección tanto de BrdU como de la proteína específica de núcleo neuronal (NeuN). Luego de desparafinar e hidratar los cortes del hipocampo dorsal adheridos a los portaobjetos, se procedió a realizar el rescate antigénico, para lo cual las laminillas se sumergieron en vasos de Koplín que contenían citrato de sodio (10 mMol/L, PH = 6); y se colocaron en baño maría dentro de un horno de microondas durante 30 minutos. Posteriormente, se bloqueó con albúmina sérica bovina (1% en PBS) durante una hora y se incubó con el anticuerpo primario anti-BrdU (1:200; Abcam) durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día, se incubó con el anticuerpo secundario anti-oveja conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:300; Millipore) durante dos horas a temperatura ambiente. Antes de continuar con el segundo marcador, nuevamente se bloqueó durante dos horas con albúmina sérica bovina (5% en PBS/Tritón 0.3%) y se incubó con el anticuerpo primario anti-NeuN (1:100; Millipore) durante toda la noche a 4 °C. Subsecuentemente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con cianina 3 (Cy3) (1:200; Millipore) durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras del hipocampo dorsal adheridas a los portaobjetos fueron protegidas con un medio especial para fluorescencia (DAKO) y cubiertas con sus respectivos cubreobjetos.

La identificación de las células que fueron positivas tanto a BrdU como a NeuN (BrdU⁺/NeuN⁺) fue realizada en un microscopio de escaneo láser confocal (Axio Plan 2 LSM 510 de Carl Zeiss) equipado con un láser de argón-helio/neón, a través del programa Zeiss LSM Image Examiner.

Las células Brdu⁺/NeuN⁺ fueron contadas de manera cegada (cinco cortes coronales por rata), a lo largo del GD del hipocampo, en cinco campos microscópicos a 400x. De esta manera, se obtuvo la sumatoria de células Brdu⁺/NeuN⁺ contadas en el GD, izquierdo y derecho, de cinco cortes coronales del hipocampo dorsal (en total 50 campos microscópicos analizados) para obtener un valor individual del número de neuronas nuevas ya maduras. Con base en lo anterior, se calcularon los promedios de neuronas nuevas en el GD del hipocampo para cada grupo experimental.

Evaluación de la población de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo utilizando la Técnica de Nissl

De manera complementaria, se analizó la despoblación o preservación pos-isquemia de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo a través de la técnica de tinción de Nissl, para lo cual cortes coronales del hipocampo dorsal de 10 µm de grosor espaciados a 100 µm, adheridos a portaobjetos, fueron desparafinados, hidratados en alcoholes decrecientes, teñidos con Violeta de Cresilo a través de la técnica de Nissl, secados a temperatura ambiente y montados con resina sintética (Entellan, Merck) para su observación. Bajo un microscopio óptico (Leica DM750), de manera cegada, se contó el número de neuronas piramidales de CA1 en sectores de 350 µm de longitud en campos microscópicos a 400x. Sólo se contaron las neuronas piramidales sin alteraciones morfológicas y que tuvieran el citoplasma y el núcleo con contenido claro y el nucléolo visible. Las neuronas contadas en el hipocampo derecho e izquierdo, en tres campos microscópicos de CA1 de al menos dos cortes histológicos, fueron promediadas para obtener un valor para cada rata, a partir de lo cual se calcularon los valores de la media para cada grupo experimental.

Análisis estadístico

Los parámetros del desempeño funcional, en el laberinto acuático de Morris, se analizaron de la siguiente manera: Las diferencias grupales en las latencias de escape durante el período de prueba de 6 días, se analizaron mediante la prueba de ANOVA de medidas repetidas. Posteriormente, se analizaron las diferencias intragrupalas de este parámetro a través de ANOVA de una vía seguida de la prueba t para muestras pareadas. Las diferencias intergrupales fueron analizadas mediante la ANOVA seguida de la prueba de Tukey. El número de cruces sobre el lugar donde se encontraba originalmente la plataforma durante la prueba de transferencia (día 7), se comparó entre los grupos mediante ANOVA seguida de la prueba de Tukey. El número de neuronas piramidales remanentes en CA1 y el número de neuronas nuevas ya maduras ($\text{Brdu}^+/\text{NeuN}^+$) en el GD del hipocampo, se compararon entre los diferentes grupos mediante ANOVA seguida de pruebas de Tukey y mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de pruebas U de Mann-Whitney, respectivamente. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ (Siegel, 1970; Downie y Heath, 1983).

2.5 RESULTADOS

Latencias de escape en el aprendizaje espacial

Análisis intragrupal: Las latencias de escape del grupo SHAM mostraron una disminución progresiva durante los días sucesivos de prueba ($F(5, 4) = 33.272, p < 0.01$; Figura 10 A), alcanzando valores significativamente más bajos del segundo al sexto día ($p < 0.001$) con respecto a los del primer día. Las ratas del grupo ISQ + VEH también mostraron una reducción moderada de sus latencias de escape a lo largo de los días de prueba ($F(5, 3) = 11.896, p < 0.05$), y fueron significativamente más bajas en los días 3 y 4 ($p < 0.05$), así como en los días 5 y 6 ($p < 0,001$) en comparación con el primer día. Por otra parte, las ratas del grupo ISQ + P4 tuvieron una disminución de las latencias de escape en los días sucesivos de prueba ($F(5, 5) = 80.620, p < 0.001$), similar al grupo SHAM, con valores significativamente más bajos en los días 3 ($p < 0,01$) y 4 a 6 ($p < 0,001$), en comparación con el primer día (Figura 10 A).

Análisis intergrupales: Las latencias de escape difirieron entre los tres grupos en los diferentes días de prueba: día 2 ($F(2, 24) = 5.771, p < 0.01$), día 3 ($F(2, 24) = 5.088, p < 0.05$), día 4 ($F(2, 24) = 14,253, p < 0,001$), día 5 ($F(2, 24) = 14,241, p < 0,001$) y día 6 ($F(2, 24) = 25,195, p < 0,001$). Las latencias de escape del grupo ISQ + VEH fueron significativamente más largas en los días 2 y 3 ($p < 0.05$) y 4 a 6 ($p < 0.01$) con respecto al grupo SHAM (Figura 10 A), mientras que los valores del grupo ISQ + P4 fueron similares a los del grupo SHAM desde el día 3 al día 6 y fueron significativamente más altos que este grupo solo en el día 2 ($p < 0,05$). Las latencias de escape del grupo ISQ + P4 fueron significativamente más cortas en comparación con las del grupo ISQ + VEH, en los días 4 a 6 ($p < 0.01$).

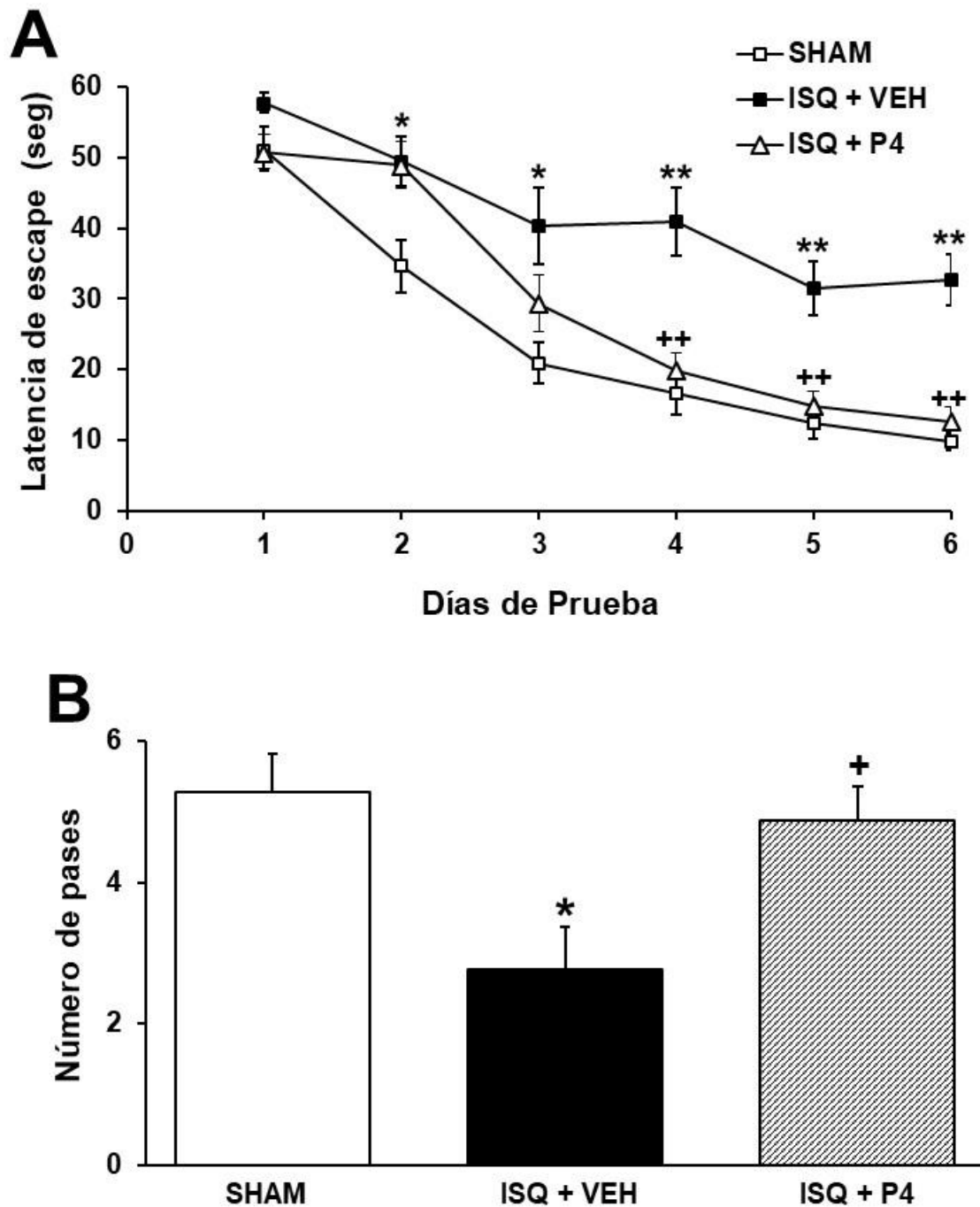


Figura 10. Aprendizaje (evaluado a través de las latencias de escape, Media \pm EE) y memoria espacial (considerando el número de pases, Media \pm EE) de las ratas de los tres grupos experimentales utilizando el laberinto acuático de Morris. (A) La isquemia cerebral global alteró el aprendizaje espacial, ya que las latencias de escape fueron más largas en el grupo tratado con vehículo (ISQ + VEH), en comparación con el grupo SHAM. El tratamiento con P4 previno esta alteración cognitiva, como lo demuestran las latencias de escape progresivamente más cortas en el grupo ISQ + P4, similares a las de SHAM y más cortas que las del grupo ISQ + VEH. (B) El tratamiento con P4 también favoreció la memoria espacial, como se observa el número de pases por donde se encontraba la plataforma de escape del grupo ISQ + P4 fue similar al de grupo SHAM, y mayor que la del grupo ISQ + VEH. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ISQ + VEH vs. SHAM. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$ ISQ + P4 vs. ISQ + VEH. ANOVA seguido de pruebas de Tukey.

Número de pases en relación con la memoria espacial

Las ratas del grupo SHAM mostraron una búsqueda persistente de la plataforma, nadando principalmente a través del cuadrante objetivo donde se localizaba ésta en los seis días previos, de donde se retiró durante la prueba de transferencia realizada el día 7. Las ratas del grupo ISQ + VEH tuvieron un patrón de nado aleatorio a través de los cuatro cuadrantes del laberinto, mientras que las ratas del grupo ISQ + P4 mostraron una búsqueda persistente de la plataforma en el cuadrante objetivo, similar a la realizada por el grupo SHAM. En consecuencia, el número de cruces sobre el lugar donde se ubicaba la plataforma fue diferente entre los grupos ($F(2, 24) = 7.085, p < 0.01$); en el grupo ISQ + VEH (Media \pm EE: $2.8 \pm 0.6, p < 0.01$) fue más bajo, con respecto al grupo SHAM (5.3 ± 0.5); en tanto que las ratas del grupo ISQ + P4 tuvieron un número de cruces (4.9 ± 0.5) similar al de las ratas del grupo SHAM y significativamente más alto ($p < 0.05$) que el de las ratas del grupo ISQ + VEH (Figura 10 B).

Población neuronal en la región CA1 del hipocampo

El daño neuronal del hipocampo resultante de 30 minutos de isquemia global fue severo tanto en las ratas tratadas con Veh como en las tratadas con P4 en comparación con las ratas del grupo SHAM, con una pérdida extensa y significativa de neuronas piramidales, particularmente en la región CA1 ($F(2, 24) = 212.296, p < 0,001$).

Se encontraron un promedio de 4.4 ± 2.1 y 6.0 ± 2.6 (Media \pm EE) neuronas piramidales remanentes por sector ($350 \mu\text{m}$) en los grupos ISQ + VEH e ISQ + P4 (en los cortes teñidos con la técnica de Nissl), los cuales fueron significativamente menores que el promedio 59.7 ± 1.4 (Media \pm EE) del grupo SHAM (Figura 11). Los promedios de los grupos ISQ + VEH e ISQ + P4 corresponden a un 7,3% y un 10,1% de las neuronas contabilizadas en el grupo SHAM (100%).

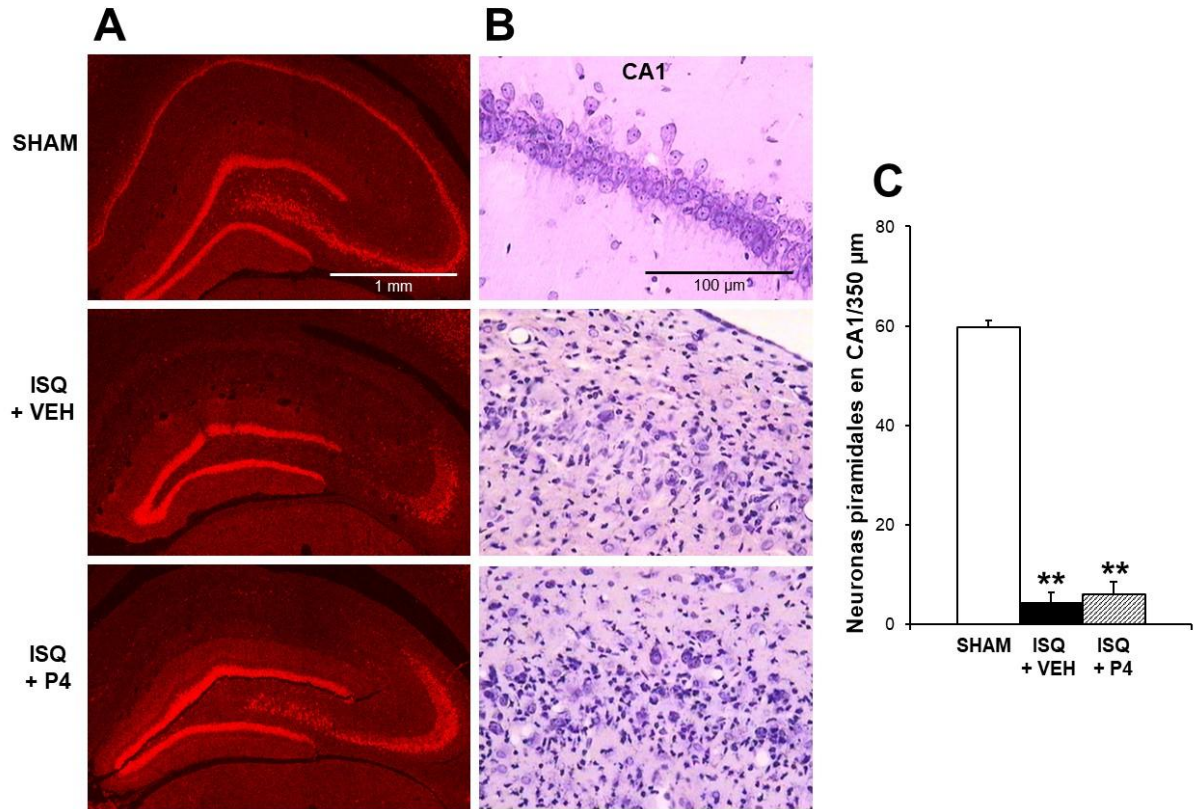


Figura 11. Pérdida de las neuronas piramidales del cuerno de Ammon (CA) del hipocampo, inducida por el episodio de isquemia cerebral global severa. Imágenes representativas que muestran a las neuronas NeuN⁺ (bajo aumento, 40x, A) y a las neuronas teñidas con la técnica de Nissl de la región CA1 (mayor aumento, 400x, B), en cortes coronales del hipocampo de ratas sometidas a procedimientos simulados (SHAM), o a isquemia cerebral global y tratamiento con vehículo (ISQ + VEH) o P4 (ISQ + P4). Nótese la pérdida severa de neuronas piramidales en CA1, tanto en las ratas sometidas a isquemia y tratadas con Veh como en las tratadas con P4; y también la despoblación neuronal en otras regiones del hipocampo, particularmente del grupo ISQ + VEH. Los resultados numéricos graficados (Media ± EE) se muestran en C. ** $p < 0.001$ vs SHAM. ANOVA seguido de pruebas de Tukey.

