



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA SOBRE
ALGUNOS INDICADORES TARDÍOS DE DAÑO NEURONAL EN RATAS
SOMETIDAS A ISQUEMIA

T E S I S

Que para obtener el grado académico de Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A
BE Claudia Espinosa García

COMITÉ TUTORAL:
Dra. Gabriela Morali de la Brena
Dra. Marcela Arteaga Silva
Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

México D.F., a 9 de Diciembre del 2009

Comité Tutorial:

Dra. Gabriela Morali de la Brena. CODIRECTORA EXTERNA, Investigadora Titular B Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades. CMN Siglo XXI, IMSS.

Dra. Marcela Arteaga Silva CODIRECTORA INTERNA, Profesor Titular C, Tiempo Completo. Depto. Biología de la Reproducción. División CBS, UAM-Iztapalapa.

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, ASESORA, Investigadora en Ciencias Médicas D. Laboratorio de Histomorfología. Instituto Nacional de Pediatría, SSA.

Este trabajo fue realizado en:

- La Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.
- El Servicio de Cirugía Experimental y Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.
- El Laboratorio de Histomorfología del Instituto Nacional de Pediatría, SSA.
- El Laboratorio de Biología Conductual y Reproductiva de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACyT con número de registro UAMI 309-0 y con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de mis estudios de Maestría se me otorgaron becas por parte de:

1. CONACyT, con número de registro 229241.
2. Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, con número de registro 99093776.
3. COMECYT, con número de registro 09BTM0207.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA SOBRE ALGUNOS INDICADORES TARDÍOS DE DAÑO NEURONAL EN RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA”, con fecha de examen el 9 de diciembre del 2009.

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Ana Elena Lemus Bravo

PRESIDENTE

Profesora Titular C. Departamento de
Biología de la Reproducción, División
CBS, UAM-Iztapalapa

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

SECRETARIO

Investigadora en Ciencias Médicas D
Laboratorio de Histomorfología
Instituto Nacional de Pediatría, SSA

Dra. Mina Königsberg Fainstein

VOCAL

Profesora Titular C. Departamento de
Ciencias de la Salud, División CBS,
UAM-Iztapalapa

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro

VOCAL

Profesor-Investigador Tiempo Completo.
Fac. de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”, Universidad
Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

De inicio, me gustaría agradecer a mi maestra la Dra. Gabriela Morali de Brena, por creer en mí, guiarme, apoyarme y por brindarme todos sus conocimientos a manos llenas, ¡Por eso y más gracias!

Le agradezco enormemente también a la Dra. Marcela Arteaga Silva y a la Dra. Rosa María Villegas Villaseñor por su valiosa asesoría, su tiempo y los recursos invertidos en este trabajo; ¡Gracias por todo su esfuerzo e interés!

Mi gratitud al Dr. José Miguel Cervantes Alfaro por estar siempre al tanto de los avances y resultados de este trabajo, todas sus observaciones y comentarios fueron muy valiosos.

Por otro lado, no me puedo olvidar de aquellas personas que en todo momento tuvieron la paciencia necesaria para brindarme sus conocimientos técnico-prácticos, a los Histotecnólogos Juan de Dios Moreno Álvarez, Patricia Quintanar López, Pedro Medina Granados y a la Dra. Ma. Inés Pérez Ordoñez; de verdad los aprecio no sólo por eso, sino por haberse convertido además en mis amigos ¡Mil gracias!, espero haber sido una buena alumna.

Le agradezco enormemente a la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, al Servicio de Cirugía Experimental y Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, al Laboratorio de Histomorfología del Instituto Nacional de Pediatría y al Laboratorio de Biología Conductual y Reproductiva de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, donde realicé este trabajo, por todas las atenciones recibidas, ¡Gracias!

A mis compañeros y amigos, Ale y Tomás, gracias por el trabajo, el tiempo y la dedicación que ustedes han invertido en este proyecto, estos resultados también son suyos.

De una manera muy afectuosa quiero agradecerle a mi segunda casa, la UAM-I, y con ello me refiero a la institución y a la planta académica que me formó durante mis cursos. En particular, quisiera agradecer afectuosamente a la Coordinadora del Posgrado en Biología Experimental, la Dra. Mina Königsberg Fainstein quien siempre estuvo ahí cuando la necesité, por su orientación y atenciones ¡Muchas gracias!

Ahora en el ámbito personal, a mis padres, Momy y Dady, a mis hermanitas Fille y Peque; les agradezco el que ustedes me animen a seguir por este camino, son una gran inspiración. Gracias por ser mi familia, ¡Los amo!

A mi amor, Mono, gracias por caminar todos los días a mi lado, gracias por tu compañía y tu apoyo; perdón por el tiempo invertido, pero los frutos bien valen la pena, ¿verdad? Gracias porque además de ser mi pareja y amigo, eres un gran fan. ¡Te amo!

A mis amigas del alma, malditonas, Haydesona, Hildona, Pau y Alo; ojalá que siempre estemos juntas pues somos un gran equipo, no sólo en la escuela sino también en la vida. ¡Las quiero mucho!

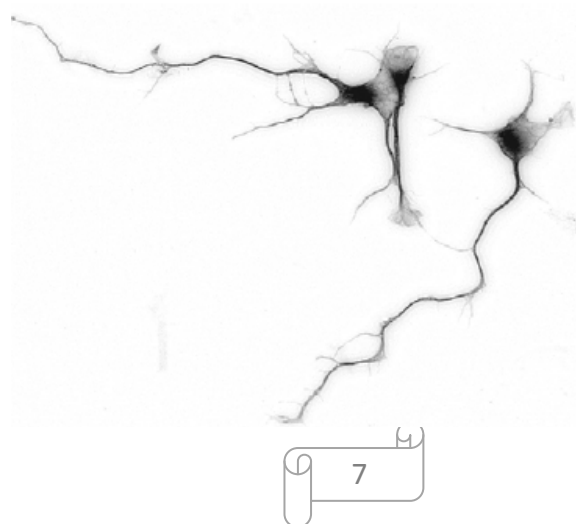
ÍNDICE

RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	11
Isquemia Cerebral	11
Modelos animales de isquemia cerebral	11
Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	14
Isquemia cerebral global aguda	15
Vulnerabilidad selectiva	16
El hipocampo	17
Daño isquémico en CA1	18
Muerte celular en la isquemia cerebral	18
Marcadores tardíos de daño neuronal	20
Caspasas	21
Caspasa-3	22
Fragmentación del DNA.....	25
Estrategias de neuroprotección.....	26
Progesterona.....	26
Efectos neuroprotectores de P ₄	27
P ₄ en isquemia cerebral.....	28
Mecanismos celulares de acción de P ₄	28
II. ANTECEDENTES	32
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. OBJETIVOS	35
V. HIPÓTESIS	36
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	37
Diseño experimental.....	37
Procedimientos experimentales	39
Modelo de Isquemia Cerebral Global Aguda	39
Obtención y preparación del tejido cerebral.....	40
Técnica de Nissl.....	41
Técnica Inmunohistoquímica	42
Detección de caspasa-3 total	42
Detección de caspasa-3 activa	43
Técnica de TUNEL.....	43

Control positivo para Inmunohistoquímica y TUNEL.....	44
Evaluación de los parámetros.....	45
Análisis estadístico.....	45
VII. RESULTADOS.....	46
1. Evaluación de la población neuronal.....	46
2. Evaluación inmunohistoquímica de la caspasa-3 total.....	52
i. Validación de la técnica inmunohistoquímica.....	52
ii. Efecto de la isquemia sobre la caspasa-3 total.....	52
iii. Efecto de P ₄ sobre la caspasa-3 total.....	53
3. Evaluación inmunohistoquímica de la caspasa-3 activa.....	53
i. Validación de la técnica inmunohistoquímica.....	53
ii. Efecto de la isquemia sobre la caspasa-3 activa.....	54
iii. Efecto de P ₄ sobre la caspasa-3 activa.....	55
4. Evaluación de la fragmentación del DNA.....	59
i. Validación de la técnica de TUNEL.....	59
ii. Efecto de la isquemia sobre la fragmentación del DNA.....	59
iii. Efecto de P ₄ sobre la fragmentación del DNA.....	60
VIII. DISCUSIÓN.....	62
IX. CONCLUSIONES.....	69
X. PERSPECTIVAS.....	70
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
XII. ANEXO.....	88

ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CAD	DNAsa activada por caspasas
Casp-3	Caspasa-3
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Glu	Glutamato
3β-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
iCAD	Inhibidor de la DNAsa activada por caspasas
ICF	Isquemia cerebral focal
ICG	Isquemia cerebral global
ICGA	Isquemia cerebral global aguda
IR	Inmunorreactividad
NMDA	N-metil-D-aspartato
P₄	Progesterona
P450 scc	Citocromo P450
PARP	Poli-ADP-ribosa polimerasa
PLA2	Fosfolipasa A2
PPTM	Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial
PR	Receptor de progesterona
Pro-Casp-3	Procaspasa-3
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TBI	Daño traumático al cerebro
THP	3 α , 5 α -tetrahidroprogesterona
4-VO	Oclusión de los 4 vasos



RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La reducción del suministro de oxígeno y glucosa al cerebro hasta concentraciones inferiores al 10% de lo normal, como ocurre durante la isquemia cerebral global aguda (ICGA) asociada a un paro cardíaco o a hipotensión severa, provoca daño en estructuras cerebrales específicas, que se manifiesta principalmente por la muerte de neuronas consideradas como muy vulnerables, entre las que se encuentran las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral, las células de Purkinje del cerebelo y las neuronas espinosas del núcleo caudado, con la consecuente alteración de las funciones cognoscitivas que son integradas en estas zonas. Cuando una célula es expuesta a un estímulo de daño, dependiendo de su severidad, se pueden activar diversos fenómenos que llevan a un daño reversible, o bien a daño irreversible y muerte. En la secuencia de los fenómenos de daño hay indicadores tempranos que no definen aún el destino de las células y otros fenómenos tardíos relacionados con el curso definitivo del daño neuronal. En particular, la activación de la caspasa-3 (Casp-3) y la fragmentación internucleosomal del DNA en neuronas del área CA1 del hipocampo, se han interpretado como indicadores tardíos de daño producido por isquemia. La reducción de estos indicadores mediante la administración previa o inmediata al periodo de isquemia, de fármacos neuroprotectores, que disminuyen o contrarrestan uno o varios de los mecanismos fisiopatológicos desencadenados por esta condición, es un parámetro de la eficacia y del mecanismo celular de acción de estos fármacos. Entre los diversos agentes neuroprotectores que reducen la magnitud del daño por isquemia cerebral global se encuentra la progesterona (P_4), la cual tiene varios mecanismos celulares de acción: incremento de la actividad GABAérgica inhibitoria, acciones antioxidantes, propiedades anti-edema, disminución de la liberación de citocinas proinflamatorias y acciones anti-apoptóticas. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que P_4 administrada en el período inmediato post-isquemia (15 min), preserva las características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales del hipocampo, incluyendo sus arborizaciones y la densidad de espinas dendríticas y reduce las alteraciones de indicadores

funcionales de la integridad del hipocampo. Sin embargo, no se conoce si los efectos de P₄ están mediados, al menos en parte, por la reducción de la activación de la Casp-3 y de la fragmentación del DNA, tal y como ha sido descrito en otros modelos de daño, como daño traumático al cerebro e isquemia *in vitro*. **OBJETIVOS:** Evaluar el efecto de la administración de progesterona sobre la activación de la Casp-3 y la fragmentación del DNA como indicadores tardíos de daño neuronal, en las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 y el *hilus* del giro dentado del cuerno de Ammón del hipocampo de ratas, después de un episodio de ICGA. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se utilizaron 3 grupos de ratas macho *Sprague Dawley* adultas: el primero fue sometido a las maniobras simuladas (sham) del modelo de ICGA y los otros dos fueron sometidos a ICGA por el “modelo de oclusión de los cuatro vasos”: uno de estos dos fue tratado con el vehículo (β -ciclodextrina al 20% en agua inyectable, 0.5 mL, iv) y el otro con P4 (8 mg/kg, iv), a los 15 min y a las 2, 6, 22, 46 y 70 h post-isquemia. Las ratas fueron anestesiadas con una dosis letal de pentobarbital sódico a las 24, 48, 72 h o 7 d después del período de ICGA o de la manipulación sham y los cerebros de los animales, fijados por perfusión intracardiaca. Se cortaron rebanadas coronales de 3 mm, conteniendo al hipocampo y fueron procesadas hasta su inclusión en bloques de parafina, de los cuales se obtuvieron cortes coronales de 10 ó de 5 μ m donde se analizaron, respectivamente, la población neuronal remanente de las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo en cortes teñidos mediante la técnica de Nissl, la inmunoreactividad (IR) a Casp-3 en su forma activa e inactiva mediante la técnica de inmunohistoquímica, y la fragmentación del DNA por medio de la técnica de TUNEL. **RESULTADOS:** la ICGA provocó daño neuronal, particularmente en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, evidenciado a través de la pérdida de la mayoría de esas neuronas a partir de las 72 h post-isquemia. La ICGA indujo un incremento en la IR a Casp-3 total en las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo, y en menor grado a Casp-3 activa, particularmente en las neuronas piramidales de la región CA1, a las 72 h post-isquemia. La ICGA indujo la fragmentación del DNA de las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo manifestada a través de un incremento en el número de neuronas positivas a TUNEL, a partir de las 72 h post-isquemia. P4 no redujo

la pérdida de neuronas piramidales en CA1, ni la IR a Casp-3 total o activa, pero redujo significativamente el número de neuronas positivas a TUNEL en la región CA1. **CONCLUSIONES:** la ICGA provocó la muerte neuronal tardía de las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo. El aumento en la IR a Casp-3 total, comparado con el menor aumento (grado) a Casp-3 activa, sugiere un incremento en la síntesis de esta enzima, más que en su activación, posterior a la ICGA. La ICGA incrementó la fragmentación del DNA en las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo. El efecto neuroprotector de P4 se manifestó a través de la reducción de la fragmentación del DNA después de la ICGA, especialmente a los 7 d post-isquemia.

I. INTRODUCCIÓN

ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia cerebral es una condición cerebrovascular en la cual ocurre una disminución del flujo sanguíneo, y por lo tanto, de oxígeno y glucosa al cerebro, a concentraciones que interfieren con el funcionamiento neuronal. Con base en la localización anatómica y en la extensión que abarca, la isquemia que involucra al cerebro completo y ocurre durante un paro cardíaco o hipotensión sistémica severa, se denomina isquemia cerebral global (ICG), mientras que aquella que afecta a regiones restringidas del cerebro y ocurre por la oclusión o ruptura de una arteria, se le denomina isquemia cerebral focal (ICF) (Roine, 1997; Lipton, 1999). En la Tabla 1 se presentan algunas de las diferencias entre estos dos tipos de isquemia.

Tabla 1. Diferencias fisiopatológicas entre la isquemia cerebral global y focal.

ISQUEMIA GLOBAL	ISQUEMIA FOCAL
Transitoria	Transitoria/ Permanente
Isquemia completa/ incompleta	Isquemia completa
Disminución o cese del flujo sanguíneo cerebral	Oclusión o ruptura de una arteria
Muerte neuronal selectiva	Infarto cerebral
Lesión excitotóxica	Desconocido
Lesión dependiente de la temperatura	Lesión independiente de la temperatura
Lesión bilateral (ambos hemisferios)	Lesión unilateral (sólo un hemisferio)
Seguida de reperfusión	Seguida o no de reperfusión
La lesión se completa luego de días	El infarto se completa luego de horas

Tomada y modificada de Roine, 1997.

La isquemia cerebral se incluye dentro de las cuatro primeras causas de mortalidad en México y en el mundo. Las cifras varían en función del género (en edad reproductiva hay menor incidencia en las mujeres que en los hombres y luego de la menopausia es igual en ambos); y de la edad (mayor después de los 65 años). En cuanto a las cifras de mortalidad en nuestro país, tenemos que las enfermedades cerebrovasculares (incluyendo ICF) son responsables del 5.8% de las defunciones por año, mientras que la enfermedad isquémica del corazón (que incluye ICG) lo es del 10.6% (Dirección General de Información en Salud, 2004; Velázquez-Monroy y cols., 2007; INEGI, 2009).

Modelos animales de isquemia cerebral

La mejor herramienta de que se dispone hoy por hoy para estudiar la fisiopatología de la isquemia cerebral son los modelos experimentales, ya que

permiten realizar manipulaciones experimentales y analizar el curso temporal, la distribución regional y los aspectos moleculares de los fenómenos celulares que tienen lugar durante y después de la isquemia; y que pueden llevar al daño cerebral isquémico. Además, los modelos animales permiten estudiar los efectos de nuevos compuestos capaces de minimizar dicho daño, lo que es de especial interés para su aplicación clínica. El conocimiento de los mecanismos subyacentes al daño cerebral es el paso previo al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y nuevos fármacos que eviten la aparición de lesiones irreversibles (Roda y cols., 1998; Prieto-Arribas y cols., 2008).

Actualmente, los animales que ofrecen más ventajas como modelos experimentales son los pequeños roedores, especialmente las ratas. Las ratas tienen una anatomía vascular cerebral y una fisiología aceptablemente similares a las de los humanos y son animales de bajo costo, fáciles de criar y manejar, por lo que se han convertido en los animales de experimentación más ampliamente utilizados (Ginsberg y Busto, 1989; Pérez-Asensio, 2005). Existen modelos de isquemia cerebral con los que se puede inducir una isquemia global, si ésta afecta a todo el cerebro, o focal, si se limita a una parte del cerebro. También puede diferenciarse entre modelos de isquemia transitoria, si la fase de isquemia va seguida de una fase de reperfusión; o permanente, si sólo se produce isquemia sin restituirse el flujo sanguíneo. Los distintos modelos animales de isquemia cerebral se pueden agrupar en tres tipos: modelos de isquemia cerebral global, de isquemia cerebral focal y hemorrágicos (Tabla 2) (Prieto-Arribas y cols., 2008).

Tabla 2. Modelos animales de isquemia cerebral.

<i>In vivo</i>		Autor, año
Modelos de isquemia cerebral global en animales		
Parada cardíaca	Fibrilación ventricular	Hossmann, 1973
	Inyección intracardíaca de cardiopléjicos	Kofler, 2004
	Exanguinación	Behringer, 2000
	Ahogamiento	Makarenko, 1972
	Asfixia	Liachenko, 1998

Interrupción de la circulación cerebral	Interrupción completa de la circulación cerebral	Oclusión 2 vasos(jerbos)	Levine, 1966
		Oclusión 2 vasos(ratas) + hipotensión/hipoxia	Eklöf, 1972
		Oclusión 4 vasos(ratas)	Pulsinelli, 1979 Sugio, 1988
		Estrangulación cervical	Rabat, 1938
		Decapitación	Hinzen, 1972
Interrupción incompleta de la circulación cerebral		Hipotensión arterial. Estenosis de arterias carótidas comunes o mediante una fístula arteriovenosa	Shibata, 2004 Hai, 2002
		Hipertensión intracraneal	Siesjö, 1970
Modelos de isquemia cerebral focal en animales			
Oclusión de la arteria carótida común	Oclusión de la arteria carótida común en jerbos		Kelly, 2001 Levine, 1966
	Encefalopatía anóxica-isquémica		Levine, 1960
Oclusión de la arteria cerebral media	Oclusión transorbital		Hudgins, 1970 Hossman, 1980
	Oclusión transcraneal	Proximal a cisura rinal	Tamura, 1981
		Distal a cisura rinal	Chen, 1986 Liu, 1989 Bederson, 1986
	Oclusión intraluminal mediante un filamento		Koizumi, 1986 Zea Longa, 1989 Belayev, 1996 Smith-Elsaesser, 1998
	Oclusión intraluminal mediante embolia de coágulo de sangre autólogo o heterólogo		Overgaard, 1992 Overgaard, 1994 Zhang, 1997
Oclusión microvascular de la arteria cerebral media	Oclusión fototrombótica		Watson, 1985
	Agregados plaquetarios		Fieschi, 1975
	Inyección intracerebral de endotelinas (tipos 1 y 3)		Sharkey, 1995 Henshall, 1999
Infartos espontáneos en ratas espontáneamente hipertensas			Yamori, 1976
<i>In vitro</i>			
Cultivos primarios neuronales			Goldberg, 1993
Cultivos organotípicos			Vornow, 1994
Rodajas de cerebro	Rodajas de hipocampo		Taylor, 1995

Tomada de Prieto-Arribas y cols., 2008.

Fisiopatología de la isquemia cerebral

La isquemia cerebral desencadena una secuencia de fenómenos moleculares a corto y a largo plazo que se inician por la falla energética relacionada con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y el déficit en la producción de ATP (Fig. 1) (Arango-Dávila y cols., 2004).

La pérdida de los gradientes iónicos transmembranales debido a fallas en los intercambiadores iónicos dependientes de energía, principalmente la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, induce la despolarización masiva de neuronas y células gliales por la entrada de Na^+ al citoplasma, lo que a su vez provoca el ingreso de Ca^{2+} , así como de Cl^- a través de canales dependientes de voltaje, y agua, lo que resulta en edema celular. La falla energética y los cambios iónicos asociados ocasionan la liberación pre-sináptica masiva de neurotransmisores excitatorios como el aminoácido glutamato (Glu), que resulta en excitación post-sináptica de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), lo que induce un incremento aún mayor de la concentración de calcio intracelular. Este incremento de calcio intracelular, por lo tanto, no depende exclusivamente de la estimulación de canales de calcio dependientes de voltaje, sino también de la activación de receptores de Glu (Kogure y cols., 1988; Siesjö y cols., 1995; Sarraf-Yazdi y cols., 1999; Gwag y cols., 2002; Mehta y cols., 2007). El calcio intracelular también se incrementa por su liberación a partir de los reservorios intracelulares, como el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Choi, 1987; Gwag y cols., 2002) y por su parte, la sobrecarga de calcio provoca la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria y la liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembranal hacia el citoplasma, como por ejemplo, el citocromo c (Zhang y cols., 2001). El ingreso y la permanencia de cantidades anormalmente grandes de calcio libre en las células desencadena un conjunto de alteraciones celulares progresivas que pueden llevar al daño neuronal irreversible y a la lisis de diversos componentes estructurales de las neuronas, entre los que destacan la activación de diversas proteínas efectoras, tales como: la fosfolipasa A2 (PLA2), que hidroliza a los fosfolípidos de las membranas celulares e incrementa los niveles de ácidos grasos libres como el araquidónico, algunas proteasas como las calpaínas que degradan a importantes proteínas estructurales y funcionales (Earnshaw y

cols., 1999; Nicholson, 1999; Chang y Yang, 2000); y la sintasa del óxido nítrico que junto con especies reactivas de oxígeno (ROS) forman especies reactivas de nitrógeno (RNS) que inician los mecanismos de daño a macromoléculas, como lípidos de membrana, DNA y proteínas (White y cols., 1996).

Por otro lado, la isquemia cerebral desencadena la activación y expresión de genes. Algunos de estos genes forman parte de la reacción inmediata de la neurona, al daño (Akins y cols., 1996), mientras que otros se asocian a procesos celulares que determinan el destino próximo de la neurona afectada y otros coordinan los mecanismos de reparación de la neurona y los tejidos.

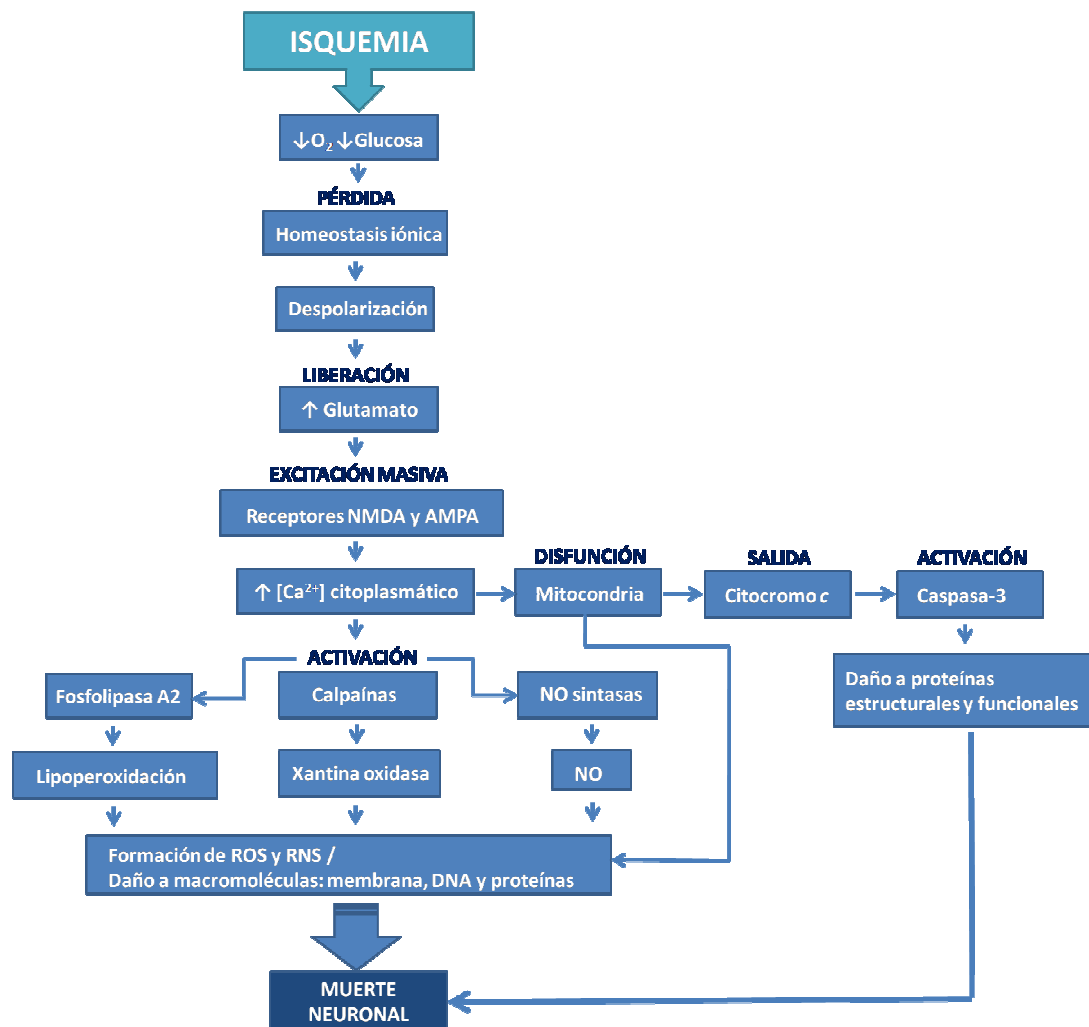


Figura 1. Principales fenómenos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia cerebral global.

