



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto neuroprotector de la progesterona en células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda, en ratas ovariectomizadas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

M.V.Z. Omar Montes Narváez

Directores:

Dr. Marcos García Juárez

Dr. Óscar González Flores

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2020



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto neuroprotector de la progesterona en células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda, en ratas ovariectomizadas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

M.V.Z.Omar Montes Narváez

Comité Tutorial

Codirectores: Dr. Marcos García Juárez

Dr. Óscar González Flores

Tutores: Dr. Kurt Leroy Hoffman

Dr. Raymundo Domínguez Ordóñez

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2020

Financiamiento

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Reproducción Animal (C.I.R.A.) pertenecientes a la Universidad Autónoma de Tlaxcala, ubicadas en la localidad de Panotla, Tlaxcala México.

Parcialmente financiado por PRODEP NPTC No. UATLX-PTC-128 a MGJ, y CONACYT No. CB-2015-255936 a OGF. OMN es becario del CONACYT No. 930329.

La Maestría en Ciencias Biológicas perteneciente al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, se encuentra registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional así como en el Padrón Nacional de Posgrados



**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Omar Montes Narváez** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Efecto neuroprotector de la progesterona en células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda, en ratas ovariectomizadas.**

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 4 DE 2020

DR. KURT LEROY HOFFMAN

DR. MARCOS GARCÍA JUÁREZ

DR. AGUSTÍN JUAN GALVAN ROSAS

DR. FRANCISCO JAVIER LIMA HERNÁNDEZ

DR. RAYMUNDO DOMÍNGUEZ ORDOÑEZ



Agradecimientos

Primeramente, quisiera agradecer al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, así como a la Universidad Autónoma de Tlaxcala por darme la oportunidad de estudiar un posgrado de alta calidad dentro de sus instalaciones.

También quisiera agradecer el aporte económico parcial otorgado para la realización de éste proyecto por PRODEP NPTC No. UATLX-PTC-128 a MGJ, así como al CONACyT por la beca que me fue asignada con No. 930329.

Finalmente, manifiesto mi entero agradecimiento a mis codirectores de tesis el Dr. Marcos García Juárez y Dr. Oscar González Flores, quienes me han guiado y apoyado con su trabajo, tiempo, dedicación y conocimientos durante todo éste tiempo. Así mismo, externo mi gratitud al Dr. Kurt Leroy Hoffman y al Dr. Raymundo Domínguez Ordóñez quienes fungieron como mis tutores a lo largo de la maestría.

Agradecimientos a título personal

Agradecimiento especial a mi madre Claudia y mi hermana Miriam quienes han estado a mi lado a lo largo de toda mi trayectoria y cuyos consejos, ejemplo, trabajo incansable y amor incondicional me han guiado e inspirado a lo largo de toda mi vida.

Quisiera externar mis enteros agradecimientos a todos aquellos familiares, amigos, profesores y terceros que han contribuido a mi formación tanto académica como personal, ya que sin su apoyo esto no habría sido posible.

Finalmente agradezco a la sociedad civil por permitirme seguir desarrollándome de manera profesional.

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico a 4 personas en especial. Primeramente, a mis dos motores de vida, Elena y Hernán, en ustedes encuentro mis mayores motivos de superación.

Quisiera dedicar éste trabajo también a mi compañera de vida Paola que me ha brindado soporte y que ha estado a mi lado desde siempre.

Por último, quisiera dedicar éste trabajo a donde quiera que se encuentre a mi difunto padre Fernando Omar.

Resumen

La progesterona es una hormona sexual femenina de síntesis esteroidea con múltiples y variadas funciones fisiológicas. Se han demostrado diversas acciones neuroprotectoras de la misma en modelos animales de isquemia cerebral, es por ello que se ha propuesto dicha hormona tiene la capacidad de ejercer estas acciones cuando es administrada en ratas macho jóvenes e intactos, sin embargo, los resultados obtenidos han denotado la importancia de conocer el periodo de ventana óptimo para el inicio de los tratamientos de reemplazo hormonal en hembras que han sido ovariectomizadas previo a ser sometidas a un episodio de isquemia cerebral global aguda. El propósito del presente proyecto es el de documentar los efectos neuroprotectores de esta hormona ante un episodio isquémico en grupos de ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con distintos tiempos post-ovariectomía (15 y 30 días). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en la región CA1 del hipocampo, en hembras con 15 y 30 días post-ovariectomía, la isquemia redujo dramáticamente el conteo neuronal en comparación con el grupo control, sin embargo, cuando se administró la P, ésta produjo un efecto neuroprotector sobre las neuronas piramidales de esta región del hipocampo, llegando a ser significativo ($p \leq 0.001$) en ambos grupos cuando se compararon con los grupos experimentales que sufrieron la isquemia pero no recibieron tratamiento, sin llegar a lograr una recuperación tan importante como los animales control. Así mismo, existió una diferencia significativa ($p \leq 0.001$) al comparar el grupo isquémico de 15 días post-ovariectomía con tratamiento vs el grupo isquémico de 30 días post-ovariectomía con tratamiento. Los conteos neuronales en las regiones CA2 y CA3 no mostraron diferencias significativas. Los datos obtenidos en el presente estudio mostraron que la progesterona tuvo un mejor efecto neuroprotector ante un episodio isquémico en los grupos de 15 días post-ovariectomía comparado con los de 30 días post-ovariectomía, esto apoya la idea de que el receptor a progesterona es el principal mediador de las respuestas neuroprotectoras asociadas a la misma.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Clasificación de los ACV.....	1
1.1.1 Accidente cerebro-vascular isquémico.....	2
1.1.2 Accidente cerebro-vascular hemorrágico.....	2
1.2 Factores de riesgo del ACV.....	3
1.3 Biosíntesis de la progesterona.....	5
1.4 Fisiología de la menopausia.....	6
1.5 Anatomía del hipocampo.....	7
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1 Función de las hormonas esteroideas en la neuroprotección.....	13
2.2 Efecto neuroprotector de las hormonas esteroideas.....	14
2.3 Participación de los receptores de la progesterona en la neuroprotección.....	17
2.4 Neuroprotección con progesterona.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2. Objetivos específicos.....	21
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1 Tipo de estudio.....	22
6.2 Especificaciones de los animales.....	22
6.3 Variable de estudio.....	22
6.4 Asepsia, cirugías e inducción de la isquemia cerebral global.....	23
6.4.1 Asepsia quirúrgica.....	23
6.5 Ovariectomía.....	25
6.6 Electrocauterización de arterias vertebrales.....	26
6.7 Exposición de arterias carótidas comunes.....	27
6.8 Isquemia Cerebral Global Aguda.....	27
6.9 Perfusión.....	29
6.10 Especificaciones quirúrgicas y experimentales.....	30
6.11 Experimento 1.....	30
6.11.1 Cronograma quirúrgico experimento 1.....	31
6.12 Experimento 2.....	31
6.12.1 Cronograma quirúrgico experimento 2.....	32
6.13 Evaluación histológica.....	33
7. RESULTADOS.....	35
8. DISCUSIÓN.....	43
9. CONCLUSIONES.....	46
10. PERSPECTIVAS.....	47
11. REFERENCIAS.....	48
12. PUBLICACIONES.....	56

1. INTRODUCCIÓN

Los Accidentes Cerebro-Vasculares (ACV), son todas aquellas neuropatologías caracterizadas por una disminución del flujo sanguíneo y por ende de sus nutrientes, principalmente oxígeno y glucosa hacia el cerebro. Los ACV son catalogados como un síndrome clínico, debido a su gran diversidad etiológica, tienen como característica un desarrollo veloz de las lesiones que propician.¹

La clasificación internacional de enfermedades define al ACV como el desarrollo rápido de signos clínicos de afectación focal o global de las funciones cerebrales, con síntomas que duran por lo menos 24 h, conduciendo a la muerte, sin otra causa aparente que no sea el origen vascular.²

En los países desarrollados los ACV son considerados como la tercera causa de muerte más frecuente, antecedido únicamente por las cardiopatías y cáncer.³ Esta incidencia se ha mantenido más o menos constante durante al menos las últimas tres décadas, generando altas tasas de incapacidad permanente.

1.1 Clasificación de los ACV

Existen varios tipos de clasificación para los ACV tomando en cuenta diversos aspectos propios de la enfermedad; sin embargo, de acuerdo a su etiología pueden ser clasificados en dos grupos: hemorrágicos e isquémicos, representando un 20% y 80% respectivamente del total de casos. A su vez los isquémicos se subdividen en dos grupos de acuerdo al área cerebral que hayan afectado, ya sea en focales o globales, los primeros afectan a una determinada área cerebral y los segundos se presentan cuando todo el cerebro se ve involucrado.⁴

1.1.1 Accidente cerebro-vascular isquémico

Se produce cuando un vaso sanguíneo se ve obstruido de forma total o parcial propiciando un déficit en el aporte sanguíneo nutrimental. Estos bloqueos vasculares ocurren principalmente de dos formas, trombótica y embólica. El ACV trombótico ocurre cuando se desprende un coágulo de sangre que viaja a través de los vasos sanguíneos hasta llegar a un sitio donde impide la circulación. Estos coágulos son generados por una excesiva producción plaquetaria, lesiones endoteliales, arterioesclerosis o estenosis vascular.⁵

El ACV embólico se genera cuando una sustancia que puede ser endógena, exógena, sólido, líquido o gas, interrumpen el correcto flujo sanguíneo a través de los vasos. Agujas, grasas, objetos extraños, burbujas de dióxido de carbono, entre otras, pueden ser las causantes de un émbolo.⁵

1.1.2 Accidente cerebro-vascular hemorrágico

Este tipo de ACV es menos común que el isquémico, tiene como principal característica una ruptura de los vasos sanguíneos que irrigan al cerebro, produciendo una hemorragia. Las causas atribuibles a este tipo de patología son los aneurismas, deformaciones venosas, presión arterial alta y contusiones. Algunos autores subdividen a este grupo en otros dos, subaracnoideos e intracerebrales.⁶ De tal clasificación los ACV hemorrágicos subaracnoideos se caracterizan por una hemorragia en la superficie del cerebro, en la parte medial de las meninges que recubren al mismo, mientras que los ACV hemorrágicos intracerebrales o también llamados intrahemisféricos ocurren por una hemorragia a nivel interno del cerebro.