Neuronas nuevas en el giro dentado del hipocampo

En la figura 12 A se muestra el conteo promedio de células con doble marcaje Brdu⁺/NeuN⁺ en el GD del hipocampo, donde se reveló la presencia de neuronas granulares nuevas en los tres grupos experimentales, pero con diferencias entre ellos ($\chi^2(2) = 11.173, p < 0.01$).

Las ratas del grupo ISQ + VEH tuvieron una disminución significativa ($p < 0.01$) en el número de neuronas granulares recién formadas en el GD del hipocampo (Me = 17.5) en comparación con las ratas del grupo SHAM (Me = 50), mientras que las ratas sometidas a

isquemia cerebral global y que recibieron tratamiento con P4 (ISQ + P4) mostraron un número significativamente mayor ($p < 0.05$) de neuronas granulares nuevas ($\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$) en el GD del hipocampo (Mediana = 32), con respecto a las ratas del grupo ISQ + VEH (Figura 12 B).

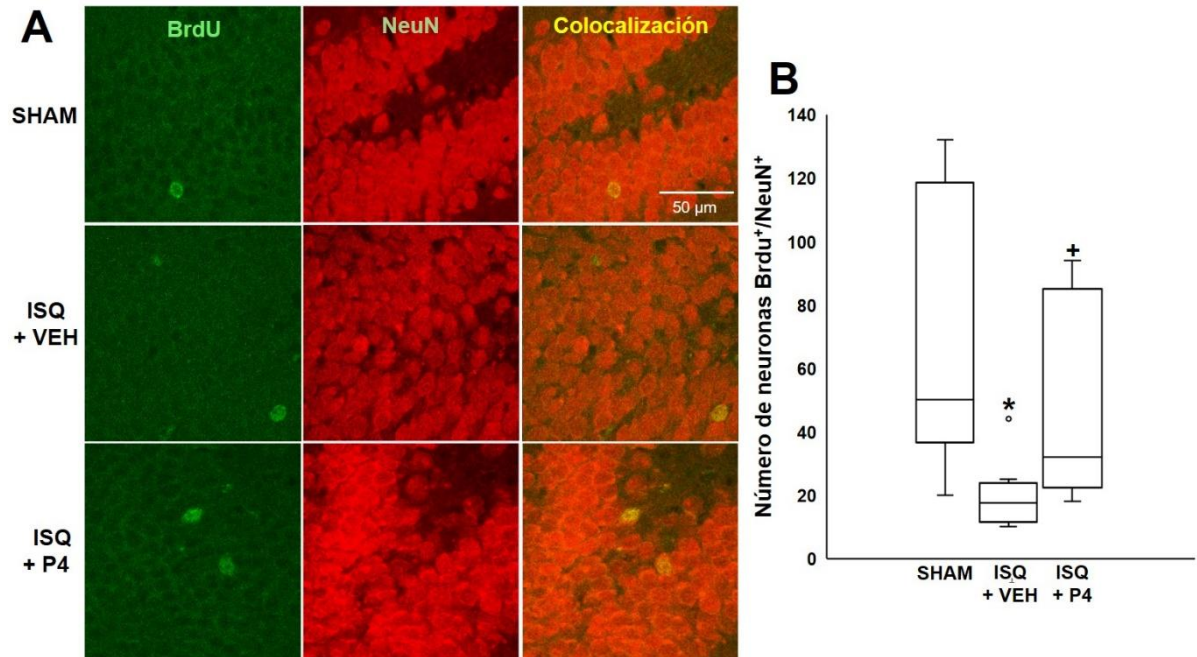


Figura 12. Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo de ratas de los tres grupos experimentales. Imágenes representativas (A) que muestran neuronas granulares BrdU^+ , NeuN^+ y $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ (colocalización en neuronas nuevas maduras), en el giro dentado del hipocampo de ratas sometidas a procedimientos simulados (SHAM) o a isquemia cerebral global y tratadas con vehículo (ISQ + VEH) o con P4 (ISQ + P4). Los datos numéricos (número acumulado en 50 campos microscópicos por animal) de cada grupo experimental (Mediana y rangos intercuartiles) se muestran en (B): Se encontró un mayor número de neuronas nuevas ya maduras ($\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$) en las ratas del grupo ISQ + P4, que en las del grupo ISQ + VEH. * $p < 0.01$ ISQ + VEH vs SHAM. + $p < 0.05$ ISQ + P4 vs ISQ + VEH. Kruskal-Wallis seguido de prueba U de Mann-Whitney.

2.6 DISCUSIÓN

Los hallazgos mostraron que el tratamiento pos-isquemia con P4 favoreció la presencia de neuronas granulares nuevas ya maduras en el GD del hipocampo de ratas sometidas a un episodio de isquemia cerebral global severo (30 minutos). Además, el tratamiento con P4 permitió que los animales conservaran sus funciones cognitivas, dado que estas ratas tuvieron un desempeño funcional adecuado en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial, 21-27 días después de la isquemia, en comparación con las ratas que recibieron el vehículo. Sin embargo, el desempeño funcional de las ratas tratadas con P4 no se asoció con un efecto neuroprotector de esta hormona que disminuyera la muerte neuronal, dado que ambos grupos sometidos a isquemia tuvieron una pérdida severa y similar de neuronas piramidales en CA1, independientemente del tratamiento recibido.

La eficiencia en el desempeño cognitivo de las ratas isquémicas tratadas con P4, similar a la de los sujetos sometidos a maniobras simuladas a pesar de la escasa preservación de las neuronas piramidales en CA1 del hipocampo, es consistente con nuestros estudios previos (Moralí y cols., 2011; Espinosa-García y cols., 2014). En esos estudios, si bien las ratas fueron sometidas a un episodio de isquemia menos severo (15 o 20 minutos) también tuvieron daño neuronal en la región CA1. Además, a través de las pruebas de aprendizaje y de memoria que se realizaron en un período corto (14 días) o a largo plazo (90 días), después de la isquemia, se demostró que el tratamiento con P4 o con alopregnanolona (ALLO) mejoraba significativamente estas funciones a pesar de la pérdida severa de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo (P4: 19.9 % y ALLO: 25.5 % de neuronas remanentes en comparación con el grupo SHAM) (Moralí y cols., 2011; Espinosa-García y cols., 2014).

En un trabajo subsecuente, descrito también en esta tesis (Moralí y cols., 2012), se dilucidó que la recuperación funcional a largo plazo de las ratas isquémicas tratadas con P4 estaba asociada con cambios plásticos compensatorios en la citoarquitectura de las neuronas

piramidales remanentes de la región CA1 del hipocampo, incluyendo una mayor proporción de espinas dendríticas tipo hongo. De hecho, se conoce que varios mecanismos de plasticidad cerebral se activan en respuesta a un episodio de isquemia, incluida la plasticidad sináptica y la neurogénesis (Kokaia y Lindvall, 2003; Murphy y Corbett, 2009; Lindvall y Kokaia, 2015). La plasticidad sináptica implica principalmente el brote de nuevos axones y el incremento de dendritas y espinas dendríticas en las neuronas maduras remanentes, lo cual resulta en una mayor conectividad sináptica (Cheatwood y cols., 2008; Murphy y Corbett, 2009; Sandvig y cols., 2018).

En el presente estudio, el tratamiento con P4 administrado durante un período de 72 horas después de la isquemia, podría haber favorecido la acción de un microambiente permisivo para el desarrollo de los mecanismos de plasticidad cerebral, lo que resultó en una ejecución cognitiva adecuada 21 días después de la isquemia. En este sentido, se ha demostrado que la administración pos-isquemia de P4 disminuye la expresión del inhibidor del crecimiento neurítico Nogo-A, su receptor Ng-R y su efector intracelular la proteína Rho cinasa A (Rho-A) en la región CA1 del hipocampo (Espinosa-García y cols., 2014). Aunado a lo anterior, se ha descrito que la P4 incrementa la expresión de la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43) y de la sinaptofisina en CA1, después de un episodio de isquemia global; lo cual indica la existencia de rebrote neuronal y sinaptogénesis en esta región del hipocampo (Zhao y cols., 2011). Además, se ha reportado que la P4 regula los niveles del BDNF y del VEGF después de la isquemia a través de la activación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt). Estos efectos de la P4 podrían contribuir a sus efectos neuroprotectores, dado que los factores neurotróficos mencionados tienen importantes implicaciones funcionales en la recuperación pos-isquemia mediante la regulación de la sobrevivencia neuronal, la plasticidad cerebral incluyendo la neurogénesis, así como la remodelación vascular del cerebro (Ishrat y cols., 2012; Jiang y cols., 2017). Más

aún, se ha demostrado que la P4 cambia el fenotipo de la microglía de proinflamatorio a antiinflamatorio, disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias, e incrementa la de las citocinas antiinflamatorias en el hipocampo isquémico (Perez-Alvarez y Wandosell, 2016; Espinosa-García y cols., 2017).

Por otra parte, se ha sugerido que la neurogénesis es un mecanismo de plasticidad cerebral que puede contribuir al desempeño de tareas de aprendizaje y memoria espacial, si es que las neuronas nuevas pueden incorporarse tanto estructuralmente como funcionalmente en las redes neuronales preexistentes de estructuras cerebrales específicas (Toni y cols., 2008; Toni y Schinder, 2015; Lieberwirth y cols., 2016). Los resultados del presente trabajo demuestran que el tratamiento con P4 favoreció la sobrevivencia de nuevas neuronas, posiblemente inducidas por la isquemia global, que se incorporaron al GD del hipocampo; dado que a los 28 días pos-isquemia se encontró un mayor número de neuronas granulares nuevas ya maduras ($\text{Brdu}^+/\text{NeuN}^+$) en el GD de las ratas tratadas con P4 con respecto a las ratas tratadas con el vehículo. Por lo tanto, las acciones de la P4 mantenidas durante las 72 horas que duró el tratamiento, posteriores al episodio de isquemia, habrían favorecido la activación de mecanismos de recuperación a largo plazo, a través de fenómenos de plasticidad cerebral como la neurogénesis. Otros estudios han reportado que la P4, administrada durante un periodo similarmente corto (dos o tres días), promueve la sobrevivencia de las neuronas nuevas en el GD tanto en ratones adultos intactos (Zhang y cols., 2010b), como en el GD y ZSV de ratones y ratas sometidas a isquemia cerebral focal (Zhang y cols., 2010a; Jiang y cols., 2017). Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento con P4 regula los niveles de neurogénesis en el GD del hipocampo después de daño traumático (Barha y cols., 2011).

Se ha reportado que la P4 induce la sobrevivencia de las neuronas nuevas en el hipocampo a través de la unión con su receptor nuclear y con su receptor de membrana. Este último, activa la vía de señalización de la cinasa 1/2 regulada por señales extracelulares Src

(Src-ERK1/2) y la vía PI-3K/Akt (Zhang y cols., 2010a; Zhang y cols., 2010b). Dichos mecanismos podrían estar involucrados con el incremento en la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Yao y cols., 2005; Li y cols., 2015) y con la disminución en la expresión de moléculas proapoptóticas como la proteína X asociada a Bcl-2 (Bax), la proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2 (Bad) y la caspasa-3; que regula la P4 (Djebaili y cols., 2004; Ishrat y cols., 2012). Al respecto, previamente demostramos que el tratamiento con P4 disminuye los niveles y la activación de la caspasa-3, y también reduce la fragmentación del DNA en el hipocampo de ratas sometidas a isquemia cerebral global (Espinosa-García y cols., 2013).

Existe evidencia de que, en condiciones normales, las neuronas granulares nuevas se pueden integrar al circuito trisináptico del hipocampo y son funcionales, debido a que sus espinas dendríticas reciben aferencias y establecen sinapsis con la vía perforante y sus axones se proyectan hacia la región CA3 (Toni y cols., 2008; Toni y Schinder, 2015). Además, se ha demostrado que la neurogénesis en el GD del hipocampo de roedores está asociada con la ejecución de tareas de aprendizaje espacial (Marín-Burgin y Schinder, 2012; Lieberwirth y cols., 2016; Ohline y Abraham, 2019), en conjunto con la región CA1, la cual se ha relacionado ampliamente con el aprendizaje y la memoria espacial (Okada y cols., 2003; Ohline y Abraham, 2019). El desempeño cognitivo adecuado de las ratas isquémicas tratadas con P4, a pesar de la escasa preservación neuronal en CA1 del hipocampo, puede representar el resultado de una interacción cooperativa de varios mecanismos de plasticidad promovidos por este esteroide neuroactivo en diferentes sustratos neuronales, incluido el GD (Zhang y cols., 2010a; Zhang y cols., 2010b; Morali y cols., 2012; Espinosa-García y cols., 2014; Hansberg-Pastor y cols., 2015). Por otra parte, como resultado de los mecanismos de plasticidad cerebral, las ratas sometidas a isquemia tratadas con P4 podrían haber utilizado estrategias alternativas para afrontar exitosamente la tarea de aprendizaje espacial en la que

están involucradas además del hipocampo, otras estructuras cerebrales como el estriado (Devan y cols., 1996; Vorhees y Williams, 2014).