Isquemia cerebral global aguda

La isquemia cerebral global aguda (ICGA) se origina por la reducción del flujo sanguíneo a todo el cerebro a valores inferiores al 10% de lo normal (>10 mL/min/100g de tejido) (isquemia global incompleta), o bien la supresión total

(isquemia global completa) por periodos de varios minutos y se asocia generalmente con eventos como un paro cardiaco o una hipotensión severa, resultando en una hipoperfusión del órgano entero (Roine, 1997).

Vulnerabilidad selectiva

Diversos estudios han puesto de manifiesto algunas características del sistema nervioso central que pueden influir de manera importante en el daño cerebral provocado por diferentes patologías agudas o crónicas. Tal es el caso de la diferente vulnerabilidad de los distintos tipos de neuronas que forman parte de estructuras cerebrales específicas, ante una reducción del flujo sanguíneo en todo el cerebro, como ocurre en la ICGA. Así, se han identificado a las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo (Fig. 2), a las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral, a las células de Purkinje del cerebelo y a las neuronas espinosas del núcleo caudado, como los tipos neuronales más susceptibles a la isquemia (Araki y cols., 1989; Kogure y cols, 1988; Siesjö y cols, 1995; Sarraf-Yazdi y cols, 1999).

Este daño provocado por la isquemia induce a su vez deterioro en aquellas funciones cerebrales cuya integración depende de las estructuras lesionadas, como son la orientación espacial, el aprendizaje y la memoria en el caso del hipocampo (Zola-Morgan y cols., 1986; Block, 1999).

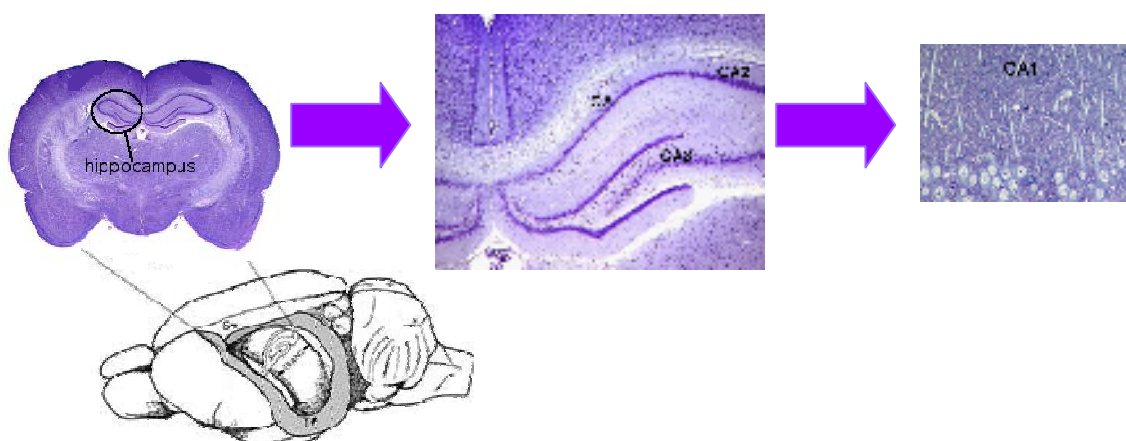


Figura 2. Anatomía del hipocampo de rata. Se muestran las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo, en mayor aumento se muestra la región CA1. Tomada y modificada de www.bio.davidson.edu/.../method/Brainparts.html

El hipocampo

El hipocampo (Fig. 2) es la estructura cerebral donde es más evidente el fenómeno de vulnerabilidad selectiva. Por ejemplo, 5 min de isquemia inducen muerte neuronal tardía de casi todas las neuronas piramidales de CA1 (Kirino y cols., 1984), sin efectos en otras poblaciones; mientras que 20 min inducen muerte celular en las neuronas de CA3 además de las de CA1, sin efectos en las células granulares del giro dentado o en las interneuronas de CA1 (Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Lipton, 1999). Las bases del fenómeno de vulnerabilidad selectiva no han sido totalmente determinadas; sin embargo, una de las explicaciones es la abundancia de inervación excitatoria, además de otras diferencias que se han ido reconociendo entre las células más vulnerables con respecto a las menos vulnerables (Tabla 3).

Tabla 3. Bases potenciales para la vulnerabilidad selectiva de las células piramidales de CA1

Cambios en detrimento de CA1	Cambios benéficos que no ocurren en CA1
↑ RNA m de Casp-3	Expresión de genes inmediatos (c-fos, c-Jun, etc.)
↓ Síntesis de proteínas	Síntesis de BDNF
↓ SOD a 24 h post-isquemia	Síntesis de proteínas de choque térmico
↑ Ácidos grasos libres	Síntesis de Bcl-2
↓ Niveles basales de calpastatina	
↑ Ca ²⁺ y ↓ ATP a 24 h post-isquemia	
Acumulación de Zinc	
Restablecimiento lento del pH	
↑ de NF _κ B	
Pérdida de ubiquitina	
Pérdida de BDNF	
↑ RNAm de c-Jun a 24-48 h post-isquemia	
Vulnerabilidad de CA1 a radicales libres	

Abreviaturas: SOD, Superóxido dismutasa; BDNF, Factor neurotrófico derivado del cerebro. NF_κB, Factor nuclear kappa B. ↑, incremento; ↓, disminución. Tomada y modificada de Lipton, 1999.

Recientemente, se han descrito otras causas para la vulnerabilidad selectiva post-isquemia de las neuronas de CA1:

- La liberación mitocondrial de citocromo c (Sugawara y cols., 1999).
- El incremento en la actividad de la PLA2 (Arai y cols., 2001).
- La disfunción selectiva de los astrocitos de CA1 que pierden el transportador de glutamato GLT1 (Ouyang y cols., 2007).

Daño isquémico en CA1

Las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo son las más vulnerables de todo el cerebro anterior. Kirino (1982) describió que las neuronas de CA1 mantienen una apariencia normal hasta 2 d después de la isquemia y es hasta después que muestran signos de daño. Este curso temporal puso de manifiesto que existe un mecanismo de daño isquémico denominado muerte neuronal tardía (Pulsinelli y cols., 1982), como se ilustra en la Fig. 3. En numerosos estudios se ha establecido que después de un episodio de ICGA con una duración de 5-10 min en jerbos y de 5-30 min en ratas, las neuronas piramidales de la región CA1 sufren cambios morfológicos que indican daño neuronal, que sólo se evidencia a las 48 o 72 h post-isquemia (Schmidt-Kastner y Freund, 1991).

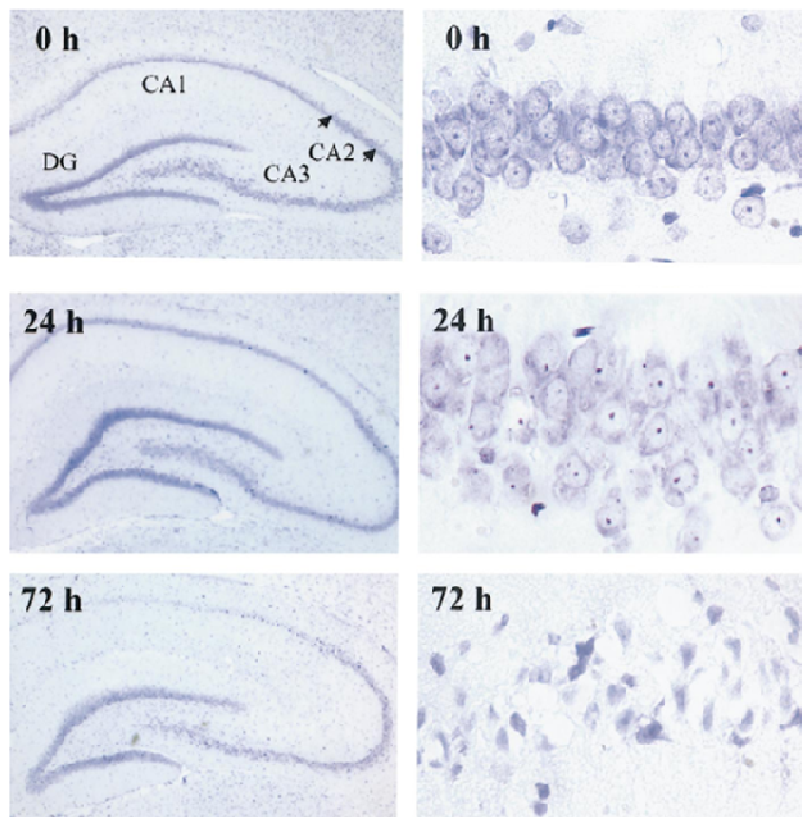


Figura 3. Morfología del hipocampo post-isquemia. Cortes del cuerno de Ammón del hipocampo (izquierda) y de la región CA1 (derecha) después de la cirugía sham 0 h, o a 24 h y a 72 h de reperusión, teñidos con violeta de cresilo. A las 72 h, se observa una pérdida neuronal severa en CA1. Tomada y modificada de Jin y cols., 2001.

Muerte celular en la isquemia cerebral

Cuando una célula es expuesta a un estímulo nocivo, dependiendo de su severidad, se pueden activar diversos fenómenos que llevan a un daño

reversible, o bien a daño irreversible y muerte. Existen al menos tres formas diferentes de muerte celular que participan en la muerte neuronal isquémica (Lipton, 1999). Dos de ellas, apoptosis y autofagia, no son exclusivas de los procesos de daño sino que también están involucradas en algunos procesos fisiológicos críticos en los organismos multicelulares, como son el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis celular y durante el recambio del sistema inmune (Galluzzi y cols., 2007). La apoptosis es un proceso activo en el que ocurre la expresión de algunos genes y la síntesis y activación de proteínas (Graham y Chen, 2001; Elmore, 2007); la apoptosis se caracteriza morfológicamente por la condensación del núcleo y del citoplasma, la fragmentación nuclear y la aparición de agregados de cromatina condensada que dan lugar a la formación de cuerpos apoptóticos rodeados de membrana que pueden a su vez ser posteriormente fagocitados sin desencadenar un proceso inflamatorio (Allen y cols., 1997; Love, 2003; Elmore, 2007). Por otro lado, en la autofagia ocurre la formación de autofagosomas que son el resultado de la fusión de los lisosomas con otros organelos celulares (Chu, 2008). La tercera categoría de muerte celular, denominada necrosis, se diferencia de las otras dos por ser el resultado de una disfunción celular aguda, que en el caso de la isquemia ocurre en respuesta a los fenómenos fisiopatológicos descritos anteriormente y es un proceso severo relativamente pasivo, donde no se requiere la expresión de genes ni la activación de proteínas (Syntichaki y Tavernarakis, 2003). Morfológicamente, la necrosis está caracterizada por un incremento del volumen celular y de los organelos, entre ellos las mitocondrias, con la ruptura de las membranas plasmática y nuclear y la posterior liberación del contenido celular al medio intercelular, la cual puede causar importantes daños en el tejido afectando a las células vecinas al activar y atraer diversos tipos celulares al lugar de la lesión como resultado de la liberación de moléculas proinflamatorias (Proskuryakov y cols., 2003).

La muerte neuronal isquémica se inicia por cambios que alteran o inhiben de la fosforilación oxidativa, como son la disminución del ATP, la disminución del pH, la producción de radicales libres por la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial, el incremento intracelular de iones Na^+ y la despolarización de la membrana plasmática como resultado de la falta del sustrato (ATP) de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, así como el incremento de las concentraciones de

calcio intracelular (Lipton, 1999; Gwag y cols., 2002; Mehta y cols., 2007). Lo anterior conduce a cambios secundarios en las concentraciones iónicas y en la liberación de neurotransmisores, así como a la activación de algunos genes y enzimas, que en conjunto con los cambios iniciales, desencadenan la activación de los procesos de daño. Dichos procesos de daño son denominados “perpetradores” y se caracterizan por la habilidad de producir cambios a largo plazo en las macromoléculas. Éstos incluyen la activación de proteasas, fosfolipasas y la generación de radicales libres. El proceso de muerte neuronal isquémica resultante de la activación de los perpetradores puede ser dividido en dos etapas principales: Cambios funcionales y estructurales críticos, como incremento en la permeabilidad de la membrana, disfunción mitocondrial, disminución de la síntesis de proteínas y daño al citoesqueleto, y estadíos finales de muerte celular (Fig. 1), con la morfología que caracteriza a cada tipo de muerte neuronal (Allen y cols., 1997; Lipton, 1999) (Tabla 4).

Tabla 4. Rasgos comparativos entre la apoptosis y la necrosis.

NECROSIS	APOPTOSIS
Pérdida de la homeostasis celular	Sin cambios importantes al inicio
Permeabilidad de la membrana alterada	No vista, al menos inicialmente
Salida de K ⁺ , entrada de Na ⁺	Sin entrada de Na ⁺ , sin cambios en la concentración de K ⁺ de la célula
Caída del potencial de membrana	Condensación del citoplasma y organelos intactos
Edema de organelos y destrucción de los mismos	Sin depleción de energía celular
Depleción de la energía celular (ATP)	Síntesis alta de macromoléculas
Síntesis baja de macromoléculas	No afecta a las células vecinas (Sin inflamación)
Afecta a las células vecinas (inflamación)	Fragmentación internucleosomal del DNA
Fragmentación desordenada del DNA	DEGENERACIÓN ACTIVA
ATROFIA PASIVA	

Tomada y modificada de Allen y cols., 1997.

Marcadores tardíos de daño neuronal

Cuando el estímulo de daño es de severidad moderada, se pueden activar intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática responsable de los fenómenos de muerte por apoptosis. En la secuencia de los fenómenos de este tipo de daño, hay indicadores tempranos y tardíos. Entre los indicadores tempranos están las proteínas resultantes de la expresión de los genes inmediatos tempranos o algunas proteínas anti-apoptóticas (Barone y cols., 1998; Kapinya y cols., 2000; Gwag y cols., 2002), pero estos indicadores

pueden representar la respuesta de las neuronas hacia los estímulos y, por lo tanto, no permiten reconocer aún el destino de las células hacia daño reversible o hacia daño irreversible y muerte.

Por otro lado, entre los fenómenos tardíos, relacionados con el curso definitivo del daño neuronal, se encuentran la activación de las caspasas y la fragmentación del DNA.

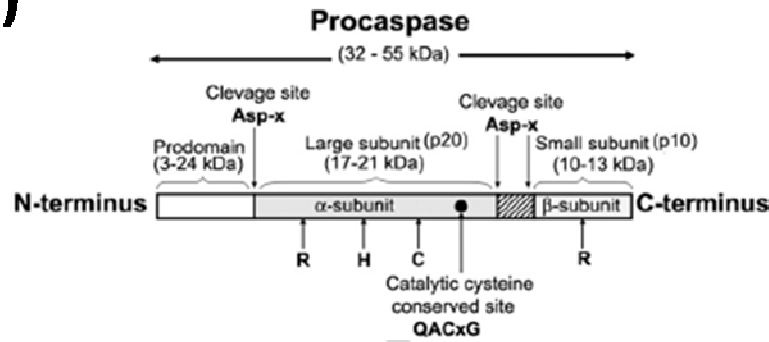
Caspasas

El nombre de caspasa es una contracción de “proteasa dependiente de cisteína y específica de aspartato” (en inglés caspase, **c**ysteiny **a**spartate-specific proteinase) (Fernandes-Alnemri y cols., 1996). Las caspasas son proteasas altamente conservadas a lo largo de la evolución desde el nemátodo *C. elegans* hasta los mamíferos (Nicholson y Thornberry, 1997; Philchenkov, 2004). Estas proteínas contienen tres dominios funcionales: un prodominio N-terminal, una subunidad grande que contiene el centro activo formado por una cisteína dentro de un motivo altamente conservado, QACXG, y una subunidad pequeña en el C-terminal (Fig. 4a) (Earnshaw y cols., 1999).

Hasta ahora se han identificado 14 caspasas diferentes en mamíferos (Chowdhury y cols., 2008), distribuidas en dos subfamilias biológicas distintas: una de ellas participa en el procesamiento de citocinas proinflamatorias (caspasas activadoras 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14), y la otra es necesaria para iniciar (caspasas iniciadoras 2, 8, 9 y 10) y ejecutar (caspasas efectoras 3, 6 y 7) la respuesta durante la muerte celular programada (Nicholson y Thornberry, 1997; Nuñez y cols., 1998; Budihardjo y cols., 1999; Earnshaw y cols., 1999; Nicholson, 1999; Chang y Yang, 2000; Reed, 2000; Philchenkov, 2004; Prunell y cols., 2005).

De manera normal y constante, las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos (procaspasas), estado en el cual se mantienen inactivas. Estos zimógenos están compuestos de tres dominios: un prodominio N-terminal, y los dominios p20 y p10 (Fig. 4b) que luego de 2 cortes proteolíticos formarán la enzima madura y activa, organizada en un heterotetrámero que contiene dos p20/p10 heterodímeros y dos centros activos (Earnshaw y cols., 1999; Chowdhury y cols., 2008).

a)



b)

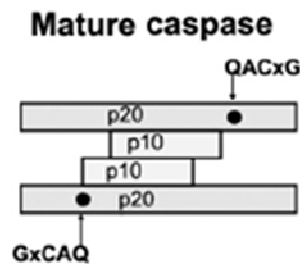


Figura 4. Estructura general de las caspasas. En la parte a) se muestra la estructura de una procaspasa y en la b) la estructura de una caspasa activa. Tomada y modificada de Chowdhury y cols., 2008.

Caspasa-3

Dentro de las caspasas efectoras, se encuentra la caspasa-3 (Casp-3), también conocida como CPP32, apopainá o Yama (Fernandes-Alnemri y cols., 1996). La Casp-3 es codificada por un RNAm de 2.6 Kb que se expresa en varios tejidos y tipos celulares (Kumar, 1997). Su precursor, es decir, la forma inactiva de la Casp-3 denominada procaspasa-3 tiene un peso molecular de 32 KDa (pro-Casp-3, p32) y comparte alrededor del 35% de homología con la proteína efectora de la apoptosis en *C. elegans* CED3 (Nicholson y cols., 1995).

La forma enzimáticamente activa de la Casp-3 está formada por 2 subunidades de 17 KDa (p17) y 12 KDa (p12) derivados del precursor p32. La activación, mediada por la Granzima B, Mch4, caspasa-8 y caspasa-9, ocurre en el residuo Asp175 y genera las subunidades p20 y p12. Posteriormente, el corte en Asp9 y Asp28 (posiblemente por autocatálisis) genera la subunidad p17 (Fig. 5a) (Kumar, 1997). Los fragmentos p17 y p12 forman de un heterodímero que, por asociación con un dímero similar, da lugar a un heterotetramero enzimáticamente activo (Fig. 5b) (Nicholson y cols., 1995).

La similitud estructural de la Casp-3 y CED-3 sugiere el papel de esta proteína en el proceso de apoptosis (Kumar, 1997).

Durante el desarrollo normal del cerebro de los mamíferos, cuando más de la mitad de las neuronas en algunas regiones cerebrales son removidas a través de apoptosis, Casp-3 juega un papel esencial. En la rata, la Pro-Casp-3 está sobreexpresada desde el día 17 del desarrollo embrionario hasta el día post-natal 7 y disminuye después del día 14 post-natal (Kurosu y cols., 2004). La importancia de la activación de Casp-3 en el desarrollo del sistema nervioso central se estudió en animales modificados genéticamente, el ratón knockout (Casp-3 $-/-$) presenta una expansión neuronal y desarrollo cerebral anormal que resultan en la muerte del animal en las primeras 3 semanas de vida (Kuida y cols., 1996; Los y cols., 1999).

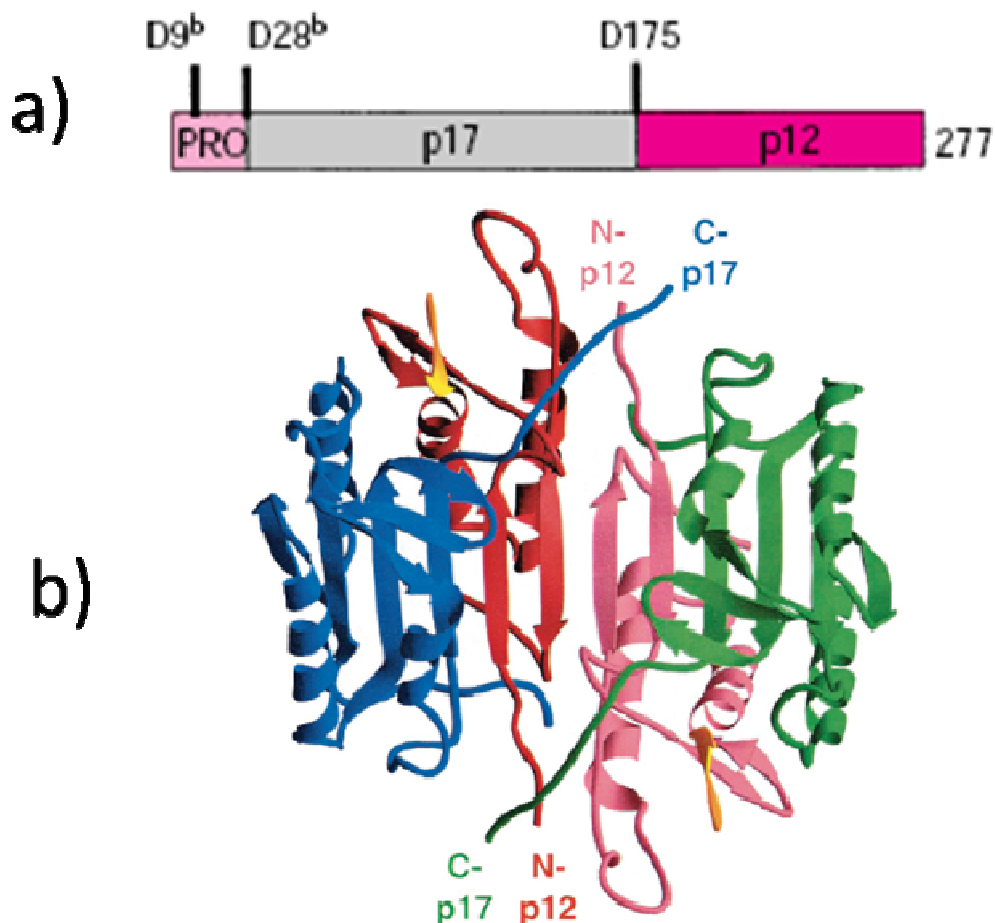


Figura 5. Estructura de la Casp-3. En la parte a) se esquematiza a la estructura primaria de la Casp-3 y los sitios de corte. En la parte b) se muestran las subunidades p17 en azul y verde, las subunidades p12 en rojo y rosa, y el sitio de unión de los inhibidores en amarillo. Se indican los extremos amino y carboxilo. Tomada y modificada de Chang y Yang, 2000.

Se sabe que Casp-3 ejerce su efecto sobre proteínas que participan en la reparación del DNA, como son la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) y otros sustratos involucrados en el mantenimiento de la integridad estructural de la célula (Revisión en Chang y Yang, 2000). Uno de los blancos particulares de Casp-3 es el inhibidor (iCAD) de la DNAsa activada por caspasas (CAD) (Enari y cols., 1998) que una vez fragmentado libera la forma activa de la CAD que se trasloca al núcleo y fragmenta al DNA (Fig. 6) (Nagata, 2000).