1.2 Factores de riesgo del ACV

Los factores de riesgo son todas aquellas variables, circunstancias, características personales o ambientales propias de un individuo o un grupo de individuos que se encuentran asociadas con una mayor probabilidad de padecer determinadas enfermedades, y funcionan como predictores estadísticos de las mismas.⁷ Para poder ser considerados como factores de riesgo, deben poseer los postulados de causalidad que a continuación se enlistan:

- Intensidad de la asociación.
- Coherencia (con lo conocido sobre la historia natural y la biología).
- Especificidad (una causa-un efecto).
- Temporalidad (la causa antecede al efecto).
- Relación dosis-respuesta o gradiente biológico.
- Verosimilitud o plausibilidad biológica.
- Consistencia (en diferentes circunstancias).
- Experimentación (relacionada con la hipótesis).
- Analogía (con otras hipótesis probadas).

Los factores de riesgo que predisponen a los ACV se dividen en dos grupos llamados modificables y los no modificables, definidos así por el hecho de que algunos pueden ser evitados o controlados y otros no.⁸

Dentro de los factores de riesgo modificables encontramos:

- Tabaquismo: Este hábito daña a los vasos sanguíneos haciéndolos más rígidos comprometiendo su funcionalidad aún en fumadores pasivos.
- Diabetes: La diabetes junto con el consumo excesivo de bebidas azucaradas pueden elevar a más del doble la probabilidad de un ACV.
- Colesterol: El colesterol elevado incrementa las probabilidades de una obstrucción en los vasos sanguíneos, este fenómeno está estrechamente correlacionado con otros dos factores de riesgo que son el sedentarismo y la obesidad.

- Enfermedad arterial: Cualquier tipo de enfermedad que esté asociada a una de las principales cuatro arterias que irrigan el cerebro (carótidas y vertebrales), puede inducir un ACV.
- Ataques isquémicos transitorios (AIT): Diagnosticar y tratar los AIT es de vital importancia para evitar ACV futuros, se ha comprobado que las personas que han sufrido un AIT tienen 50% más probabilidad de sufrir un ACV posteriormente, principalmente durante las siguientes dos semanas posteriores al AIT.
- Cardiopatías: Los problemas cardíacos son muy variados, un mal funcionamiento cardíaco puede conllevar a un ACV ya que si las estructuras que componen el corazón y se encargan de realizar el gasto cardíaco no funcionan de manera adecuada pueden ocasionar aglutinamiento sanguíneo y coagulación en las cavidades del corazón.
- Trastornos sanguíneos: Algunas alteraciones en la sangre como un elevado conteo de glóbulos rojos puede predisponer la aparición de coágulos, de igual manera patologías como la anemia falciforme puede ocasionar que las células falciformes se adhieran a las paredes vasculares ocasionando una estenosis del lumen vascular.
- Alcoholismo: El consumo cotidiano de bebidas embriagantes pueden generar hipertensión o una congestión alcohólica que pueden derivar en un ACV.
- Consumo de drogas ilegales: Algunas drogas ilegales como la ketamina, cocaína, éxtasis, heroína entre otras, se han asociado con un mayor riesgo de padecer ACV.

Dentro de los factores de riesgo no modificables encontramos:

- Sexo: Los hombres tienen mayor probabilidad de padecer cualquier tipo de ACV en edades tempranas en comparación con las mujeres; sin embargo, se sabe que la incidencia en mujeres en edades post-menopausia igualan e incluso incrementan a las de los hombres.
- Genética: Todas aquellas personas cuyos parientes de consanguinidad directa han sufrido un ACV tienen una mayor predisposición a sufrir ACV, de igual manera las personas de raza negra son más propensas a sufrir este tipo de patologías comparados con las personas de raza caucásica.

- Edad: A pesar de que los ACV afectan a personas de todas las edades, es claro que la tendencia a padecer estas patologías se incrementa drásticamente a medida que las personas tienen mayor edad, siendo las personas geriátricas las más susceptibles a este tipo de episodios.

Los ACV, son una patología que tradicionalmente ha sido correlacionada con las personas de edad avanzada, y se prevé que para el año 2030, la incidencia, discapacidad y muerte por este tipo de enfermedades se verá duplicado a nivel mundial.⁹ Por su parte, en países en vías de desarrollo también se encuentra catalogada como la segunda causa más común de mortalidad en adultos jóvenes y como la primera en invalidez. Los pronósticos acerca de esta patología no son alentadores, ya que la tendencia a padecer estas patologías continúa en ascenso debido a la mayor esperanza de vida.¹⁰ Además, la relación edad/ACV se cree puede estar influenciada por la ausencia en la producción de hormonas gonadales, principalmente estradiol y progesterona, esto explicaría el aumento en la incidencia de esta enfermedad en mujeres postmenopáusicas¹⁰.

1.3 Biosíntesis de la progesterona

La progesterona (P) es una hormona sexual femenina de origen esteroideo, su biosíntesis ocurre principalmente en las gónadas sexuales femeninas (ovarios), aunque también se conoce que dicha hormona y sus metabolitos pueden sintetizarse en células gliales del sistema nervioso central (SNC) y en las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP).¹¹

Las biomoléculas esteroideas poseen una estructura química que consiste básicamente en el ciclo pentanoperhidrofenantreno¹². La P está conformada por 21 átomos de carbono y deriva de la pregnenolona, que, a su vez, proviene del colesterol.¹³ Durante la biosíntesis esteroidea participan: el citocromo P50 scc (enzima desramificante del colesterol), citocromo P50 17- α -hidroxilasa, la P50 aromatasa y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD). Estas enzimas participan en la regulación de la conversión del colesterol en pregnenolona, de la pregnenolona a progesterona y finalmente en la conversión de andrógenos a estradiol (E).¹⁴

Con el uso de técnicas como la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica, se ha conseguido dilucidar la distribución cerebral de las enzimas que intervienen en la biosíntesis esteroidogénica en una amplia variedad de animales, sin importar el género; dichas enzimas han sido localizadas en la corteza cerebral, cerebelo, amígdala, bulbo olfatorio, cuerpo estriado, septum e hipocampo. De igual manera se ha localizado al receptor para la progesterona en neuronas del hipotálamo, amígdala, septum, cerebelo, corteza cerebral e hipocampo^{15,16}. La P produce efectos plásticos en el SNC, pues interviene en la formación, maduración, diferenciación y funcionalidad de las células nerviosas.¹⁷ Se sabe que la P desempeña un papel regulador en la diferenciación sexual del SNC, la activación de la conducta de lordosis¹⁸ y las conductas maternas.¹⁹ De las funciones no reproductivas destacan la anestésica y la analgésica, mediadas por sus metabolitos a través de receptores GABA-A,²⁰ modulando las concentraciones intracelulares del ion cloro.²¹ Otros estudios han demostrado la hipersensibilidad de las áreas antes mencionadas ante el daño provocado por un ACV, en donde la P promueve la disminución del edema cerebral después de un ACV,²² estas investigaciones sugieren que el espectro y los roles biológicos de la P son más amplios y diversos de lo que se creía anteriormente, pues al ser un neuroesteroide activo, influye en diversos mecanismos fisiológicos y no exclusivamente en la fisiología reproductiva.²³

1.4 Fisiología de la menopausia

La menopausia por definición, es la terminación de los ciclos menstruales en la mujer, con un diagnóstico retrospectivo posterior a 12 meses consecutivos de amenorrea, ocasionado por la atresia de los folículos ováricos y su incapacidad para producir E y progestágenos ante el estímulo de sus precursores como la hormona folículo estimulante (FSH). A la signología y sintomatología que se ocasionan durante esta transición se les conoce como síndrome climatérico, el cual incluye a los bochornos, cambios anímicos, osteoporosis, mayor probabilidad de cardiopatías y ACV entre otros. Cuando la disminución estrogénica provoca esta sintomatología, se aplican tratamientos de reemplazo hormonal con E y progestágenos exógenos. Se conoce que las mujeres comienzan a presentar estos estados en edades que van del

rango de los 45-55 años; para el caso específico de México se ha logrado documentar que el promedio de edad es de 48 años.²⁴

El comienzo de la menopausia se ve identificado por la reducción de la inhibina, hormona que a su vez regula la síntesis de FSH, los niveles de estradiol y la progesterona al comienzo de la menopausia se mantienen normales o ligeramente bajos. Sin embargo, estas ligeras modificaciones hormonales ocasionan un acortamiento de la fase folicular dependiente de E y consecuentemente una menor duración de los ciclos menstruales. El aumento en los niveles séricos de FSH por la atresia folicular ovárica, disminuye la síntesis de E y progestágenos.²⁵ Este proceso es considerado como una retroalimentación negativa, debido a que al verse disminuidos los niveles de E y progestágenos en el plasma sanguíneo, principalmente E y P, el hipotálamo expulsa grandes cantidades de hormona liberadora de gonadotropina, con la finalidad de que la adenohipófisis reciba la señal para liberar también grandes concentraciones de FSH, el problema resulta en que ya no existe la suficiente cantidad de folículos para su síntesis. En mujeres que se encuentran en edades menopaúsicas, existe un déficit en las células de la granulosa y esto genera una incapacidad para sintetizar aromatasa que transforma la testosterona en E.²⁶ El declive de los niveles de E y P ocasiona maduraciones foliculares irregulares con ciclos ovulatorios y anovulatorios. En los ciclos anovulatorios no habrá producción de P.²⁷

1.5 Anatomía del hipocampo

Etimológicamente el vocablo hipocampo tiene sus raíces del latín *hippocampus*, y este, a su vez, proviene del griego *hipposkampos*. Actualmente es considerada una de las estructuras cerebrales más importantes de los mamíferos, entre ellos, el humano, debido a sus múltiples funciones fisiológicas. Fue nombrado por el anatomista Giulio Cesare Aranzio en el siglo XVI, pues fue quien apreció una similitud morfológica con el caballito de mar.