2.7 CONCLUSIÓN

Los resultados demuestran que el tratamiento con P4, después de un episodio de isquemia cerebral global severa, promueve la neurogénesis en el GD del hipocampo, lo cual es uno de los mecanismos de plasticidad cerebral favorecidos por la hormona que subyacen a la recuperación funcional observada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 2005; 85:523-569.
- Ahn JH, Choi JH, Park JH, Kim IH, Cho JH, Lee JC, Koo HM, Hwangbo G, Yoo KY, Lee CH, Hwang IK, Cho JH, Choi SY, Kwon YG, Kim YM, Kang IJ, Won MH. Long-Term Exercise Improves Memory Deficits via Restoration of Myelin and Microvessel Damage, and Enhancement of Neurogenesis in the Aged Gerbil Hippocampus After Ischemic Stroke. *Neurorehabil Neural Repair.* 2016; 30:894-905.
- Alia C, Spalletti C, Lai S, Panarese A, Lamola G, Bertolucci F, Vallone F, Di Garbo A, Chisari C, Micera S, Caleo M. Neuroplastic Changes Following Brain Ischemia and their Contribution to Stroke Recovery: Novel Approaches in Neurorehabilitation. *Front Cell Neurosci.* 2017; 11:76.
- Alkayed NJ, Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke.* 2000; 31:161-168.
- Attella MJ, Nattinville A, Stein DG. Hormonal state affects recovery from frontal cortex lesions in adult female rats. *Behav Neural Biol.* 1987; 48:352-367.
- Azcoitia I, Leonelli E, Magnaghi V, Veiga S, Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiol Aging.* 2003; 24:853-860.
- Bakthavachalam P, Shanmugam PST. Mitochondrial dysfunction - Silent killer in cerebral ischemia. *J Neurol Sci.* 2017; 375:417-423.
- 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; 231:72-81.
- Belarbi K, Rosi S. Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7:145.
- Bendel O, Bueters T, Von ME, Ove SÖ, Sandin J, Von GE. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow and Metab.* 2005; 25:1585-1595.
- Betz AL, Coester HC. Effect of steroid therapy on ischaemic brain oedema and blood to brain sodium transport. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1990; 51:256-258.
- Betz AL, Coester HC. Effect of steroids on edema and sodium uptake of the brain during focal ischemia in rats. *Stroke.* 1990; 21:1199-1204.
- Block F, Schwarz M. Global ischemia neuronal damage relates to behavioural deficits: a pharmacological approach. *Neuroscience.* 1998; 82:791-803.
- Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol.* 1999; 58:279-295.
- Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.* 2015; 38:145-157.
- Bourne J, Harris KM. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol.* 2007; 17:381-386.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, et al. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol.* 2008; 29:313-339.
- Briones TL, Suh E, Hattar H, Wadowska M. Dentate gyrus neurogenesis after cerebral ischemia and behavioral training. *Biol Res Nurs.* 2005; 6:167-179.
- Briones TL, Suh E, Jozsa L, Woods J. Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning. *Exp Neurol.* 2006; 198:530-538.

- Brotfain E, Gruenbaum SE, Boyko M, Kutz R, Zlotnik A, Klein M. Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury. *Curr Neuropharmacol*. 2016; 14:641-653.
- Brown CE, Li P, Boyd JD, Delaney KR, Murphy TH. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci*. 2007; 27:4101-4109.
- Brown CE, Wong C, Murphy TH. Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke. *Stroke*. 2008; 39:1286-1291.
- Bueters T, von Euler M, Bendel O, von Euler G. Degeneration of newly formed CA1 neurons following global ischemia in the rat. *Exp Neurol*. 2008; 209:114-124.
- Cai W, Zhu Y, Furuya K, Li Z, Sokabe M, Chen L. Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008; 55:127-138.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Cupini L, Bernardi G. Synaptic plasticity in the ischaemic brain. *Lancet Neurol*. 2003; 2:622-629.
- Caleo M. Rehabilitation and plasticity following stroke: Insights from rodent models. *Neuroscience*. 2015; 311:180-194.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *NeuroReport*. 1998; 9:3993-3996.
- Cervantes M, González-Vidal MD, Ruelas R, Escobar A, Morali G. Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res*. 2002; 33:6-14.
- Cervantes M, Morali G, Letechipía-Vallejo G. Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *J Pineal Res*. 2008; 45:1-7.
- Céspedes Rubio ÁE, Pérez-Alvarez MJ, Lapuente Chala C, Wandosell F. Sex steroid hormones as neuroprotective elements in ischemia models. *J Endocrinol*. 2018; 237:R65-R81.
- Chalkias A, Xanthos T. Post-cardiac arrest brain injury: pathophysiology and treatment. *J Neurol Sci*. 2012; 315:1-8.
- Chauhan A, Moser H, McCullough LD. Sex differences in ischaemic stroke: potential cellular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 2017; 131:533-552.
- Cheatwood JL, Emerick AJ, Kartje GL. Neuronal plasticity and functional recovery after ischemic stroke. *Top Stroke Rehabil*. 2008; 15:42-50.
- Chen J, Chopp M, Li Y. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci*. 1999; 171:24-30.
- Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx*. 2004; 1:36-45.
- Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP. Global ischemia activates nuclear factor-kB in forebrain neurons of rats. *Stroke*. 1997; 28:1073-1081.
- Cohen EJ, Quarta E, Bravi R, Granato A, Minciacchi D. Neural plasticity and network remodeling: From concepts to pathology. *Neuroscience*. 2017; 344:326-345.
- Corbett D, Giles T, Evans S, McLean J, Biernaskie J. Dynamic changes in CA1 dendritic spines associated with ischemic tolerance. *Exp Neurol*. 2006; 202:133-138.
- Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Progress in Neurobiology*. 1998; 54:531-548.
- Crepel V, Epsztein J, Ben-Ari Y. Ischemia induces short- and long-term remodeling of synaptic activity in the hippocampus. *J Cell Mol Med*. 2003; 7:401-407.
- Cutler SM, VanLandingham JW, Stein DG. Tapered progesterone withdrawal promotes long-term recovery following brain trauma. *Exp Neurol*. 2006; 200:378-385.

- De Nicola AF, Labombarda F, Deniselle MC, González SL, Garay L, Meyer M, Gargiulo G, Guennoun R, Schumacher M. Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Front Neuroendocrinol*. 2009; 30:173-187.
- Devan BD, Goad EH, Petri HL. Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem*. 1996; 66:305-323.
- Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience*. 2004; 123:349-359.
- Downie MM, Heath RW. *Basic Statistical Methods*. Harper & Row, New York, 1983. pp. 347.
- Ekdahl, CT, Claasen, JH, Bonde, S, Kokaia, Z, Lindvall, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:13632-13637.
- El-Falougy H, Benuska J. History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratisl Lek Listy*. 2006; 107:103-106.
- 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; 550:98-103.
- 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*. 2014; 1545:23-34.
- Espinosa-Garcia C, Sayeed I, Yousuf S, Atif F, Sergeeva EG, Neigh GN, Stein DG. Stress primes microglial polarization after global ischemia: Therapeutic potential of progesterone. *Brain Behav Immun*. 2017; 66:177-192.
- Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999; 49:377-391.
- Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res*. 2017; 120:439-448.
- Finklestein SP, Fisher M, Furlan AJ, Goldstein LB, Gorelick PB, Kaste M, Lees KR, Traystman RJ. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*. 1999; 30:2752-2758.
- Frisén J. Neurogenesis and Gliogenesis in Nervous System Plasticity and Repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2016; 32:127-141.
- Frye CA, Scalise TJ. Anti-seizure effects of progesterone and 3 α , 5-THP in Kainic acid and perforant pathway models of epilepsy. *Psychoneuroendocrinology*. 2000; 25:407-420.
- Giatti S, Romano S, Pesaresi M, Cermenati G, Mitro N, Caruso D, Tetel MJ, Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Neuroactive steroids and the peripheral nervous system: An update. *Steroids*. 2015; 103:23-30.
- Giatti S, Garcia-Segura LM, Barreto GE, Melcangi RC. Neuroactive steroids, neurosteroidogenesis and sex. *Prog Neurobiol*. 2019; 176:1-17.
- Gibson CL, Constantin D, Prior MJW, Bath PMW, Murphy SP. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2005; 193:522-530.
- Gibson CL, Murphy SP. Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; 24:805-813.
- Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*. 2008; 55:363-389.
- Gobbo OL, O'Mara SM. Impact of enriched environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res*. 2004; 152:231-241.

- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*. 2016; 167:897-914.
- González SL, Labombarda F, González Deniselle MC, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone up-regulates neuronal brain-derived neurotrophic factor expresión in the injured spinal cord. *Neuroscience*. 2004; 125:605-614.
- González-Burgos I. From synaptic transmission to cognition: an intermediary role for dendritic spines. *Brain Cogn*. 2012; 80:177-183.
- González-Burgos I, Tapia-Arizmendi G, Feria-Velasco A. Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *Biotech Histochem*. 1992; 67:288-296.
- González-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Morali G, Cervantes M. Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2007; 423:162-166.
- González-Deniselle MC, Garay L, González S, Saravia F, Labombarda F, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone modulates brain-derived neurotrophic factor and choline acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons. *Exp Neurol*. 2007; 203:406-414.
- González-Vidal MD, Cervera-Gaviria M, Ruelas R, Escobar A, Morali G, Cervantes M. Progesterone: Protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res*. 1998; 29:117-124.
- Goss CW, Hoffman SW, Stein DG. Behavioral effects and anatomic correlates after brain injury: a progesterone dose-response study. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003; 76:231-242.
- Gould E, Wooley C, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*. 1990; 10:1286-1291.
- GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature*. 2000; 403:439-443.
- Guennoun R, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Liere P, De Nicola AF, Schumacher M. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015; 146:48-61.
- Guennoun R, Zhu X, Fréchou M, Gaignard P, Slama A, Liere P, Schumacher M. Steroids in Stroke with Special Reference to Progesterone. *Cell Mol Neurobiol*. 2019; 39:551-568.
- Gwag BJ, Won SJ, Kim DY. Excitotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in ischemic neuronal death. En: RCS Lin, editor. *New Concepts in Cerebral Ischemia*. Boca Raton EEUU: CRC Press, 2002:79-112.
- Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Piña-Medina AG, Camacho-Arroyo I. Sex Hormones Regulate Cytoskeletal Proteins Involved in Brain Plasticity. *Front Psychiatry*. 2015; 6:165.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao BH. Ultrastructure, development, and plasticity of dendritic spine synapses in area CA1 of the rat hippocampus: extending our vision with serial electron microscopy and three-dimensional analyses, In: V. Chan-Palay, & Ch. Kolr (eds.), *The Hippocampus-New Vistas*. New York: Alan R. Liss, 1989. pp. 17-31.
- Hartman RE, Lee JM, Zipfeld GJ, Wozniak DF. Characterizing learning and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2005; 1043:48-56.
- Herguido MJ, Carceller F, Roda JM, Avendaño C. Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats: a critical assessment. *Neuroscience*. 1999; 93:71-80.
- Hoffman GE, Moore N, Murphy AZ. Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. *Experimental Neurology*. 2003; 182:124-134.

- Hoyo Y, Kawato S. Neurosteroids in Adult Hippocampus of Male and Female Rodents: Biosynthesis and Actions of Sex Steroids. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:183.
- Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. En: Walz W. Ed. *Cerebral ischemia. Molecular and Cellular Pathophysiology*. Humana Press. Totowa NJ. 1999. pp. 3-32.
- 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; 226:183-190.
- 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; 210:442-450.
- Ito U, Kuroiwa T, Nagasao J, Kawakami E, Oyanagi K. Temporal profiles of axon terminals, synapses and spines in the ischemic penumbra of the cerebral cortex: ultrastructure of neuronal remodeling. *Stroke*. 2006; 37:2134-2139.
- Jessberger S, Parent JM. Epilepsy and Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 7:a020677.
- Jiang N, Chopp M, Stein D, Feit H. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res*. 1996; 735:101-107.
- Jiang C, Zuo F, Wang Y, Lu H, Yang Q, Wang J. Progesterone changes VEGF and BDNF expression and promotes neurogenesis after ischemic stroke. *Mol Neurobiol*. 2017; 54:571-581.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral sub-ventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:4710-4715.
- Jourdain P, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci*. 2002; 22:3108-3116.
- Ju F, Ran Y, Zhu L, Cheng X, Gao H, Xi X, Yang Z, Zhang S. Increased BBB Permeability Enhances Activation of Microglia and Exacerbates Loss of Dendritic Spines After Transient Global Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci*. 2018; 12:236.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill/Interamericana Madrid España, 2001. pp. 1400.
- Karpova NN, Sales AJ, Joca SR. Epigenetic Basis of Neuronal and Synaptic Plasticity. *Curr Top Med Chem*. 2017; 17:771-793.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*. 2003; 26:360-368.
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci*. 2010; 33:121-129
- Kato T, Eriguchi T, Fujiwara N, Murata Y, Yoshino A, Sakatani K, Katayama Y. Effects of enriched environment on hippocampal neuronal cell death and neurogenesis in rat global ischemia. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 812:203-208.
- Kawabori M, Yenari MA. Inflammatory responses in brain ischemia. *Curr Med Chem*. 2015; 22:1258-1277.
- Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, Okuyama N, Mochizuki N, Takeo S. Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; 24:548-555.
- Kempf A, Schwab ME. Nogo-A represses anatomical and synaptic plasticity in the central nervous system. *Physiology (Bethesda)*. 2013; 28 :151-163.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressouches A, Guennoun R. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*. 1995; 268:1500-1502.

- Koenig MA. Brain resuscitation and prognosis after cardiac arrest. *Crit Care Clin.* 2014; 30:765-783.
- Kohman RA, Rhodes JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun.* 2013; 27:22-32.
- Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Current Opinion in Neurobiology.* 2003; 13:127-132.
- Kolb B, Harker A, Gibb R. Principles of plasticity in the developing brain. *Dev Med Child Neurol.* 2017; 59:1218-1223.
- Kovalenko T, Osadchenko I, Nikonenko A, Lushnikova I, Voronin K, Nikonenko I, Muller D, Skibo G. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus.* 2006; 16:814-825.
- Kumon Y, Kim SC, Tompkins P, Stevens A, Sakaki S, Loftus CM. Neuroprotective effect of postischemic administration of progesterone in spontaneously hypertensive rats with focal cerebral ischemia. *J Neurosurg.* 2000; 92:848-852.
- Langdon KD, Granter-Button S, Corbett D. Persistent behavioral impairments and neuroinflammation following global ischemia in the rat. *Eur J Neurosci.* 2008; 28:2310-2318.
- Lee RJ, Kim JK, Chao D, Kuo L, Mally A, McClean ME, Pemberton HE, Wilmington AR, Wong J, Murphy SP. Progesterone and allopregnanolone improves stroke outcome in male mice via distinct mechanisms but neither promotes neurogenesis. *J Neurochem.* 2015; 132:32-37.
- Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev.* 2002; 39:55-73.
- Letchipía-Vallejo G, López-Loeza E, Espinoza-González V, González-Burgos I, Olvera-Cortés ME, Morali G, Cervantes M. Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J Pineal Res.* 2007; 42:138-146.
- Li X, Zhang J, Zhu X, Wang P, Wang X, Li D. Progesterone reduces inflammation and apoptosis in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage through the PI3K/Akt pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8:8197-8203.
- Li Y, Xu XL, Zhao D, Pan LN, Huang CW, Guo LJ, Lu Q, Wang J. TLR3 ligand Poly IC Attenuates Reactive Astrogliosis and Improves Recovery of Rats after Focal Cerebral Ischemia. *CNS Neurosci Ther.* 2015; 21:905-913.
- Li L, Deng B, Wang S, Zhong H, Liu Z, Jin W, Jiang T, Xiao Z, Wang Q. Asynchronous therapy targeting Nogo-A enhances neurobehavioral recovery by reducing neuronal loss and promoting neurite outgrowth after cerebral ischemia in mice. *J Drug Target.* 2016; 24:13-23.
- Li P, Stetler RA, Leak RK, Shi Y, Li Y, Yu W, Bennett MVL, Chen J. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology.* 2018; 134(Pt B):208-217.
- Lieberwirth C, Pan Y, Liu Y, Zhang Z, Wang Z. Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Res.* 2016; 1644:127-140.
- Lindvall O, Kokaia Z. Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7:a019034.
- LinksSchäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke.* 2007; 38:2165-2172.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999; 79:1431-1568.