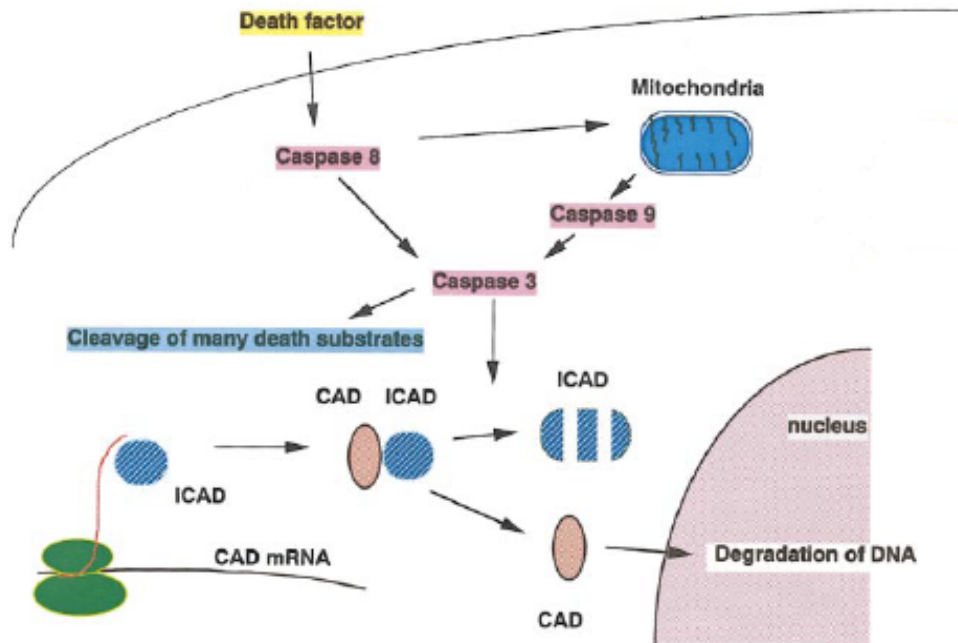


Figura 6. Fragmentación del DNA resultante de la actividad proteolítica de la Casp-3. Tomada de Nagata, 2000.

En modelos de isquemia cerebral global se ha reportado la activación de la Casp-3 en la región CA1, misma que ha sido interpretada como evidencia de que la muerte neuronal ocurre por apoptosis (Armstrong y cols., 1997; Gillardon y cols., 1997; Chen y cols., 1998; Ni y cols., 1998; Niwa y cols., 2001; Müller y cols., 2004; Tanaka y cols., 2004; Shimizu y cols., 2007; Teschendorf y cols., 2008). La participación de la Casp-3 activa en la muerte neuronal isquémica ha sido también apoyada por la observación de que un inhibidor selectivo de Casp-3 ejerce neuroprotección disminuyendo la muerte neuronal (Chen y cols., 1998). Sin embargo, esto ha sido cuestionado por algunos autores, quienes, basados en sus propias observaciones y en las características morfológicas de las neuronas isquémicas analizadas bajo microscopia electrónica, atribuyen la muerte neuronal en estos estudios al proceso de necrosis y proponen la posibilidad de que la activación de la Casp-3 sea un hecho concomitante de la

muerte neuronal y que tanto necrosis como apoptosis puedan estar ocurriendo simultáneamente (Colbourne y cols., 1999).

Fragmentación internucleosomal del DNA

Otro de los eventos moleculares que ha sido tomado como indicador del fenómeno de muerte neuronal isquémica por apoptosis, es la fragmentación internucleosomal del DNA (Héron y cols., 1993; MacManus y cols., 1993; Ferrer y cols., 1994; Sei y cols., 1994; Iwai y cols., 1995; Nitatori y cols., 1995; Volpe y cols., 1995). Después de la isquemia, el material genético es degradado en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases y múltiplos de ellos, que son los que por electroforesis en geles de agarosa generan lo que se conoce como “patrón en escalera” (Fig. 7a y b).

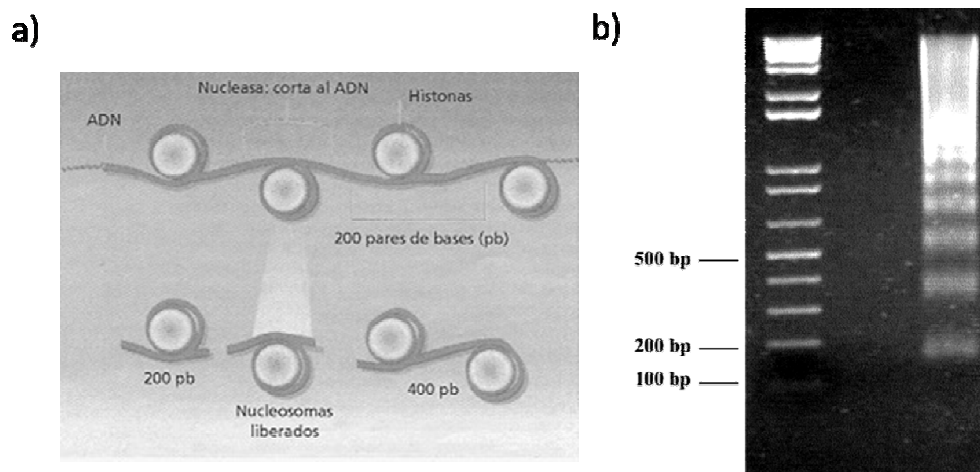


Figura 7. Esquema que ilustra la fragmentación del DNA internucleosomal (a) que origina un patrón en escalera (b). Tomada de <http://www.chinaphar.com/1671-4083/23/figs/803f2.jpg>

Sin embargo, la fragmentación del DNA también ocurre en células necróticas, aunque en este caso se genera más bien un barrido de DNA que indica su degradación (Gwag y cols., 2002; Petit y cols., 1997). Esta controversia existe hasta la fecha y aparentemente sólo la microscopía electrónica, dando evidencia de la integridad o no de las membranas y de la existencia o no de los “cuerpos apoptóticos” permite diferenciar entre la muerte neuronal por apoptosis o por necrosis.

Sin embargo, independientemente de esta controversia y de la naturaleza del daño celular (apoptótico o necrótico), la activación de la caspasa-3 (Casp-3) y la ruptura del DNA en “patrón en escalera”, en neuronas de la región CA1 del hipocampo, se han interpretado como indicadores tardíos de daño, predictores

de muerte neuronal; a su vez, la reducción de su magnitud, da evidencia de la preservación neuronal.

Estrategias de neuroprotección

A partir de los estudios realizados en modelos animales de isquemia cerebral, se ha podido determinar una serie de fenómenos bioquímicos que se suceden en una secuencia definida, integrando lo que se ha conocido con el término de cascada isquémica (Fig. 1), que van desde la disminución de la producción de energía en las neuronas hasta la muerte celular y de allí, ha surgido la posibilidad de intervención farmacológica en esos diferentes fenómenos, con el objeto de preservar tejido cerebral mediante la recuperación de aquellas neuronas que aún conservan su viabilidad y por tanto, tienen posibilidad de ser rescatadas. En este orden de ideas, se ha establecido el concepto de neuroprotección, que se refiere al conjunto de medidas terapéuticas destinadas a prevenir o limitar la lesión del tejido cerebral que ocurre en zonas con flujo sanguíneo disminuido y/o en zonas selectivamente vulnerables interfiriendo con uno o más de los fenómenos que se desencadenan tras una isquemia aguda (Marcano-Torres, 2004).

De este modo, el daño específico en las neuronas de las regiones selectivamente vulnerables a la isquemia, como las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, se ha utilizado como un indicador de la severidad del daño por isquemia global, en tanto que su preservación, es un indicador del efecto neuroprotector del fármaco utilizado.

Se han estudiado diversas estrategias farmacológicas, como es el uso de algunos anestésicos para bloquear la despolarización anóxica, bloqueadores de canales de calcio y antagonistas de los receptores de Glu tipo NMDA; y no farmacológicas (p. ej., hipotermia, hipoglucemia, hipotensión arterial, etc.) en contra del daño por isquemia (Castillo y cols., 2003; Fukuda y Warner, 2007).

Progesterona

La progesterona (P_4) es una hormona esteroide, cuyo nombre sistemático es 4-pregnen-3,20-diona; es sintetizada por el ovario (cuerpo lúteo), la corteza adrenal y la placenta en las hembras y por los testículos y la corteza adrenal en los machos. Las concentraciones de P_4 en el plasma son generalmente más

altos en las hembras que en los machos, excepto durante la fase folicular o las fases estro-diestro del ciclo estral de la rata, en que las concentraciones de las hembras son muy similares a las de los machos. El que en los machos también haya producción de P_4 sugiere su importancia en ambos sexos (Singh, 2005). Sin embargo, P_4 y algunos de sus metabolitos también son biosintetizados por las neuronas del hipotálamo, cuerpo estriado, amígdala, septum, cerebelo y corteza cerebral; por las células gliales en el sistema nervioso central y por las células de Schwann en el sistema periférico (Schumacher y cols., 2004). Desde hace algún tiempo, P_4 ha sido reconocida como un neuroesteroide activo (Paul y Purdy, 1992).

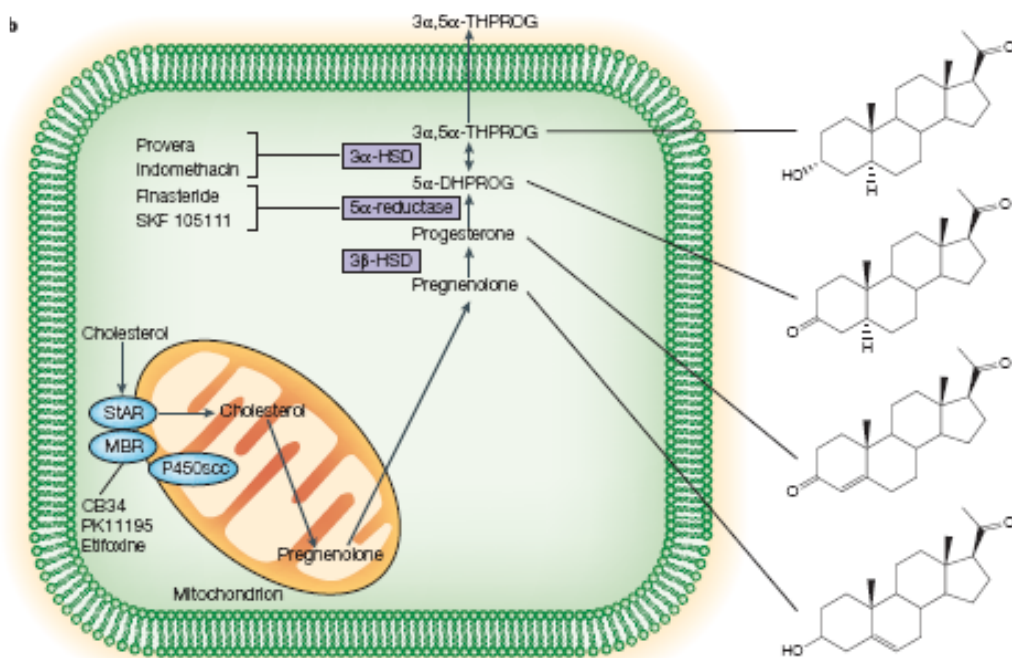


Figura 9. Biosíntesis y metabolismo de neuroesteroides. En particular, la síntesis de P_4 involucra 2 pasos: la conversión de colesterol a pregnenolona por la citocromo P450 scc, enzima que corta la cadena lateral del colesterol) y la conversión de pregnenolona a P_4 por la Δ^5 -3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD). P_4 es metabolizada por la 5α -reductasa a 5α -dihidroprogesterona, la cual es reducida a 3α , 5α -tetrahidroprogesterona por la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Tomada y modificada de Belelli y Lambert, 2005.

Efectos neuroprotectores de P_4

P_4 tiene diversos efectos neuroprotectores en varios modelos de daño, incluyendo el daño por isquemia (Singh, 2005; Stein, 2005; Stein, 2008; Stein y cols., 2008; Gibson y cols., 2009).

De hecho, se ha demostrado que P_4 tanto en machos, como en hembras: (1) puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y reducir considerablemente el edema después de daño traumático al cerebro (TBI) e

isquemia (Roof y Stein, 1992; Roof y cols., 1996; Wang y cols., 2009); (2) puede reducir la peroxidación lipídica, que contribuye al daño post-isquemia (Roof y cols., 1997; Aggarwal y cols., 2008; Ozacmak y Sayan, 2008); (3) incrementa la actividad GABAérgica inhibitoria que contrarresta el daño ocasionado por los neurotransmisores excitadores (Majewska, 1990; Lambert y cols., 1999); (4) genera metabolitos que reducen moléculas pro-apoptóticas e incrementan las anti-apoptóticas (Djebaili y cols., 2004; Yao y cols., 2005); (5) reduce la expresión de genes pro-inflamatorios y sus productos proteicos (He y cols., 2004; Grossman y cols., 2004; Pettus y cols., 2005); (6) estimula la mielinogénesis de nervios periféricos lesionados y de oligodendrocitos en cultivo y en el cerebelo de rata (Schumacher y cols., 2004); (7) produce efectos similares entre las especies (ratón y rata) (Ibanez y cols., 2003); y (8) reduce la extensión del área de muerte celular necrótica y mejora el resultado en pruebas conductuales (Jiang y cols., 1996; Djebaili y cols., 2005).

P₄ en isquemia cerebral

P₄ reduce la magnitud del daño por isquemia cerebral focal (Jiang y cols., 1996; Chen y cols., 1999; Sayeed y cols., 2006; Sayeed y cols., 2007; Ishrat y cols., 2009) y global (González-Vidal y cols., 1998; Cervantes y cols., 2002; Morali y cols., 2005), así como en un modelo de isquemia *in vitro* (Ardeshiri y cols., 2006).

Siendo un compuesto originalmente endógeno, P₄ tiene la ventaja, sobre los fármacos neuroprotectores sintéticos, de tener menores efectos secundarios adversos, además de tener múltiples mecanismos de acción que de manera simultánea pueden contrarrestar varios de los fenómenos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia.

Mecanismos celulares de acción de P₄

P₄ produce sus múltiples efectos en el cerebro a través de varios mecanismos celulares de acción:

1. MODULACIÓN DE LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN

a. Receptor GABA_A

P₄ y sus metabolitos, principalmente la 3 α , 5 α -tetrahidroprogesterona (THP), pueden modular el funcionamiento del complejo receptor

GABA_A/benzodiazepinas influyendo en las concentraciones intracelulares del ion cloro. El receptor GABA_A se encuentra en la membrana postsináptica, es de tipo ionotrópico por pertenecer a la familia de los receptores que en su macromolécula forman canales que permiten el paso de iones específicos, y está conformado por diferentes subunidades (α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3 y δ), constituyendo un canal selectivo al ion cloro. Tiene múltiples sitios de reconocimiento: para el ácido γ -aminobutírico (GABA), las benzodiazepinas, los barbitúricos y otros compuestos como los esteroides (Fig. 10). P₄ y algunos de sus metabolitos funcionan como moduladores alostéricos positivos al aumentar la afinidad del receptor por el GABA, con lo que se incrementa la frecuencia y la duración de la apertura del canal de cloro acoplado al receptor GABAérgico (Majewska, 1990; Lambert y cols., 1999; Belelli y Lambert, 2005).

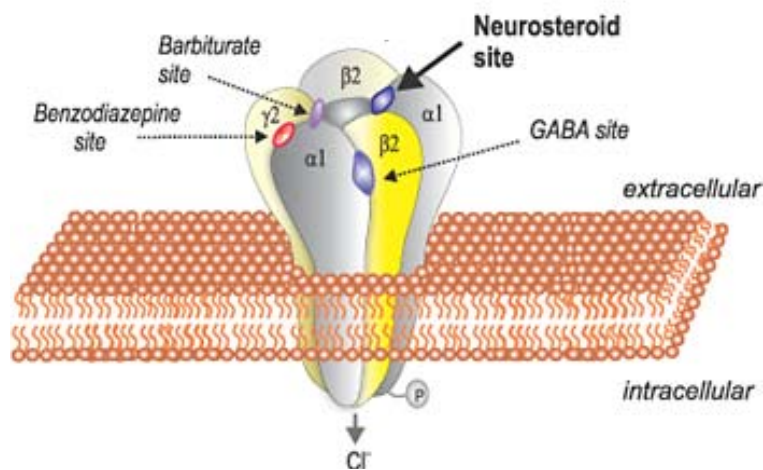


Figura 10. Estructura del receptor GABA_A que ilustra el sitio de unión de sus agonistas, en particular de los neuroesteroides.

Tomada de http://journals.prous.com/journals/doi/20042903/html/df290227/images/Reddy_f3.jpg

2. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA

El modelo genómico clásico de la acción de los esteroides, en este caso P₄, involucra la entrada del esteroide a la célula a través de la membrana lipídica mediante difusión pasiva. A nivel intracelular, P₄ se une a su receptor intracelular (PR) que se localiza en el núcleo. Una vez unido a su ligando, PR sufre un cambio conformacional que lo disocia de proteínas accesorias (chaperonas) y expone su dominio de unión al DNA. En el núcleo, el complejo ligando-receptor interactúa con elementos de respuesta específicos (SRE) en el DNA donde actúa como factor de transcripción en la región promotora de

genes blanco para modular su expresión (Fig. 11) (Mahesh y cols., 1996; Lösel y Wehling, 2003; Brinton y cols., 2008).

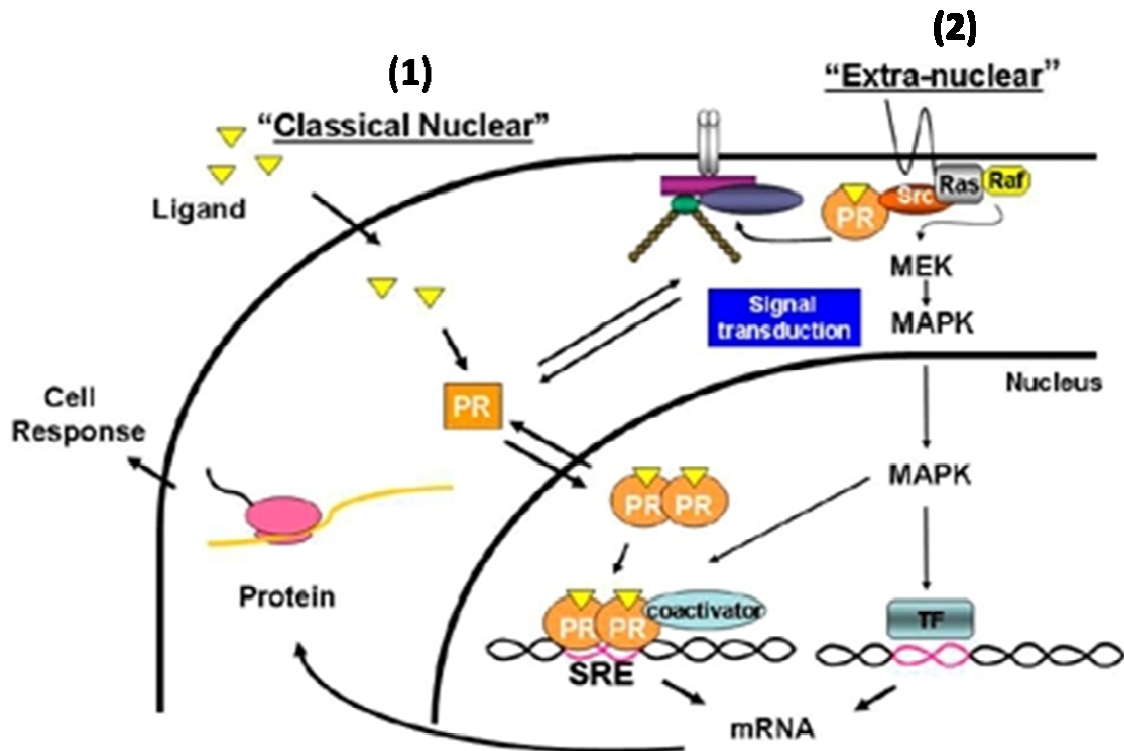


Figura 11. Mecanismo genómico y no-genómico de acción de P_4 . El esquema muestra: (1) El modelo clásico de acción del PR, (2) las acciones no genómicas del PR incluyendo la interacción del PR con Src y la cascada de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK)/proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la cual induce la actividad de factores de transcripción (TF) en el núcleo.

Tomada de http://www.bcm.edu/cms_web/179//DeanEdwardsresearch2007.JPG

3. ACTIVACIÓN DE CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN

Los efectos rápidos no genómicos de los esteroides involucran la activación de varias cascadas de señalización (Fig. 11).

El PR clásico contiene un dominio amino terminal rico en prolina, homólogo a Src-3 (coactivador del receptor de esteroides-3), con el que es capaz de interactuar con varias proteínas en respuesta a P_4 . Una de ellas es la cinasa Src, que a su vez activa la cascada de las pequeñas GTPasas Ras/Raf y las cinasas ERK/MAPK (Fig. 11). Estudios de mutagénesis han demostrado que esta activación es independiente de las propiedades de transactivación del PR. Esto indica que P_4 puede tener un papel dual a través de vías genómicas y no-genómicas (Lösel y Wehling, 2003).

Se ha demostrado que la administración de P₄ (48 h antes de la isquemia) incrementa la fosforilación y traslocación nuclear de ERK1/2 (Cai y cols., 2008).

4. ACCIONES ANTIOXIDANTES DE P₄

Aunque P₄ no tiene una estructura característica de un antioxidante, dosis altas de esta hormona son efectivas para reducir el daño por radicales libres dado que el tratamiento con P₄ reduce la lipoperoxidación después de TBI (Roof y cols., 1997), disminuye la generación de radicales libres (Sugino y cols., 1996) e incrementa los sistemas antioxidantes endógenos en ratas pseudopreñadas, tales como la actividad de la enzima catalasa en ratas macho castradas (Pajović y cols., 2003), y disminuye los niveles de malondialdehído (MDA, marcador de estrés oxidativo) y preserva los niveles de glutatión reducido (GSH, principal antioxidante endógeno) luego de isquemia global (Ozacmak y Sayan, 2008).

5. EFECTO DE P₄ SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MITOCONDRIA

En los últimos años, la mitocondria se ha considerando como el lugar donde convergen diferentes vías de señalización apoptótica, ya que gracias a la capacidad de regulación de la permeabilidad de sus membranas, controla la liberación al citoplasma de señales capaces de activar cascadas de señalización que conducen a la muerte celular. El poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) es un complejo multiproteico que se forma en las zonas de unión entre las membranas interna y externa de la mitocondria, cuya apertura produce la permabilización de las membranas mitocondriales y permite el paso de moléculas con actividad pro-apoptótica, como citocromo c. Entre los factores que regulan la formación y apertura del PPTM destaca el calcio cuyos niveles se ven incrementados tras un episodio de isquemia (Crompton, 1999; Tornero y cols., 2002).

P₄, a través de su metabolito THP, evita la formación del PPTM mediante la inhibición del edema mitocondrial dependiente de calcio, lo cual previene la liberación de citocromo c y por tanto la muerte neuronal por apoptosis (Sayeed y cols., 2009).

II. ANTECEDENTES

Los efectos neuroprotectores de la progesterona en contra del daño provocado por isquemia cerebral global aguda han sido demostrados en nuestro laboratorio tanto en gatos (González-Vidal y cols., 1998; Cervantes y cols., 2001) como en ratas (Moralí y cols., 2005). De hecho, utilizando el modelo de isquemia cerebral global aguda en ratas por “oclusión de los cuatro vasos”, se ha demostrado que P₄ administrada en el período inmediato post-isquemia, ejerce efectos neuroprotectores que se manifiestan tanto en indicadores histológicos como funcionales de la integridad del hipocampo (Montes y cols., manuscrito enviado a publicación).

Adicionalmente, se ha explorado el efecto de la administración de P₄ en el periodo inmediato post-isquemia sobre la presencia de las proteínas pro-apoptótica Bax y anti-apoptótica Bcl-2 en el hipocampo de ratas, de las 24 a las 96 h post-isquemia. Se caracterizó el curso temporal y la topografía de la presencia de estas proteínas en las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 y el *hilus* del giro dentado del cuerno de Ammón del hipocampo, así como en el giro dentado y en la corteza cerebral, después de un episodio de ICGA. La mayor cantidad de la proteína Bax se encontró a las 48 h post-isquemia, pero ésta se encontró en las neuronas de todas las regiones del cuerno de Ammón del hipocampo, sin existir una relación con su diferente vulnerabilidad. Comparativamente, se encontró menor presencia de la proteína Bcl-2 en dichas áreas (Hernández-Morales, 2006). El tratamiento con P₄ redujo la muerte neuronal pero no modificó significativamente los indicadores inmunohistoquímicos evaluados. Dado que estas proteínas representan una etapa inicial en la serie de respuestas que llevan a la muerte neuronal, su presencia no necesariamente asegura su destino final.