Anatómicamente es una estructura marginal, pareada, con dos porciones que resultan ser imágenes especulares, una en cada hemisferio, se encuentra íntimamente relacionada por una

parte con la arquicorteza y por otra, con el sistema límbico. Conforman junto con el subículo y el giro dentado la denominada formación hipocampal. Se localiza en la parte inferior de la porción medial o interna en el lóbulo temporal bajo la superficie cortical, la antes mencionada forma de caballo es propia de algunos primates, sin embargo, en otras especies es variada, llegando a tener forma de banana. En el cerebro de los vertebrados tiene su origen en el palio, el cual comprendía funciones olfativas, mismas a las que fue relacionado el hipocampo antiguamente.

El desarrollo hipocampal ocurre cuando comienzan a crearse los hemisferios cerebrales a partir de la quinta semana gestacional, presentándose en forma de evaginaciones a los lados de la pared externa del prosencéfalo. Aproximadamente a los 45 días del embarazo estas evaginaciones comienzan a crecer y a los 60 días sobresalen de la porción superior del diencefalo.²⁸ Las comisuras del cuerpo calloso mantienen unida esta nueva región de los hemisferios cerebrales con el techo del diencefalo, estas comisuras son una fina capa de células endimarias recubiertas por un mesénquima vascularizado que a su vez, originará el plexo coroideo, el cual sobresale en el ventrículo lateral, prosiguiendo hacia la fisura coroidea y por encima de esta se origina el hipocampo.²⁹

El hipocampo es considerado una elaboración del extremo de la corteza cerebral. Se logra distinguir como una zona donde el córtex se estrecha en una densa capa celular empaquetada en forma de S apretada. Así mismo, las estructuras que arreglan el límite del córtex es el denominado sistema límbico. De forma conjunta el hipocampo tiene forma de tubo curvado, y está dividido en las regiones llamadas cuerno de Amón (CA) CA1, CA2, CA3 y CA4, así como el giro dentado. Comprende porciones ventrales y dorsales, compartiendo ambas una composición similar, pero siendo partes de diferentes circuitos neurales. En roedores, los dos hipocampos asemejan por su forma a bananas unidas por su tallo, mientras que en primates la principal porción se encuentra de forma ventral cerca a la base del lóbulo temporal.³⁰

La corteza entorrinal es la principal proveedora de aferencias hacia el hipocampo, se conecta con otras áreas de la corteza cerebral y es lo que la capacita para hacer una función de interfaz entre el hipocampo y variadas áreas del cerebro. El flujo de información dentro del hipocampo

es de forma unidireccional, propagando señales a través de capas celulares en dirección hacia el giro dentado, posteriormente a la capa CA3 y después CA1, pasando por el subículo y finalmente saliendo del hipocampo hacia la corteza entorrinal. Estas capas contienen una circuitería intrínseca compleja con amplia cantidad de conexiones longitudinales.³¹

A la porción cortical adyacente al hipocampo se le denomina circunvalación hipocampal, la cual incluye las cortezas entorrinal y perirrinal, esta última debe su nombre a su posición anatómica estando al lado de la cisura rinal. La corteza perirrinal juega un rol importante en el registro visual de objetos con alta complejidad, aunado a esto, la evidencia científica sugiere que podría estar implicada también en los procesos de memorización, contribuyendo a las funciones hipocampales. Es importante señalar, que la amnesia completa únicamente tiene lugar cuando ambas estructuras (corteza perirrinal e hipocampo) se encuentran dañadas.³²

Las células que conforman al hipocampo son neuronas piramidales cuya principal característica radica en la morfología de su soma, ya que estos cuerpos celulares tienen una notable forma de pirámide la cual es la característica de mayor coincidencia entre esta estirpe celular ya que sus demás porciones suelen ser variables dotándolas de subclasificaciones poblacionales acorde a variados parámetros morfofuncionales como su ubicación anatómica, esta última subclasificándolas en: corticales, dado que se localizan en la corteza cerebral, las subcorticales como las cingulares, presentes en la corteza del cíngulo, amigdalinas, situadas en la amígdala, e hipocampales, dispuestas en el hipocampo.

Anteriormente se pensaba que la neurogénesis de células neuronales se encontraba limitada a una etapa inicial en la formación de las estructuras cerebrales durante el desarrollo embrionario y culminaría en la pubertad.³³ Sin embargo, en el siglo XIX se publicaron evidencias que demostraron que la neurogénesis ocurre de forma continua a lo largo de toda la vida y de forma independiente a las primeras etapas del desarrollo embrionario,³⁴ ya que la neurogénesis que ocurre durante la adultez se encuentra estrechamente correlacionada con las funciones de aprendizaje y memoria desempeñadas por el hipocampo.³⁴ De esta manera la neurogénesis adulta puede definirse como el proceso a través del cual se propicia la creación de nuevas neuronas, a partir de células madres neuronales y progenitoras en la etapa adulta de los

individuos.³⁵ Esta neurogénesis no ocurre en todo el encéfalo, únicamente se lleva a cabo en dos sitios específicos, la zona subgranular (ZSG) del giro dentado en el hipocampo y en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales. Las células neuronales generadas en la ZSG del hipocampo se añaden en el giro dentado, sin embargo, las células generadas en la ZSV de los ventrículos laterales, migran para integrarse en el bulbo olfatorio.³⁶ Algo importante de señalar es que no todas las nuevas neuronas logran sobrevivir y las que lo logran se vuelven funcionales y se integran a la circuitería neuronal del tejido cerebral.^{37,38}

Históricamente se creía que el hipocampo comprendía funciones de tipo olfativo, ya que se pensaba recibía aferencias directas del bulbo olfatorio.³⁹ Los estudios posteriores se encaminaron en tres ideas principales: memoria, espacio e inhibición. La idea de la participación del hipocampo en la inhibición de la conducta sexual, tomó fuerza en la década de los años 60's del siglo XX gracias a O'Keefe y Nadel⁴⁰ quienes a partir de observaciones en individuos con daño hipocampal, descubrieron que dichos individuos mostraban una tendencia mayor a comportamiento hiperactivo, así mismo, los individuos sometidos a la lesión hipocampal, muestran complicaciones para inhibir respuestas previamente enseñadas, el científico Jeffrey Gray apoyó esta línea de teórica en modelos animales de ansiedad. Cabe señalar que actualmente la teoría de la inhibición es la menos popular de la triplete. La segunda línea teórica de importancia es la memoria, ciertos trabajos señalaron esta idea, pero fue debido a Scoville y Brenda Milner⁴² que esta teoría se hizo popular, cuando publicaron un famoso artículo en el cual se detallan los resultados en un paciente masculino llamado Henry Gustav Molaison, después conocido únicamente por sus iniciales como H.M., quien sufría severos ataques epilépticos y como opción quirúrgica le fue extirpado de forma parcial el lóbulo temporal. Posterior a la intervención quirúrgica, el hombre presentó una amnesia anterógrada grave y una amnesia retrógrada parcial.⁴¹ El hombre era incapaz de formar nuevos recuerdos; sin embargo, si lograba recordar algunos episodios de su infancia. Una vez suscitado este hecho, H.M. se convirtió en el individuo más ampliamente estudiado en la historia de la medicina, pues representó una oportunidad única de investigar las consecuencias en el daño hipocampal en un paciente humano vivo. Posterior a la muerte de H.M. surgieron nuevos casos similares con daño hipocampal por cirugías o enfermedades.⁴³

En la actualidad existe un amplio consenso pues la evidencia científica determina que el hipocampo desempeña un rol importante en la memoria y el aprendizaje; no obstante, aún no se han determinado los mecanismos fisiológicos ni moleculares en su totalidad ni la implicación de otras estructuras.⁴⁴

Finalmente, la tercera línea teórica de funcionalidad hipocampal es la relacionada con la función espacial. Las primeras evidencias de esta teoría fueron proporcionadas por E.C. Tolman's, él trabajó en lo que denominó "mapas cognitivos", tanto en animales como en humanos, estos estudios influenciaron a O'Keefe y Nadel⁴⁵ descubrieron que, en las neuronas del hipocampo de la rata, existía una actividad relacionada con la localización de la rata en su entorno. Diez años después en 1978 publicaron un libro llamado "The Hippocampus as a Cognitive Map", el cual fue un texto de alta influencia en su época. Tal como en la línea teórica de la memoria, existe un consenso casi universal sobre la participación del hipocampo en las funciones espaciales.

2. ANTECEDENTES

Hasta épocas recientes, los modelos animales para estudiar la neuroprotección mediada por hormonas gonadales, habían sido realizados en ratas macho, jóvenes e intactos, debido a que son un excelente modelo para el estudio de mecanismos moleculares; sin embargo, estos no reflejan la comorbilidad de la población humana susceptible a los ACV, debido a que el sector poblacional con mayor riesgo de sufrir esta patología son las personas longevas o bien mujeres en periodos postmenopáusicos. Aunado a esto, los trabajos realizados se enfocaban exclusivamente en el uso de E, dejando de lado las posibles acciones neuroprotectoras de la P. Ahora sabemos que la P también se encuentra involucrada en una serie de mecanismos moleculares que inducen neuroprotección en modelos animales de daño cerebral.

De esta manera, Bramlett y Dietrich⁴⁶ publicaron un estudio llamado, protección neuropatológica después de un daño cerebral en ratas macho intactos vs hembras intactas u ovariectomizadas. En dicho trabajo, los autores estudiaron si las hormonas circulantes en el plasma sanguíneo de la rata hembra, tenían la capacidad de proporcionar neuroprotección en ratas machos intactos y hembras intactas u ovariectomizadas. Sus resultados mostraron que las hembras intactas, tuvieron menor lesión comparadas con los machos y las hembras ovariectomizadas, estas últimas presentaban áreas de lesión más grandes que el de hembras intactas, equiparable con el daño visto en machos. Los resultados de este estudio, permitieron sugerir la protección histopatológica hormonal endógena, después de una lesión cerebral.

Por otra parte, Ciriza y cols.⁴⁷, estudiaron la neuroprotección mediada por los niveles plasmáticos de hormonas gonadales, en un modelo animal de degeneración del hipocampo provocada por la administración de ácido kaínico, tanto en ratas macho y hembra intactos, como en hembras y machos gonadectomizados. Así, demostraron que una administración baja de este compuesto a dosis de 7mg/kg, propició una disminución considerable de las neuronas dentadas en machos castrados y no así, en las neuronas de los machos intactos. El efecto de esta neurotoxina, generó efectos distintos, ya que en las neuronas de las ratas hembras, hubo variabilidad dependiendo el día del ciclo estral en que se administró el compuesto; en las ratas inoculadas en la mañana del estro, no se manifestó ningún efecto significativo, pero, en las ratas

inoculadas en la mañana del proestro, el decremento neural fue considerable, muy similar al daño visto en neuronas de las ratas ovariectomizadas.