- Liu Z, Fan Y, Won SJ, Neumann M, Hu D, Zhou L, Weinstein PR, Liu J. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2007; 38:146-152.
- Liu PZ, Nusslock R. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. *Front Neurosci*. 2018; 12:52.
- Magaki SD, Williams CK, Vinters HV. Glial function (and dysfunction) in the normal & ischemic brain. *Neuropharmacology*. 2018; 134(Pt B):218-225.
- Maiti P, Manna J, Ilavazhagan G, Rossignol J, Dunbar GL. Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015; 59:208-237.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*. 1986; 232:1004-1007.
- Marín-Burgin A, Schinder AF. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav Brain Res*. 2012; 227:391-399.
- Marques BL, Carvalho GA, Freitas EMM, Chiareli RA, Barbosa TG, Di Araújo AGP, Nogueira YL, Ribeiro RI, Parreira RC, Vieira MS, Resende RR, Gomez RS, Oliveira-Lima OC, Pinto MCX. The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke. *Semin Cell Dev Biol*. 2019; S1084-9521:30251-30259.
- Martone ME, Jones YZ, Young SJ, Ellisman MH, Zivin JA, Hu BR. Modification of postsynaptic densities after transient cerebral ischemia: a quantitative and three-dimensional ultrastructural study. *J Neurosci*. 1999; 19:1988-1997.
- Martone ME, Hu BR, Ellisman MH. Alterations of hippocampal postsynaptic densities following transient ischemia. *Hippocampus*. 2000; 10:610-616.
- Matsumori Y, Hong SM, Fan Y, Kayama T, Hsu CY, Weinstein PR, Liu J. Enriched environment and spatial learning enhance hippocampal neurogenesis and salvages ischemic penumbra after focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2006; 22:187-198.
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*. 2001; 4:1086-1092.
- Mayor D, Tymianski M. Neurotransmitters in the mediation of cerebral ischemic injury. *Neuropharmacology*. 2018; 134:178-188.
- 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 outgrowth. *Neuron*. 1994; 13:805-811.
- Melcangi RC, Giatti S, Calabrese D, Pesaresi M, Cermenati G, Mitro N, Viviani B, Garcia-Segura LM, Caruso D. Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol*. 2014; 113:56-69.
- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005; 28:223-250.
- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011; 70:687-702.
- Moralí G, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Montes P, Hernández-Morales L, Cervantes M. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neurosci Lett*. 2005; 382:286-290.
- 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; 29:1-15.

- 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; 30:1-8.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlings JNP, O'Keefe J. Place navigation is impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982; 297:681-683.
- Mudrick LA, Baimbridge KG. Long-term structural changes in the rat hippocampal formation following cerebral ischemia. *Brain Res*. 1989; 493:179-184.
- Murphy SJ, Littleton-Kearney MT, Hurn PD. Progesterone administration during reperfusion, but not preischemia alone, reduces injury in ovariectomized rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22:1181-1188.
- Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10:861-872.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*. 2002; 110:429-441.
- 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; 20:1865-1872.
- Neumann JT, Cohan CH, Dave KR, Wright CB, Perez-Pinzon MA. Global cerebral ischemia: synaptic and cognitive dysfunction. *Curr Drug Targets*. 2013; 14:20-35.
- Nieto-Sampedro M, Nieto-Díaz M. Neural plasticity: changes with age. *J Neural Transm*. 2005; 112:3-27.
- Nunn JA, LePeillet E, Netto CA, Hodges H, Gray JA, Meldrum BS. Global ischaemia: hippocampal pathology and spatial deficits in the water maze. *Behav Brain Res*. 1994; 62:41-54.
- O'Reilly SM, Grubb NR, O'Carroll RE. In-hospital cardiac arrest leads to chronic memory impairment. *Resuscitation*. 2003; 58:73-79.
- Ohline SM, Abraham WC. Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology*. 2019; 145(Pt A):3-12.
- Okada T, Yamada N, Tsuzuki K, Horikawa HP, Tanaka K, Ozawa S. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *Eur J Neurosci*. 2003; 17:341-349.
- Olsen GM, Scheel –Krüger J, Moller A, Jensen LH. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. *Behav Neurosci*. 1994; 108:681-690.
- 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; 38:125-136.
- Ozacmak VH, Sayan H. The effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiol Res*. 2009; 58:909-912.
- 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; 51:433-441.
- 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; 16:529-536.

- Paredes MF, Sorrells SF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez Martin AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A. Does Adult Neurogenesis Persist in the Human Hippocampus? *Cell Stem Cell*. 2018; 23:780-781.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. N.York, 1986.
- Perez-Alvarez MJ, Wandosell F. Stroke and Neuroinflammation: Role of sexual hormones. *Curr Pharm Des*. 2016; 22:1334-1349.
- Piccini A, Malinow R. Transient oxygen-glucose deprivation induces rapid morphological changes in rat hippocampal dendrites. *Neuropharmacology*. 2001; 41:724-729.
- Plamondon H, Roberge MC. Dietary PUFA supplements reduce memory deficits but not CA1 ischemic injury in rats. *Physiol Behav*. 2008; 95:492-500.
- Ploughman M, Granter-Button S, Chernenko G, Attwood Z, Tucker BA, Mearow KM, Corbett D. Exercise intensity influences the temporal profile of growth factors involved in neuronal plasticity following focal ischemia. *Brain Res*. 2007; 1150:207-216.
- Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979; 10:267-272.
- Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: Method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*. 1988; 19:913-914.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*. 1982; 11:491-498.
- Reis C, Akyol O, Araujo C, Huang L, Enkhjargal B, Malaguit J, Gospodarev V, Zhang JH. Pathophysiology and the Monitoring Methods for Cardiac Arrest Associated Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2017; 18:E129.
- Roberge MC, Hotte-Bernard J, Messier C, Plamondon H. Food restriction attenuates ischemia-induced spatial learning and memory deficits despite extensive CA1 ischemic injury. *Behav Brain Res*. 2008; 187:123-132.
- Roine RO. Global cerebral ischemia. En: Fisher M, Bogoslavsky J, eds. *Current Rev Cerebrovascular Dis, Current Medicine*. Philadelphia. 1997:159-164.
- Roof RL, Duvdevani R, Stein DG. Progesterone treatment attenuates brain edema following contusion injury in male and female rats. *Restor Neurol Neurosci*. 1992; 4:425-427.
- Roof RL, Duvdevani R, Stein DG. Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Res*. 1993; 607:333-336.
- Roof RL, Duvdevani R, Braswell L, Stein DG. Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats. *Exp Neurol*. 1994; 129:64-69.
- Roof RL, Duvdevani R, Heyburn JW, Stein DG. Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp Neurol*. 1996; 138:246-251.
- Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma*. 2000; 17:367-388.
- Ruan YW, Sou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, Gao TM, Yao Z, Xu C. Dendritic plasticity of CA1 neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*. 2006; 140:191-201.
- 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; 87:61-68.
- Rudolph LM, Cornil CA, Mittelman-Smith MA, Rainville JR, Remage-Healey L, Sinchak K, Micevych PE. Actions of Steroids: New Neurotransmitters. *J Neurosci*. 2016; 36:11449-11458.
- Rupprecht P. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; 28:139-168.

- Sadelli K, Stamegna JC, Girard SD, Baril N, Escoffier G, Brus M, Véron AD, Khrestchatsky M, Roman FS. Global cerebral ischemia in rats leads to amnesia due to selective neuronal death followed by astroglial scar formation in the CA1 layer. *Neurobiol Learn Mem.* 2017; 141:168-178.
- Sandvig I, Augestad IL, Håberg AK, Sandvig A. Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks. *Eur J Neurosci.* 2018; 47:1414-1428.
- Sanganalmath SK, Gopal P, Parker JR, Downs RK, Parker JC Jr, Dawn B. Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology and diagnostic modalities. *Mol Cell Biochem.* 2017; 426:111-127.
- Sarraf-Yazdi S, Laskowitz D, Warner DS. Pathophysiology of ischemic brain damage. En: Shuaib A, Goldstein LB, eds., *Management of Acute Stroke.* N. York: Marcel Dekker, 1999:243-277.
- Sato K. Effects of Microglia on Neurogenesis. *Glia.* 2015; 63:1394-1405.
- Sayed I, Stein DG. Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury. *Prog Brain Res.* 2009; 175:219-237.
- Schmidt A, Minnerup J. Promoting recovery from ischemic stroke. *Expert Rev Neurother.* 2016; 16:173-186.
- Schmidt-Kastner R, Truettner J, Lin B, Zhao W, Saul J, Busto R, Ginsberg M. Transient changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001; 92:157-166.
- Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci.* 2014; 34:6-17.
- Schumacher M, Mattern C, Ghoumari A, Oudinet JP, Liere P, Labombarda F, Sitruk-Ware R, De Nicola AF, Guennoun R. Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog Neurobiol.* 2014; 113:6-39.
- Schwab ME, Caroni P. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth inhibitors. *J Neurosci.* 1988; 8:2381-2393.
- Segal M. Dendritic spines: Morphological building blocks of memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2017; 138:3-9.
- Sekhon MS, Ainslie PN, Griesdale DE. Clinical pathophysiology of hypoxic ischemic brain injury after cardiac arrest: a "two-hit" model. *Crit Care.* 2017; 21:90.
- Seo TB, Kim TW, Shin MS, Ji ES, Cho HS, Lee JM, Kim TW, Kim CJ. Aerobic exercise alleviates ischemia-induced memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing neuronal apoptosis in hippocampus. *Int Neurol J.* 2014; 18:187-197.
- 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; 25:1366-1375.
- Siegel S. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Trillas, México, 1970. pp. 346.
- Sims NR, Yew WP. Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function. *Neurochem Int.* 2017; 107:88-103.
- Singh M, Su C. Progesterone, brain-derived neurotrophic factor and neuroprotection. *Neuroscience.* 2013; 239:84-91.
- Skivo GG, Nikonenko AG. Brain plasticity after ischemic episode. *Vitam Horm.* 2010; 82:107-127.

- Smith SS. Progesterone administration attenuates excitatory amino acid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience*. 1991; 42:309-320.
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 2018; 555:377-381.
- Spruston N, McBain C. Structural and functional properties of hippocampal neurons. In: P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss & J. O'Keefe (eds.), *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, 2007. pp. 133-201.
- Stamenova V, Nicola R, Aharon-Peretz J, Goldsher D, Kapeliovich M, Gilboa A. Long-term effects of brief hypoxia due to cardiac arrest: Hippocampal reductions and memory deficits. *Resuscitation*. 2018; 126:65-71.
- Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci*. 2001; 24:386-391.
- Stein DG. Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res Rev*. 2008; 57:386-397.
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*. 2003; 111:1843-1851.
- Surinkaew P, Sawaddiruk P, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Role of microglia under cardiac and cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. *Metab Brain Dis*. 2018; 33:1019-1030.
- Teyler TJ, Discenna P. The topological anatomy of the hippocampus: a clue to its function. *Brain Res Bull*. 1984; 12:711-719.
- Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, Shaffrey CI, Chopp M. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine*. 1999; 24:2134-2138.
- Tobin MK, Bonds JA, Minshall RD, Pelligrino DA, Testai FD, Lazarov O. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014; 34:1573-1584.
- Toda T, Gage FH. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res*. 2018; 373:693-709.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells *Nat Neurosci*. 2008; 11:901-907.
- Toni N, Schinder AF. Maturation and functional integration of new granule cells into the adult hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 8:a018903.
- Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J*. 2003; 44:85-95.
- Türeyen K, Vemuganti R, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurgery*. 2005; 57:1254-1263.
- Veiga S, García –Segura LM, Azcoitia I. Propiedades neuroprotectoras de los esteroides sexuales y los neuroesteroides. *Rev Neurol*. 2004; 39:1043-1051.
- Velázquez-Zamora DA, González-Ramírez MM, Beas-Zárate C, González-Burgos I. Egocentric working memory impairment and dendritic spine plastic changes in prefrontal neurons after NMDA receptor blockade in rats. *Brain Res*. 2011; 1402:101-108.
- Vilar M, Mira H. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. *Front Neurosci*. 2016; 10:26.

- Vorhees CV, Williams MT. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies *Neurotoxicol Teratol.* 2014; 45:75-90.
- Wahlgren NG, Ahmed N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis.* 2004; 17:153-166.
- 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; 471:941-944.
- Wang W, Liu L, Jiang P, Chen C, Zhang T. Levodopa improves learning and memory ability on global cerebral ischemia-reperfusion injured rats in the Morris water maze test. *Neurosci Lett.* 2017; 636:233-240.
- Woolley CS, McEwen BS. Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* 1993; 336:293-306.
- Wright DW, Bauer ME, Hoffman SW, Stein DG. Serum progesterone levels correlate with decreased cerebral edema after traumatic brain injury in male rats. *J Neurotrauma.* 2001; 18:901-909.
- Wu YV, Burnham WM. Progesterone, 5 α -dihydroprogesterone and allopregnanolone's effects on seizures: A review of animal and clinical studies. *Seizure.* 2018; 63:26-36.
- Xiong XY, Liu L, Yang QW. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol.* 2016; 142:23-44.
- Xiong XY, Liu L, Yang QW. Refocusing Neuroprotection in Cerebral Reperfusion Era: New Challenges and Strategies. *Front Neurol.* 2018; 9:249.
- Yao XL, Liu J, Lee E, Ling GSF, McCabe JT. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2005; 22:656-668.
- 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; 58:930-939.
- 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; 20:402-412.
- Zhang B, Chen X, Lv Y, Wu X, Gui L, Zhang Y, Qiu J, Song G, Yao W, Wan L, Zhang C. Cdh1 overexpression improves emotion and cognitive-related behaviors via regulating hippocampal neuroplasticity in global cerebral ischemia rats. *Neurochem Int.* 2019; 124:225-237.
- 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; 65:880-891.
- 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; 309:368-376.
- Zhu L, Wang L, Ju F, Ran Y, Wang C, Zhang S. Transient global cerebral ischemia induces rapid and sustained reorganization of synaptic structures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017; 37:2756-2767.

Cytoarchitectural characteristics of hippocampal CA1 pyramidal neurons of rats, four months after global cerebral ischemia and progesterone treatment

Gabriela Morali^{a,*}, Pedro Montes^a, Ignacio González-Burgos^b, Dulce A. Velázquez-Zamora^b and Miguel Cervantes^c

^a*Unidad de Investigación Médica en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D. F., Mexico*

^b*Laboratorio de Psicobiología, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS; and CUCBA, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico*

^c*Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de SNH, Morelia, Michoacán, Mexico*

Abstract. Purpose: To analyze the cytoarchitectural characteristics of the remaining pyramidal neurons in the hippocampal CA1 subfield of rats, four months after global cerebral ischemia (GCI) and progesterone treatment.

Methods: Dendritic arborization, and density and shape of the dendritic spines of CA1 pyramidal neurons in brains of intact rats, or rats submitted 120 days earlier to GCI and treatment with progesterone (8 mg/kg) or its vehicle, at 15 min, and 2, 6, 24, 48, and 72 h after the onset of reperfusion, were analyzed in samples processed by a modified Golgi method.

Results: Few impregnated CA1 pyramidal neurons were identified in the ischemic vehicle-treated rats, with a short apical dendrite devoid of bifurcations and dendritic spines. In contrast, the remaining CA1 pyramidal neurons sampled from ischemic progesterone-treated rats showed sinuously branched dendrites with similar number of bifurcations and whole density of spines, and higher proportional density of mushroom spines than those in the intact group.

Conclusions: These cytoarchitectural characteristics may underlie the long-term preservation of place learning and memory functions seen after ischemia and progesterone neuroprotective treatment, possibly compensating for the severe reduction in neuronal population.

Keywords: Progesterone neuroprotection, global cerebral ischemia, hippocampal pyramidal neurons cytoarchitecture, dendritic spines, rat

1. Introduction

Progesterone (P₄) has been shown to reduce the neuronal damage and functional deficits elicited by traumatic brain or spinal cord injury (Cutler et al., 2006; Djebaili et al., 2005; González et al., 2004; Labombarda et al., 2009; O’Connor et al., 2007), as well as that resulting from either transient or permanent

*Corresponding author: Gabriela Morali, Ph.D, Unidad de Investigación Médica en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., Mexico. Tel.: (+52) 555 687 8606; E-mail: gmorali@hotmail.com.

focal cerebral ischemia (Cai et al., 2008; Chen et al., 1999; Gibson & Murphy, 2004; Ishrat et al., 2009; Jiang et al., 1996; Sayeed et al., 2007) and from global cerebral ischemia (Cervantes et al., 2001; González-Vidal et al., 1998; Morali et al., 2005; Morali et al., 2011) in vulnerable brain structures. Progesterone also exerts neurotrophic effects related to plastic changes accounting for neuronal connectivity, which have been proposed as a part of the mechanisms involved in the recovery after CNS injury (Baulieu & Schumacher, 2000; González et al., 2004; González et al., 2009; Gould et al., 1990; Yu et al., 2010).