En el presente trabajo se analizaron indicadores tardíos de daño neuronal, como son la activación de la Casp-3 y la fragmentación del DNA en las neuronas piramidales del hipocampo después del episodio de isquemia, para evaluar la posible acción neuroprotectora de P₄ sobre éstos. En otros modelos de daño con una fisiopatología semejante a la isquemia, se ha descrito que tanto P₄ como su metabolito activo, la THP, inhiben la actividad de la Casp-3 en la corteza cerebral prefrontal después de TBI (Djebaili y cols., 2004) y

disminuyen la fragmentación del DNA en neuronas en cultivo expuestas a NMDA o deprivadas de O₂ y glucosa (Lockhart y cols., 2002; Ardeshiri y cols., 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

Dado que para diversos agentes neuroprotectores la “ventana de oportunidad terapéutica” se limita a los primeros minutos de iniciada la isquemia, la posibilidad de interferir con algunos de los mecanismos de daño neuronal tardío, entre ellos la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA, involucrados en la muerte neuronal, que ocurre después de la isquemia, la administración de progesterona, que interfiere con estos procesos celulares en otros modelos de daño con una fisiopatología similar a la de la ICGA, ofrece una alternativa que merece ser explorada. Las evidencias que resulten de este trabajo, aportarán información acerca de los posibles mecanismos celulares de las acciones neuroprotectoras de la progesterona, aplicable para proponerla como estrategia terapéutica en el tratamiento del daño inducido en pacientes, por episodios de isquemia cerebral.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo fue evaluar el efecto de la administración de progesterona sobre la activación de la Casp-3 y la fragmentación del DNA como indicadores de daño neuronal, en las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 e *hilus* del giro dentado del cuerno de Ammón del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda provocado en ratas mediante el modelo de “oclusión de los cuatro vasos”.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar el curso temporal de la pérdida neuronal en las regiones CA1, CA2, CA3 e *hilus* del giro dentado del hipocampo de ratas, a las 24, 48, 72 h y 7d después de un período de isquemia cerebral global aguda inducido por el modelo de “oclusión de los cuatro vasos”.
2. Caracterizar el curso temporal de la activación de la Casp-3 mediante la evaluación del número de neuronas inmunorreactivas a Casp-3 total y Casp-activa, así como de la fragmentación del DNA mediante la evaluación del número de neuronas positivas al marcaje por la técnica de TUNEL, en las regiones CA1, CA2, CA3 e *hilus* del giro dentado del hipocampo de ratas, a las 24, 48, 72 h y 7d después de un período de isquemia cerebral global aguda inducido por el modelo de “oclusión de los cuatro vasos”.
3. Evaluar el efecto de progesterona sobre la activación de la Casp-3 mediante la evaluación del número de neuronas inmunorreactivas a Casp-3 total y Casp-activa, así como sobre la fragmentación del DNA mediante la evaluación del número de neuronas positivas al marcaje por la técnica de TUNEL, en las regiones CA1, CA2, CA3 e *hilus* del giro dentado del hipocampo de ratas, a las 24, 48, 72 h y 7d después de un período de isquemia cerebral global aguda inducido por el modelo de “oclusión de los cuatro vasos”.

V. HIPÓTESIS

El tratamiento con progesterona disminuirá la magnitud de indicadores tardíos de muerte celular, como son la activación de la Casp-3 y la fragmentación del DNA, en las neuronas piramidales del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

a) Diseño del estudio:

Estudio experimental, farmacológico, comparativo.

b) Universo de trabajo:

Se utilizaron 60 ratas macho *Sprague Dawley* adultas, sanas, con peso corporal entre 400 y 600 g, que fueron sometidas a los procedimientos que más adelante se describen y que cumplieron con los criterios de selección establecidos. Los procedimientos quirúrgicos y demás manipulaciones, fueron realizados de acuerdo con los lineamientos establecidos internacionalmente y en la Norma Oficial Mexicana (Publicación de la NIH No. 80-23 revisada en 1996; NOM-062-ZOO-1999) para evitar el sufrimiento innecesario de los mismos.

c) Descripción de las variables:

VARIABLES INDEPENDIENTES

- ICGA
- Tratamiento con P₄ o con el vehículo

VARIABLES DEPENDIENTES

- Número de neuronas piramidales presentes en las regiones del cuerno de Ammón del hipocampo (CA1, CA2, CA3 e *hilus* del giro dentado)
- Número de neuronas inmunorreactivas a Casp-3 y TUNEL en las regiones mencionadas del hipocampo, cuyo marcaje identifica la magnitud del daño neuronal producido por ICGA.

d) Selección de la muestra:

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se utilizaron 5 ratas para cada grupo y tiempo de estudio: 24, 48, 72 h o 7 d post-isquemia. Este tamaño de muestra se determinó de acuerdo con la variabilidad que hemos encontrado en estudios previos en nuestro laboratorio con este mismo modelo de daño cerebral por isquemia en ratas, en cuanto al

resultado en diversas pruebas conductuales y a la población de neuronas piramidales en el hipocampo (Montes, 2005; Morali y cols., 2005).

CRITERIOS DE SELECCIÓN

- i. Criterios de inclusión
 - Pérdida del estado de conciencia durante la oclusión transitoria de las carótidas, después de la cauterización permanente de las arterias vertebrales.
 - Restitución del flujo de las arterias carótidas después del periodo de oclusión.
 - Mantenimiento del estado de inconsciencia al menos durante 10 min tras haber iniciado la reperfusión.
- ii. Criterios de no inclusión
 - Ausencia de la pérdida del estado de conciencia durante la oclusión transitoria de las carótidas.
 - Recuperación del estado de conciencia antes de transcurrir 10 min de iniciada la reperfusión.
 - Presentación de complicaciones quirúrgicas que limiten el aporte sanguíneo al cerebro después de liberar las carótidas de la oclusión, o el aporte de oxígeno por insuficiencia respiratoria.
- iii. Criterios de eliminación
 - Muerte o deterioro severo del estado de salud de los animales antes de la terminación del periodo de estudio.

e) Grupos experimentales:

Las ratas utilizadas en este estudio fueron sometidas a una de tres condiciones experimentales:

Grupo 1 (SHAM): Animales sometidos a maniobras quirúrgicas simuladas del modelo de ICGA (pero sin interrumpir el flujo sanguíneo cerebral de las arterias vertebrales ni de las carótidas).

Grupo 2 (ISQ + VEH): Ratas sometidas a un periodo de 10 min de isquemia cerebral global aguda mediante el modelo de “oclusión de los cuatro vasos”, que consiste en la cauterización permanente de las arterias vertebrales, oclusión transitoria de las arterias carótidas comunes y control de la circulación

colateral (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988), tratadas con el vehículo, β -ciclodextrina (C2485, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, EEUU) al 20% en agua inyectable iv, 0.5 mL, a los 15 min, 2, 6, 22, 46, y 70 h después del episodio de isquemia.

Grupo 3 (ISQ + P₄): Ratas sometidas a un periodo de 10 min de isquemia cerebral global aguda mediante el modelo de “oclusión de los cuatro vasos”, y tratadas con progesterona soluble en agua (P7556, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, EEUU) (8 mg/Kg, iv) a los 15 min, 2, 6, 22, 46, y 70 h después del episodio de isquemia.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL

El episodio de ICGA fue inducido de acuerdo al modelo de “oclusión de los 4 vasos” (4-VO) (Pulsinelli y Brierley, 1979; Pulsinelli y Buchan, 1988). Bajo anestesia con xilacina (10mg/Kg, im) y ketamina (90mg/Kg, im) se hizo una incisión en la piel de la nuca y se separaron los músculos por disección, en la línea media, hasta que se logra el acceso a las primeras vértebras cervicales. Se localizó a cada lado, en el foramen alar del atlas (primera vértebra cervical), la arteria vertebral y se cauterizó quedando ocluida permanentemente (Fig. 12a). A través de un acceso en la parte ventral del cuello, se localizaron las arterias carótidas comunes, se disecaron y se dejaron referidas mediante hilos de seda (calibre 000) para su acceso 48 h después. Se introdujo un hilo de seda quirúrgica gruesa (calibre 0) por detrás de la tráquea, esófago, carótidas y nervios vagos, pero por delante de la musculatura cervical y paravertebral; sus cabos se pasaron por debajo de la piel hasta salir por la incisión de la nuca. Se suturaron las heridas y se permitió la recuperación total del animal. Dos días después, bajo anestesia con sevoflurano, se tiró de los cabos de la seda gruesa a fin de comprimir la musculatura cervical y paravertebral, se abrió la incisión que permitía el acceso a las carótidas, se separaron del tejido adyacente. Inmediatamente, se ocluyeron ambas carótidas en forma simultánea durante 10 min, verificando bajo microscopio que el flujo haya quedado suspendido (Fig. 12b). Como consecuencia, la rata permanece inconsciente. Cumplido este periodo se quitaron los clips que ocluían el flujo y se verificó que éste se reiniciara. Se determinó la duración del periodo de

inconsciencia post-isquemia. Se retiró la seda gruesa y se suturó la herida, permitiendo la recuperación total del animal.

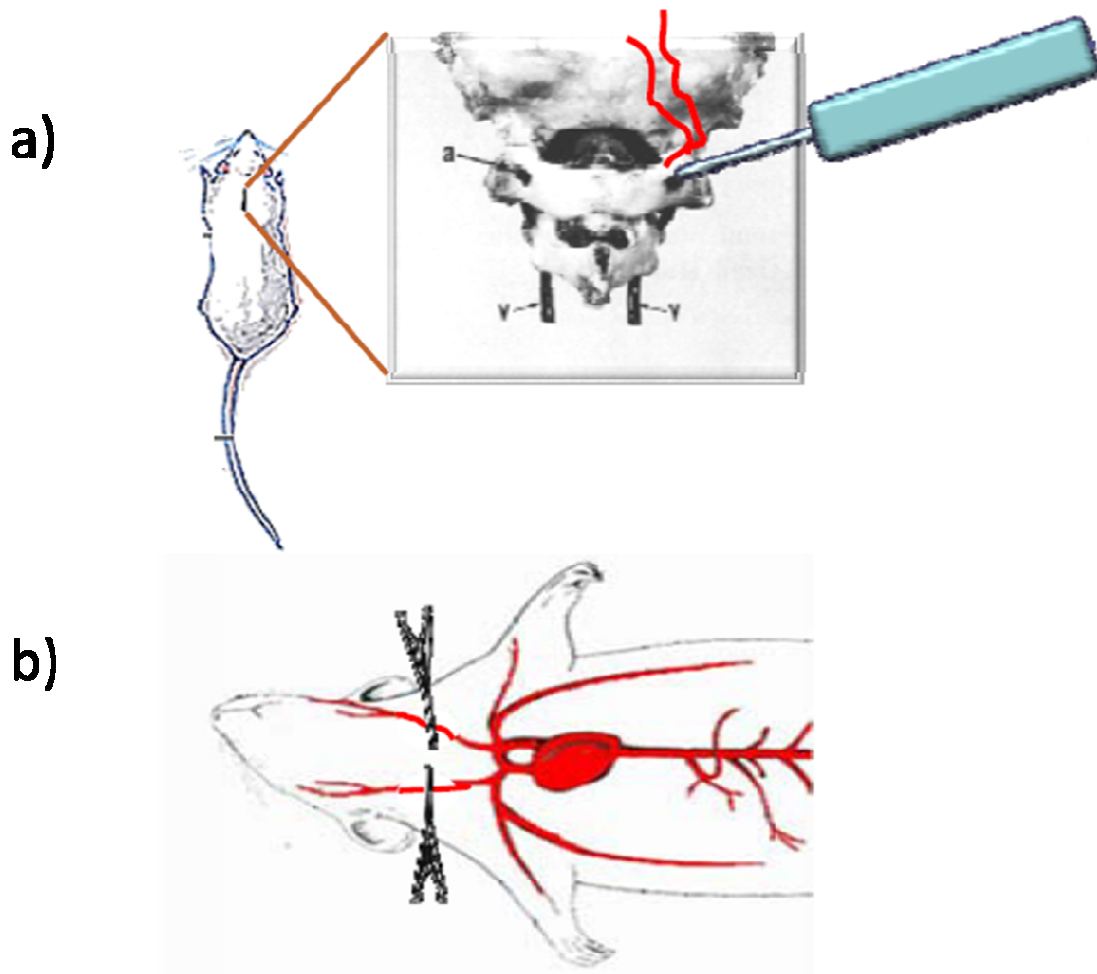


Figura 12. Modelo de ICGA. En la parte a) se esquematiza el procedimiento quirúrgico correspondiente a la cauterización permanente de las arterias vertebrales. En la parte b) se esquematiza la oclusión transitoria de las arterias carótidas comunes.

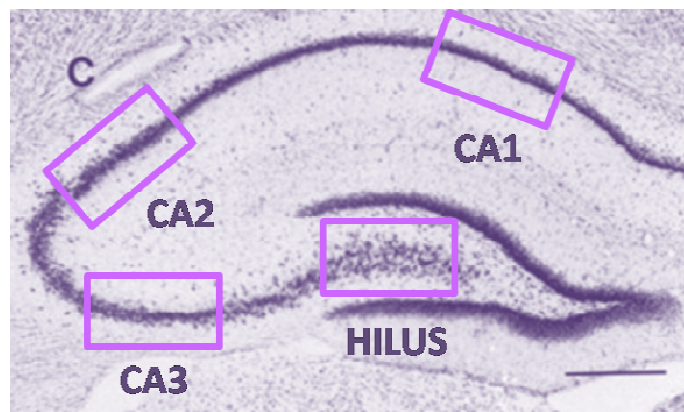
OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL

En cada grupo, las ratas fueron anestesiadas con una dosis letal de pentobarbital sódico (0.0945 g, ip) a las 24, 48, 72 h y 7 d post-isquemia. Sus cerebros fueron fijados por perfusión intracardiaca con una solución lavadora (ver anexo) seguida de paraformaldehído al 4% en salina en buffer de fosfatos (PBS, ver anexo). Los cerebros fueron removidos y post-fijados por inmersión en paraformaldehído por 24 h. De cada cerebro se obtuvo una rebanada coronal de 3 mm de grosor, en donde estuviera ubicado el hipocampo dorsal, entre las coordenadas Bregma -2.30 a -4.52 de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1986). Estas rebanadas fueron lavadas varias veces con PBS para eliminar el exceso de fijador, sumergiendo la rebanada en un

volumen de PBS 10 o 20 veces mayor que su volumen. Entonces, la rebanada se introdujo en el procesador de tejidos para su inclusión en parafina.

TÉCNICA DE NISSL

A partir de los bloques de parafina, se obtuvieron 3 cortes coronales de 10 μm de espesor por cada cerebro. Estos cortes se colocaron en un portaobjetos preparado con gelatina (ver anexo). Un día después, las laminillas se colocaron en una caja coplin con xilol y se desparafinaron dentro de la estufa a 60° C por 30 min, se hidrataron con etanol/agua a concentraciones decrecientes (100% 4 min, 96% 8 min, 96% 4 min, 70% 2 min) hasta 100% de agua destilada. Una vez hidratados, se tiñeron con violeta de cresilo (C5042, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, EEUU) al 0.1% en agua destilada, durante 10 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Una vez secas, las laminillas se humedecieron con xilol y se montaron con medio permanente (Entellan; OB467707, MERCK) cubriendo con cubreobjetos. Las laminillas fueron revisadas bajo microscopía de luz a 100x y a 400x. El número de neuronas en cada región del cuerno de Ammón del hipocampo fue evaluado en relación al área examinada (área = 70,000 μm^2). Las áreas examinadas fueron obtenidas de acuerdo a la ubicación de cada una de las regiones del cuerno de Ammón del hipocampo (Esquema 1).



Esquema 1. Diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo. Las áreas examinadas se muestran en recuadros morados.

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

- DETECCIÓN DE CASPASA-3 TOTAL

Para la detección de la Casp-3 total se utilizó la técnica de inmunohistoquímica de la peroxidasa, que se describe a continuación:

A partir de los bloques de parafina, se obtuvieron cortes de 4 μm de espesor. Estos cortes se colocaron en un portaobjetos (1 corte en cada portaobjetos junto con un corte del control positivo, ver adelante) previamente preparado con gelatina (ver anexo). Después de 24 h, las laminillas se desparafinaron dentro de una estufa a 60° C por 30 min sumergidas en una caja coplin con xilol y posteriormente, se rehidrataron con etanol/agua a concentraciones decrecientes (100%, 96% y 70%) hasta 100% de agua destilada. Para permeabilizar las células, las laminillas se sumergieron en citrato de sodio 0.01M pH 6 (0.294 g de citrato de sodio en 100 mL de agua destilada) y se calentaron a baño maría en el horno de microondas durante 15 min, se enjuagaron con agua destilada 5 min y se dejaron secar al aire. Para evitar el derrame de reactivos por fuera de la muestra, los tejidos fueron rodeados por un trazo con un lápiz hidrofóbico (S2002, Dako). Los portaobjetos se colocaron horizontalmente en una cámara húmeda (caja de metal con tapa, con soportes de vidrio para colocar los portaobjetos y una capa de agua destilada en el fondo que mantiene la humedad y evita la evaporación de reactivos); en esa posición se incubaron en forma sucesiva con los siguientes reactivos: peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada por 8 min, tritón (T9284, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, EEUU) al 3% en PBS (PBS-tritón) por 10 min, PBS 0.2 M por 10 min, albúmina sérica bovina (BSA; RPN412V, GE Health Care UK) al 5% en PBS-tritón durante 2 h, y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario policlonal hecho en cabra para la forma activa e inactiva (p20) de la Casp-3 a una dilución 1:100 (sc-1226, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Al día siguiente, se lavaron con PBS 0.2 M y se adicionó el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra hecho en caballo a una dilución 1:200 (BA-9500, Vector) en PBS-tritón y se incubó durante 2 h. Nuevamente se enjuagaron con PBS-tritón y se agregó el complejo avidina-biotina/peroxidasa (PK6100, Vector). Por último, los cortes se revelaron incubando unos minutos con diaminobencidina (K0679, DAKO), luego se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y se montaron con medio permanente (Entellan; OB467707, MERCK).

Las laminillas fueron observadas por microscopia de luz a 100x para ubicar la zona y evaluadas a 400x estimando el número de neuronas positivas a Casp-3 total, de cada región del cuerno de Ammón, en relación al área examinada (área = 70,000 μm^2).

- **DETECCIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA**

Para la detección de la Casp-3 activa, el procedimiento fue el mismo que se describió anteriormente, a excepción de que se incubó por 48 h con otro anticuerpo primario policlonal hecho en conejo que detectaba únicamente la forma activa (p17) de la Casp-3 a una dilución 1:20 (AB3623, CHEMICON) y el mismo anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo hecho en cabra, a una dilución 1:200 (BA-1000, Vector).

La marca se cuantificó, bajo microscopia de luz, estimando la densidad óptica promedio del total de neuronas piramidales inmunorreactivas a Casp-3 activa, de cada región del cuerno de Ammón, en áreas de 70,000 μm^2 .

TÉCNICA DE TUNEL (por sus siglas en inglés, Terminal deoxinucleotidil transferase mediated dUTP Nick End Labeling)

DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA

Se realizó el procedimiento antes descrito hasta la hidratación de los cortes. Posteriormente, se colocaron las laminillas en una cámara húmeda y se incubaron en forma sucesiva con los siguientes reactivos: 2 veces con PBS 0.2 M por 5 min, solución de Hank (14170, GIBCO) por 10 min, DAPI (1 μg /1mL de solución de Mc Ilvaine, ver anexo) por 10 min, proteinasa K (03115836001, ROCHE) 1:1000 (20 μg /mL) por 30 min, solución de bloqueo (0.3% de peróxido de hidrógeno en metanol) por 30 min en un vaso coplin, todo ello a temperatura ambiente; posteriormente se incubó con la solución de permeabilización (0.1% Tritón X-100 mL de PBS) 2 min a 4°C, y con la solución de TUNEL (10 μL de la enzima + 90 μL de la solución de nucleótidos marcados) (In Situ Cell Death Detection Kit, ROCHE) a 37°C en una estufa. Finalmente, las laminillas se montaron con medio de fluorescencia (53023, DAKO) y se colocaron en una charola cubiertas con papel de aluminio en el refrigerador hasta su observación. Para el análisis, se empleó un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) usando una longitud de onda de excitación

358 nm / emisión 461 nm para DAPI (azul) y de 490 nm / 520 nm para FITC (fluoresceína-5-isotiocianato, verde-amarillo). Las observaciones se realizaron a 100X, 160X y 600X capturando las imágenes mediante el software Image Pro Plus 5.1. Se evaluó el número de neuronas positivas a TUNEL a una amplificación de 200X de cada región del cuerno de Ammón en relación al área examinada (143,401 μm^2).

Nota: La adición de DAPI, si bien no es parte esencial de la técnica de TUNEL, no interfiere con ella y, al marcar los núcleos celulares, facilita la identificación de las áreas del hipocampo para su evaluación.

CONTROL POSITIVO PARA INMUNOHISTOQUÍMICA Y TUNEL

Para validar la técnica inmunohistoquímica (comprobar la reactividad de los anticuerpos) y la técnica de TUNEL, se deben procesar junto con las muestras experimentales, tejidos que actúen como controles positivos, en los que se presente la marca que se busca.

Se sabe que la exposición al alcohol durante el desarrollo del cerebro puede causar un síndrome neurológico denominado Síndrome Alcohólico Fetal. El etanol induce muerte neuronal apoptótica en etapas específicas del desarrollo, particularmente durante el periodo de sinaptogénesis, el cual ocurre a partir del inicio del tercer trimestre de la gestación y continúa por varios años después del nacimiento en humanos, mientras que en roedores esto ocurre en las primeras dos semanas post-natales (Ikonomidou y cols., 2000; Olney y cols., 2000; Olney y cols., 2002). En ratas o en ratones de 4 a 7 días de edad, la administración de una dosis alta de etanol (al 20%) induce la activación de la Casp-3 (Olney y cols., 2002; Han y cols., 2005) y muerte neuronal apoptótica en el cerebro anterior (Bonthius y cols., 1990; Olney y cols., 2000; Young y cols., 2003) a través de un mecanismo dual que incluye el bloqueo de los receptores de Glu de tipo NMDA, y una excesiva activación de los receptores GABA_A (Miller, 1996; Ikonomidou y cols., 2000; Olney y cols., 2000; Olney y cols., 2002), que en esta etapa del desarrollo son excitatorios.

Por lo tanto, se obtuvo el cerebro de ratas de 7 a 9 días de edad tratadas con el siguiente esquema de administración: dos dosis de etanol al 20% (6.0 g/Kg, sc) con 2 h de diferencia y perfundidas 12 h después de la primera administración de etanol (Han y cols., 2005).

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS

La población de neuronas piramidales remanentes se analizó contando el número de neuronas sanas teñidas con la técnica de Nissl (neuronas con morfología normal, con citoplasma y núcleo bien definidos, con contenido claro y nucléolo visible), observadas en áreas de 70,000 μm^2 de cada región del cuerno de Ammón en los dos hemisferios en 2 cortes del hipocampo de cada rata de cada grupo experimental.

Para evaluar la inmunorreactividad (IR) a Casp-3 activa se analizó evaluando la densidad promedio de cada subpoblación de neuronas inmunorreactivas a este marcador, observadas en áreas de 70,000 μm^2 , tanto en neuronas sanas (con morfología normal), como en neuronas con signos morfológicos de daño (encogimiento del cuerpo neuronal, con contenido oscuro y forma romboidal), la cual fue discriminada del valor de fondo (background) específico de cada laminilla. La densidad óptica se cuantificó utilizando un sistema de análisis de imágenes (MetaMorph Imaging System 4.5, Universal Imaging Corp.). En cada región del cuerno de Ammón en los dos hemisferios, en 2 cortes del hipocampo de cada animal, a cada uno de los tiempos y en cada condición experimental. El número de neuronas positivas a TUNEL fue evaluado bajo microscopio de fluorescencia, en áreas de 143,401 μm^2 de cada región del cuerno de Ammón, en los dos hemisferios, en cada rata de los diferentes grupos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las comparaciones de cada parámetro entre los grupos, para cada tiempo de estudio, se realizó un ANOVA de Kruskal-Wallis seguido de la prueba *U* de Mann-Whitney (Siegel, 1956; Daniel, 2004).

VII. RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA POBLACIÓN NEURONAL

En los animales sometidos a maniobras quirúrgicas simuladas (sham), no se encontraron neuronas con morfología de daño en ninguna de las regiones del cuerno de Ammón del hipocampo, a ningún tiempo post-manipulación.

La ICGA indujo una pérdida significativa de neuronas piramidales principalmente en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, la cual se manifestó a las 72 h y a los 7 d post-isquemia, existiendo diferencias entre los tres grupos experimentales en ambos periodos de tiempo ($H= 11.94$, $p<0.01$; $H= 9.02$, $p<0.05$, respectivamente) pero no en los tiempos más cortos. En los animales del grupo ISQ + VEH se observó una pérdida neuronal significativa ($p<0.01$) en las regiones CA1 y CA2 con sólo 19.5% de neuronas remanentes en CA1 y 52% en CA2 a las 72 h en comparación con la población de los animales del grupo Sham considerada como el 100% (Tabla 5; Figs. 13, 14 y 15). A los 7 d se observó una pérdida neuronal también significativa ($p<0.05$) en CA1 (Tabla 5, Fig. 14), con sólo 13.3% de neuronas remanentes en comparación con el grupo Sham, de modo que en algunos sujetos se observaron muy pocas neuronas piramidales sanas, predominando las neuronas dañadas, con abundante microglía (Fig. 13-7 d), mientras que en otros, se observaron tanto neuronas sanas como neuronas dañadas (Fig. 13-7 d*).