2.1 Función de las hormonas esteroideas en la neuroprotección

Para el caso de la administración de E o de E más P en las ratas ovariectomizadas, estas mostraron tener efecto neuroprotector al evitar la pérdida neural denotado en el conteo de células piramidales en distintas áreas hipocampales cuando fueron inyectadas simultáneamente con la neurotoxina, o bien veinticuatro horas antes, no así cuando fueron administradas veinticuatro horas después de inocular el compuesto neurotóxico. Dichos resultados revelan que los niveles plasmáticos de hormonas gonadales endógenas, protegen a las neuronas hipocampales de la degeneración excitotóxica; aunado a esto, la variación hormonal dependiente de la etapa del ciclo estral y la gonadectomía, al momento de la exposición con el agente, influyó en la vulnerabilidad neural de los individuos con niveles bajos de estas hormonas.

Más recientemente Moralí y cols.,⁴⁸ evaluaron la neurogénesis en el giro dentado (GD) del hipocampo, así como la recuperación funcional mediante la administración de P en ratas previamente sometidas a procedimientos de isquemia cerebral global aguda (ICGA), encontraron que las ratas que fueron sometidas a procedimientos isquémicos y que fueron tratadas con P, tuvieron una mejoría significativa en cuanto a pruebas de aprendizaje y memoria espacial en comparación con aquellos individuos a los que se les administró únicamente el vehículo. Además, mostraron un aumento significativo en el número de nuevas neuronas maduras en el GD. Adicionalmente, las ratas tratadas con P posterior a la isquemia, obtuvieron un correcto funcionamiento celular y una disminución significativa en la pérdida de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, lo cual sugiere que esta hormona puede ejercer sus efectos neuroprotectores al influir en los micro-eventos de los mecanismos de plasticidad cerebral. De esta manera, el tratamiento con P en animales que previamente fueron sometidos a ICGA, promueve la supervivencia celular de nuevas neuronas creadas en el GD y que los mecanismos de plasticidad neural reflejados en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial, pueden estar íntimamente relacionados con la misma.⁴⁸

En otro estudio hecho por el mismo grupo de investigadores en el que se realizó la administración postisquémica de la (P) a razón de 8mg/kg vía intravenosa o de su vehículo a los 15 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 horas posteriores a la reperusión, con la finalidad de determinar si esta reducía la activación de la caspasa 3 y la fragmentación del DNA a nivel hipocampal, encontraron que existe una gran y selectiva pérdida de células piramidales en la región CA1 y no así en otras regiones del hipocampo, en el grupo de los animales que sólo sufrió la de isquemia. De forma particular, los animales del grupo que fue tratado con P, disminuyeron la pérdida de neuronas piramidales en CA1; asimismo se observó la disminución en los niveles de caspasa-3 y la activación de la fragmentación del DNA.⁴⁹

Por su parte, Ozacmak y cols.⁵⁰ observaron los efectos neuroprotectores de las hormonas gonadales 17 β -estradiol, 17 α -estradiol y P en el hipocampo y la corteza de individuos expuestos a ICGA durante 10 minutos, con 4-6 semanas previas de ovariectomía bilateral y con una reperusión de 72 horas. En este trabajo se determinó que la administración del 17 β -estradiol y la P, disminuyeron las concentraciones de los marcadores de estrés oxidativo malondialdehído y glutatión en el hipocampo y no así en la corteza. Encontraron además que la administración conjunta de los compuestos hormonales redujo la lipoperoxidación lipídica en todos los tejidos cerebrales. Así mismo, estos autores sugieren que los efectos neuroprotectores vistos en el grupo donde únicamente se administró P después de la ICGA, pueden estar dados por mecanismos moleculares que eliminan radicales libres. Este estudio coincide con otros reportes donde también se demostró la neuroprotección mediante la administración sola de P en neuronas hipocampales ante diferentes tipos de daño cerebral.⁵⁰

2.2 Efecto neuroprotector de las hormonas esteroides

Tanto en hombres como en mujeres adultas, las células del sistema nervioso están expuestas a altas concentraciones de P, sintetizada por los ovarios para el caso de mujeres y por las glándulas suprarrenales para ambos sexos. Además, la P es un neuroesteroide sintetizado *de novo* dentro del cerebro. Algunos de los efectos que se han asociado entre la P y el cerebro, incluyen la regulación en la excitabilidad neuronal al participar sobre la superficie de la membrana celular,

así mismo, posee efectos de modulación sobre la composición y la función de ciertos receptores⁵¹.

Los trabajos que se han realizado para estudiar el efecto neuroprotector de las hormonas esteroides han mostrado que la extirpación quirúrgica de los ovarios en ratas hembra, resultó en un aumento en el área de lesión en ratas que fueron sometidas a un evento isquémico.⁵² Así mismo, se han observado áreas de infarto más grandes en modelos isquémicos focales de ratas hembra que se encontraban en la fase de metaestro al momento del episodio; es decir, cuando sus niveles circulantes de estrógenos y progestágenos son bajos en comparación con el proestro.

También, se ha corroborado que los niveles plasmáticos de E y P están inversamente correlacionados con el volumen de infarto en el cerebro y la acumulación de neutrófilos y Dichas observaciones sugieren un importante papel neuroprotector de los estrógenos y progestágenos endógenos.⁵³

Particularmente en un estudio realizado por Bandeira y cols.⁵⁴, demostró que los animales que se encuentran gonadalmente intactos y a quienes se les administraron fármacos antagonistas de los receptores intracelulares para E y P, aumentaron de forma considerable y estadísticamente significativa el volumen de daño isquémico, lo cual ratifica la importancia de los estrógenos y progestágenos endógenos en las distintas vías de señalización molecular que se desencadenan durante y posteriores el evento isquémico, encaminadas a disminuir y reparar los daños celulares resultantes de la cascada isquémica.⁵⁴

Por otra parte, Surg⁵⁵ demostró que la administración exógena de P proporcionó protección contra la isquemia cerebral transitoria de una manera dependiente de la dosis, efecto que fue abolido por la mifepristona. Es interesante señalar que el tratamiento con P para modelos isquémicos ha mostrado una eficacia neuroprotectora de duración mediana-larga con aproximadamente una ventana de oportunidad en relación a las 6 horas.

En modelos de isquemia cerebral global transitoria Arbo y cols.⁵⁶, observaron que las ratas hembras jóvenes muestran áreas de lesión más pequeñas, así como déficits sensoriales y motores disminuidos, en comparación con ratas macho con edades similares; sin embargo, esta

diferencia de sexo no ha sido observada en mujeres a las que se les ha privado de su producción endógena de esteroides ováricos por ovariectomía o en mujeres envejecidas.

Las diferencias de sexo en la susceptibilidad a la isquemia y sus resultados se han demostrado en diferentes modelos experimentales, incluso en presencia de comorbilidades como diabetes, obesidad o hipertensión.⁵⁷

La P también es considerada un neuroesteroide con propiedades neuroprotectoras ante eventos hipóxicos, esto al promover la estabilidad de la barrera hematoencefálica, disminuir la peroxidación lipídica y anomalías morfológicas de células neurales. Mediante estos y otros mecanismos moleculares se ha corroborado la mejora en la cognición posterior a distintos tipos de daño cerebral, incluyendo aquellos provocados por lesión cerebral traumática e isquemia cerebral.⁵⁷ Además, se ha señalado a la P como la responsable en la activación de las vías de señalización directamente involucradas en los procesos de fosforilación de ciertas proteínas como la Akt y ERK, caracterizadas por su contribución en la promoción de la supervivencia celular en distintas áreas cerebrales.⁵⁸

La P también puede reducir la expresión y la actividad de la caspasa-3, un efector principal de la apoptosis⁵⁸

El incremento en los niveles sanguíneos circundantes esteroidales, es característico de los mecanismos neuroprotectores endógenos activados posteriores a los accidentes cerebrovasculares isquémicos. En un primer estudio realizado por Liu y cols.⁵⁹, demostraron que los niveles de P, y 5 α -dihidroprogesterona se encontraban elevados en el cerebro de ratones machos en un lapso de tiempo tan corto como 6 horas posteriores al evento isquémico. En un segundo estudio realizado por el mismo grupo de investigadores, se buscó detallar los cambios temporales en los niveles de esteroides en plasma sanguíneo y cerebro tanto en ratones machos como hembras en fase de diestro. Dicho estudio reveló la existencia de marcadas diferencias en los niveles cerebrales esteroidales entre machos y hembras en ausencia de lesiones cerebrales, pero también cambios directamente dependientes del sexo en los niveles esteroidogénicos endógenos después del evento isquémico.

Por tanto, el aumento significativo en los niveles de P tanto en cerebro como a nivel plasmático puede ser un mecanismo con funciones de protección neural ante los efectos negativos de los elevados niveles de glucocorticoides. Concordando con esta hipótesis, otro estudio más reciente logró verificar que el estrés crónico incrementó la neuroinflamación así como la pérdida de células piramidales en el hipocampo en las ratas que fueron sometidas a la isquemia cerebral global, dicho estudio también demostró la eficacia de la P para reducir los efectos nocivos del estrés.