Long-term preservation of the neuronal substrate in cerebral vulnerable structures underlying functional recovery after cerebral ischemia has been considered to be a major end point of neuroprotective strategies (Corbett & Nurse, 1998; STAIR, 1999). Dendritic restructuring and reactive synaptogenesis (Briones et al., 2006; Brown et al., 2007; Crepel et al., 2003; Jourdain et al., 2002; Kovalenko et al., 2006; Neigh et al., 2004; Onodera et al., 1990; Ruan et al., 2006; Skivo & Nikonenko, 2010) among other phenomena including the activation of a variety of potential growth-promoting processes (Arvidsson et al., 2001; Carmichael, 2006; Schmidt-Kastner et al., 2001), have been described to occur in neurons surviving the ischemic insult in vulnerable brain structures.

In particular, pyramidal neurons in the Ammon's horn, especially those in the CA1 subfield of the hippocampus, are among the most vulnerable cell types to even mild global ischemia which results in both pyramidal neuron loss and learning and memory impairment (Block, 1999; Hartman et al., 2005; Lim et al., 2004; Olsen et al., 1994; Zola-Morgan et al., 1986). In a recent study, post-ischemic treatment with P₄ reduced the long-term impairment of spatial learning and memory after global cerebral ischemia, in spite of a severe hippocampal neuronal loss (only 20% remaining CA1 pyramidal neurons) similar to that seen in ischemic vehicle-treated rats (Morali et al., 2011).

Preservation of the hippocampal-dependent functions in ischemic, progesterone-treated rats (Morali et al., 2011) may involve long-term cytoarchitectural modifications in the remaining hippocampal CA1 pyramidal neurons, accounting for learning and memory performance, given their role for the processing of information critical for these functions (Block, 1999; McDonald & White, 1993; McNamara & Sketton, 1993; Olsen et al., 1994; Olvera-Cortés et al., 2002; Silva et al., 1998).

Present study was done to evaluate cytoarchitectural characteristics, such as dendritic branching, dendritic spine density, and proportion of the various types of dendritic spines, in pyramidal neurons remaining in the CA1 hippocampal subfield of rats long after global cerebral ischemia and progesterone-induced neuroprotection.

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.

Brain tissue samples were obtained from some subjects of a previous study (Morali et al., 2011): intact rats (Control, $n=5$) and rats having been submitted, four months earlier, to acute global cerebral ischemia for 20 min through four vessel occlusion (4 VO), and progesterone, 8 mg/kg iv (Isch + P₄, $n=5$), or vehicle (Isch + Veh, $n=5$) administration, at 15 min, and 2, 6, 24, 48, and 72 h after the onset of cerebral blood flow reestablishment. In brief, the 4 VO occlusion procedure consists of permanent cauterization of vertebral arteries through the *alar foramina* at the first cervical vertebra, and transient occlusion of common carotid arteries for 20 min using microvascular clamps. Interruption of blood flow to the brain and severity of global ischemia are confirmed by maintenance of rats' unconsciousness throughout the occlusion period and for at least 30 min after clamp removal. As a result of this condition, a severe (70–80%) loss of pyramidal neurons in the CA1 subfield of the hippocampus usually occurs because of their selective vulnerability to ischemia (Kogure et al., 1988; Pulsinelli et al., 1982). Four months after ischemia, brains were fixed by intracardiac perfusion of the rats (saline followed by 10% formalin in phosphate buffer; both solutions flowed at a rate of 11.5 ml/min) under deep anesthesia. Following perfusion, the brains were removed from the skull and post-fixed by immersion in 100 ml of a fresh fixing solution for at least 2 days before histological processing.

Five, either left or right, hippocampi per group were processed according to a modification of the Golgi method (González-Burgos et al., 1992; González-Burgos et al., 2007). Several coronal slices 75 μ m thick

were obtained per animal, and six pyramidal neurons selected at random from the hippocampal CA1 subfield were studied per rat. In every neuron, the number of dendritic bifurcations in the *oriens-alveus* (basal dendrites) and in the *stratum radiatum* (apical dendrite), were counted (Perception Analysis System by Human-Computer Interface, Cambridge, UK). One segment of 50 μm in length from one oblique dendrite protruding from its parent apical dendrite was chosen in each neuron, on the basis of being the branches where a high proportion of all CA1 dendritic spines are located (Spruston and McBain, 2007), for quantification of the density of spines as well as proportion of spines with different shapes (Harris et al., 1989; Spruston and McBain, 2007; Velázquez-Zamora et al, 2011): thin (long, narrow protrusions terminating in a small bulbous head, the diameter of the neck being much less than the total length, and the diameter of the head being only slightly greater than the neck diameter), stubby (small protrusions lacking a clearly distinguishable neck and a head, the diameter of the neck being greater than or equal to the spine length), mushroom (protrusions with a narrow neck and a large bulbous head, both the diameter and length of the neck being much less than the head diameter, and length of the neck less than that of thin spines), wide (protrusions very similar to stubby ones, but their length being greater than the diameter of the neck), double (a neck protruding from the parent dendrite and connected with a bulb which in turn connects to another bulb by a second neck), and branched (protrusions with a short single neck that branches into two oblique necks ending as bulbous heads). The Student's *t*-test was used for statistical comparisons between groups, and Bonferroni correction was applied additionally for variations in the proportional density of the different types of spines.

3. Results

Only two impregnated CA1 pyramidal neurons were identified after examination of all samples of ischemic vehicle-treated rats. They showed only a very short, thick apical dendrite, almost devoid of arborizations (3 and zero respectively) and without any dendritic spine (Figs. 1 and 2). The remaining CA1 pyramidal neurons found in samples from ischemic progesterone-treated rats showed sinuously branched dendrites with a similar number of bifurcations to those seen in neurons from intact control rats, and similar density of spines in the analyzed segments (Table 1, Figs. 2 and 3). However, a higher proportional density of mushroom spines was found in the Isch + P₄-treated rats than in the intact control group ($t=2.97$; $p=0.021$; Table 1). Proportional density of thin, stubby, wide, double, and branched spines, were not different between the ischemic progesterone-treated and the intact control group (Table 1).

4. Discussion

The main findings in the present study were the similar values of some cytoarchitectural parameters of the remaining CA1 pyramidal neurons in the hippocampus of ischemic progesterone-treated rats, as compared to pyramidal neurons of the intact rats, in terms of number of dendritic bifurcations and density of dendritic spines, though with a different proportion of mushroom spines.

These findings could be of particular interest because the ischemic, P₄-treated rats had shown a successful performance in spatial learning and memory tasks, despite a significant loss of CA1 pyramidal



Fig. 1. Photomicrographs of representative coronal sections of CA1 subfields of the hippocampus of an Intact, an ischemic vehicle-treated (Isch + Veh), and an ischemic progesterone-treated (Isch + P₄) rat. Note the narrowing of the *stratum radiatum* as a result of the lack of pyramidal neurons in the Isch + Veh rat, differing from Intact and Isch + P₄ rats. Scale bar: 250 μm .

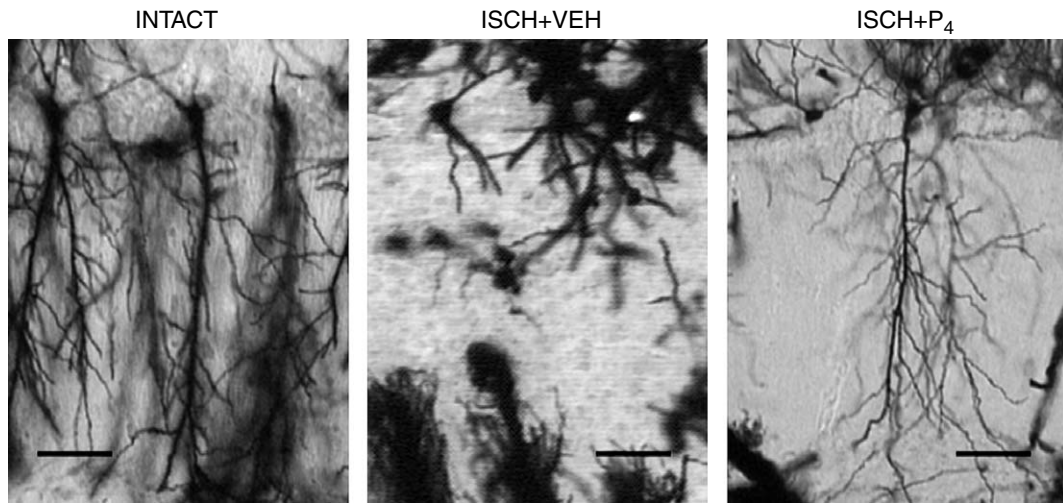


Fig. 2. Photomicrographs of pyramidal neurons observed in representative CA1 subfields of the hippocampus of an Intact, an ischemic vehicle-treated (Isch + Veh), and an ischemic progesterone-treated (Isch + P₄) rat. Pyramidal neurons of the Intact and the Isch + P₄ rat show similar average number of dendritic bifurcations. A single neuron almost devoid of bifurcations is shown in the Isch + Veh image. Scale bar: 100 μ m.

Table 1

Total number of dendritic bifurcations, spine density, and percentages of the various types of spines from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the Intact and the Ischemic P₄-treated group. Mean \pm SEM

Parameter	Group	
	Intact	Ischemia+P ₄
Bifurcations	30.3 \pm 1.9	25.6 \pm 0.4
Spine density (Number of spines per 50 μ m)	110.9 \pm 1.9	111.4 \pm 2.1
Spine-type percentages		
Thin	38.8 \pm 2.0	38.8 \pm 1.9
Stubby	22.4 \pm 1.6	18.5 \pm 1.8
Mushroom	38.7 \pm 2.0	42.2 \pm 1.9*
Wide	1.9 \pm 0.6	1.5 \pm 0.3
Double	0.4 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1
Ramified	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1

* $p < 0.05$ as compared to the Intact control group. No data are included of the Ischemia + Veh group because of the insufficient number of neurons and the absence of dendritic spines.

neurons (only 20% remaining) compared to intact rats (Moralí et al., 2011).

A severe loss (>70%) of CA1 pyramidal neurons after global cerebral ischemia in experimental animals is known to lead to permanent deficits in spatial learning and memory as assessed in the Morris water maze (Block, 1999; Hartmann et al., 2005; Letechipía-Vallejo et al., 2007; Olsen et al., 1994). So, in ischemic rats treated with P₄, a functional sufficiency of the remaining hippocampal neural substrate may account

for preservation of these cognitive functions (Moralí et al., 2011), as has also been shown under other procedures aimed to favor functional recovery after ischemia (Gobbo & O'Mara, 2004; Plamondon & Roberge, 2008; Roberge et al., 2008).

Short- and long-term structural alterations occurring in the remaining pyramidal neurons of the hippocampus after ischemia, such as axonal degeneration and reduction of: dendritic length and arborizations, number and shape of dendritic spines, and number of synapses, are usually related to impairment of cognitive functions and recognized as degenerative changes; by contrast, when preservation of cognitive functions after the ischemic insult is observed, cytoarchitectural adjustments such as axonal and dendritic sprouting, increase of number of dendritic spines and synapses, changes in the relative proportion of spine types, have been interpreted as compensatory plastic responses of surviving neurons, contributing to neuronal circuit remodeling and functional recovery (Briones et al., 2006; Jourdain et al., 2002; Mudrick & Baimbridge, 1989; Neigh et al., 2004; Onodera et al., 1990; Ruan et al., 2006; Skibo & Nikonenko, 2010).

Ischemic, vehicle-treated rats had been found to have a similar number of remaining hippocampal pyramidal neurons in CA1 (almost 20% in relation to intact rats) to those of Isch + P₄ rats, as revealed by Nissl staining, but failed to perform as well in tests of spatial learning and memory (Moralí et al., 2011). In the present study,

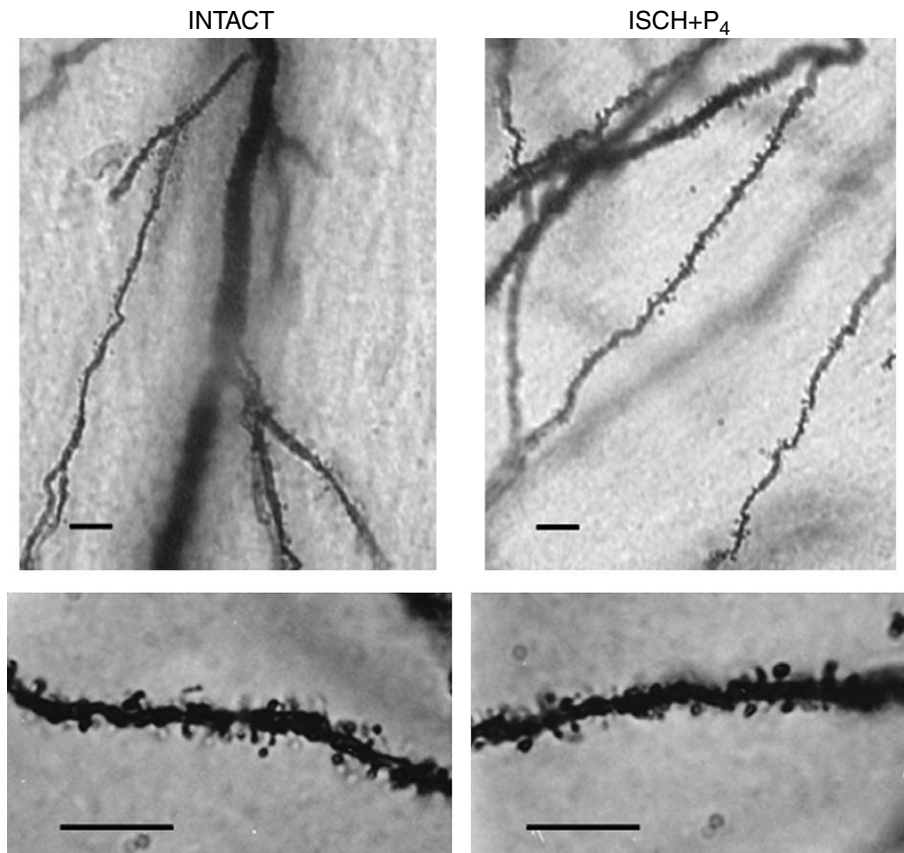


Fig. 3. Photomicrographs, at two magnifications, of oblique dendrite segments from hippocampal CA1 pyramidal neurons of Intact, and ischemic progesterone-treated (Isch + P₄) rats. Note the similar density of spines in both groups. No image is included of the Ischemia + Veh group because of the absence of dendritic spines. Scale bars: 10 μ m.

only very few impregnated CA1 pyramidal neurons, almost devoid of any arborization, could be identified in Golgi processed samples of Isch + Veh rats. There is no clear information on the particular biochemical characteristics of damaged neurons making them less suitable for impregnation through the Golgi technique. Whether this is or not the case, it is possible that the altered cytoarchitectonic characteristics of these neurons, lacking of dendritic arborizations made them difficult to be morphologically identified as pyramidal neurons in the Golgi samples, in contrast with reliably identified pyramidal neurons of the ischemic P₄-treated rats. The structural differences observed between pyramidal neurons of these groups are also consistent with differences in the width of the hippocampal formation and in particular of the CA1 subfield, mainly due to a significant shrinkage of the *stratum radiatum* in Isch + Veh rats (Morali et al., 2011).