La ICGA no tuvo un efecto significativo sobre la población neuronal de la región CA3 (Tabla 5 y Fig. 16), y sólo provocó una pérdida parcial de las neuronas del *hilus* del giro dentado ($p<0.05$), pero no a los 7 d en comparación con el grupo Sham (Tabla 5 y Fig. 17).

El tratamiento con P_4 no modificó los efectos de la isquemia sobre la población neuronal del cuerno de Ammón del hipocampo, no existiendo diferencias significativas entre este grupo y el tratado con vehículo en ninguna de las regiones del cuerno de Ammón del hipocampo, a ningún tiempo post-isquemia (Tabla 5; Figs. 13, 14, 15, 16 y 17).

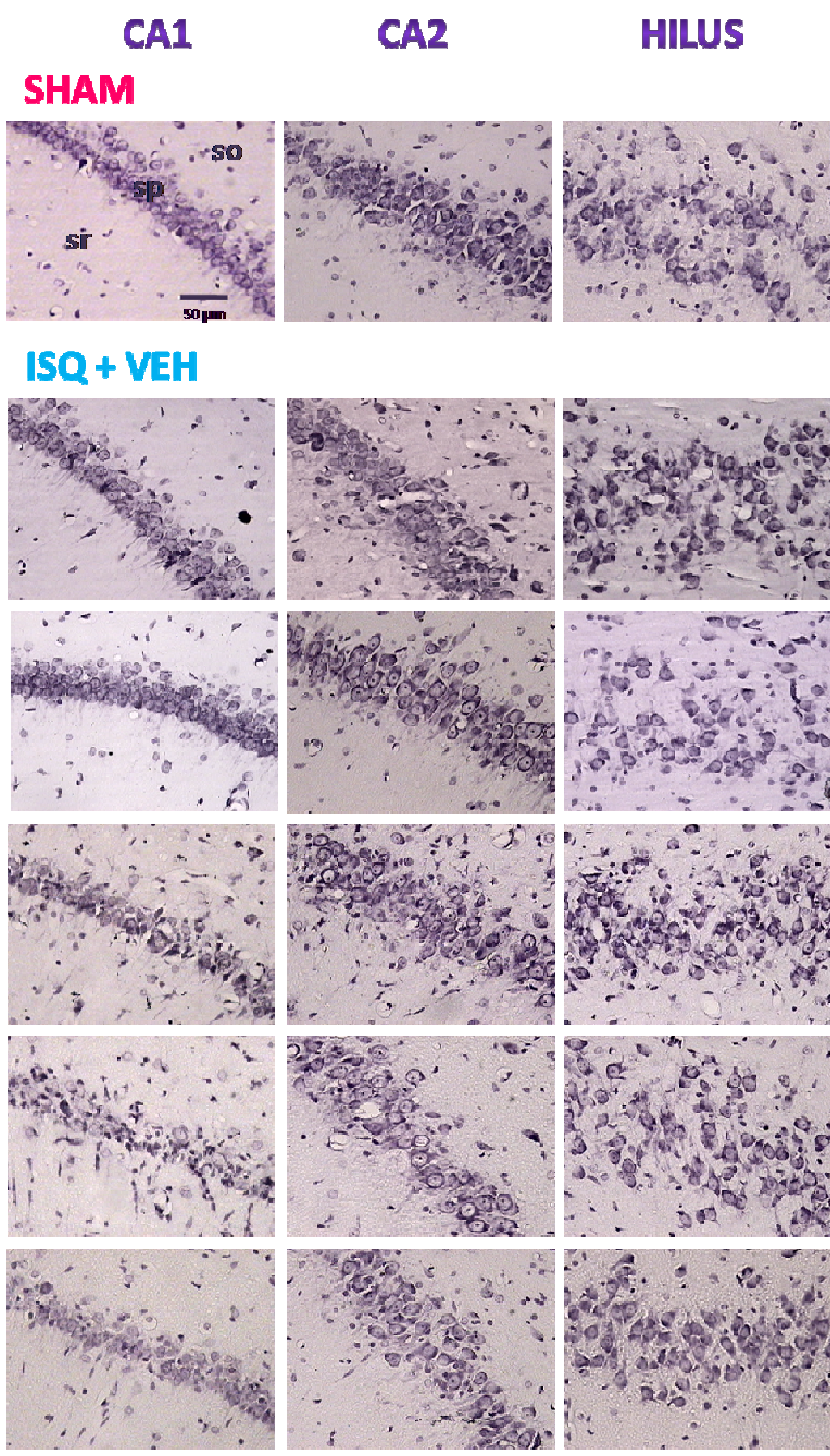


Figura 13. Ver página siguiente.

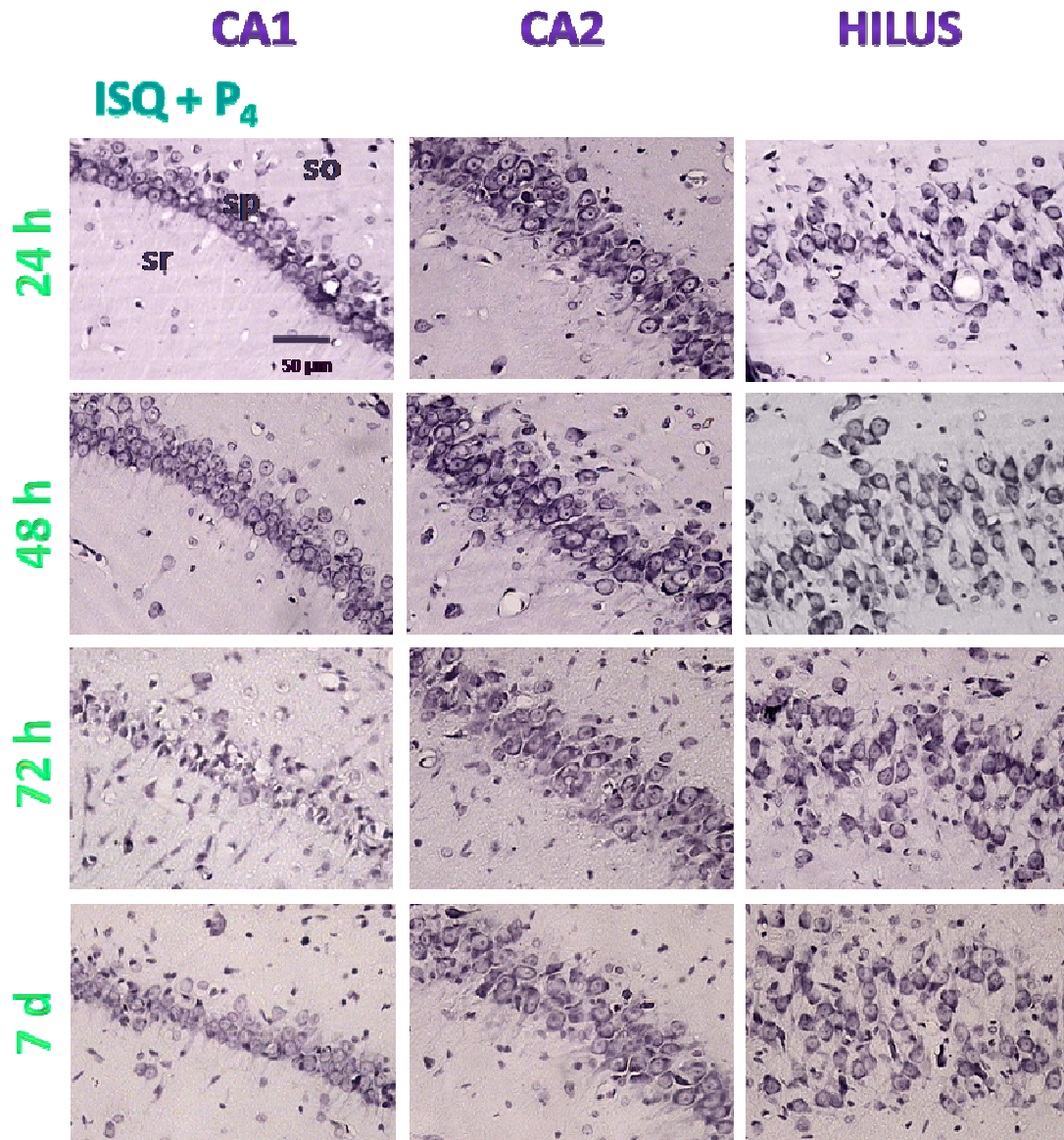


Figura 13. Población neuronal remanente en las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo de ratas sometidas a manipulaciones sham (página anterior), o a isquemia y tratadas con vehículo (ISQ + VEH) (página anterior) o con progesterona (ISQ + P₄). Se observa el daño neuronal y la pérdida severa de neuronas piramidales sanas en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo en función del tiempo post-isquemia, especialmente a partir de las 72 h post-isquemia, y la disminución sólo parcial de la población neuronal en CA2 y el *hilus* del giro dentado. Estrato piramidal (sp), estrato oriens (so), estrato radiado (sr). Amplificación: 400X.

Tabla 5. Número (Media \pm EE) de neuronas piramidales contadas en un área de 70,000 μm^2 de cada región del cuerno de Ammón del hipocampo, de las ratas de las 3 condiciones experimentales, a los diferentes tiempos post-isquemia.

Tiempo post-isquemia	GRUPO	CA1	CA2	CA3	HILUS
24 h	SHAM	58.5 \pm 0.6 (100)	48.6 \pm 0.9 (100)	39.3 \pm 1.8 (100)	59.7 \pm 1.0 (100)
	ISQ + VEH	56.0 \pm 1.0 (96)	51.5 \pm 0.5 (106)	38.0 \pm 1.6 (97)	59.7 \pm 0.9 (100)
	ISQ + P ₄	57.0 \pm 0.8 (97)	48.7 \pm 1.9 (100)	38.3 \pm 1.2 (98)	60.5 \pm 0.7 (101)
48 h	SHAM	58.5 \pm 0.6 (100)	48.6 \pm 0.9 (100)	35.5 \pm 1.1 (100)	59.7 \pm 1.0 (100)
	ISQ + VEH	57.7 \pm 0.9 (99)	48.3 \pm 1.5 (99)	40.0 \pm 1.2 (113)	54.0 \pm 3.1 (91)
	ISQ + P ₄	57.5 \pm 1.2 (98)	48.8 \pm 1.5 (100)	36.8 \pm 4.4 (104)	57.8 \pm 2.0 (97)
72 h	SHAM	57.5 \pm 0.7 (100)	47.7 \pm 1.2 (100)	34.7 \pm 1.4 (100)	58.8 \pm 1.4 (100)
	ISQ + VEH	11.2 \pm 3.1 ** (20)	24.7 \pm 6.8 ** (52)	39.5 \pm 2.3 (114)	47.5 \pm 3.2 * (81)
	ISQ + P ₄	6.3 \pm 2.1 ** (11)	26.5 \pm 4.4 ** (56)	34.3 \pm 2.5 (99)	42.7 \pm 7.9 * (73)
7 d	SHAM	60.0 \pm 0.4 (100)	50.0 \pm 0.9 (100)	43.5 \pm 0.9 (100)	61.0 \pm 1.1 (100)
	ISQ + VEH	8.0 \pm 2.5 * (13)	34.3 \pm 8.2 (69)	39.5 \pm 1.3 (91)	53.5 \pm 4.0 (88)
	ISQ + P ₄	31.8 \pm 9.2 * (53)	34.0 \pm 6.0 * (68)	38.4 \pm 1.5 (88)	47.0 \pm 3.7 * (77)

Los números entre paréntesis son los porcentajes en relación a los valores del grupo Sham. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo Sham. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

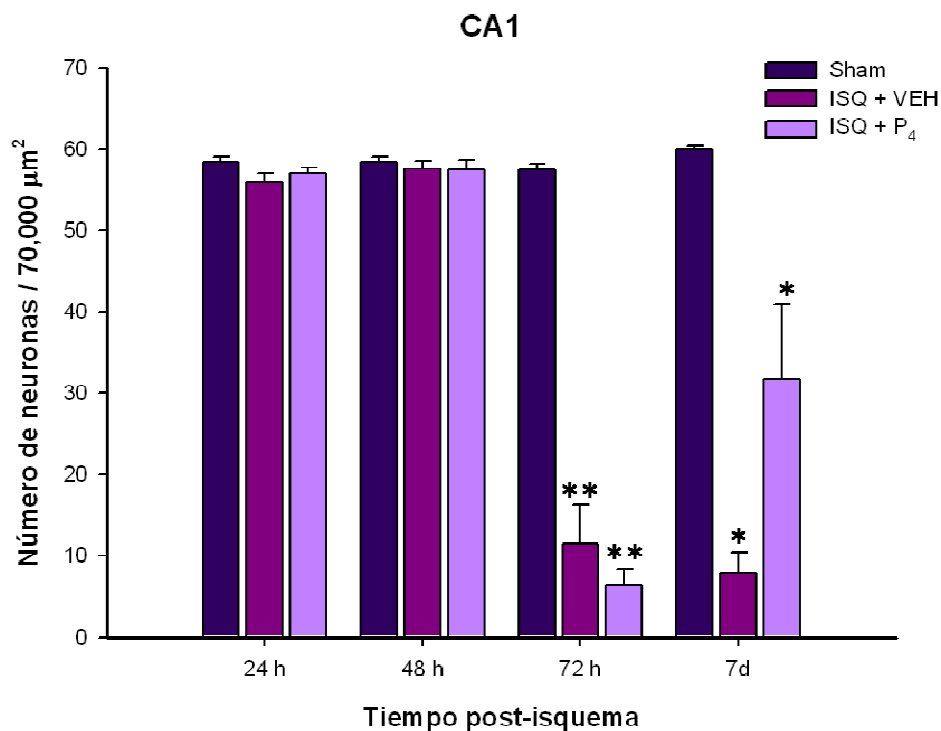


Figura 14. Población de neuronas piramidales en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo en los diferentes tiempos post-isquemia. La población disminuyó significativamente a partir de las 72 h post-isquemia, tanto en el grupo tratado con vehículo (ISQ + VEH), como con progesterona (ISQ + P₄). Media \pm EE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo Sham. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

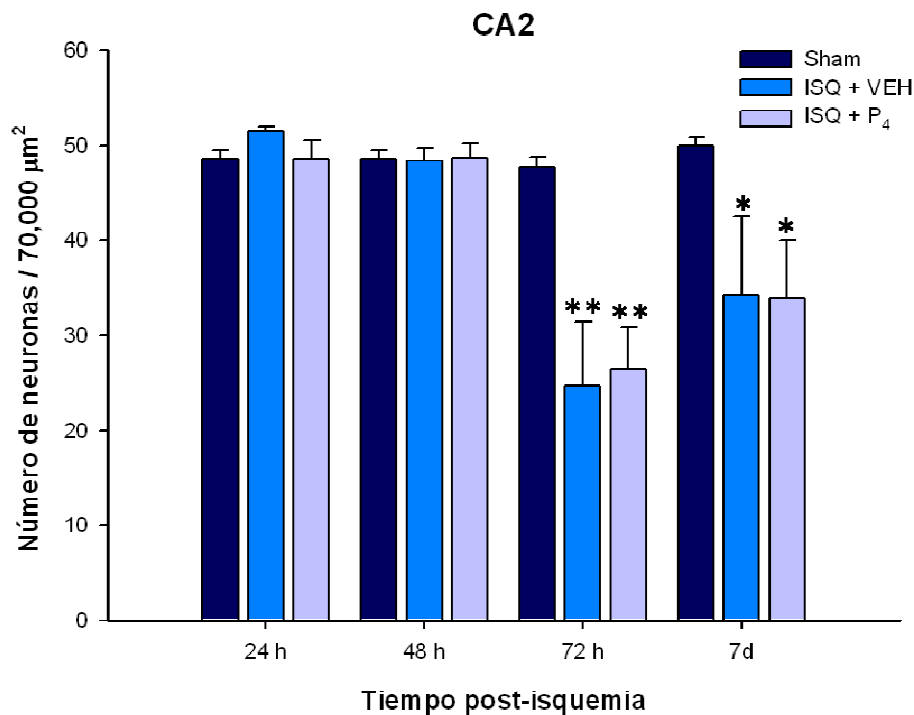


Figura 15. Población de neuronas piramidales en la región CA2 del cuerno de Ammón del hipocampo en los diferentes tiempos post-isquemia. La población disminuyó significativamente a partir de las 72 h post-isquemia, tanto en el grupo tratado con vehículo (ISQ + VEH), como con progesterona (ISQ + P₄). Media ± EE. **p*<0.05, ***p*<0.01 en comparación con el grupo Sham. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

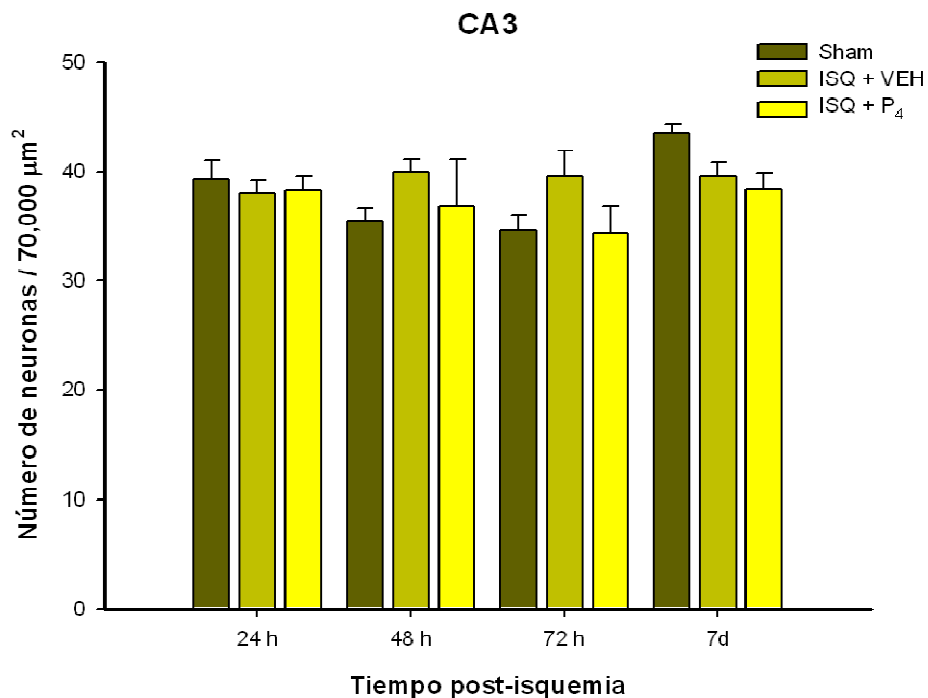


Figura 16. Población de neuronas piramidales en la región CA3 del cuerno de Ammón del hipocampo en los diferentes tiempos post-isquemia. La isquemia no modificó la población de neuronas piramidales de esta región. Media ± EE. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

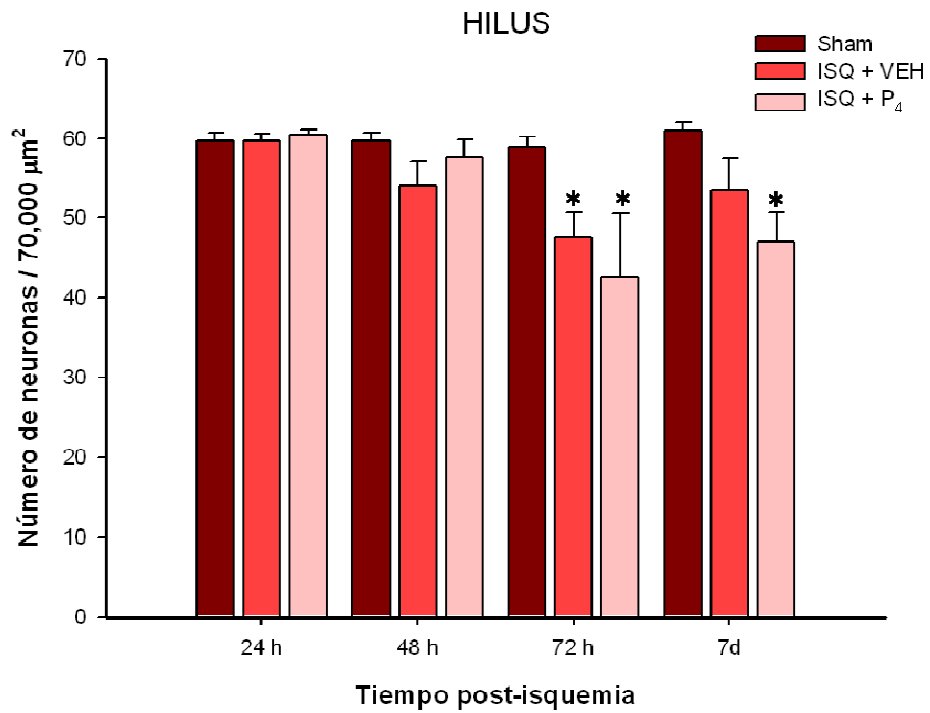


Figura 17. Población de neuronas piramidales en el *hilus* del cuerno de Ammón del hipocampo en los diferentes tiempos post-isquemia. La población disminuyó sólo en forma parcial a partir de las 72 h post-isquemia, en el grupo tratado con vehículo (ISQ + VEH), y con progesterona (ISQ + P₄). Media ± EE. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo Sham. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

2. EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA CASP-3 TOTAL

i. Validación de la técnica inmunohistoquímica

En los cerebros de ratas neonatas tratadas con etanol, utilizados como control positivo para la validación de que las células dañadas fueran inmunorreactivas a Casp-3 total, efectivamente se encontraron neuronas inmunorreactivas en la corteza cerebral. La mayor IR se observó en la capa II de la corteza occipital (Fig. 18).

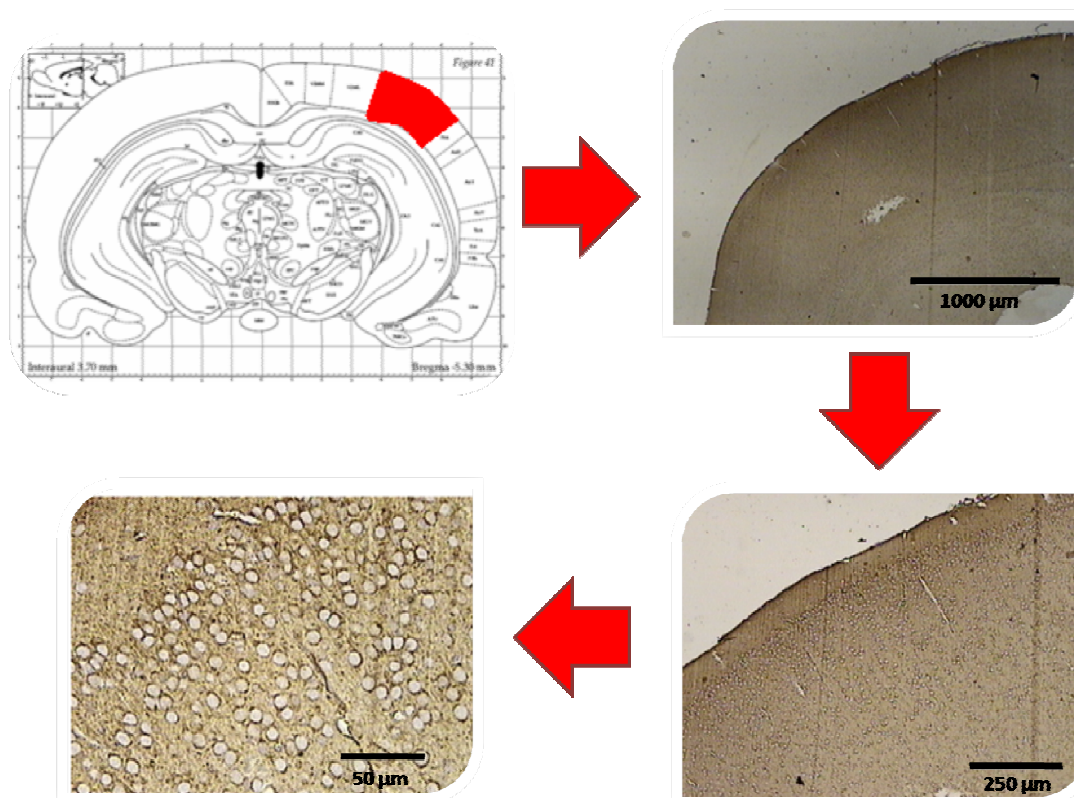


Figura 18. Inmunorreactividad a Casp-3 total (marca café alrededor del núcleo, en el citoplasma de las neuronas) de la corteza cerebral de ratas neonatas tratadas con etanol (control positivo). La zona de la corteza con mayor IR se resalta en rojo en el diagrama. Amplificaciones: 40X, 100X y 400X, respectivamente.

ii. Efecto de la isquemia sobre la Casp-3 total

La ICGA indujo un incremento en la IR a Casp-3 total (p20) en comparación con los animales del grupo Sham, en las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo, el cual se manifestó a partir de las 72 h post-isquemia, en las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA3 e *hilus*, pero no a tiempos más cortos. La IR se observó principalmente en neuronas sanas de esas regiones, pero también se observó en algunas neuronas dañadas de la región CA3 (Fig. 19).

iii. Efecto de P₄ sobre la Casp-3 total

El tratamiento con P₄ no tuvo efecto aparente sobre la IR a Casp-3 total después de ICGA (Fig. 19).