2.3 Participación de los receptores de la progesterona en la neuroprotección

Schumacher y cols.⁶⁰, señalaron que los receptores para la P son promisorios mediadores del efecto neuroprotector producido por la P, al mostrar diversas funciones dentro del daño isquémico como son: la proliferación y maduración de oligodendrocitos, la regeneración central de mielina y algunas funciones reguladoras en la microglia, resultando en efectos antiinflamatorios. Por su parte Peña Casanova y cols.⁶¹, refieren diversos estudios donde los tratamientos con P en ratas y ratones después del ACV reducen el volumen de lesión y recobraban la función neurológica. Con la utilización de ratones knock out de receptores para progesterona totales y ratones que carecen selectivamente de expresión de estos en las células neurales centrales de (ratones PRNesCre), se evidenció que la deficiencia de receptores a P, promueve un aumentaba en el daño cerebral e incrementa el deterioro de algunas funciones de tipo motor posteriores a la isquemia. De esta manera Zhu y cols.⁶², también con el uso de ratones knock out, apoyan la idea del papel crucial de los receptores a P en la neuroprotección después de eventos isquémicos, pues la ausencia de receptores generó un aumento del daño celular y deterioro de la coordinación motora. Estos resultados sugieren un papel muy importante de la P y su receptor en la neuroprotección después de un evento isquémico, tal vez a través de la modulación de transcripción de genes diana, ya que la distribución de dichos receptores no solamente es en el útero, los ovarios o glándulas mamarias, sino que pueden ser expresados en todo el cerebro, siendo más abundantes no sólo en los núcleos hipotalámicos asociados al control de funciones de índole reproductiva sino también en la corteza cerebral y algunas estructuras subcorticales incluyendo al hipocampo.

La casi nula atención que se le ha prestado a los receptores a progesterona en su relación con las diversas funciones cerebrales, como la neuroprotección, se encuentra íntimamente relacionado con la suposición, aun ampliamente aceptada de que los efectos neuroprotectores de la P, son mediados y facilitados por su metabolito la alopregnona⁶³; sin embargo, otros autores reportan que incluso las funciones neuroprotectores de la P pueden ser limitadas por su metabolito, que no interactúa con los receptores de la P; sin embargo, se ha reportado que el metabolito de la P, al oxidarse a 5 α -dihidroprogesterona (5 α -DHP) interactúa con los receptores de P, regulando las funciones neuronales mediante la activación génica.⁶⁴

La biodisponibilidad de los receptores a P se encuentra regulada por los estrógenos y la P en el hipotálamo; sin embargo, la expresión de receptores de P en otras áreas cerebrales como el núcleo supraóptico, el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo amigdaloides y la región CA1 del hipocampo⁶⁵, sólo son moderadamente inducidos por el estrógeno. De igual manera, la P regula a la baja sus receptores inducidos por estrógenos en el hipotálamo, pero no aquellos que no son inducidos por estrógeno, como en el caso de la población de receptores de la corteza frontal, bulbo olfatorio, así como en el cerebelo; mientras que sólo regula a la baja la isoforma PR-A en el hipocampo.

Los estudios realizados por (Güleç 2018) utilizando ratones KO para el receptor a P demostraron que la carencia de dicho receptor en machos juveniles incrementó de forma considerable el daño cerebral isquémico, así como los problemas motores 6 y 24 horas después del accidente vascular. Este tipo de resultados destacan la relevancia de los procesos moleculares dependientes de este receptor para la protección cerebral sobre todo en la fase aguda. Este grupo de investigadores desarrolló una línea de ratones transgénicos carentes selectivamente para la expresión de receptores a P en células neurales, con la finalidad de evaluar el papel del receptor ante daño isquémico. Sus resultados mostraron que los ratones de esta línea después de una isquemia cerebral transitoria desarrollaron déficits neurológicos de forma exacerbada en comparación con los animales que expresan el receptor de forma normal; sin embargo, la falta de expresión de estos receptores, mostró efectos más nocivos en machos que en hembras jóvenes.⁶⁶

Los hallazgos de estos autores sugieren la existencia de un mecanismo cerebroprotector endógeno que actúa de manera precoz y que depende de la biodisponibilidad y función de los receptores a P, tanto en células neurales de mujeres jóvenes, así como de hombres. Si bien puede existir una similitud en este proceso cerebroprotector en ambos sexos después del accidente isquémico, sus eficiencias pueden ser diferentes. Lo cual plantea una dificultad pues la principal problemática es la progresiva y masiva propagación del daño en el tejido nervioso derivado de la pérdida neural.⁶⁷ Si bien los modelos experimentales avocados a estudiar los accidentes cerebrovasculares isquémicos han generado fuerte evidencia de los efectos benéficos de la P, la gran mayoría de los estudios han evaluado sus funciones en modelos de isquemia focal.⁶⁸

2.4 Neuroprotección con progesterona

Los tratamientos neuroprotectores con hormonas esteroides han permitido determinar que el estrógeno es la hormona más efectiva para evitar los efectos dañinos causados por un evento isquémico; sin embargo, los estudios realizados para determinar el efecto neuroprotector de la progesterona en modelos de isquemia cerebral global, han mostrado que esta última también ofrece muy buenos resultados en diferentes modelos de isquemia cerebral. La mayoría de los trabajos utilizando progesterona como agente neuroprotector han explorado diferentes dosis de la hormona como tratamiento y ha permitido determinar que la dosis más efectiva para disminuir el daño producido por eventos isquémicos en modelos animales, es de 8mg/kg, generalmente inoculada vía subcutánea y/o intraperitoneales.⁶⁹ En un modelo transitorio de oclusión de la arteria cerebral media, la administración de 8 mg/kg de progesterona a las 2 h después de la isquemia, redujo el tamaño del infarto y mejoró los resultados funcionales, mientras que el tratamiento con 4 o 32 mg/ no tuvo efectos.⁷⁰

En otro modelo de accidente cerebrovascular permanente Brotfain y cols.⁷¹, obtuvieron resultados benéficos en la disminución de la pérdida neural con dosis de P a dosis de 8mg/kg o 16mg/kg con resultados funcionales incluso tres semanas posteriores en ratas envejecidas. Cabe destacar que dicha dosis mostró mayor eficiencia para mejorar la memoria de tipo espacial. Un estudio más reciente realizado por el mismo grupo de investigadores, logró un incremento de la

supervivencia en isquemia crónica hasta las 8 semanas, mostrando aún una mejora en los animales tratados con el compuesto hormonal a la misma dosis.

Como se mostró anteriormente en múltiples estudios experimentales lograron demostrar que el tratamiento con P mejora la capacidad de recuperación neural, aumenta el conteo de células neurales, modifica la expresión de genes proapoptóticos, disminuye la extensión de la lesión e infarto isquémico y mejora la memoria espacial así como la funcionalidad motora; sin embargo, aún no se conoce del todo la complejidad de los eventos celulares y moleculares orquestados por la P para la neuroprotección ante eventos isquémicos. Basados en esta necesidad se han realizado estudios donde se observaron varias vías receptoras por las cuales actúa la P. Una de las posibilidades del efecto neuroprotector de la P es a través de unirse a la 25-Dx, la cual se encuentra regulada mediante el aumento en las neuronas e inducida en los astrocitos posteriores a la lesión isquémica en distintas estructuras involucradas en la osmorregulación y homeostasis de agua al controlar el edema celular.^{72,73}

El tratamiento con P posterior a la isquemia produce efectos neuroprotectores como el aumento en la proteína asociada al crecimiento y la sinaptofisina, ambos correlacionados como marcadores de sinaptogénesis, con la utilización de P posterior a la oclusión de los 4 vasos para provocar isquemia cerebral global. Por su parte Zhao y cols.⁷⁴, documentaron que la P conserva las estructuras citoarquitectónicas, incluyendo las bifurcaciones dendríticas y las estructuras espinosas incluso 4 meses posteriores a la isquemia cerebral global. Adicionalmente, el aumento en la concentración de calcio inducido por NMDA intracelular también se ve atenuado por P después de la oclusión parcial de la arteria cerebral media.

3. JUSTIFICACIÓN

La progesterona tiene propiedades neuroprotectoras en modelos animales de isquemia cerebral, se ha propuesto que dicha hormona puede ejercer estas propiedades cuando se administra en machos intactos; sin embargo, se desconoce el periodo de ventana apropiado para el inicio del tratamiento hormonal en hembras que han sido ovariectomizadas y sometidas a isquemia cerebral global aguda.

4. HIPÓTESIS

El efecto neuroprotector de la progesterona será mayor en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas con 15 días de ovariectomía.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Explorar el efecto neuroprotector de la progesterona en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas ovariectomizadas después de un episodio de isquemia cerebral global aguda.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la administración de progesterona sobre el daño producido a las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, después de un episodio de ICGA en ratas con 15 días post-ovariectomía.
2. Evaluar el efecto de la administración de progesterona sobre el daño producido a las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, después de un episodio de ICGA en ratas con 30 días post-ovariectomía.

6. METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio

Este trabajo de investigación es un estudio descriptivo mixto, ya que se analizó la población neural hipocampal posterior a un estado de isquemia cerebral global con un tratamiento neuroprotector de progesterona.

6.2 Especificaciones de los animales

Para el presente trabajo se utilizó un total de 36 ratas hembra de la cepa Sprague Dawley. Los animales fueron asignados aleatoriamente en 6 grupos (*Grupo control 15 días n=6, Grupo control de 30 días n=6, Grupo isquémico de 15 días sin Tx n=6, Grupo isquémico de 30 días sin Tx n=6, Grupo isquémico de 15 días con Tx n=6 y Grupo isquémico de 30 días con Tx n=6*). El promedio de edad de los sujetos de estudio fue de 3 meses y un peso de 300-350 gr obtenidos de la colonia del Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala. Los animales fueron mantenidos a una temperatura de $(23 \pm 2^{\circ}\text{C})$, con un ciclo invertido de luz-obscuridad (14:10, la luz se apaga a las 10:00h); alimentados con nutricubos Purina (Purina, México) y agua a libre acceso. El manejo de los animales y los procedimientos experimentales se apegaron a los protocolos de la ley mexicana de protección animal (NOM-062-ZOO-999).

6.3 Variable de estudio

Nuestra variable de estudio dependiente fue la respuesta a la administración de P a dosis de 8 mg/kg.

6.4 Asepsia, cirugías e inducción de la isquemia cerebral global

Los animales fueron sometidos al proceso de isquemia cerebral global aguda de acuerdo a la metodología propuesta por (Pulsinelli y Brierley, 1979), la cual consiste en la oclusión de las cuatro arterias principales que irrigan el cerebro (arterias vertebrales y arterias carótidas) mediante la implementación de tres cirugías preparatorias, denominadas ovariectomía, electrocauterización de arterias vertebrales y exposición de arterias carótidas comunes. Estos procedimientos se realizaron bajo una asepsia rigurosa, variando únicamente el área anatómica según correspondió en cada caso, éste manejo tuvo como finalidad garantizar la pulcritud del área exploratoria, optimizando la recuperación de los animales, dicho proceso se describe a continuación:

6.4.1 Asepsia quirúrgica

Es una técnica de prevención que intenta evitar la transmisión de microorganismos patógenos a los tejidos manipulados durante el proceso operatorio, actuando sobre los órganos mediante productos químicos llamados antisépticos, los cuales logran la condición tisular libre de microorganismos que producen enfermedades o infecciones. La asepsia quirúrgica consiste en varios pasos que involucran al cirujano, el material y equipo, así como el propio paciente.