The similar number of dendritic bifurcations of both basal and apical dendrites of pyramidal neurons in the Isch + P₄ samples to that of intact rats may indicate that progesterone treatment for 72 h after ischemia led to conditions either favoring the long-term preservation of the general structure in the remaining pyramidal neurons, or maintaining their capacity for their repair. In addition, the similar overall spine density of pyramidal neurons in Isch + P₄ samples as compared with the Intact group, may reflect a similar turnover of these structures long after ischemia, possibly associated with the adequate processing of information involved in learning and memory processes. In contrast, a proportion of thin spines similar to that of pyramidal neurons of intact rats may be interpreted as giving these neurons a comparable potentiality to process short term information. The increase in the proportion of mushroom spines observed in the Isch + P₄ samples may

represent, as in the intact rats, stable, long-lasting synaptic connections presumably linked to the consolidation of memory (Kasai et al., 2010).

It has been shown that dendritic spines are dynamic structures whose rapid creation, retraction, and variability in shape, are the basis for short- and long-term plasticity at excitatory synapses on pyramidal neurons in the cerebral cortex and the hippocampus among other brain structures, being considered as substrates for stable memory formation (Brown et al., 2007; Kasai et al., 2010). Small, thin spines are NMDA receptor dominated, highly motile, and capable of expanding and stabilizing or retracting, whereas large, big-headed spines are highly stable and AMPA receptor dominated (Bourne & Harris, 2007; Kasai et al., 2003; Matsuzaki et al., 2001). These observations lead to the hypothesis that small spines are required for learning new information, whereas the large stable spines mediate stable circuits linked to memory (Kasai et al., 2010).

Results of the present study may indicate that P₄, at the dose and time schedule used, although only having a neuroprotective effect on a small proportion of the pyramidal neuron population of CA1 after a severe ischemia, possibly preserved in the remaining neurons their cytoarchitectonic structure, and/or their capacity to respond to the CNS repair phenomena known to occur after ischemic damage (Jourdain et al., 2002; Mudrick & Baimbridge, 1989; Onodera et al., 1990; Ruan et al., 2006; Schmidt-Kastner et al., 2001; Skibo & Ninonenko, 2010).

The cellular and molecular mechanisms of action presumably involved in the neuroprotective and restorative effects of progesterone have been analysed in the recent years (De Nicola et al., 2009; Sayeed & Stein, 2009; Stein, 2008). Among them, stimulation of the synthesis of neurotrophic factors and preservation of cytoskeleton components may play a role in preserving or promoting growth of neurites and dendritic spines, with their corresponding implications for connectivity and maintenance of brain functions. Progesterone-induced increases in both BDNF mRNA and protein levels have been found in several models of damage both *in vivo* (Cutler et al., 2006; Gonzalez et al., 2004; Gonzalez-Deniselle et al., 2007) in relation to parameters of functional recovery, and *in vitro*, where the cytoprotective effects of progesterone on the cerebral cortex neurons were found to be attenuated by inhibition of neurotrophin signaling (Kaur et al., 2007).

Results of the present study suggest that progesterone may have preserved either the cytoarchitectonic

structure in the remaining neurons after a severe ischemia, or the cellular mechanisms to participate in the CNS repair phenomena known to occur after ischemic damage, thus resulting in cytoarchitectural characteristics that may underlie the long-term preservation of place learning and memory functions seen after ischemia and progesterone neuroprotective treatment, in spite of a small number of remaining hippocampal CA1 pyramidal neurons.

Acknowledgments

Partially supported by Instituto Mexicano del Seguro Social, MEXICO (2006/1A/I/029; FIS/IMSS/PROT/196).

References

- Arvidsson, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M., Saarma, M. & Lindvall, O. (2001). Stroke induces widespread changes of gene expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors in the adult rat brain. *Neuroscience*, 106, 27-41.
- Baulieu, E.E. & Schumacher, M. (2000). Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids*, 65, 605-612.
- Block, F. (1999). Global ischemia and behavioral deficits. *Prog Neurobiol*, 58(3), 279-295.
- Bourne, J. & Harris, K.M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*, 17(3), 381-386.
- 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(2), 530-538.
- Brown, C.E., Li, P., Boyd, J.D., Delaney, K.R. & Murphy, T.H. (2007). Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci*, 27(15), 4101-4109.
- Cai, W., Zhu, Y., Furuya, K., Li, Z., Sokabe, M. & Chen, L. (2008). Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(2), 127-138.
- Carmichael, S.T. (2006). Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: Making waves. *Ann Neurol*, 59, 735-742.
- Cervantes, M., González-Vidal, M.D., Ruelas, R., Escobar, A. & Morali, G. (2002). Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res*, 33(1), 6-14.
- Chen, J., Chopp, M. & Li, Y. (1999). Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci*, 171(1), 24-30.

- Corbett, D. & Nurse, S. (1998). The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol*, 54(5), 531-548.
- Crepel, V., Epsztein, J. & Ben-Ari, Y. (2003). Ischemia induces short- and long-term remodeling of synaptic activity in the hippocampus. *J Cell Mol Med*, 7(4), 401-407.
- Cutler, S.M., VanLandingham, J.W. & Stein, D.G. (2006). Tapered progesterone withdrawal promotes long-term recovery following brain trauma. *Exp Neurol*, 200(2), 378-385.
- De Nicola, A.F., Labombarda, F., Deniselle, M.C., Gonzalez, S.L., Garay, L., Meyer, M., Gargiulo, G., Guennoun, R. & Schumacher, M. (2009). Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Front Neuroendocrinol*, 30(2), 173-187.
- 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(1), 106-118.
- Gibson, C.L. & Murphy, S.P. (2004). Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24(7), 805-813.
- Gobbo, O.L. & O'Mara, S.M. (2004). Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res*, 152(2), 231-241.
- 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(3), 605-614.
- González, S.L., López-Costa, J.J., Labombarda, F., González-Deniselle, M.C., Guennoun, R., Schumacher, M. & De Nicola, A.F. (2009). Progesterone effects on neuronal ultrastructure and expression of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in rats with acute spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol*, 29, 27-39.
- González-Burgos, I., Tapia-Arizmendi, G. & Feria-Velasco, A. (1992). Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *Biotech Histochem*, 67, 288-296.
- González-Burgos, I., Letechipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Morali, G. & Cervantes, M. (2007). Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*, 423(2), 162-166.
- Gonzalez-Deniselle, M.C., Garay, L., González, S., Saravia, F., Labombarda, F., Guennoun, R., Schumacher, M. & De Nicola, A.F. (2007). Progesterone modulates brain-derived neurotrophic factor and choline acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons. *Exp Neurol*, 203(2), 406-414.
- González-Vidal, M.D., Cervera-Gaviria, M., Ruelas, R., Escobar, A., Morali, G. & Cervantes, M. (1998). Progesterone: Protective effects on the rat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res*, 29(2), 117-124.
- Gould, E., Wooley, C., Frankfurt, M. & McEwen, B.S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*, 10, 1286-1291.
- Harris, K.M., Jensen, F.E. & Tsao, B.H. (1989). Ultrastructure, development, and plasticity of dendritic spine synapses in area CA1 of the rat hippocampus: extending our vision with serial electron microscopy and three-dimensional analyses. In: V. Chan-Palay, & Ch. Köhr (eds.), *The Hippocampus-New Vistas*. New York: Alan R. Liss, pp. 17-31.
- Hartman, R.E., Lee, J.M., Zipfel, G.J. & Woznia, D.F. (2005). Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 1043(1-2), 48-56.
- Ishrat, T., Sayeed, I., Atif, F. & Stein, D.G. (2009). Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 1257(1), 94-101.
- Jiang, N., Chopp, M., Stein, D. & Feit, H. (1996). Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res*, 735(1), 101-107.
- Jourdain, P., Nikonenko, I., Alberti, S. & Muller, D. (2002). Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-ischemia. *J Neurosci*, 22, 3108-3116.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N. & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 26, 360-368.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A. & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci*, 33(3), 121-129.
- Kaur, P., Jodhka, P.K., Underwood, W.A., Bowles, C.A., de Fiebre, N.C., de Fiebre, C.M. & Singh, M. (2007). Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. *J Neurosci Res*, 85(11), 2441-2449.
- Kogure, K., Tanaka, J. & Araki, T. (1988). The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. *Neurochem Pathol*, 9, 145-170.
- 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(10), 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(8), 884-897.
- Letechipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Espinoza-González, V., González-Burgos, I., Olvera-Cortés, M.E., Morali, G. & Cervantes, M. (2007). Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J Pineal Res*, 42(2), 139-146.
- Lim, C., Alexander, M.P., LaFleche, G., Schnyer, D.M. & Verfaellie, M. (2004). The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. *Neurology*, 63(10), 1774-1778.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M. & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, 4(11), 1086-1092.

- McDonald, R.J. & White, N.M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus. *Behav Neurosci*, 107, 3-22.
- McNamara, R.K. & Sketton, R.W. (1993). The neuropharmacological and neurochemical bases of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Rev*, 18, 33-49.
- Morali, 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(3), 286-290.
- Morali, 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), 1-15.
- Mudrick, L.A. & Baimbridge, K.G. (1989). Long-term structural changes in the rat hippocampal formation following cerebral ischemia. *Brain Res*, 493, 179-184.
- Neigh, G.N., Glasper, E.R., Kofler, J., Traystman, R.J., Mervis, R.F., Bachstetter, A. & De Vries, 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.
- O'Connor, C.A., Cernak, I., Johnson, F. & Vink, R. (2007). Effects of progesterone on neurologic and morphologic outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol*, 205, 145-153.
- Olsen, G.M., Scheel-Krüger, J., Moller, A. & Jenssen, L.F. (1994). Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. *Behav Neurosci*, 108(4), 681-690.
- Olvera-Cortés, E., Cervantes, M. & González-Burgos, I. (2002). Place-learning, but not cue-learning training modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res Bull*, 58(3), 261-270.
- 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.
- Plamondon, H. & Roberge, M.C. (2008). Dietary PUFA supplements reduce memory deficits but not CA1 ischemic injury in rats. *Physiol Behav*, 95(3), 492-500.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B. & Plum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 11(5), 491-498.
- Roberge, M.C., Hotte-Bernard, J., Messier, C. & Plamondon, H. (2008). Food restriction attenuates ischemia-induced spatial learning and memory deficits despite extensive CA1 ischemic injury. *Behav Brain Res*, 187(1), 123-132.
- Ruan, Y.W., Sou, B., Fan, Y., Li, Y., Lin, N., Zeng, Y.S., Gao, T.M., Yao, Z. & Xu, C. (2006). Dendritic plasticity of CA1 neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*, 140, 191-201.
- Sayeed, I. & Stein, D.G. (2009). Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury. *Prog Brain Res*, 175, 219-237.
- Sayeed, I., Wali, B. & Stein, D.G. (2007). Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Restor Neurol Neurosci*, 25(2), 151-159.
- Schmidt-Kastner, R., Truettner, J., Lin, B., Zhao, W., Saul, J., Busto, R. & Ginsberg, M. (2001). Transient changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in the rat. *Mol Brain Res*, 92, 157-166.
- Silva, A.J., Giese, K.P., Fedrov, N.B., Frankland, P.W. & Kogan, J.H. (1998). Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol Learn Memory*, 70, 44-61.
- Skivo, G.G. & Nikonenko, A.G. (2010). Brain plasticity after ischemic episode. *Vitam Horm*, 82, 107-127.
- Spruston, N. & McBain, C. (2007). Structural and functional properties of hippocampal neurons. In: P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss & J. O'Keefe (eds.), *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, pp. 133-201.
- STAIR (1999). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, 30(12), 2752-2758.
- Stein, D.G. (2008). Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res Rev*, 57, 386-397.
- Velázquez-Zamora, D.A., González-Ramírez, M.M., Beas-Zárate, C. & González-Burgos, I. (2011). Egocentric working memory impairment and dendritic spine plastic changes in prefrontal neurons after NMDA receptor blockade in rats. *Brain Res*, (in press).
- Yu, H.J., Fei, J., Chen, X.S., Cai, Q.Y., Liu, H.L., Liu, G.D. & Yao, Z.X. (2010). Progesterone attenuates neurological behavioral deficits of experimental autoimmune encephalomyelitis through remyelination with nucleus-sublocalized Olig1 protein. *Neurosci Lett*, 476(1), 42-45.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R. & Amaral, D.G. (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(10), 2950-2967.

Copyright of Restorative Neurology & Neuroscience is the property of IOS Press and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.



Progesterone treatment in rats after severe global cerebral ischemia promotes hippocampal dentate gyrus neurogenesis and functional recovery

Pedro Montes, Rosa María Viguera-Villaseñor, Julio César Rojas-Castañeda, Tomas Monfil, Miguel Cervantes & Gabriela Morali

To cite this article: Pedro Montes, Rosa María Viguera-Villaseñor, Julio César Rojas-Castañeda, Tomas Monfil, Miguel Cervantes & Gabriela Morali (2019) Progesterone treatment in rats after severe global cerebral ischemia promotes hippocampal dentate gyrus neurogenesis and functional recovery, *Neurological Research*, 41:5, 429-436, DOI: [10.1080/01616412.2019.1576356](https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1576356)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1576356>



Published online: 14 Feb 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 28




View Crossmark data [↗](#)

ARTICLE



Progesterone treatment in rats after severe global cerebral ischemia promotes hippocampal dentate gyrus neurogenesis and functional recovery

Pedro Montes ^{a*}, Rosa María Viguera-Villaseñor ^b, Julio César Rojas-Castañeda ^b, Tomas Monfil ^a, Miguel Cervantes ^c and Gabriela Morali ^a

^aUnidad de Investigación Médica en Farmacología, CMN Siglo XXI, IMSS, México, México; ^bSubdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, México, México; ^cFacultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, UMSNH, Morelia, México

ABSTRACT

Objective: Rats treated with progesterone (P4) after ischemia show an adequate functional performance despite a significant loss of hippocampal pyramidal neurons, suggesting that P4 could favour a permissive microenvironment for cerebral plasticity mechanisms. The possibility of P4 treatment promoting the survival of newly generated hippocampal neurons, in relation to the performance of ischemic rats in a spatial learning task, was assessed in this study.

Methods: Adult male rats were subjected to a severe global cerebral ischemia episode (30 min) and treated with P4 or its vehicle at 15 min, 2, 6, 24, 48 and 72 h of reperfusion. From day 4 to 8 post-ischemia 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) was administered to label proliferating cells. Twenty-one days post-ischemia, the rats were exposed to the Morris water maze to assess behavioral parameters of spatial learning and memory. Subsequently, the brain was perfusion-fixed and immunofluorescence procedures were performed to quantify the number of new mature neurons (BrdU⁺/NeuN⁺) in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus.

Results: Rats subjected to severe global cerebral ischemia and treated with P4 had a significantly better performance in spatial learning-memory tests, than those treated with vehicle, and a significantly higher number of new mature neurons (BrdU⁺/NeuN⁺) in the DG.

Conclusion: These findings show that post-ischemia P4 treatment, following an episode of severe global cerebral ischemia, promotes the survival of newly generated hippocampal neurons in the DG, which may be one of the mechanisms of cerebral plasticity induced by the hormone, that underlie a successful functional performance in learning and memory tests.

ARTICLE HISTORY

Received 18 September 2018
Accepted 26 January 2019

KEYWORDS

Global cerebral ischemia; neurogenesis; progesterone; brain plasticity; functional recovery

Introduction

It is currently documented that neurogenesis occurs in the adult brain of mammals [1,2]. Neural progenitor cells that give rise to new neurons have been identified in specialized regions called ‘neurogenic niches’ in the subventricular zone (SVZ) and in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG) [1,2]. Neurogenesis is modulated by physiological stimuli such as physical exercise and learning processes [3,4], as well as pathophysiological conditions such as traumatic brain injury and cerebral ischemia [5,6].

Cerebral ischemia is known to induce pathophysiological mechanisms that may lead to the death of pyramidal neurons of the Cornu Ammonis (CA) and, under severe conditions, of granule neurons of the DG in the hippocampus [7,8]. This neuronal loss is associated with functional alterations; for instance, animals subjected to global ischemia show impairments of spatial learning and memory in the Morris water maze [9,10].