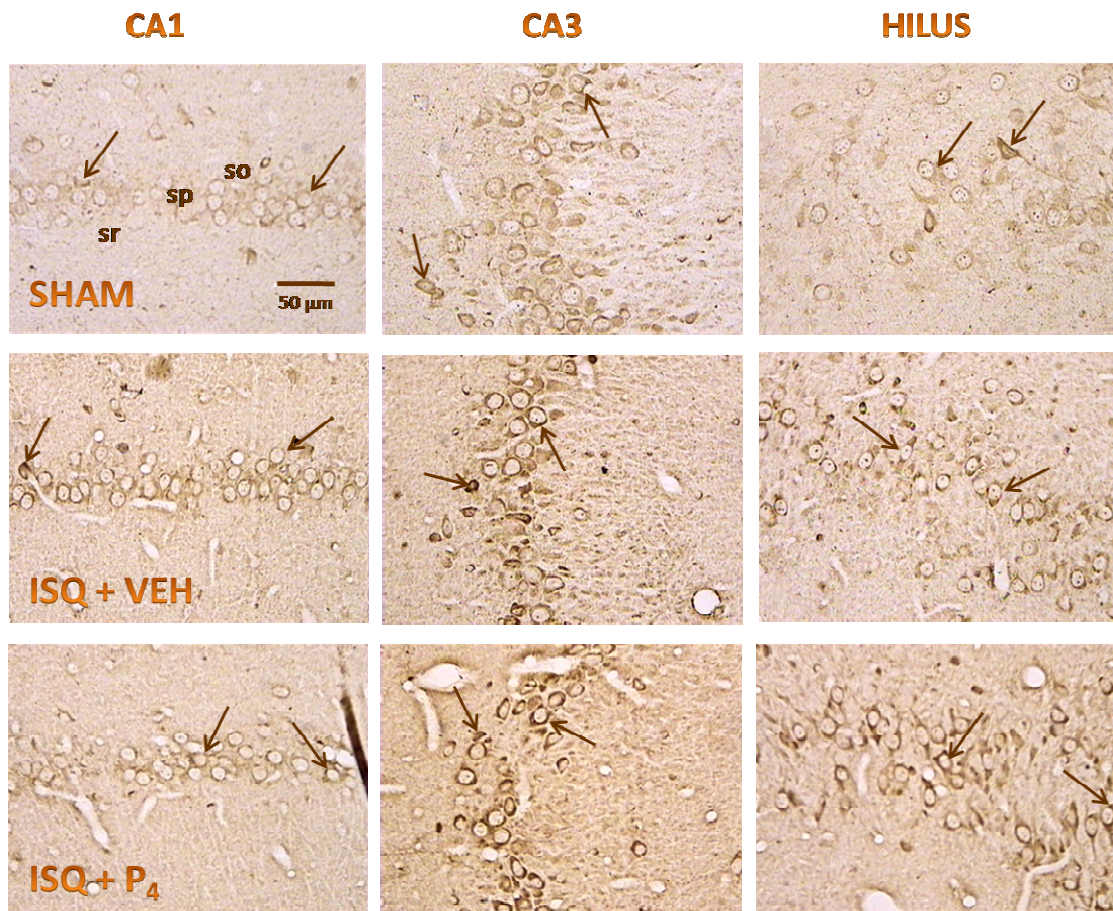


Figura 19. Inmunorreactividad a Casp-3 total (marca café alrededor del núcleo, en el citoplasma de las neuronas) en las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo de las ratas, a las 72 h de ser sometidas a manipulaciones sham, o a isquemia y tratadas con vehículo (ISQ + VEH) o con progesterona (ISQ + P₄) a 72 h post-isquemia. La IR a Casp-3 total en las neuronas piramidales de CA1, CA3 e *hilus* (señalada con flechas), se incrementó tanto en el grupo ISQ + VEH, como ISQ + P₄, en comparación con el grupo Sham, y se observó principalmente en neuronas sanas de esas regiones y algunas dañadas en CA3 (señaladas con flechas). Estrato piramidal (sp), estrato oriens (so), estrato radiado (sr). Amplificación: 400X.

3. EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA CASP-3 ACTIVA

i. Validación de la técnica inmunohistoquímica

Para la validación de la IR a Casp-3 activa (p17), se procesaron los controles positivos y de igual forma se encontraron neuronas inmunorreactivas en la corteza cerebral. Sin embargo, a diferencia de la IR a Casp-3 total, sólo algunas de esas neuronas fueron inmunorreactivas a la forma activa de la Casp-3 (Fig. 20).

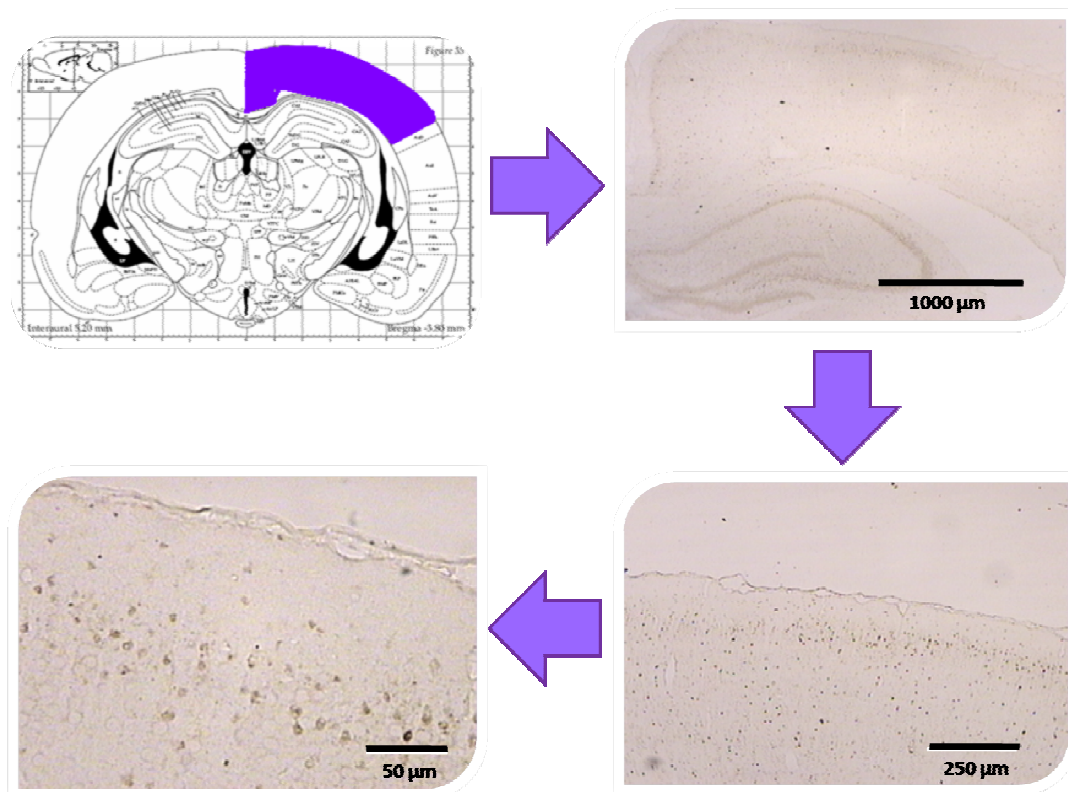


Figura 20. Inmunorreactividad a Casp-3 activa (marca café en el citoplasma de las neuronas) en la corteza cerebral de ratas neonatas tratadas con etanol (control positivo). La zona de la corteza con mayor IR se resalta en morado en el diagrama. Amplificaciones: 40X, 100X y 400X, respectivamente.

ii. Efecto de la isquemia sobre la IR a Casp-3 activa

En contraste con la IR a Casp-3 total, la IR a Casp-3 activa (p17) después de ICGA fue muy escasa y se observó únicamente en las neuronas piramidales de la regiones CA1 y CA3 del cuerno de Ammón del hipocampo, a partir de las 72 h post-isquemia pero no en los tiempos más cortos (Figs. 21 y 22). La IR en CA1 se observó en neuronas con características morfológicas de daño, mientras que en CA3 se observó en neuronas sanas tanto a las 72 h como a los 7 d post-isquemia (Fig. 21 y 22). En comparación con los animales del grupo Sham, la ICGA indujo un incremento ligero, pero significativo ($p < 0.05$), en la IR a Casp-3 activa en la región CA1 a las 72 h, mientras que en CA3 no hubo diferencias entre los grupos (Tabla 6; Figs. 23 y 24). A los 7 d post-isquemia se detectó una IR de menor intensidad (menor densidad óptica promedio) que a las 72 h en la región CA1, y de una intensidad similar en las neuronas piramidales sanas de la región CA3, sin diferencias entre los grupos experimentales (Tabla 6; Figs. 23 y 24).

Otros tipos celulares, con diferente morfología y menor tamaño que las neuronas piramidales, posiblemente células gliales, presentaron también IR a Casp-3 activa (Figs. 21 y 22). Esta marca se consideró inespecífica, ya que se encontró en todas las condiciones experimentales y a los diferentes tiempos analizados.

iii. Efecto de P₄ sobre la IR a Casp-3 activa

El tratamiento con P₄ no tuvo efecto sobre el incremento de la IR a Casp-3 activa provocado por la ICGA, ya que se presentó la misma intensidad de marca que en el grupo ISQ + VEH a las 72 h post-isquemia (Tabla 6; Figs. 21 y 23).

Tabla 6. Densidad óptica (Media ± EE) de las neuronas piramidales inmunorreactivas a Casp-3 activa en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, de las ratas de cada una de las condiciones experimentales a las 72 h y a los 7 d post-isquemia. Como comparación se presenta la densidad óptica del control positivo (neuronas piramidales de la corteza occipital de neonatos tratados con etanol).

Tiempo post-isquemia	GRUPO	CA1	CA3	CONTROL POSITIVO
72 h	SHAM	0.0064 ± 0.0064 (100)	0.0360 ± 0.0194 (100)	0.2173 ± 0.0260
	ISQ + VEH	0.0174 ± 0.0032 * (272)	0.0633 ± 0.0125 (176)	
	ISQ + P ₄	0.0219 ± 0.0044 * (342)	0.0480 ± 0.0102 (133)	
7 d	SHAM	0.0002 ± 0.0002 (100)	0.0401 ± 0.0168 (100)	0.2173 ± 0.0260
	ISQ + VEH	0.0014 ± 0.0014 (700)	0.0301 ± 0.0101 (75)	
	ISQ + P ₄	0.0003 ± 0.0003 (150)	0.0475 ± 0.0344 (118)	

Los números entre paréntesis son los porcentajes en relación a los valores del grupo Sham tomado como 100%. **p*<0.05 en comparación con el grupo ISQ + VEH. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

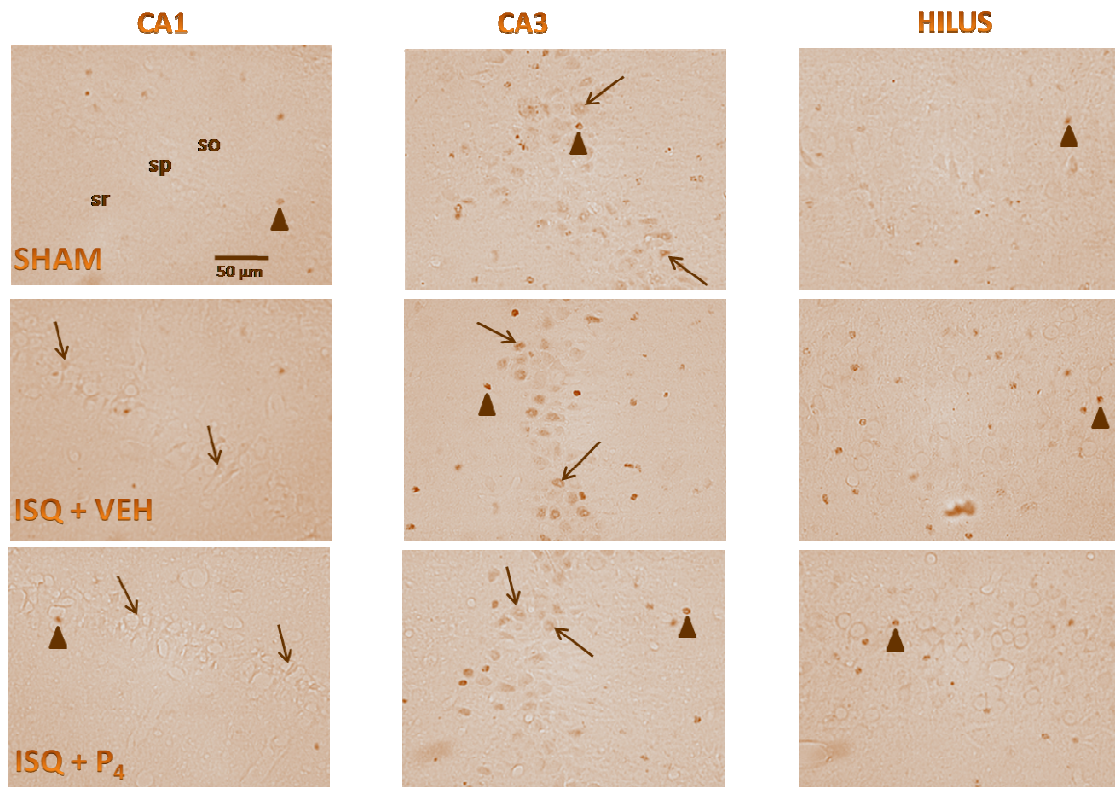


Figura 21. Inmunorreactividad a Casp-3 activa (marca café en el citoplasma de las neuronas) en las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo de las ratas, a las 72 h de ser sometidas a manipulaciones sham, o a isquemia y tratadas con vehículo (ISQ + VEH) o con progesterona (ISQ + P₄). Se observa una escasa, pero mayor IR en las neuronas piramidales dañadas de CA1 (señaladas con flechas), de los grupos sometidos a isquemia (ISQ + VEH e ISQ + P₄) en comparación con el grupo Sham; la marca se observó también en neuronas sanas de CA3 (señaladas con flechas), sin diferencias entre los grupos. Se observa IR inespecífica, en otras células (señaladas con cabezas de flecha). Estrato piramidal (sp), estrato oriens (so), estrato radiado (sr). Amplificación: 400X.

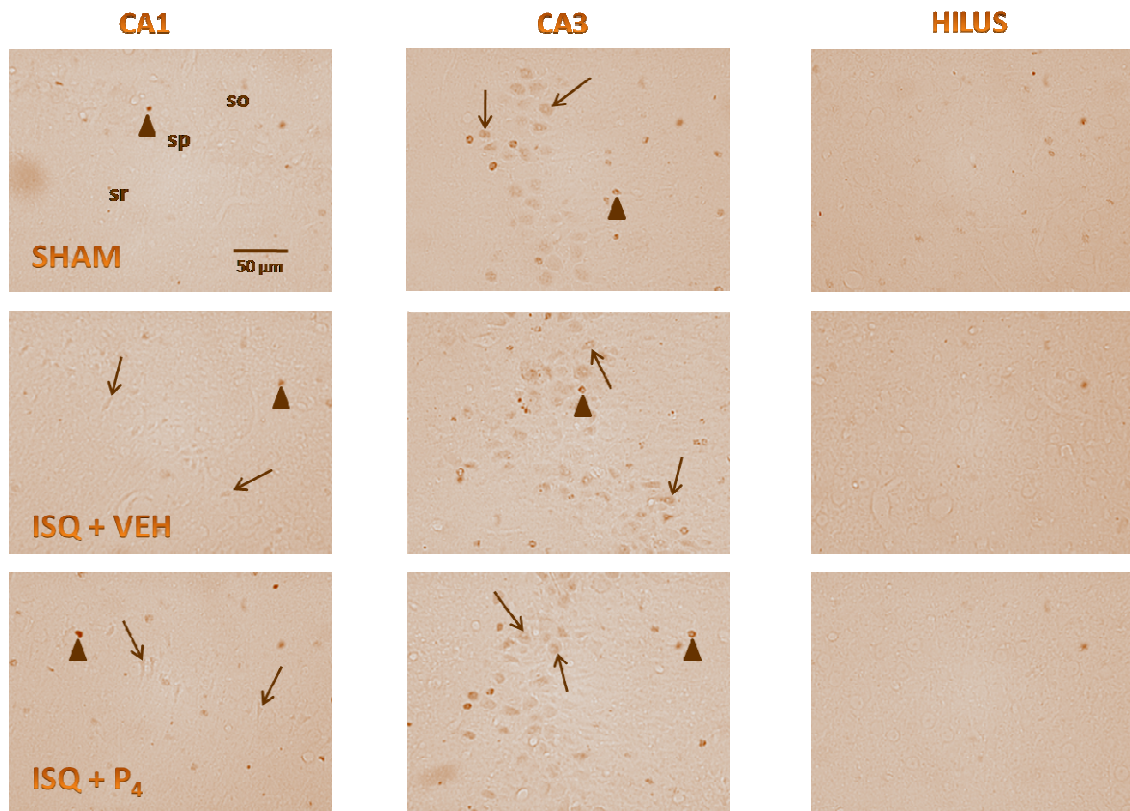


Figura 22. Inmunorreactividad a Casp-3 activa en las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo de las ratas, a los 7 d de ser sometidas a manipulaciones sham, o a isquemia y tratadas con vehículo (ISQ + VEH) o con progesterona (ISQ + P₄). Se observó IR en algunas neuronas piramidales dañadas de CA1 (señaladas con flechas), tanto en el grupo ISQ + VEH, como ISQ + P₄, en comparación con el grupo Sham, así como en neuronas sanas de CA3 (señaladas con flechas), de las tres condiciones experimentales, sin diferencias entre ellas. Se observa IR inespecífica, en otras células (señaladas con cabezas de flecha). Estrato piramidal (sp), estrato oriens (so), estrato radiado (sr). Amplificación: 400X.

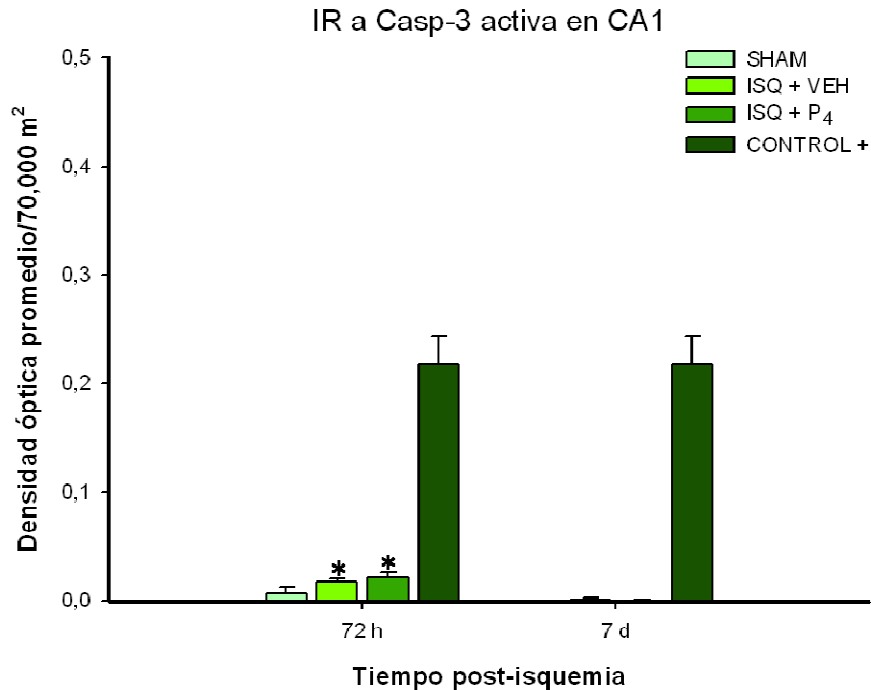


Figura 23. Densidad óptica promedio (Media \pm EE) de las neuronas piramidales inmunorreactivas a Casp-3 activa de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, de las ratas de las tres condiciones experimentales a las 72 h y a los 7 d post-isquemia. La IR a Casp-3 activa fue significativamente mayor tanto en el grupo tratado con vehículo (ISQ + VEH), como con progesterona (ISQ + P₄) en comparación con el grupo Sham a las 72 h post-isquemia; mientras que a los 7 d post-isquemia la marca ya no se presentó en ninguno de los tres grupos experimentales. Como comparación se presenta la densidad óptica de las neuronas del control positivo (CONTROL+). * $p < 0.05$ en comparación con el grupo Sham. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

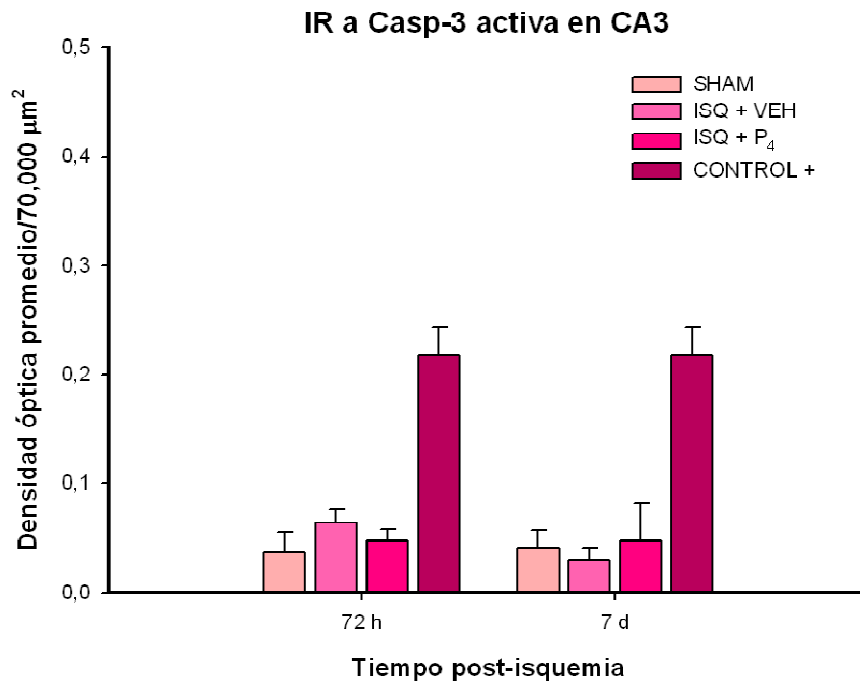


Figura 24. Densidad óptica promedio (Media \pm EE) de las neuronas piramidales inmunorreactivas a Casp-3 activa de la región CA3 del cuerno de Ammón del hipocampo, de las ratas de las tres condiciones experimentales, a las 72 h y 7 d post-isquemia. La isquemia no modificó la IR a Casp-3 activa de esta región. Como comparación se presenta la densidad óptica de las neuronas del control positivo (CONTROL+). Pruebas *U* de Mann-Whitney.

4. EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA

i. Validación de la técnica de TUNEL

En los cerebros de ratas neonatas tratadas con etanol, utilizados como control positivo para la validación del procedimiento de determinación de la fragmentación del DNA en neuronas dañadas mediante la técnica de TUNEL, se encontraron neuronas positivas a esta técnica en la corteza cerebral, principalmente en la corteza occipital (Fig. 25).