El primer paso de la asepsia quirúrgica consistió en el lavado profuso con agua y jabón, así como la desinfección (con yodo o autoclave según corresponda) del área operatoria, instrumental y equipo. Una vez garantizada la inocuidad en la utilización de la mesa quirúrgica, instrumental y equipo, se realizó la preparación del cirujano, comenzando con el lavado de manos en ocho fases, repitiendo la técnica en 3 ocasiones. Una vez concluido el lavado de manos se procedió a la colocación cuidadosa de guantes, cubrebocas y bata al cirujano, siendo muy importante evitar su contaminación durante el acto. Posteriormente el primer ayudante colocó cuidadosamente a las ratas y las introdujo en la cámara anestésica con ventilación al 60% de Sevoflurano para conseguir que el animal entrara en un plano pre-quirúrgico, esto sirve para facilitar la manipulación del paciente, de esta forma se logra disminuir su estrés y la posibilidad de daño físico. Con el animal sedado se hizo el rasurado de pelo con máquina en las regiones anatómicas ventroabdominal, nuca y cuello para la ovariectomía, electrocauterización de

arterias vertebrales y exposición de arterias carótidas comunes respectivamente. Acto seguido se procede al lavado del área rasurada y su periferia con agua y jabón, posteriormente con Benzalconio y finalmente se retira el exceso con gasas. Una vez concluida la asepsia quirúrgica se posiciona al animal y se procede a la realización de las distintas técnicas quirúrgicas que se describen enseguida.



Figura 1. *Equipo y material quirúrgico necesarios para la realización del protocolo isquémico.*

6.5 Ovariectomía

La ovariectomía es la definición establecida para referirse al procedimiento quirúrgico cuyo objetivo es el de extirpar las gónadas sexuales femeninas (ovarios). Este procedimiento contribuyó a evitar las fluctuaciones en las concentraciones estrogénicas séricas, lo que podría haber modificado nuestros resultados al estar trabajando con un modelo con fluctuaciones hormonales variables. Para la realización de esta cirugía se posicionó a los animales decúbito dorsal y se comenzó haciendo una incisión en piel con mango y hoja de bisturí sobre la línea media ventral al nivel de la intersección del segundo par de pezones a razón de 0.5 cm aproximadamente. Enseguida con unas tijeras tipo Mayo se realizó la separación de la piel y la fascia muscular para poder incidir los músculos abdominales de forma más precisa e ingresar a cavidad ventroabdominal. Con ayuda de pinzas de exploración, se localizaron los cuernos uterinos y se protuyeron. Al estar expuestas las tubas uterinas, se realizó un riego de lidocaína con epinefrina para disminuir el sangrado y dolor al mínimo. Al observar la vasoconstricción local inducida, se procedió a la colocación de suturas absorbibles con catgut crómico por debajo de los cuerpos ováricos. Una vez que se hizo la hemocontención ovárica, se realizó el seccionamiento con tijeras de corte recto Metzembraum.

Al corroborar que no existían hemorragias, las vísceras se lubricaron con suero fisiológico y fueron reintroducidas para comenzar con la primera sutura de músculo en técnica de U y posteriormente la sutura de piel con puntos simples separados para concluir con el procedimiento.



Figura 2. *Proceso quirúrgico de extirpación ovárica (ovariectomía). Es ésta figura se puede observar la protrusión, extirpación y sutura de las gónadas sexuales femeninas en rata de la cepa Sprague-Dawley.*

6.6 Electrocauterización de arterias vertebrales

La segunda cirugía preparatoria que se realizó fue la electrocauterización de arterias vertebrales. En esta cirugía se busca reducir de forma permanente el flujo sanguíneo proyectado por estas arterias sin que se induzca un proceso isquémico propiamente. Para realizar este procedimiento el animal fue colocado en una posición decúbito ventral y fijado por el tren superior con ayuda de un aparato estereotáxico. Fue realizada una incisión con hoja y mango de bisturí sobre la línea media dorsal con una longitud de 1 cm aproximadamente, a nivel de la cruz. Inmediatamente después, con un separador tisular mecánico (blefaróstato) y pinzas curvas de exploración, se hizo la desunión de los músculos esplénicos cervicales y se localizó el foramen vertebral. Utilizando un microscopio quirúrgico, así como un lápiz electrocauterio se

cauterizaron las arterias vertebrales. Por último, se realizó una sutura con hilo catgut crómico 000 haciendo puntos simples continuos.

6.7 Exposición de arterias carótidas comunes

La exposición de arterias carótidas comunes fue la última de las tres cirugías preparatorias que se realizaron previas al proceso isquémico. Esta cirugía se practicó con la finalidad de localizar y exaltar las arterias carótidas comunes para ser más fácil su ubicación, retracción y oclusión durante el evento isquémico. En primera instancia se procedió a colocar al animal decúbito dorsal y se realizó una incisión en piel de 1.5 cm aproximadamente con hoja y mango de bisturí a través de la línea media ventral a nivel del canal vertebral cervical. Posteriormente con micro-pinzas de exploración y haciendo uso de un microscopio quirúrgico se localizaron los vasos de interés y fueron separados cuidadosamente del nervio vago. Una vez que se liberó el vaso, éste se abrazó sin ser anudado con sutura no absorbible tipo nylon de forma bilateral. Finalmente se realiza una sutura en piel con puntos simples continuos y material de sutura indistinta.

6.8 Isquemia cerebral global aguda

Posteriormente a la realización de las cirugías preparatorias se prosiguió a ejecutar el procedimiento isquémico, el cual tiene como propósito inducir un daño celular cerebral por ausencia de glucosa y oxígeno.

El proceso inicia con la inducción anestésica del animal a plano pre-quirúrgico mediante una exposición inhalatoria de Sevoflurano al 60%. De forma inmediata se colocó al animal decúbito dorsal para retirar la sutura de la cirugía anterior. Con auxilio de micro-pinzas para exploración se expusieron las arterias carótidas comunes por retracción de los hilos posicionados previamente. Al ir retrayendo cada uno de los hilos, fueron colocados clips quirúrgicos para ocluir las arterias carótidas comunes, que sumado al proceso de electrocauterización ocluyó los cuatro vasos. Con este paso se inicia propiamente la isquemia cerebral. Quince minutos después

de haber colocados los clips quirúrgicos se hizo el retiro de los mismos. Si al menos 20 minutos posteriores a la reperusión el animal permanecía sin recuperar el reflejo de enderezamiento ni poseer movimientos voluntarios, entonces fue considerado para el estudio. Otros factores a considerar para ingresar o descartar a los animales en el protocolo de investigación fueron la pérdida de peso no mayor a 30 gr entre cada una de las cirugías y la manifestación clínica de los signos patognomónicos isquémicos como la piloerección, asimetría de miembros torácicos y pélvicos, hiperextensión o hipercontracción falángica, movimientos rotatorios de cauda, ataxia, espasmos musculares, movimientos de acicalamiento, respiración abdominal, movimientos masticatorios o de pedaleo entre otros.

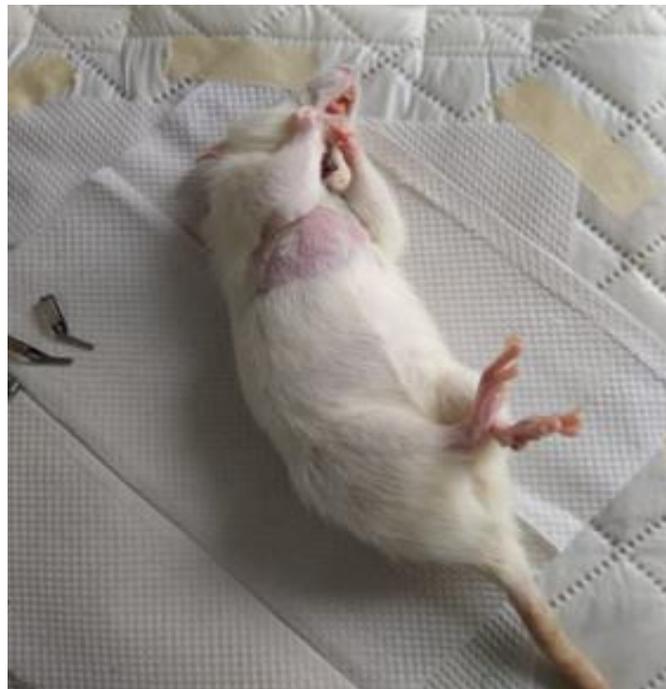


Figura 3. *Signos clínicos patognomónicos isquémicos en rata hembra de la cepa Sprague Dawley. En ésta figura se puede apreciar algunos signos clínicos propios de la ICGA como lo es la asimetría de miembro, la torsión de columna y piloerección.*

6.9 Perfusión

La perfusión de los animales se hizo siete días posteriores al proceso isquémico. Para poder realizarlas las ratas fueron anestesiadas con Sevoflurano y rápidamente se seccionaron órganos y tejidos con tijera de corte punta recta desde la porción ventral hasta alcanzar la cavidad torácica y exponer el corazón. Se les introdujo en el ápice inferior del ventrículo izquierdo una aguja conectada a una bomba de perfusión marca Daigger modelo fisherbrand por la cual se les perfundieron 400ml de solución de PBS ph 7.5 e inmediatamente después, 400ml de solución de formalina al 10%. Como paso siguiente se realizó la decapitación de los individuos para la extracción del tejido cerebral completo. Una vez obtenido el tejido cerebral, se hizo la sección del mismo con navajas, consiguiendo la porción media que es la de nuestro particular interés.

Éstos tejidos fueron crioprotectados colocándolos en soluciones de sacarosa en concentraciones del 10%, 20% y 30% durante veinticuatro horas en cada solución previos a ser sometidos al proceso histológico.