In addition to the mechanisms of neuronal damage, cerebral ischemia also activates plastic mechanisms such as neurogenesis, synaptogenesis, spinogenesis, and axonal sprouting [6,11,12], which favor reorganization of altered neuronal circuits. An increase of neurogenesis in the hippocampal DG has been observed both in models of focal [13] and transient global cerebral ischemia [14,15]. Stimulation of neurogenesis by global cerebral ischemia does not necessarily lead to a significant recovery of the altered functions [16]. Therefore, it is crucial the search for therapeutic agents that may prevent neuronal death and/or favor the plastic recovery mechanisms, after an episode of global ischemia. In this regard, it has been experimentally demonstrated that progesterone (P4) exerts neuroprotective effects improving functional recovery in several models of brain injury [17–20], including focal [21,22] and global ischemia [23,24]. Besides its neuroprotective effects [24–26], P4 promotes plastic phenomena able to preserve the

CONTACT Gabriela Morali  gmorali@hotmail.com  Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Mexico City 06720, Mexico

*Present address: Laboratorio de Neurotoxicología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía ‘Manuel Velasco Suárez’, SS, México, DF, México

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

cytoarchitecture of pyramidal CA1 neurons and to stimulate spinogenesis [27], as well as reducing the Nogo-A neurite growth inhibitory signaling pathway [28], all these responses possibly contributing to functional recovery after ischemia.

On the other hand, P4 increases the survival of newborn neurons in the hippocampal DG, despite suppressing proliferation of progenitor cells, after focal cerebral ischemia [29]. This neurogenesis regulated by P4 is associated with better functional performance [29,30]. Progesterone also increases neurogenesis in the SVZ after ischemic stroke, related to improving of neurological functions [31]. However, in a study conducted with a similar model of focal ischemia, P4 did not promote neurogenesis either in the hippocampal DG or in the SVZ [32]. In sum, neurogenesis promoted by P4 as a restorative plastic mechanism after focal (stroke-related) ischemia, is still controversial; furthermore, this possibility after global (cardiac arrest-related) ischemia has not been analyzed. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of P4 on hippocampal DG neurogenesis in relation to the performance on a task of spatial learning, in rats subjected to severe global cerebral ischemia.

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 P4 (20% 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin in sterile water, 0.5 ml, i.v.; Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA); and (3) Isch + P4, animals subjected to 4-VO and receiving P4 (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 72 h. For administration of P4 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 30 min by a 4-VO model [33] routinely used in our laboratory [24–28]. Only rats ($n = 27$) remaining unconscious, with complete loss of the righting reflex during ischemia and for 30–60 min afterwards, as a neurological sign of having suffered a severe ischemia [33], were included in

the study. All rats in the sham group ($n = 9$) survived. Mortality rates in ischemic Ss, mainly due to respiratory arrest or to post-ischemic seizures, were 5/13 in the Isch + Veh group, and 4/14 in the Isch + P4 group. Thus, groups of 9, 8 and 10 rats surviving in each experimental group were subjected to the different procedures as described below.

To label proliferative cells, the thymidine analog 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; 100 mg/Kg, i.p.; Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA) was administered to rats of the three experimental groups, twice daily for 5 consecutive days during days 4 to 8 after global ischemia or sham procedures.

Spatial learning and memory tests were performed starting at 21 d of reperfusion or sham procedures, by using the Morris water maze test [34], as previously described [25,28]. Rats were required to find a hidden platform using environmental spatial clues which were maintained constant throughout testing, within 60 s (escape latency) and allowed to stay on the platform for 15 s to learn its location; otherwise, the rat was guided to it by the experimenter and a score of 60 s was assigned as escape latency. Each rat performed two escape trials with a 20 min interval, in each of 6 d of testing, starting (facing the wall) from one of four points into the water maze, that varied every day. The escape latencies of both trials for each rat, in each daily session, were averaged, and 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 s) to assess their spatial memory, in which the platform was removed. The number of crossings over the former platform location was recorded. Mean values were calculated for each experimental group.

After learning and memory tests (28 d after ischemia), animals were deeply anesthetized and perfused with phosphate buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS to obtain the brain and assess neurogenesis in the hippocampal DG. Brain slices (3 mm thick) containing the dorsal hippocampus, corresponding to coronal coordinates from bregma -3.14 to -4.52 mm [35], were processed for paraffin embedding and coronal sections (10 μ m) were slide-mounted and double-immunostained for the neuron-specific nuclear protein (NeuN) and BrdU. To retrieve antigens, sections were boiled in a microwave oven in 10 mMol/L citrate buffer for 30 min. After blocking, sections were incubated overnight with sheep anti-BrdU antibody (1:200; Abcam) at 4 °C and then incubated for 2 h with FITCC-conjugated donkey anti-sheep IgG antibody (1:300; Millipore) at room temperature. Sections were incubated overnight with mouse anti-NeuN antibody (1:100; Millipore) at 4 °C and then for 2 h with Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:200; Millipore) at room temperature. Samples were then dried, slip-covered, and kept in darkness to prevent fluorescence fading.

Fluorescence was detected using a Zeiss LSM 510 confocal microscope equipped with argon-helium/neon laser. Brdu-NeuN positive (Brdu⁺/NeuN⁺) cells in five microscopy fields at 400x along the hippocampal DG were counted in a blind manner in five coronal sections per animal (10 μ m thick) spaced 100 μ m apart. A cumulative number of Brdu⁺/NeuN⁺ cells counted in the right and left hippocampal DG in the five sections of each animal (50 fields per animal), was obtained to provide a single individual value. Mean numbers of newly formed neurons were calculated for each experimental group.

Additional 10 μ m thick coronal sections were stained with cresyl violet and analyzed for CA1 pyramidal neuron counts at 400x, in a blind manner, under light microscopy (Leica DM750). Cell counts from the right and left hippocampus in three CA1 microscopy fields on at least two sections were averaged to provide a single value for each animal. Mean values were calculated for each experimental group. Only pyramidal neurons having the cytoplasm and nucleus with clear content and visible nucleoli were counted.

Parameters of performance in the Morris water maze were analyzed as follows: Group differences in escape latencies over the 6-d testing period were analyzed by repeated-measures ANOVA. Daily averages of this parameter were analyzed by ANOVA followed by the 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. Numbers of remaining pyramidal neurons in CA1 and numbers of Brdu⁺/NeuN⁺ cells in the DG were compared among groups by ANOVA followed by Tukey tests, and by non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U tests, respectively. A *p* < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Escape latencies of the Sham group showed a progressive reduction over the successive days of testing ($F_{(5, 4)} = 33.272$, *p* < 0.01; Figure 1), with its values being significantly lower from the second to the sixth day (*p* < 0.001) than those on the first day. Isch + Veh rats also showed a moderate reduction of their escape latencies along testing ($F_{(5, 3)} = 11.896$, *p* < 0.05), being significantly lower on days 3 and 4 (*p* < 0.05), as well as 5 and 6 (*p* < 0.001), as compared to the first day. On the other hand, rats in the Isch + P4 group showed a reduction of the escape latencies in the successive days of testing ($F_{(5, 5)} = 80.620$, *p* < 0.001), similar to the Sham group, with values significantly lower on days 3 (*p* < 0.01) and 4 to 6 (*p* < 0.001), as compared to the first day (Figure 1). Escape latencies

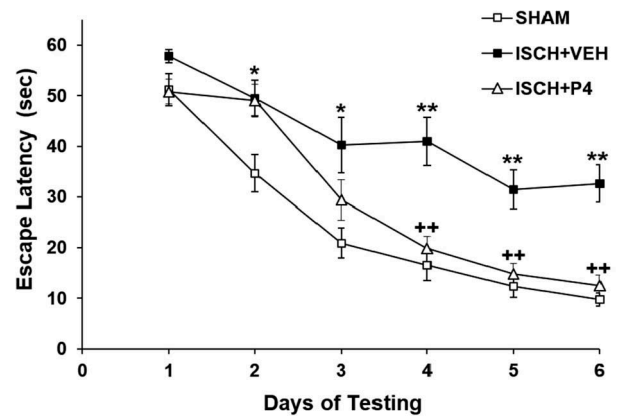


Figure 1. Performance of spatial learning (Escape latencies, Mean \pm SEM) by rats of the three experimental groups on the successive days of testing in the Morris water maze.

Global cerebral ischemia impaired the spatial learning, as evidenced by longer escape latencies in the vehicle-treated (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 + P4 group, similar to those of the SHAM and shorter than those of the ISCH + VEH group. * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01 ISCH + VEH vs. SHAM. ++ *p* < 0.01 ISCH + P4 vs. ISCH + VEH. ANOVA followed by Tukey tests.

differed among the three groups in the various days of testing: day 2 ($F_{(2, 24)} = 5.771$, *p* < 0.01), day 3 ($F_{(2, 24)} = 5.088$, *p* < 0.05), day 4 ($F_{(2, 24)} = 14.253$, *p* < 0.001), day 5 ($F_{(2, 24)} = 14.241$, *p* < 0.001), and day 6 ($F_{(2, 24)} = 25.195$, *p* < 0.001). Escape latencies of the Isch + Veh group were significantly longer on days 2 and 3 (*p* < 0.05) and 4 to 6 (*p* < 0.01) than those of the Sham group (Figure 1). Values of the Isch + P4 group were similarly low as those of the Sham group from day 3 to 6, being significantly higher than this group only at day 2 (*p* < 0.05). Escape latencies of the Isch + P4 group were significantly shorter than those in the Isch + Veh group on days 4 to 6 (*p* < 0.01).

A persistent search for the platform through the target quadrant during the probe trial was displayed by rats in the Sham group. Those in the Isch + Veh group showed a random swimming pattern through the four quadrants of the maze. Rats in the Isch + P4 group also showed a persistent search for the platform in the target quadrant, similar to the Sham group. As a consequence, the number of crossings over the former platform location differed among groups ($F_{(2, 24)} = 7.085$, *p* < 0.01): it was lower in the Isch + Veh group (Mean \pm SEM: 2.8 ± 0.6 , *p* < 0.01) than in the Sham group (5.3 ± 0.5), while rats in the Isch + P4 group had a number of crossings (4.9 ± 0.5) similar to the Sham group, and significantly higher (*p* < 0.05) than the Isch + Veh group.

Hippocampal neuronal damage resulting from 30 min global ischemia was severe both in Veh- and in P4-treated rats as compared to the Sham group, with an extensive, significant loss of pyramidal neurons particularly in CA1 ($F_{(2, 24)} = 212.296$, *p* < 0.001). An average of 4.4 ± 2.1 and 6.0 ± 2.6 (Mean \pm SEM) of remaining neurons per field were counted in the Isch + Veh and Isch + P4 groups (Nissl-stained

slices), differing from the Sham group ($p < 0.001$) and corresponding to a 7.3% and a 10.1% of neurons counted in that group, respectively (Figure 2). Pyramidal neuron losses in CA3, hilus, and the DG were found in **some** samples of ischemic Veh- and P4-treated groups: 6 out of 18, and 3 out of 19, respectively (Figure 2).

Cumulative counting of Brdu⁺/NeuN⁺ double-labeled cells in the DG revealed the presence of newly formed neurons in the three experimental groups but with differences among them ($\chi^2_{(2)} = 11.173$, $p < 0.01$) (Figure 3). Rats in the Isch + Veh group showed a significant reduction ($p < 0.01$) in the number of newly formed neurons in the DG (Md = 17.5), as compared to the Sham group (Md = 50). Rats subjected to global cerebral ischemia and receiving P4 treatment showed a significantly ($p < 0.05$) higher number of Brdu⁺/NeuN⁺ cells in the DG (Md = 32) than the Isch + Veh group (Figure 3(b)).

Discussion

Findings of the present study showed that post-ischemic treatment with P4 favored the presence of mature newborn neurons in the DG of rats subjected to a severe (30 min) global cerebral ischemia. In addition, treatment with P4 preserved their cognitive functions, since these rats had a successful

performance in spatial learning-memory tests, 21--27 days after ischemia, as compared to ischemic rats treated with vehicle. However, performance of rats treated with P4 was not associated with a neuroprotective effect of this hormone preventing neuronal death, since both groups subjected to ischemia had a very severe and similar loss of pyramidal neurons in CA1, regardless of the treatment.

The efficiency in cognitive performance of P4-treated ischemic rats similar to that of subjects submitted to sham maneuvers, despite a scarce preservation of hippocampal pyramidal neurons, is consistent with some of our previous studies in which rats were subjected to a less severe ischemia episode (20 min) causing a selective loss of CA1 pyramidal neurons [25,28], though with a lower magnitude than in the present study. In those previous studies, evaluations of spatial learning and memory, as well as reference and working memory, were done either at a short- (14 days) or long-term period (90 days) after ischemia, and treatment with P4 or allopregnanolone (ALLO) was shown to significantly improve these functions even with a severe loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons (P4: 19.9 % and ALLO: 25.5 % remaining neurons, as compared to Sham). Plastic changes of the small number of remaining neurons in the CA1 subfield in P4-treated ischemic rats, including a higher dendritic spine density and a higher proportion of mushroom-type dendritic

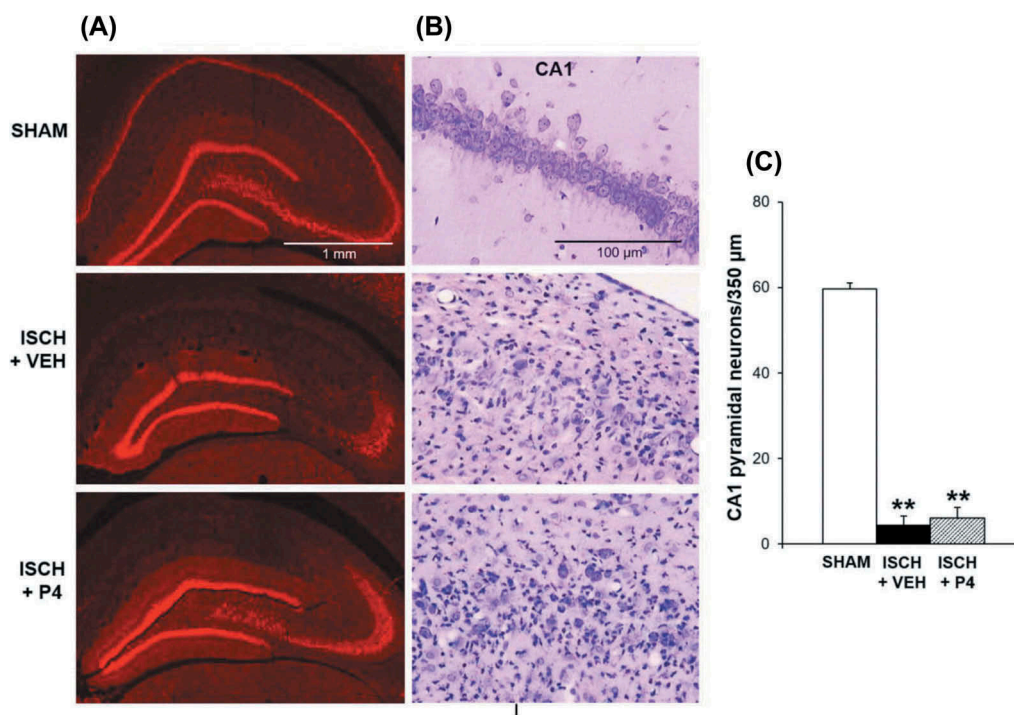


Figure 2. Loss of pyramidal neurons of the Ammon's horn by severe global ischemia.