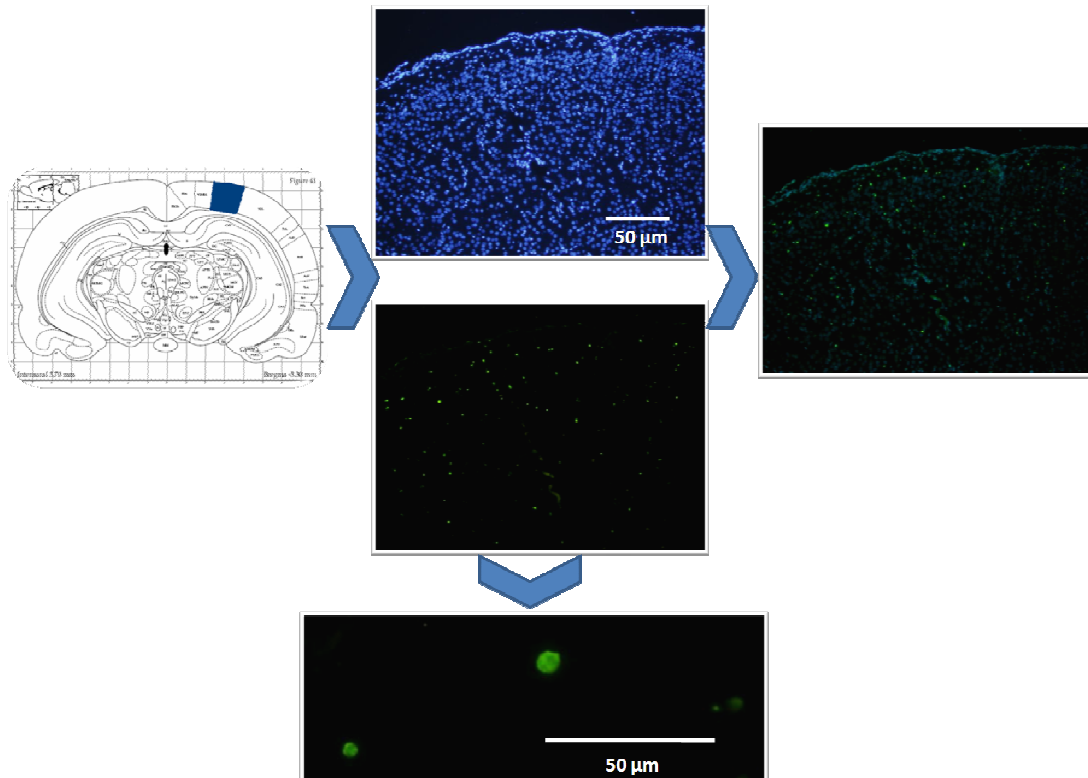


Figura 25. Fragmentación del DNA en la corteza cerebral de ratas neonatas tratadas con etanol (control positivo). La zona de la corteza con el mayor número de neuronas positivas a TUNEL (núcleos neuronales en verde) se resalta en azul en el diagrama. Amplificaciones: 100X y 600 X, respectivamente.

ii. Efecto de la isquemia sobre la fragmentación del DNA

No se encontraron neuronas positivas a TUNEL en el grupo Sham (Tabla 7); en cambio, en el grupo ISQ+VEH un gran número de las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo fueron positivas a TUNEL a las 72 h post-isquemia y en menor proporción, a los 7 días post-isquemia (Tabla 7 y Fig. 26). La mayoría de las neuronas positivas a TUNEL mostraron características morfológicas de daño (encogimiento del soma, núcleo condensado) (Fig. 26).

iii. Efectos de P₄ sobre la fragmentación del DNA

El tratamiento con P₄ redujo el número de neuronas piramidales positivas a TUNEL en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo en comparación con el grupo ISQ+VEH a las 72 h y 7 d post-isquemia, pero esta reducción sólo fue significativa ($p < 0.05$) a los 7 d post-isquemia (Tabla 7; Figs. 26 y 27).

Tabla 7. Número (Media \pm EE) de neuronas piramidales positivas a TUNEL en un área de 143,401 μm^2 de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, de las ratas de las tres condiciones experimentales, a las 72 h y a los 7 d post-isquemia.

Tiempo post-isquemia	GRUPO	CA1
72 h	SHAM	0 (0)
	ISQ + VEH	34.3 \pm 3.9 (100)
	ISQ + P ₄	27.5 \pm 0.3 (80)
7 d	SHAM	0 (0)
	ISQ + VEH	27.3 \pm 1.4 (100)
	ISQ + P ₄	15.8 \pm 4.3 (58)*

Los números entre paréntesis son los porcentajes en relación a los valores del grupo de ratas sometidas a isquemia y tratadas con vehículo (ISQ + VEH). * $p < 0.05$ en comparación con el grupo ISQ + VEH. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

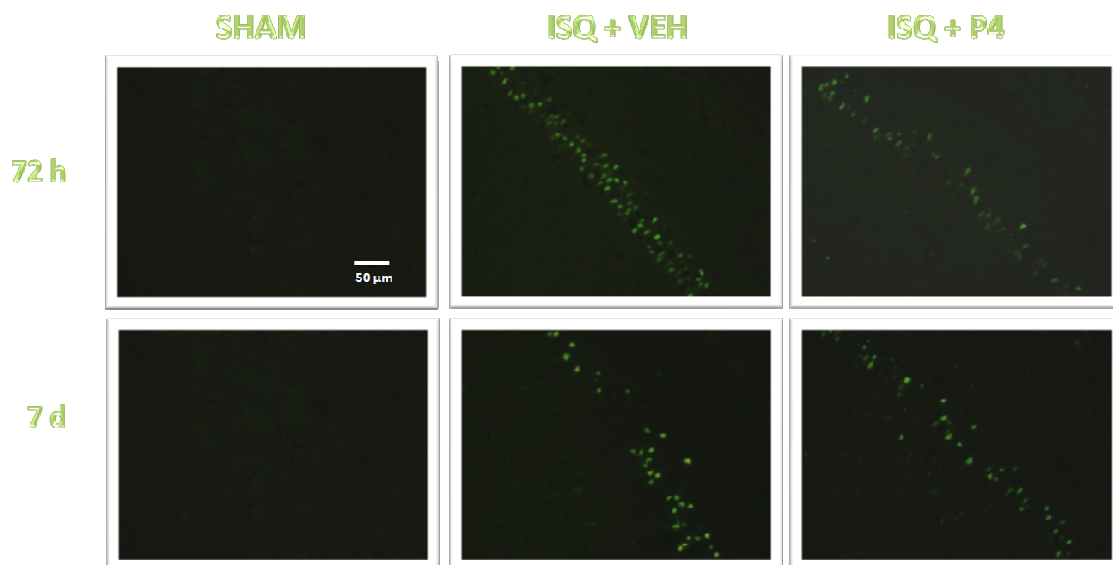


Figura 26. Fragmentación del DNA en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo de ratas sometidas a manipulaciones sham, o a isquemia y tratadas con vehículo (ISQ + VEH) o con progesterona (ISQ + P₄) a 72 h y 7 d post-isquemia. La marca de TUNEL se observó únicamente en las neuronas piramidales de la región CA1 (núcleos neuronales en verde), tanto en el grupo ISQ + VEH, como ISQ + P₄, en comparación con el grupo Sham donde no se observan neuronas marcadas. Amplificación: 200X.

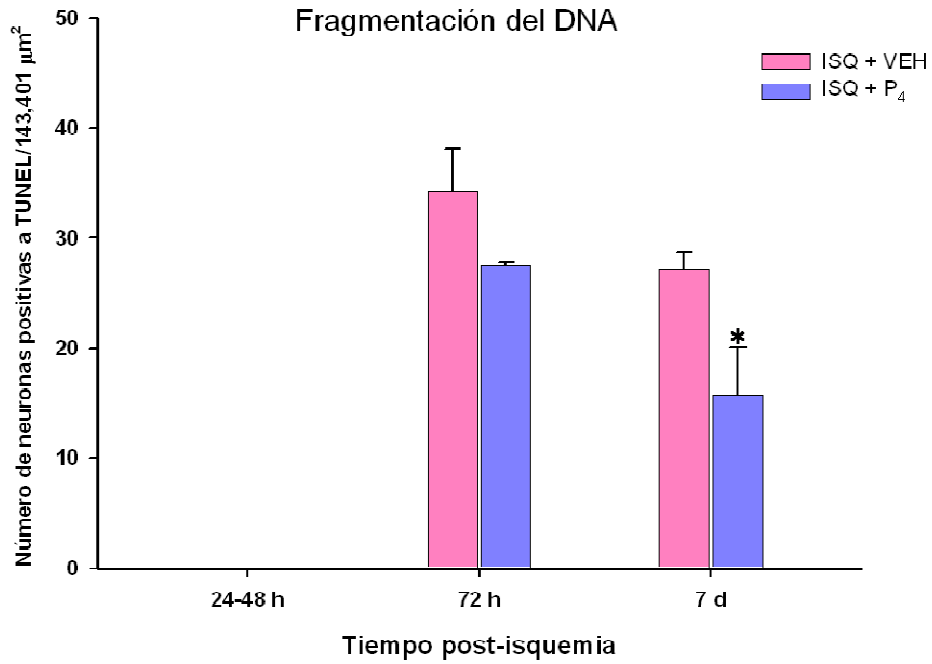


Figura 27. Número (Media ± EE) de neuronas piramidales positivas a TUNEL en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo de ratas sometidas a isquemia y tratadas con vehículo (ISQ + VEH) o con progesterona (ISQ + P₄) en los diferentes tiempos post-isquemia. El número de neuronas positivas fue significativamente menor en el grupo ISQ + P₄ en comparación con el ISQ + VEH, a los 7 d post-isquemia. * $p < 0.05$ vs. ISQ + VEH. Pruebas *U* de Mann-Whitney.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron los efectos de la progesterona sobre indicadores tardíos de daño neuronal, como son la activación de la Casp-3 y la fragmentación del DNA, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda.

La activación de la Casp-3 y la fragmentación del DNA han sido interpretadas como indicadores tardíos de daño neuronal, usualmente irreversible, a diferencia de otros indicadores como la expresión de genes inmediatos tempranos, que puede ser activada en respuesta a la isquemia sin que necesariamente culmine con la muerte neuronal (Kogure y Kato, 1993). Estas respuestas celulares, además de la sobreexpresión de genes pro-apoptóticos como Bax (Chen y cols., 1996) y la salida del citocromo *c* de la mitocondria (Sugawara y cols., 1999; Zhang y cols., 2001), se han observado en neuronas durante el proceso, relativamente prolongado, de muerte neuronal tardía, a diferencia de la muerte por necrosis que ocurre en forma aguda y en la que los procesos celulares de daño irreversible tienen lugar y culminan en un período relativamente breve (Pulsinelli y cols., 1982; Kawai y cols., 1992; Colbourne y cols., 1999).

La ICGA, dependiendo de sus características (duración y severidad), puede inducir muerte neuronal aguda, por necrosis, que se manifiesta en las primeras 24 h después de la isquemia, o muerte neuronal tardía a partir de las 72 h post-isquemia. Varios autores coinciden en señalar que el curso temporal del daño provocado por la isquemia en las neuronas piramidales del hipocampo está dado por la duración de dicho episodio. Así, se sabe que episodios de ICGA con duración entre 5 y 15 min provocan la muerte neuronal tardía de una gran proporción de las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo que se manifiesta generalmente a partir de las 72 h post-isquemia y que depende de la activación de mecanismos celulares pro-apoptóticos (Pulsinelli y cols, 1982; Kirino y cols., 1984); en tanto que episodios de ICGA de mayor duración pueden inducir muerte neuronal inmediata, que puede manifestarse desde las 24 h después de la isquemia o antes (Hernández-Morales, 2005; Kawai y cols, 1992) y que está mediada por mecanismos agudos de daño, tales como la lipoperoxidación y el edema celular

(Pulsinelli y cols, 1982; Schmidt-Kastner y Freund, 1991). La ICGA de mayor duración también puede dar lugar a la extensión del daño a otras regiones del cuerno de Ammón del hipocampo usualmente menos vulnerables, como CA3 (Radenonović y cols., 2008) y el giro dentado, así como a otras estructuras cerebrales además del hipocampo. De ahí la decisión, en el presente estudio, de someter a los animales a un episodio de isquemia de duración “moderada” (10 min).

Los resultados del presente estudio coinciden con los hallazgos mencionados anteriormente, puesto que la ICGA indujo la pérdida de la mayor parte de las neuronas piramidales principalmente en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, y no en otras regiones menos vulnerables como CA3, a partir de las 72 h post-isquemia.

La contribución relativa de los mecanismos de apoptosis (Armstrong y cols., 1997; Chen y cols., 1998; Ni y cols., 1998) y de necrosis (Colbourne y cols., 1999) a la muerte neuronal inducida por la isquemia global es un tema controversial; incluso se acepta que haya sobreposición en el curso temporal de ambos procesos (Zeng y Xu, 2000; Müller y cols., 2004; Pagnussat y cols., 2007). Independientemente de esta controversia y de la naturaleza del daño celular (apoptótico o necrótico), la activación de la Casp-3 y la fragmentación del DNA, en la neuronas piramidales del área CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, se han interpretado como indicadores tardíos de daño neuronal irreversible, y predictores de muerte neuronal. A su vez, la reducción de su magnitud por la aplicación de alguna estrategia neuroprotectora, sustentaría una mayor preservación neuronal y la eficacia de dicha estrategia.

Se ha descrito que después de un episodio de ICGA ocurre un incremento de la expresión del RNAm de la Casp-3 (Gillardon y cols., 1997; Chen y cols., 1998; Ni y cols., 1998), así como de la síntesis y la activación de la Casp-3 (cantidad de proteína, actividad enzimática o detección de la forma activa) (Chen y cols., 1998; Müller y cols., 2001; Tanaka y cols., 2004; Shimizu y cols., 2007; Teschendorf y cols., 2008) en varias regiones cerebrales vulnerables a la isquemia, particularmente en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, pero no en las regiones resistentes como CA3, en un periodo comprendido entre las 24 h y los 7 d.

Dado lo anterior, en el presente estudio se evaluó la IR tanto a la Casp-3 total (p20) que incluye las formas activa e inactiva de la enzima, así como a la Casp-3 activa (p17), a las 24, 48, 72 h y 7 d post-isquemia. Efectivamente, la ICGA indujo un incremento en la IR a Casp-3 total en las neuronas piramidales de las diferentes regiones del cuerno de Ammón del hipocampo, que se manifestó principalmente a las 72 h post-isquemia, en contraste con los animales del grupo Sham que mostraron menor IR en las mismas regiones. Este aumento podría atribuirse a la síntesis de Casp-3 coincidiendo con lo descrito por otros autores (Chen y cols., 1998; Tanaka y cols., 2004) tanto con base en determinaciones en el hipocampo completo mediante la técnica de Western Blot, como a partir del análisis de la IR a Casp-3 total en las diferentes regiones del hipocampo (Tanaka y cols., 2004) en forma similar a lo realizado en el presente estudio.

En nuestro estudio, además del incremento de la IR a Casp-3 total, la ICGA indujo un incremento ligero pero significativo de la IR a Casp-3 activa en las neuronas piramidales, con morfología de daño, de la región CA1, a las 72 h post-isquemia, a diferencia de los animales del grupo Sham que mostraron IR a Casp-3 activa únicamente en la región CA3. La marca en CA1 ya no se presentó a los 7 días post-isquemia, lo que sugiere que bajo nuestras condiciones, ese es un tiempo demasiado tardío para su detección, pese a que en otros estudios en que someten las ratas a ICGA por paro cardíaco, aún la encuentran a los 7 días (Teschendorf y cols., 2008).

La presencia de ambas formas de esta enzima y sobre todo la síntesis de nueva proteína, es muy posiblemente la razón de la marca intensa que se obtuvo al detectar la IR a Casp-3 total después de la isquemia, en comparación con la IR a Casp-3 activa, particularmente en la región CA1. El número de células inmunorreactivas a este marcador y la magnitud de la marca fueron difíciles de cuantificar, dado que no fue una marca muy densa ni bien definida; esto pese a que se utilizaron diversas condiciones de procesamiento inmunohistoquímico, Por ejemplo, dos diferentes anticuerpos dirigidos a Casp-3 activa y la incubación con el anticuerpo primario a diferentes tiempos (24 o 48 h). Posiblemente otros de los factores causales de esta marca débil sean las condiciones en las que se realizó el procesamiento de las muestras, ya que en algunos trabajos donde se ha estudiado a la Casp-3 activa con técnicas

inmunohistoquímicas (Tanaka y cols., 2004; Teschendorf y cols., 2008), se han utilizado cortes realizados por congelación, en donde se evita el proceso de la deshidratación y la exposición de las muestras a una alta temperatura (58 °C) durante la inclusión en parafina y la subsecuente desparafinación de los cortes, condiciones que pudieron haber sido muy agresivas para la integridad de la Casp-3 activa y por lo tanto, la IR detectada fue muy escasa. La escasa intensidad de la IR a Casp-3 activa hizo difícil la evaluación incluso mediante densidad óptica.

En cuanto a la presencia de IR a Casp-3 activa en la región CA3, concuerda con los hallazgos de Rami y cols. (2003) quienes la describen en ausencia de positividad a TUNEL, por lo que la interpretan como una respuesta que no dará como resultado la ejecución del programa de muerte neuronal. Coincidiendo con estos autores, en nuestros resultados la IR a Casp-3 en la región CA3 no tuvo correspondencia con la marca de TUNEL, lo que puede indicar que la síntesis y la activación de la Casp-3, en las neuronas piramidales de esa región precedieron a la fragmentación del DNA, y pudieran corresponder a una muerte neuronal que ocurra en periodos de tiempo más prolongados. De hecho, utilizando este mismo modelo de isquemia (4-VO) y un esquema de administración de P₄ también similar, se ha observado una pérdida neuronal del 32% en la región CA3, a los 21 días post-isquemia (Moralí y cols., 2005). Es posible que en el presente estudio, la marca de Casp-3 activa en neuronas sanas en CA3, tanto a 72 h como a 7 días, corresponda a las neuronas que mueren entre los 7 y los 21 días después de la isquemia.

Si bien la técnica de TUNEL fue en un inicio descrita para el marcaje de la fragmentación internucleosomal del DNA como característica intrínseca de la muerte por apoptosis (Gavrieli y cols., 1992), más tarde se llegó a la conclusión de que esta técnica no era capaz de discriminar entre apoptosis, necrosis y muerte por autofagia (Grasl-Kraupp y cols., 1995; Saraste, 1999). Así, numerosos estudios han descrito la marca de TUNEL, más bien como un indicador de la muerte neuronal tardía, que se manifiesta a partir de las 72 h después de la isquemia (MacManus y cols., 1993; Iwai y cols., 1995; Petito y cols., 1997; Maeda y cols., 1998; Sugawara y cols., 1999; Shimizu y cols., 2007; Teschendorf y cols., 2008). Coincidiendo con esos trabajos, la fragmentación del DNA se manifestó, de manera muy selectiva, en las

neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo a partir de las 72 h post-isquemia, donde se encontró un número abundante de neuronas positivas a TUNEL, en su mayoría con características morfológicas de daño.

Los efectos neuroprotectores de P₄ han sido demostrados en diversos modelos de daño tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre estos últimos, se han utilizado modelos de daño excitotóxico, de daño traumático al cerebro y a la médula espinal, de isquemia cerebral focal y de isquemia cerebral global (González-Vidal y cols., 1998; Chen y cols., 1999; Frye y Scalisse, 2000; Cervantes y cols., 2001; González Deniselle y cols., 2002; Murphy y cols., 2002; Labombarda y cols., 2002; Djebaili y cols., 2004; Morali y cols., 2005; Sayeed y cols., 2006; Cai y cols., 2008; Sayeed y cols., 2009). Se ha demostrado que uno de los mecanismos de acción de P₄, involucrado en sus efectos neuroprotectores en contra del daño traumático al cerebro (Djebaili y cols, 2004) e isquemia *in vitro* (Lockhart y cols., 2002; Ardeshiri y cols., 2006), es la reducción de la activación de la Casp-3 y de la fragmentación del DNA. Esto no había sido analizado en modelos de isquemia cerebral global, condición que comparte algunos mecanismos fisiopatológicos con el daño traumático (Leker y Shohami, 2002) y con la isquemia *in vitro* (Goldberg y Choi, 1993) en los que se han descrito estos indicadores de daño.

En estudios previos de nuestro laboratorio, se ha mostrado que el esquema de administración de P₄ a partir de los 15 min de reperusión, como fue utilizado en este estudio, da por resultado, a los 21 o a los 90 d post-isquemia, una mejor preservación de la integridad funcional del hipocampo, pero sin prevenir en forma significativa la pérdida de las neuronas piramidales de CA1 y de CA2 con una preservación de sólo el 40% y el 62%, respectivamente a los 21 días (Morali y cols., 2005) y del 20% y 32% a los 90 días (Montes y cols., manuscrito enviado a publicación). Coincidiendo con estos datos, en el presente estudio no se encontró que el tratamiento con P₄ redujera la pérdida neuronal inducida por la ICGA; sin embargo, redujo significativamente la fragmentación del DNA en las neuronas piramidales remanentes de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, especialmente a los 7 días post-isquemia. Esta respuesta pudiera interpretarse en el sentido de prevenir parte de la pérdida neuronal posterior a intervalos de tiempo mayores, y en su caso,

como parte de los mecanismos de neuroprotección que hacen posible esta preservación neuronal parcial. A este respecto, Ardeshiri y cols. (2006) describen que P₄, a través de su biotransformación al metabolito activo, la THP, disminuye la fragmentación del DNA en células de Purkinje en cultivo sometidas a privación de oxígeno y glucosa, y lo interpretan como un resultado del incremento de la actividad GABAérgica inducido por esta hormona, que contrarresta la excitotoxicidad por glutamato, aunque esto queda por ser determinado, dado que no utilizaron un diseño experimental que aportara evidencia al respecto.

Por su parte, el efecto neuroprotector de P₄ descrito en un modelo de daño traumático al cerebro de ratas macho adultas (Djebaili y cols., 2004), fue puesto en evidencia con un indicador diferente al utilizado por nosotros, a través de la disminución de la actividad enzimática de la Casp-3, y no a través de la detección inmunohistoquímica de la forma activa de la enzima como en el presente estudio, además en ese estudio la administración de P₄ fue previa a la inducción del TBI, teniendo la posibilidad de poder interferir con los mecanismos fisiopatológicos iniciales, a diferencia de nuestro estudio en el que la administración de P₄ se inició a los 15 min post-isquemia, y posiblemente no se haya podido interferir con algunos de los mecanismos fisiopatológicos inmediatos, entre ellos, la pérdida de la homeostasis iónica, la liberación masiva de Glu y la subsecuente excitación de sus receptores ionotrópicos, así como la entrada de calcio. En cambio, es muy posible que sí se haya podido interferir con algunos otros más tardíos, como son el daño por radicales libres (Sugino y cols., 1996; Roof y cols., 1997), la formación del PPTM (Sayeed y cols., 2009), la expresión de moléculas pro-apoptóticas (Djebaili y cols., 2004; Yao y cols., 2005) y la vía de sobrevivencia mediada por ERK1/2 (Cai y cols., 2008); lo que posiblemente resultó en la disminución de la fragmentación del DNA después de la isquemia.

Es posible que la falta de una marca más evidente de Casp-3 activa no haya permitido demostrar posibles efectos del tratamiento con P₄ sobre este indicador. De este modo, otro esquema de procesamiento de las muestras posiblemente permita una mejor detección de la Casp-3 y dé una evidencia más confiable del efecto del tratamiento con P₄ sobre la activación de esta enzima.

Por otra parte, otros esquemas de administración de P_4 que interfieran en forma más efectiva con los mecanismos de daño inmediatos provocados por la isquemia, que prevengan el aumento de calcio intracelular y el daño mitocondrial, y con ello permitan una mayor preservación de las neuronas piramidales del hipocampo, como ha sido demostrado por ejemplo con la administración de esta hormona durante varios días antes y varios días después de la ICGA (González-Vidal y cols., 1998), tal vez permitan poner de manifiesto la posible participación de la reducción de la Casp-3 activa como uno de los mecanismos neuroprotectores de P_4 en contra del daño por ICGA.

IX. CONCLUSIONES

1. La ICGA inducida en los animales experimentales, en el presente estudio, fue efectivamente una isquemia moderada, ya que provocó daño neuronal, particularmente en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo puesto de manifiesto a través de la pérdida de la mayoría de esas neuronas a partir de las 72 h post-isquemia.
2. La ICGA indujo la síntesis y, en menor grado, la activación de la Casp-3, particularmente en las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, manifestadas por un incremento en la IR a Casp-3 total y activa, a las 72 h post-isquemia.
3. La ICGA indujo la fragmentación del DNA de las neuronas piramidales de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, expresada a través de un incremento en el número de neuronas positivas a TUNEL a partir de las 72 h post-isquemia.
4. El efecto neuroprotector de P₄ se manifestó a través de la reducción de la fragmentación del DNA después de la ICGA, especialmente a los 7 d post-isquemia.

X. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos, se pretenden analizar otros parámetros que los complementen, por ejemplo:

- Detección de la forma activa de la Casp-3 en cortes obtenidos por congelación.
- Cuantificación de la Casp-3 en su forma activa e inactiva por la técnica de Western Blot.
- Detección y cuantificación de Anexina V que es un marcador específico de muerte por apoptosis, pues detecta la traslocación de fosfatidilserina de la cara interna de la membrana plasmática a la externa.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal R, Medhi B, Pathak A, Dhawan V, Chakrabarti A. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60(6):731-7.
- Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke*. 1996; 27(9):1682-7.
- Allen RT, Hunter WJ 3rd, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1997; 37(4):215-28.
- Arai K, Ikegaya Y, Nakatani Y, Kudo I, Nishiyama N, Matsuki N. Phospholipase A2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. *Eur J Neurosci*. 2001; 13(12):2319-23.
- Arango-Dávila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP, Pimienta-Jiménez H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol*. 2004; 39:156-65.
- Araki T, Kato H, Kogure K. Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. *Acta Neurol Scand*. 1989; 80(6):548-53.
- Ardeshiri A, Kelley MH, Korner IP, Hurn PD, Herson PS. Mechanism of progesterone neuroprotection of rat cerebellar Purkinje cells following oxygen–glucose deprivation. *Eur J Neurosci*. 2006; 24(9):2567-74.
- Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Litwack G, Fritz LC, Tomaselli KJ. Activation of the ced3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci*. 1997; 17(2):553–62.
- Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke*. 1998; 29(9):1937-51.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986; 17(3):472-6.

- Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*. 1996; 27(9):1616-22.
- Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6(7):565-75.
- Behringer W, Prueckner S, Safar P, Radovsky A, Kentner R, Stezoski SW, Henschler J, Tisherman SA. Rapid induction of mild cerebral hypothermia by cold aortic flush achieves normal recovery in a dog outcome model with 20-minute exsanguination cardiac arrest. *Acad Emerg Med*. 2000; 7(12):1341-8.
- Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol*. 1999; 58(3):279-95.
- Bonthuis DJ, West JR. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 1990; 14(1):107-18.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29(2):313-39.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev*. 1999; 15:269-90.
- Cai W, Zhu Y, Furuya K, Li Z, Sokabe M, Chen L. Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008; 55(2):127-38.
- Castillo J, Álvarez-Sabín J, Dávalos A, Díez-Tejedor E, Lizasoain I, Martínez-Vila E, Vivancos J, Zarranz JJ. Revisión de consenso. Neuroprotección farmacológica en la isquemia cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica? *Neurología*. 2003; 18(7):368-84.
- Cervantes M, González-Vidal MD, Ruelas R, Escobar A, Morali G. Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res*. 2002; 33(1):6-14.
- Chang H, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(4):821-46.

- Chen J, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler RA, Simon RP, Graham SH. Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem.* 1996; 67(1):64-71.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu R, Graham SH, Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1998; 18(13):4914–28.
- Chen J, Chopp M, Li Y. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci.* 1999; 171:24-30.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Halushka PV, Linet OI, Yatsu FM. Thromboxane, prostacyclin, and leukotrienes in cerebral ischemia. *Neurology.* 1986; 36(4):466-70.
- Choi DW. Ionic dependence of glutamate toxicity. *J Neurosci.* 1987; 7:369-79.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases — An update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008; 151(1):10-27.
- Chu CT. Eaten alive: autophagy and neuronal cell death after hypoxia-ischemia. *Am J Pathol.* 2008; 172(2):284-7.
- Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci.* 1999; 19(11):4200–10.
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999; 341(Pt 2):233-49.
- Daniel WW. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.* México. Limusa Wiley, 4ª ED; 2004. Pp. 878.
- Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2004; 123(2):349-59.
- Djebaili M, Guo Q, Pettus EH, Hoffman SW, Stein DG. The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2005; 22:106-18.
- Dirección General de Información en Salud. *Estadísticas de mortalidad en México: Muertes registradas en el año 2002.* Salud Pública de México. 2004; 46:169-85.

- Earnshaw W, Martins L, Kaufmann S. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:383-424.
- Eklöf B, Siesjö BK. The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain. *Acta Physiol Scand.* 1972; 86(4):528-38.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4):495-516.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998; 391(6662):43-50.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(15):7464-9.
- Ferrer I, Tortosa A, Macaya A, Sierra A, Moreno D, Munell F, Blanco R, Squier W. Evidence of nuclear DNA fragmentation following hypoxia-ischemia in the infant rat brain, and transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *Brain Pathol.* 1994; 4(2):115-22.
- Fieschi C, Battistini N, Volante F, Zanette E, Weber G, Passero S. Animal model of TIA: an experimental study with intracarotid ADP infusion in rabbits. *Stroke.* 1975; 6(6):617-21.
- Frye CA, Scalise TJ. Anti-seizure effects of progesterone and 3alpha,5alpha-THP in kainic acid and perforant pathway models of epilepsy. *Psychoneuroendocrinology.* 2000; 25(4):407-20.
- Fukuda S, Warner DS. Cerebral protection. *Br J Anaesth.* 2007; 99(1):10-7.
- Galluzzi L, Maiuri M, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007; 14(7):1237-66.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992; 119(3):493-501.

- Gibson CL, Coomber B, Rathbone J. Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke? *Neuroscientist*. 2009; 15(4):324-32.
- Gillardon F, Böttiger B, Schmitz B, Zimmermann M, Hossmann KA. Activation of CPP-32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997; 50(1-2):16-22.
- Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989; 20(12):1627-42.
- Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci*. 1993; 13(8):3510-24.
- González Deniselle MC, López-Costa JJ, Saavedra JP, Pietranera L, González SL, Garay L, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiol Dis*. 2002; 11(3):457-68.
- González-Vidal MD, Cervera-Gaviria M, Ruelas R, Escobar A, Morali G, Cervantes M. Progesterone: protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res*. 1998; 29(2):117-24.
- Graham S, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21(2):99–109.
- Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*. 1995; 21(5):1465-8.
- Grossman KJ, Goss CW, Stein DG. Effects of progesterone on the inflammatory response to brain injury in the rat. *Brain Res*. 2004; 1008(1):29-39.
- Gwag BJ, Won SJ, Kim DY. Excitotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in ischemic neuronal death. En: *New Concepts in Cerebral Ischemia* (RCS Lin, Ed.) CRC Press, Boca Raton, 2002, Pp. 79-111.
- Hai J, Ding M, Guo Z, Wang B. A new rat model of chronic cerebral hypoperfusion associated with arteriovenous malformations. *J Neurosurg*. 2002; 97(5):1198-202.

- Han JY, Joo Y, Kim YS, Lee YK, Kim HJ, Cho GJ, Choi WS, Kang SS. Ethanol Induces Cell Death by Activating Caspase-3 in the Rat Cerebral Cortex. *Mol. Cells*. 2005; 20(2):189-95.
- He J, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2004; 189(2):404-12.
- Henshall DC, Butcher SP, Sharkey J. A rat model of endothelin-3-induced middle cerebral artery occlusion with controlled reperfusion. *Brain Res*. 1999; 843(1-2):105-11.
- Hernández-Morales L. Efectos de la progesterona sobre la expresión de genes de daño y reparación neuronal en ratas sometidas a un periodo de isquemia cerebral global aguda. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Experimental), UNAM. 2006.
- Héron A, Pollard H, Dessi F, Moreau J, Lasbennes F, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. *J Neurochem*. 1993; 61(5):1973-6.
- Hinzen DH, Müller U, Sobotka P, Gebert E, Lang R, Hirsch H. Metabolism and function of dog's brain recovering from longtime ischemia. *Am J Physiol*. 1972; 223(5):1158-64.
- Hossmann KA, Schuier FJ. Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke*. 1980; 11(6):583-92.
- Hossmann V, Hossmann KA. Return of neuronal functions after prolonged cardiac arrest. *Brain Res*. 1973; 60(2):423-38.
- Hudgins WR, Garcia JH. Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke*. 1970; 1(2):107-11.
- Ibanez C, Shields SA, El-Etr M, Leonelli E, Magnaghi V, Li WW, Sim FJ, Baulieu EE, Melcangi RC, Schumacher M, Franklin RJ. Steroids and the reversal of age-associated changes in myelination and remyelination. *Prog Neurobiol*. 2003; 71(1): 49–56.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Hörster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. Ethanol-

- induced apoptotic neurodegeneration and the fetal alcohol syndrome. *Science*. 2000; 287(5455):1056–60.
- INEGI, 2009. México. www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mpob107&s=est&c=14742
- Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Stein DG. Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2009; 1257:94-101.
- Iwai T, Hara A, Niwa M, Nozaki M, Uematsu T, Sakai N, Yamada H. Temporal profile of nuclear DNA fragmentation in situ in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 1995; 671(2):305-8.
- Jiang N, Chopp M, Stein DG. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res*. 1996; 735(1):101-7.
- Jin K, Mao XO, Eshoo MW, Nagayama T, Minami M, Simon RP, Greenberg DA. Microarray analysis of hippocampal gene expression in global cerebral ischemia. *Ann Neurol*. 2001; 50(1):93-103.
- Kapinya K, Penzel R, Sommer C, Kiessling M. Temporary changes of the AP-1 transcription factor binding activity in the gerbil hippocampus after transient global ischemia, and ischemic tolerance induction. *Brain Res*. 2000; 872(1-2):282-93.
- Kawai K, Nitecka L, Ruetzler CA, Nagashima G, Joó F, Mies G, Nowak TS Jr, Saito N, Lohr JM, Klatzo I. Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992; 12(2):238-49.
- Kelly S, McCulloch J, Horsburgh K. Minimal ischaemic neuronal damage and HSP70 expression in MF1 strain mice following bilateral common carotid artery occlusion. *Brain Res*. 2001; 914(1-2):185-95.
- Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 1982; 239(1):57-69.
- Kirino T, Tamura A, Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropath*. 1984; 64(2):139-47.
- Kofler J, Hattori K, Sawada M, DeVries AC, Martin LJ, Hurn PD, Traystman RJ. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods*. 2004; 136(1):33-44.

- Kogure K, Tanaka J, Araki T. The mechanism of ischemia-induced brain cell injury. *Neurochem Pathol.* 1988; 9:145-70.
- Kogure K, Kato H. Altered gene expression in cerebral ischemia. *Stroke.* 1993; 24(12):2121-7.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 1986; 8: 1–8.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 1996; 384(6607):368-72.
- Kumar S. The apoptotic cysteine protease CPP32. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29(3):393-6.
- Kurosu K, Saeki M, Kamisaki Y. Formation of high molecular weight caspase-3 complex in neonatal rat brain. *Neurochem Int.* 2004; 44(4):199-204.
- Labombarda F, Gonzalez SL, Gonzalez DM, Guennoun R, Schumacher M, de Nicola AF. Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *J Neurotrauma.* 2002; 19(3):343-55.
- Lambert JJ, Belleli D, Shepherd SE, Pistis M, Peters JA. The selective interaction of neurosteroids with the GABA A receptor. En: *Neurosteroids. A New Regulatory Function in the Nervous System.* (Ed. por Baulieu EE, Robel P, Schumacher M.) Totowa, NJ, Humana Press. 1999, Pp.125-142.
- Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev.* 2002; 39(1):55-73.
- Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960; 36:1-17.
- Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol.* 1966; 16(3):255-62.
- Liachenko S, Tang P, Hamilton RL, Xu Y. A reproducible model of circulatory arrest and remote resuscitation in rats for NMR investigation. *Stroke.* 1998; 29(6):1229-38.
- Lipton P. Ischemic cell death. *Physiol Rev.* 1999; 79(4):1431-1568.

- Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol.* 1989; 256(2 Pt 2):H589-93.
- Lockhart EM, Warner DS, Pearlstein RD, Penning DH, Mehrabani S, Boustany RM. Allopregnanolone attenuates N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in cultura. *Neurosci Lett.* 2002; 328(1):33-36.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989; 20(1):84-91.
- Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity.* 1999; 10(6):629-39.
- Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(1):46-56.
- Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharm Biol Psychiatr.* 2003; 27(2):267-82.
- MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett.* 1993; 164(1-2):89-92.
- Mahesh VB, Brann DW, Hendry LB. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996; 56(1-6):209-19.
- Majewska MD. Steroid regulation of the GABAA receptor: ligand binding, chloride transport and behaviour. *Ciba Found Symp.* 1990; 153:83-97.
- Makarenko NV. The higher nervous activity in dogs revived following prolonged terms of clinical death from drowning or bloodletting. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.* 1972; 22(1):82-8.
- Marcano-Torres, M. Neuroprotección en enfermedad cerebrovascular. *Gac Méd Caracas.* 2004; 112(1): 3-13.
- Mehta SL, Manhas N, Raghurir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 2007; 54(1):34-66.
- Miller MW. Mechanisms of ethanol induced neuronal death during development: from the molecule to behavior. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20(8):128A-32A.
- Montes P. Análisis de los efectos neuroprotectores de la progesterona y la alopregnanolona sobre el daño del hipocampo resultante de un episodio de

- isquemia-anoxia cerebral global aguda en ratas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM. 2005.
- Moralí G, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Montes P, Hernández-Morales L, Cervantes M. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neurosci Lett.* 2005; 382(3):286-90.
- Müller GJ, Stadelmann C, Bastholm L, Elling F, Lassmann H, Johansen FF. Ischemia leads to apoptosis and necrosis-like neuron death in the ischemic rat hippocampus. *Brain Pathol.* 2004; 14(4):415-24.
- 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(10):1181-8.
- Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 2000; 256(1):12-8.
- Ni B, Wu X, Su Y, Stephenson D, Smalstig EB, Clemens J, Paul S. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18(3):248 –56.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 1995; 376(6535):37-43.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22(8):299-306.
- Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999; 6:1028-42.
- Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibana K, Kominami E, Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci.* 1995; 15(2):1001-11.
- Niwa M, Hara A, Iwai T, Wang S, Hotta K, Mori H, Uematsu T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett.* 2001; 300(2):103-6.

- Nuñez G, Benedict M, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998; 17(25):3237-45.
- Olney JW, Ishimaru MJ, Bittigau P, Ikonomidou C. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis*. 2000; 5(6):515-21.
- Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Muglia LJ, Jermakowicz WJ, D'Sa C, Roth KA. Ethanol-Induced Caspase-3 Activation in the in Vivo Developing Mouse Brain. *Neurobiology of Disease*. 2002; 9(2):205–19.
- Ouyang YB, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci*. 2007; 27(16):4253-60.
- Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Hoyer S, Diemer NH. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992; 12(3):484-90.
- Overgaard K. Thrombolytic therapy in experimental embolic stroke. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1994; 6(3):257-86.
- 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*. 2008. *In press*.
- Pagnussat AS, Faccioni-Heuser MC, Netto CA, Achaval M. An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. *J Anat*. 2007; 211(5):589-99.
- Pajović SB, Sačić ZS, Spasić MB, Petrović VM. The effect of ovarian hormones on antioxidant enzyme activities in the brain of male rats. *Physiol Res*. 2003; 52(2):189-94.
- Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J*. 1992; 6(6):2311-22.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd Ed. Academic Press, San Diego. 1986. Pp. 456.
- Pérez-Asensio FJ. Isquemia cerebral focal transitoria en rata: caracterización y utilidad del modelo de la sutura intraluminal en el estudio de estrategias neuroprotectoras. Tesis de Doctorado, Universidad de Valencia. 2005.
- Petito CK, Torres-Munoz J, Roberts B, Olarte JP, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA. DNA fragmentation follows delayed neuronal death in CA1 neurons exposed

- to transient global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17(9):967-76.
- Pettus EH, Wright DW, Stein DG, Hoffman SW. Progesterone treatment inhibits the inflammatory agents that accompany traumatic brain injury. *Brain Res.* 2005; 1049(1):112-9.
- Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med.* 2004; 8(4):432-44.
- Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA. Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol.* 2008; 47(8):414-26.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 2003; 283(1):1-16.
- Prunell GF, Arboleda VA, Troy CM. Caspase function in neuronal death: delineation of the role of caspases in ischemia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; 4(1):51-61.
- Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979; 10(3):267-72.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982; 11(5):491-8.
- Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: methods for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke.* 1988; 19(7):913-14.
- Rabat H, Dennis C. Decerebration in the Dog by Complete Temporary Anemia of the Brain. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1938; 38:864.
- Radenonović L, Selaković V, Bajić A, Andjus PR. Use of Confocal Microscopy in the Study of ischemia-Induced Hippocampal Neuronal Damage. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* 2008; 60(4):561-5.
- Rami A, Jansen S, Giesser I, Winckler J. Post-ischemic activation of caspase-3 in the rat hippocampus: evidence of an axonal and dendritic localization. *Neurochem Int.* 2003; 43(3):211-23.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Amer J Pathol.* 2000; 157(5):1415-30.
- Roda JM, Carceller F, Pascual JM, Herguido MJ, González-Llanos F, Alonso de Leciñana M, Avendaño C, Díez-Tejedor E. Modelos animales experimentales en isquemia cerebral. *Neurología.* 1998; 13(9):427-30.

- Roine RO. Global Cerebral Ischemia. En: Fisher M, Bogouslavsky J (Eds.). Current Review of Cerebrovascular Disease. Current Medicine, Philadelphia, 1997; Pp. 159-77.
- Roof RL, Stein DG. Progesterone treatment attenuates brain edema following contusion injury in male and female rats. Restor Neurol Neurosci. 1992; 4(6):425-27.
- 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(2):246-51.
- Roof RL, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. Mol Chem Neuropathol. 1997; 31(1):1-11.
- Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. Herz. 1999; 24(3):189-95.
- Sarraf-Yazdi S, Laskowitz D, Warner DS. Pathophysiology of brain damage. En: Schuaib A, Goldstein LB. Eds. Management of acute stroke. New York: Marcel Dekker; 1999. Pp. 243-277.
- Sayeed I, Guo Q, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion. Ann Emerg Med. 2006; 47(4):381-9.
- Sayeed I, Wali B, Stein DG. Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. Restor Neurol Neurosci. 2007; 25:151-9.
- Sayeed I, Parvez S, Wali B, Siemen D, Stein DG. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: A possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone. Brain Res. 2009; 1263:165-73.
- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. Stroke. 1998; 29(10):2162-70.

- Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*. 1991; 40(3):599-636.
- Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghomari A, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Ibanez C, Labombarda F, Coirini H, Baulieu EE, De Nicola AF. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res*. 2004; 14(Suppl A):S18-33.
- Sei Y, Von Lubitz KJ, Basile AS, Borner MM, Lin RC, Skolnick P, Fossom LH. Internucleosomal DNA fragmentation in gerbil hippocampus following forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 1994; 171(1-2):179-82.
- Sharkey J, Butcher SP. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods*. 1995; 60(1-2):125-31.
- Shibata M, Ohtani R, Ihara M, Tomimoto H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*. 2004; 35(11):2598-603.
- Shimizu H, Ohgoh M, Ikeda M, Nishizawa Y, Ogura H. Caspase-3-like protease activity-independent apoptosis at the onset of neuronal cell death in the gerbil hippocampus after global ischemia. *Biol Pharm Bull*. 2007; 30(10):1950-3.
- Siegel S. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York: McGraw-Hill; 1956. Pp. 346.
- Siesjö BK, Zwetnow NN. Effects of increased cerebrospinal fluid pressure upon adenine nucleotides and upon lactate and pyruvate in rat brain tissue. *Acta Neurol Scand*. 1970; 46(2):187-202.
- Siesjö BK, Katsura K, Kristian T. The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1995; 7(1):47-52.
- Singh M. Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection. *Ann NY Acad Sci*. 2005; 1052:145-51.
- Stein DG. The case for progesterone. *Ann NY Acad Sci*. 2005; 1052:152-69.
- Stein DG. Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res Rev*. 2008; 57(2):386-97.
- Stein DG, Wright D, Kellermann A. Does progesterone have neuroprotective properties? *Ann Emerg Med*. 2008; 51(2):164-72.

- Sugawara T, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1999; 19(22):RC39.
- Sugino N, Shimamura K, Tamura H, Ono M, Nakamura Y, Ogino K, Kato H. Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology*. 1996; 137(2):749-54.
- Sugio K, Horigome N, Sakaguchi T, Goto M. A model of bilateral hemispheric ischemia-modified four-vessel occlusion in rats. *Stroke*. 1988; 19(7):922.
- Syntichaki P, Tavernarakis N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(8):672-84.
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981; 1(1):53-60.
- Tanaka H, Yokota H, Jover T, Cappuccio I, Calderone A, Simionescu M, Bennett MV, Zukin RS. Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J Neurosci*. 2004; 24(11):2750-9.
- Taylor CP, Burke SP, Weber ML. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *J Neurosci Methods*. 1995; 59(1):121-8.
- Teschendorf P, Padosch SA, Spöhr F, Albertsmeier M, Schneider A, Vogel P, Choi YH, Böttiger BW, Popp E. Time course of caspase activation in selectively vulnerable brain areas following global cerebral ischemia due to cardiac arrest in rats. *Neurosci Lett*. 2008; 448(2):194-9.
- Tornero D, Ceña V, González-García C, Jordán J. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Rev Neurol*. 2002; 35: 354-61.
- Velázquez-Monroy O, Barinagarrementería-Aldatz FS, Rubio-Guerra AF, Verdejo J, Méndez-Bello MA, Violante R, Pavía A, Alvarado-Ruiz R, Lara-Esqueda A. Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México 2005. *Arch Cardiol Mex*. 2007; 77(1):31-39.

- Volpe BT, Wessel TC, Mukherjee B, Federoff HJ. Temporal pattern of internucleosomal DNA fragmentation in the striatum and hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 1995;186(2-3):157-60.
- Vornov JJ, Tasker RC, Coyle JT. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke*. 1994; 25(2):457-64
- Wang J, Jiang C, Li X, Liu C, Cheng N, Hao Y. The protective mechanism of progesterone on blood-brain barrier in cerebral ischemia in rats. *Brain Res Bull*. 2009; 79(6):426-30.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985; 17(5):497-504.
- White BC, Grossman LI, O'Neill BJ, DeGracia DJ, Neumar RW, Rafols JA, Krause GS. Global brain ischemia and reperfusion. *Ann Emerg Med*. 1996; 27(5):588-94.
- Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*. 1976; 7(1):46-53.
- Yao X, Liu J, Lee E, Ling G, McCabe J. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2005; 22(6):656-68.
- Young C, Klocke BJ, Tenkova T, Choi J, Labruyere J, Qin Y-Q, Holtzman DM, Roth KA, Olney JW. Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differ*. 2003; 10(10):1148-55.
- Zeng YS, Xu ZC. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurosci Res*. 2000; 37(2):113-25.
- Zhang RZ, Wu C, Fujihara H, Taga K, Qi S, Naito M, Shimoji K. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21(5): 529-40.

Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, Raman SB, Cantwell L, Chopp M. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17(2):123-35.

Zola-Morgan S, Squire L, Amaral D. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci.* 1986; 6(10):2950-67.

XII. ANEXO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

PB 0.2 M (Buffer de fosfatos, 1L)

Disolver por separado:

A. 5.5 g de fosfato monobásico en 200 mL

B. 25.4 g de fosfato dibásico en 900 mL

Tomar 190 mL de A + 810 mL de B.

Ajustar pH a 7.4

PBS 0.1 M (Buffer de fosfatos en solución salina, 1L)

IMPORTANTE: Preparar previamente PB 0.2 M

Disolver 8.5g de NaCl en 500mL de agua destilada

Luego agregar 500 mL de PB 0.2 M

Ajustar pH a 7.4

SOLUCIÓN LAVADORA (Perfusión, 1L)

Disolver (en agitación) en 950 mL de agua destilada:

0.5 g de Na_2CO_3

0.25 g de KCl

8.5 g de NaCl

Adicionar 50 mL de PB 0.2 M

Ajustar pH a 7.4

PARAFORMALDEHÍDO 4% (1L)

Calentar 500 mL de agua destilada (50-60°C), no más porque se desnaturaliza.

Agregar 40 g de paraformaldehído y agitar durante 10min.

Agregar perlas de NaOH hasta que se transparente la solución.

Meter la solución al refrigerador. Una vez fría, se vierten 500 mL de PB 0.2 M

Ajustar pH a 7.4

DESHIDRATACIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL

Para eliminar el paraformaldehído del tejido cerebral, es necesario que se realicen 3 o 4 lavados con PBS 0.1 M, incubando durante 1 h en cada

lavado, a temperatura ambiente. Una vez que se hayan terminado los lavados, se corta la rebanada del cerebro correspondiente al hipocampo dorsal. Dicha rebanada se deshidratará en el procesador de tejidos automatizado incubando con alcoholes de concentraciones crecientes y posteriormente la etapa de aclarado se llevará a cabo incubando con xilol, y finalmente en parafina.

Si se carece de un procesador de tejidos automatizado, entonces el procedimiento se puede hacer manualmente:

- Alcohol 60% 1 h 30 min
- Alcohol 70% 1 h 30 min
- Alcohol 80% 1 h 30 min
- Alcohol 90% 1 h 30 min
- Alcohol 96% 1 h 30 min
- Alcohol absoluto 1 1 h 30 min
- Alcohol absoluto 2 1 h 30 min
- Alcohol-Xilol 1 h 30 min
- Xilol 1 1 h 30 min
- Xilol 2 1 h 30 min
- Parafina 1 1 h 30 min
- Parafina 2 1 h 30 min

Tras este tiempo (18 h), las rebanadas se incluyen en bloques de parafina.

PREPARACIÓN DE LAMINILAS CON GELATINA

Calentar agua destilada entre 50-60°C y mantener a esa temperatura. Para preparar 500 mL:

Gelatina.....2.5 g

Dodecahidrato sulfato de potasio y cromo.....0.25 g

Agregar la gelatina y el sulfato cuando se hayan alcanzado los 60°C.

Agitar con mosca hasta que se disuelva completamente la solución, debe tener un color verde-azul (dejar enfriar a 30°C).

Filtrar la solución.

Por otra parte, se prepararán 4 recipientes de vidrio en el siguiente orden:

Recipiente 1 con acetona (5 minutos)

Recipiente 2 con agua destilada (3-5 minutos)

Recipiente 3 con agua destilada (3-5 minutos)

Recipiente 4 con solución gelatina-sulfato (5 minutos)

Los portaobjetos se colocan en el porta-laminillas metálico y se sumergen en los recipientes a los tiempos antes mencionados.

Tras sacar los portaobjetos de la solución de gelatina, se deben meter en la estufa a 60°C para que se sequen (alrededor de 30 minutos).

Revisar cuidadosamente que estén bien secos para evitar que se peguen entre sí.

Es recomendable que se guarden nuevamente en su caja.