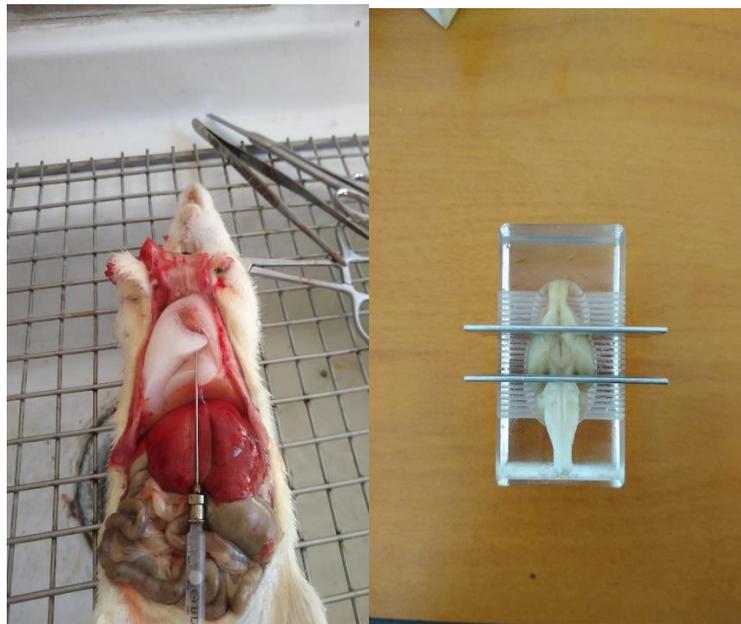


Figura 4. *Técnica de perfusión y extracción de tejido cerebral. En ésta figura podemos apreciar en la porción izquierda la perfusión intracardiaca y en la porción derecha un cerebro en seccionamiento para su crioprotección*

6.10 Especificaciones quirúrgicas y experimentales

Debemos destacar que, para los propósitos de nuestro estudio, los procedimientos quirúrgicos preparatorios fueron idénticos para el total de individuos, sin importar el grupo al que pertenecieron. Sin embargo, el proceso isquémico fue omitido para los animales que conformaron los grupos control (*grupo control de 15 días post isquemia* y *grupo control de 30 días post isquemia*).

Una vez recuperados los animales que fueron sometidos al evento isquémico, recibieron una sola administración de solución salina, 10ml/individuo vía subcutánea. Esto se realizó debido a que el daño neural que sufren los animales post-isquemia genera una fuerte deshidratación horas posteriores al experimento.

Los días siguientes al evento isquémico, los individuos fueron manipulados única y exclusivamente para realizar la administración del vehículo (aceite vegetal) o P según correspondiera, hasta su sacrificio.

6.11 Experimento 1. Efecto de la administración de P, sobre el daño producido a las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas con 15 días post-ovariectomía.

Los animales que conformaron el grupo isquémico de 15 días con tx recibieron la administración farmacológica de P a dosis de 8mg/kg vía intraperitoneal. Esto se hizo dos horas antes del evento isquémico y una hora después del mismo. Posterior a la culminación del proceso isquémico, los individuos de este grupo recibieron administraciones de P 6 horas y cada 24 horas durante 7 días hasta su sacrificio, cambiando solamente la vía de administración que para efecto de estas horas y días fue subcutánea. Para el caso de los animales que conformaron el grupo isquémico se les designó el mismo cronograma farmacológico antes descrito; sin embargo, el compuesto que se les administró fue un vehículo oleoso supliendo a la P.

Las dosis y las diferentes vías de administración de la P se basaron en el trabajo de Espinoza-García⁷⁵ con la finalidad de que a la P se le pudiera ofrecer suficiente tiempo para lograr adherirse a la mayor cantidad de receptores intracelulares pero que también fuese de forma rápida. Las dosis subcutáneas estuvieron pensadas en tener una absorción lenta para extender el efecto farmacológico.

6.11.1 Cronograma quirúrgico experimento 1

Para la realización del protocolo isquémico, los grupos que fueron asignados al experimento 1, se les realizó la primera cirugía preparatoria (ovariectomía) en el día cero.

Al día número cinco se procedió con la segunda cirugía preparatoria (electrocauterización de arterias vertebrales).

En el día número doce se les practicó a los sujetos de estudio la tercera y última cirugía preparatoria (exposición de arterias carótidas comunes).

Es así, que en el día número quince se instauró el evento isquémico propiamente.

Finalmente, el protocolo isquémico culminó con el sacrificio y perfusión de los sujetos experimentales en el día veintidós, es decir, una semana posterior al evento isquémico.

6.12 Experimento 2. Efecto de la administración de P, sobre el daño producido a las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas con 30 días post-ovariectomía.

Los animales que conformaron el grupo isquémico de 30 días con tx recibieron la administración farmacológica de P a dosis de 8mg/kg vía intraperitoneal. Esto se hizo dos horas antes del evento isquémico y una hora después del mismo. Posterior a la culminación del proceso isquémico, los individuos de este grupo recibieron administraciones de P 6 horas y cada 24 horas durante 7 días hasta su sacrificio, cambiando solamente la vía de administración que para efecto de estas

horas y días fue subcutánea. Para el caso de los animales que conformaron el grupo isquémico se les designó el mismo cronograma farmacológico antes descrito; sin embargo, el compuesto que se les administró fue un vehículo oleoso supliendo a la P.

Como ya se mencionó, las dosis y las diferentes vías de administración de la P se basaron el trabajo de Espinoza-García⁷⁵ y se realizaron con la finalidad de que a la P se le pudiera ofrecer suficiente tiempo para lograr adherirse a la mayor cantidad de receptores intracelulares pero que también fuese de forma rápida. Las dosis subcutáneas estuvieron pensadas en tener una absorción lenta para extender el efecto farmacológico.

6.12.1 Cronograma quirúrgico experimento 2

Para la realización del protocolo isquémico, los grupos que fueron asignados al experimento 2, se les realizó la primera cirugía preparatoria (ovariectomía) en el día cero.

Al día número veinte se procedió con la segunda cirugía preparatoria (electrocauterización de arterias vertebrales).

En el día número veintisiete se les practicó a los sujetos de estudio la tercera y última cirugía preparatoria (exposición de arterias carótidas comunes).

Es así, que en el día número treinta se instauró el evento isquémico propiamente.

Finalmente, el protocolo isquémico culminó con el sacrificio y perfusión de los sujetos experimentales en el día treinta y siete, es decir, una semana posterior al evento isquémico.

6.13 Evaluación Histológica

Una vez crioprotegidos los tejidos cerebrales se realizó el proceso histológico comenzando por la obtención de láminas tisulares de 16 μ m de grosor con un criostato marca Leyca. Se seccionó toda la formación hipocampal y se montaron en laminillas preparadas con grenetina. Para concluir el proceso histológico el tejido se tiñó con la técnica de violeta de cresilo.



Figura 5. *Tejido cerebral en criostato y tren de tinción. En ésta figura podemos visualizar en la porción izquierda tejido cerebral montado en criostato listo para ser cortado y en la porción derecha un tren de tinción para realizar el proceso histológico con la técnica violeta de cresyl.*

Posteriormente se capturaron imágenes panorámicas y regionales con aumentos de 5X, 10X, 20X y 40X en las porciones hipocampales CA1, CA2 y CA3 con un microscopio óptico marca Leyca. Finalmente se realizó el conteo de las poblaciones neurales hipocampales en las regiones antes mencionadas de forma bilateral en tres muestras por animal y en un campo de $1000\mu\text{m}^2$ se consideraron las coordenadas del atlas de Paxinos desde Interaural 5.40mm y Bregma -3.60mm hasta Interaural 4.48mm y Bregma -4.52, para la obtención de los cortes. De esta manera se determinó de forma manual el total de células piramidales en cada campo y en consecuencia los efectos de la ICGA así como del tratamiento probado.

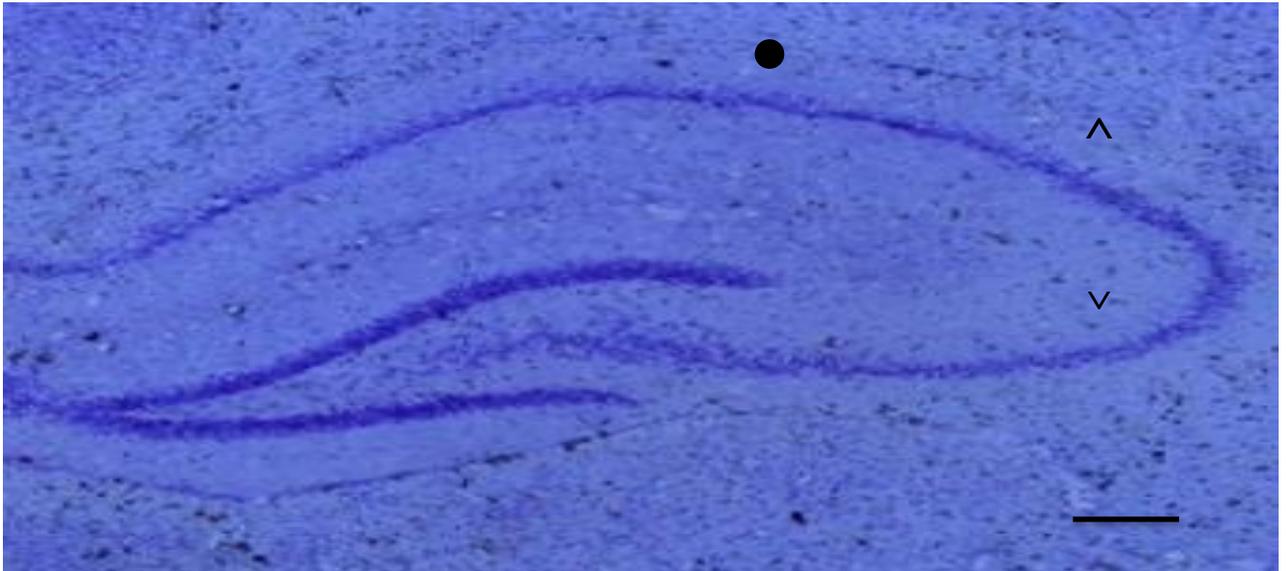


Figura 6. *Microscopia de la formación hipocampal porción derecha. Región CA1 ●, Región CA2 ▲, Región CA3 ▼. Escala 100 μ . Aumento 5x.*

7. RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de la administración de P, sobre el daño producido a las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas con 15 días post-ovariectomía.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que en la región CA1 del hipocampo, la isquemia redujo dramáticamente el conteo neuronal de las hembras que sufrieron la isquemia en comparación con el grupo control (Figura 7). Sin embargo, cuando se administró la P, ésta produjo un efecto neuroprotector sobre las neuronas piramidales de esta región del hipocampo, llegando a ser significativo ($p \leq 0.001$) cuando se comparó con el grupo que sufrió la isquemia, sin llegar a lograr una recuperación tan importante como los animales control.