Representative images showing NeuN⁺ cells (low magnification, A) and Nissl-stained cells in the CA1 subfield (higher magnification, B) in coronal sections of the hippocampus of rats submitted either to sham procedures (SHAM), or to global cerebral ischemia and treatment with vehicle (ISCH + VEH) or progesterone (ISCH + P4). Note the severe loss of CA1 pyramidal neurons **both** in ischemic Veh- and P4-treated rats, and in other hippocampal subfields of the ISCH + VEH group. Numerical data from Nissl-stained sections (Mean ± SEM) are shown in C. ** $p < 0.001$ vs SHAM. ANOVA followed by Tukey tests.

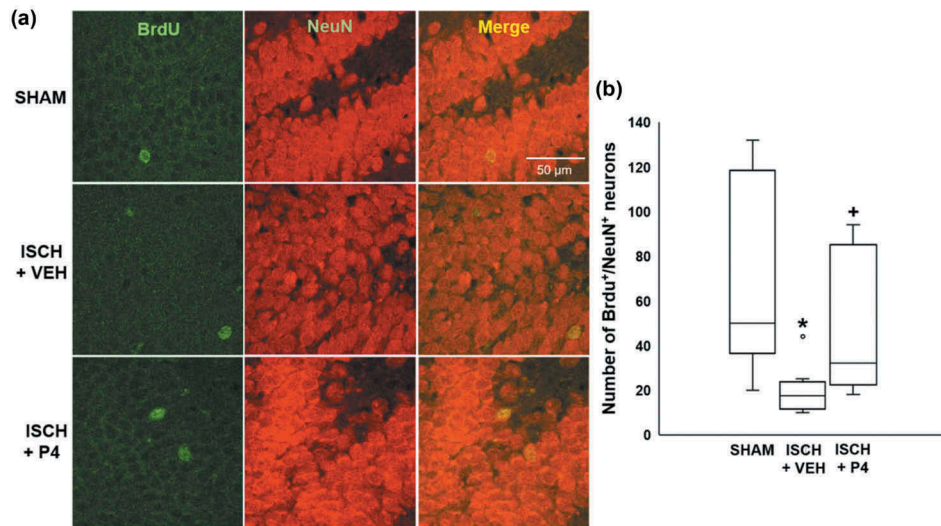


Figure 3. Neurogenesis in the DG of rats of the three experimental groups.

Representative images (a) showing BrdU⁺, NeuN⁺, and BrdU⁺/NeuN⁺ cells (Merge, newly formed neurons) in the hippocampal DG of rats submitted either to sham procedures (SHAM), or to global cerebral ischemia and treatment with vehicle (ISCH + VEH) or progesterone (ISCH + P4). Numerical data (cumulative number in 50 microscopy fields per animal) of each experimental group (Median and interquartile ranges) are shown in (b): A higher number of BrdU⁺/NeuN⁺ cells was counted in P4-treated than in Veh-treated ischemic rats. * $p < 0.01$ ISCH + VEH vs. SHAM. + $p < 0.05$ ISCH + P4 vs. ISCH + VEH. Kruskal-Wallis ANOVA followed by Mann-Whitney U tests.

spines, than those observed in intact rats, were found to occur and were proposed to explain the long-term cognitive preservation shown by these rats [27]. In fact, various mechanisms of brain plasticity are known to be activated in response to an episode of ischemia, including synaptic plasticity and neurogenesis [6,11,12]. Synaptic plasticity mainly involves sprouting of new axons, and increased formation of dendrites and spines in remaining mature neurons, leading to increased connectivity [11,36,37].

Treatment with P4, administered in the present study for a period of 72 hours after ischemia, could have favored during this time a permissive microenvironment for the development of the cerebral plasticity mechanisms, as can be induced by other conditions [38,39], which resulted in an adequate cognitive performance 21 days after ischemia. In this sense, we have also shown that post-ischemic administration of P4 decreases the expression of the neurite growth inhibitor Nogo-A, its receptor Ng-R, and its effector Rho-A in the CA1 subfield in the hippocampus [28]. Progesterone is also known to increase the growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin after global ischemia, which indicate synaptogenesis and neuronal sprouting in the hippocampal CA1 region [40]. In addition, P4 has also been reported to modify brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels after ischemia through the activation of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway. Since these trophic factors have important functional implications in post-ischemia recovery by regulating neurogenesis, neuronal survival and plasticity, as well as brain's vascular remodeling, these results were interpreted as contributing to the P4

neuroprotective effects [31,41]. Progesterone, besides increasing BDNF expression, has also been shown to shift the microglia phenotype, from pro-inflammatory to anti-inflammatory, to reduce pro-inflammatory cytokine expression, and increase anti-inflammatory cytokine in the ischemic hippocampus [42,43].

On the other hand, neurogenesis has been proposed to be a neural mechanism accounting for brain plasticity and functional preservation as long as newly formed neurons may incorporate both structurally and functionally into the neuronal networks of specific brain structures [44,45]. Our results demonstrate that P4 treatment allowed the survival of ischemia-induced new cells that were incorporated into the DG, since a higher number of mature granular neurons (BrdU⁺/NeuN⁺) were found at 28 days post-ischemia in the DG of ischemic P4-treated animals, than in the ischemic vehicle-treated rats. Thus, actions of P4 maintained during 72 hours after ischemia seem had coincided with starting of the cellular processes leading to neurogenesis. Other studies have reported that P4, given during a similarly short (two- or three-day) period, promotes the survival of newborn neurons in the DG both in intact adult mice [30], and in DG and SVZ of mice and rats subjected to focal cerebral ischemia [29,31]. Furthermore, P4 treatment was shown to normalize the levels of neurogenesis in the hippocampal DG after traumatic injury [46], thus, P4 treatment of rats under traumatic injury resulted in a similar number of newly formed neurons as those of intact rats.

Progesterone has been shown to induce the survival of hippocampal newly generated neurons through binding with its nuclear and membrane

bound P4 receptors, the last one activating the Src-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Src-ERK1/2) and PI-3K/Akt signaling pathways [29,30]. Subsequently, these mechanisms could be involved in the increase of the expression of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 [47,48], and decrease of the expression of pro-apoptotic molecules such as Bax, Bad and caspase-3 [41,49] by P4. In accordance with these data, we have previously shown that P4 treatment decreases the caspase-3 levels and activation, as well as DNA fragmentation in the hippocampus of rats subjected to global cerebral ischemia [26].

There is evidence that new mature granular neurons are integrated into the trisynaptic hippocampal circuit, since their dendritic spines receive afferents and establish synapses with the perforant path, and their axons are projected to the CA3 subfield, suggesting that they are functional [44,45]. Furthermore, neurogenesis of hippocampal DG has been shown to be associated with the execution of spatial learning tasks of rodents [39,50,51], in conjunction with the hippocampal CA1 region which has been widely related to the spatial learning and memory [50,52]. Cognitive performance of ischemic P4-treated rats having a scant CA1 hippocampal neuronal preservation may represent the result of a cooperative interaction of several mechanisms of plasticity promoted in different neuronal substrates, including the DG, by this neuroactive steroid [27–30,53].

On the other hand, as a result of the mechanisms of plasticity, ischemic P4-treated rats may have adopted alternative strategies to cope with the spatial learning task, in which other cerebral structures such as the striatum are involved in addition to the hippocampus [54].

Conclusion

The results show that post-ischemia P4 treatment, following an episode of severe global cerebral ischemia, promotes neurogenesis in hippocampal DG, which could be one of the mechanisms of brain plasticity favored by P4, underlying cognitive preservation.

Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the requirements for the Ph. D. of Pedro Montes del Carmen at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Pedro Montes was recipient of fellowships from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) [99091245] and CONACYT [172697], MEXICO. The authors thank Dr. Jorge Antonio Sosa-Melgarejo for his

advice in laser confocal microscopy procedures, and Mr. Pedro Granados for his skillful technical assistance.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) [2005/1/I/042]. Pedro Montes was recipient of fellowships from the IMSS [99091245] and CONACYT [172697].

Notes on contributors

Pedro Montes is a researcher interested in elucidating the mechanisms of cerebral plasticity that underlie functional recovery after ischemia and treatment with steroid hormones.

Rosa María Viguera-Villaseñor is the head researcher in her laboratory. Her studies on factors affecting reproductive tissues and the brain include molecular, histological, and immunohistochemical approaches.

Julio César Rojas-Castañeda, researcher. His studies on factors affecting circadian rhythmicity include molecular, histological, and immunohistochemical procedures in brain tissue.


Tomas Monfil is currently a PhD student. For his previous degrees, he participated in projects on the neuroprotective effects of progesterone on global cerebral ischemia.

Miguel Cervantes is the head researcher in his laboratory and has extensive experience in neuroprotection studies. His studies focus on the search for neuroprotective agents of endogenous nature against neurological disorders such as cerebral ischemia.

Gabriela Morali is chief researcher with extensive experience in neuroprotection studies. She has focused mainly on the analysis of the neuroprotective effects of progesterone on global cerebral ischemia, as well as the associated mechanisms of cerebral plasticity.

ORCID

Pedro Montes  <http://orcid.org/0000-0003-1630-5047>

Rosa María Viguera-Villaseñor  <http://orcid.org/0000-0003-0187-1994>

Julio César Rojas-Castañeda  <http://orcid.org/0000-0002-7988-2231>

Tomas Monfil  <http://orcid.org/0000-0002-2726-6509>

Miguel Cervantes  <http://orcid.org/0000-0002-0509-3977>

Gabriela Morali  <http://orcid.org/0000-0002-7504-9365>

References

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287(5457):1433–1438.
- [2] Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*. 2005;85(2):523–569.

- [3] Ma CL, Ma XT, Wang JJ, et al. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. *Behav Brain Res.* 2017;317:332–339.
- [4] Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell.* 2016;167(4):897–914.
- [5] Sun D. Endogenous neurogenic cell response in the mature mammalian brain following traumatic injury. *Exp Neurol.* 2016;275(Pt3):405–410.
- [6] Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol.* 2003;13(1):127–132.
- [7] Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1431–1568.
- [8] Aydın K, Cokluk C, Ayas B, et al. Hippocampal cell loss after an anterior and posterior anastomotic vein occlusion model in rats. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(7):717–722.
- [9] Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol.* 1999;58(3):279–295.
- [10] Neumann JT, Cohan CH, Dave KR, et al. Global cerebral ischemia: synaptic and cognitive dysfunction. *Curr Drug Targets.* 2013;14(1):20–35.
- [11] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behavior. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(12):861–872.
- [12] Lindvall O, Kokaia Z. Neurogenesis following stroke affecting the adult brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(11):a019034.
- [13] Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(8):4710–4715.
- [14] Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, et al. Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(5):548–555.
- [15] Kato T, Eriguchi T, Fujiwara N, et al. Effects of enriched environment on hippocampal neuronal cell death and neurogenesis in rat global ischemia. *Adv Exp Med Biol.* 2014;812:203–208.
- [16] Sadelli K, Stamegna JC, Girard SD, et al. Global cerebral ischemia in rats leads to amnesia due to selective neuronal death followed by astroglial scar formation in the CA1 layer. *Neurobiol Learn Mem.* 2017;141:168–178.
- [17] Guennoun R, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, et al. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;146:48–61.
- [18] Frye CA, Walf A. Progesterone, administered before kainic acid, prevents decrements in cognitive performance in the Morris water maze. *Dev Neurobiol.* 2011;71(2):142–152.
- [19] Si D, Wang H, Wang Q, et al. Progesterone treatment improves cognitive outcome following experimental traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett.* 2013;553:18–23.
- [20] Lei B, Wang H, Jeong S, et al. Progesterone improves neurobehavioral outcome in models of intracerebral hemorrhage. *Neuroendocrinology.* 2016;103(6):665–677.
- [21] Gibson CL, Murphy SP. Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(7):805–813.
- [22] Tanaka M, Ogaeri T, Samsonov M, et al. Progesterone improves functional outcomes after transient focal cerebral ischemia in both aged male and female rats. *Exp Gerontol.* 2018;113:29–35.
- [23] González-Vidal MD, Cervera-Gaviria M, Ruelas R, et al. Progesterone: protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res.* 1998;29(2):117–124.
- [24] Morali G, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, et al. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neurosci Lett.* 2005;382(3):286–290.
- [25] Morali G, Montes P, Hernández-Morales L, et al. Neuroprotective effects of progesterone and allopregnanolone on long-term cognitive outcome after global cerebral ischemia. *Restor Neurol Neurosci.* 2011;29(1):1–15.
- [26] Espinosa-García C, Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, et al. Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2013;550:98–103.
- [27] Morali G, Montes P, González-Burgos I, et al. 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.
- [28] Espinosa-García C, Aguilar-Hernández A, Cervantes M, et al. Effects of progesterone on neurite growth inhibitors in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Brain Res.* 2014;1545:23–34.
- [29] Zhang Z, Yang R, Cai W, et al. Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice. *Neuropharmacology.* 2010;58(6):930–939.
- [30] Zhang Z, Yang R, Zhou R, et al. Progesterone promotes the survival of newborn neurons in the dentate gyrus of adult male mice. *Hippocampus.* 2010;20(3):402–412.
- [31] Jiang C, Zuo F, Wang Y, et al. Progesterone changes VEGF and BDNF expression and promotes neurogenesis after ischemic stroke. *Mol Neurobiol.* 2017;54(1):571–581.
- [32] Lee RJ, Kim JK, Chao D, et al. Progesterone and allopregnanolone improves stroke outcome in male mice via distinct mechanisms but neither promotes neurogenesis. *J Neurochem.* 2015;132(1):32–37.
- [33] Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982;11(5):491–498.
- [34] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11(1):47–60.
- [35] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego (SD): Academic Press; 1986.
- [36] Cheatwood JL, Emerick AJ, Kartje GL. Neuronal plasticity and functional recovery after ischemic stroke. *Top Stroke Rehabil.* 2008;15(1):42–50.
- [37] Sandvig I, Augestad IL, Håberg AK, et al. Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks. *Eur J Neurosci.* 2018;47(12):1414–1428.
- [38] Foscari S, Rossi F, Carulli D. Influence of the environment on adult CNS plasticity and repair. *Cell Tissue Res.* 2012;349(1):161–167.

- [39] Lieberwirth C, Pan Y, Liu Y, et al. Hippocampal adult neurogenesis: its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Res.* 2016;1644:127–140.
- [40] Zhao Y, Wang J, Liu C, et al. Progesterone influences postischemic synaptogenesis in the CA1 region of the hippocampus in rats. *Synapse.* 2011;65(9):880–891.
- [41] Ishrat T, Sayeed I, Atif F, et al. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience.* 2012;210:442–450.
- [42] Perez-Alvarez MJ, Wandosell F. Stroke and neuroinflammation: role of sexual hormones. *Curr Pharm Des.* 2016;22(10):1334–1349.
- [43] Espinosa-Garcia C, Sayeed I, Yousuf S, et al. Stress primes microglial polarization after global ischemia: therapeutic potential of progesterone. *Brain Behav Immun.* 2017;66:177–192.
- [44] Toni N, Laplagne DA, Zhao C, et al. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci.* 2008;11(8):901–907.
- [45] Toni N, Schinder AF. Maturation and functional integration of new granule cells into the adult hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;8(1):a018903.
- [46] Barha CK, Ishrat T, Epp JR, et al. 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.
- [47] Yao XL, Liu J, Lee E, et al. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2005;22(6):656–668.
- [48] Li X, Zhang J, Zhu X, et al. Progesterone reduces inflammation and apoptosis in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage through the PI3K/Akt pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(5):8197–8203.
- [49] 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):349–359.
- [50] Ohline SM, Abraham WC. Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology.* 2019;145(Pt A):3–12.
- [51] Marín-Burgin A, Schinder AF. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav Brain Res.* 2012;227(2):391–399.
- [52] Okada T, Yamada N, Tsuzuki K, et al. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *Eur J Neurosci.* 2003;17(2):341–349.
- [53] Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Piña-Medina AG, et al. Hormones regulate cytoskeletal proteins involved in brain plasticity. *Front Psychiatry.* 2015;6:165.
- [54] Devan BD, Goad EH, Petri HL. Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem.* 1996;66(3):305–323.