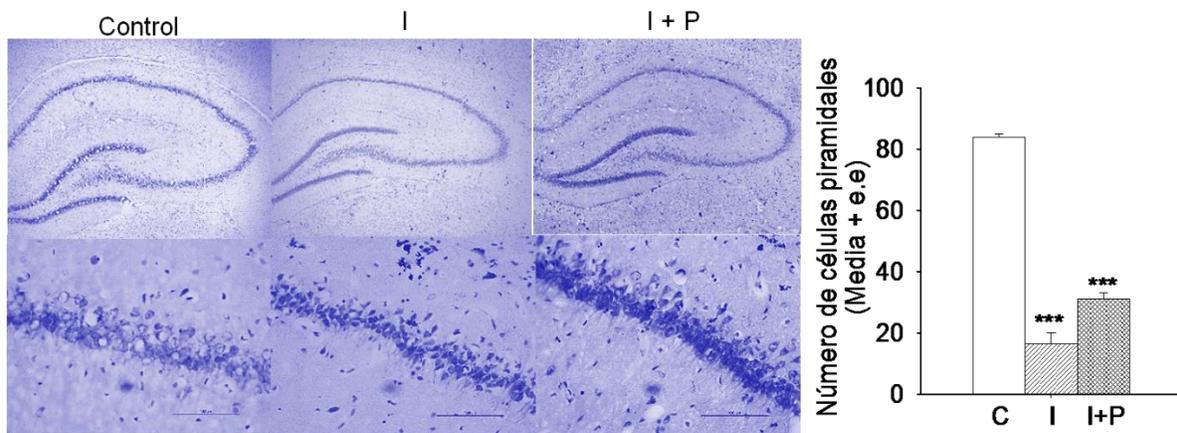


Figura 7. Efecto de la administración de 8mg/kg de P, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas con 15 días post-ovariectomía posterior a un evento isquémico. Los asteriscos sobre el grupo que recibió el evento isquémico indican comparación con el grupo control, mientras que los asteriscos sobre la barra del grupo que recibió la P, indican comparación con el grupo isquémico. Prueba t-test. *** $P < 0.001$. Control (C), Isquemia (I), Isquemia + Progesterona (I+P).

La figura 8 muestra el número de células piramidales en la región CA2 del hipocampo posterior a un evento isquémico en hembras con 15 días post-ovariectomía. La administración de P no produjo un efecto neuroprotector significativo en células piramidales de la región CA2 del hipocampo posterior a un evento isquémico en comparación con las ratas del grupo control, así como las ratas del grupo que no recibió tratamiento.

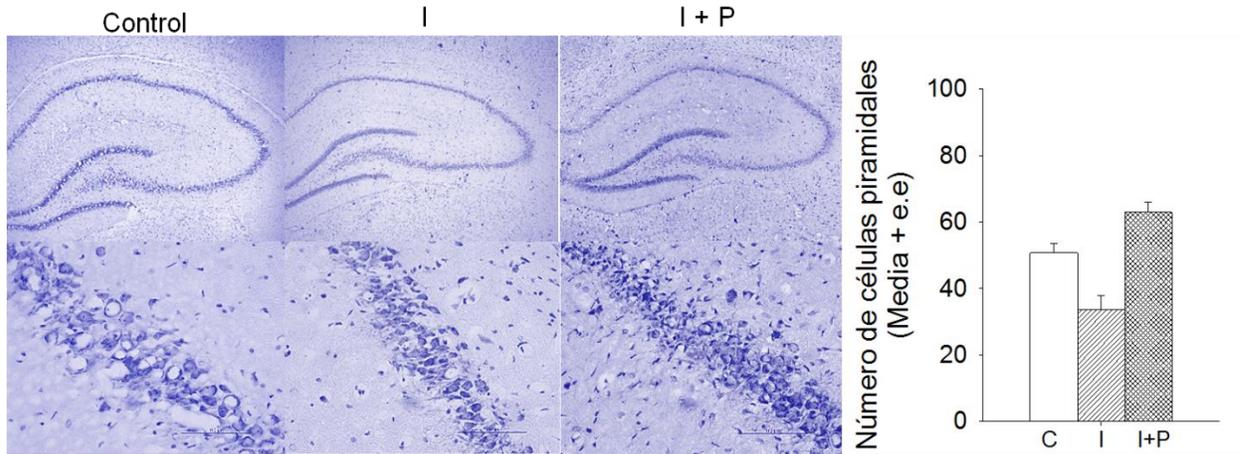


Figura 8. Efecto de la administración de 8mg/kg de P, sobre el número de células piramidales de la región CA2 del hipocampo en ratas con 15 días post-ovariectomía posterior a un evento isquémico. Control (C), Isquemia (I), Isquemia + Progesterona (I+P).

La figura 9 muestra el número de células piramidales en la región CA3 del hipocampo posterior a un evento isquémico en hembras con 15 días post-ovariectomía. La administración de P no produjo un efecto neuroprotector significativo en células piramidales de la región CA3 del hipocampo posterior a un evento isquémico en comparación con las ratas del grupo control así como las ratas del grupo que no recibió tratamiento.

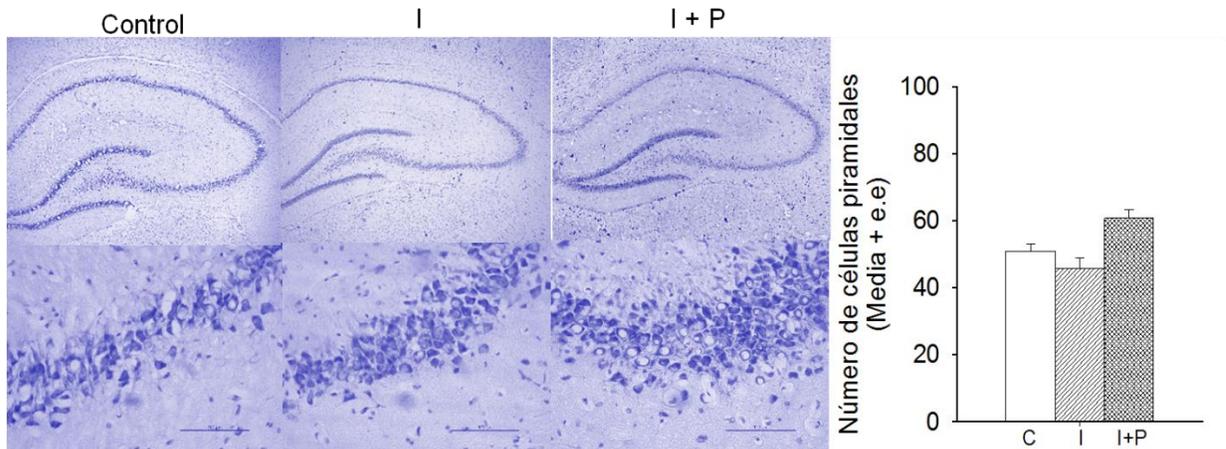


Figura 9. Efecto de la administración de 8mg/kg de P, sobre el número de células piramidales de la región CA3 del hipocampo en ratas con 15 días post-ovariectomía posterior a un evento isquémico. Control (C), Isquemia (I), Isquemia + Progesterona (I+P).

Experimento 2. Efecto de la administración de P, sobre el daño producido a las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas con 30 días post-ovariectomía.

La figura 10 muestra el número de células piramidales en la región CA1 del hipocampo posterior a un evento isquémico en hembras con 30 días post-ovariectomía. La administración de P produjo un efecto neuroprotector significativo ($p \leq 0.001$) en células piramidales de la región CA1 del hipocampo posterior a un evento isquémico en comparación con las ratas del grupo control, así como las ratas del grupo que no recibió tratamiento.

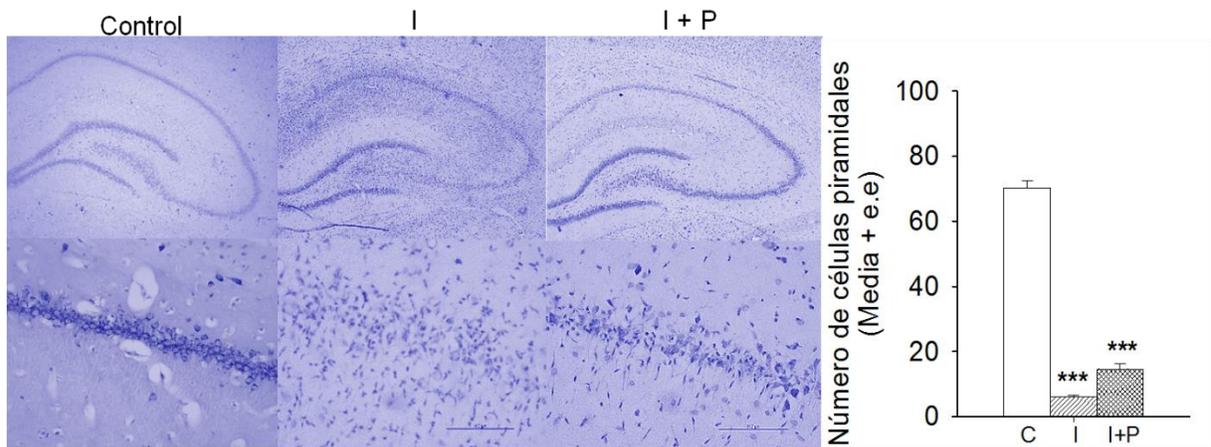


Figura 10 Efecto de la administración de 8mg/kg de P, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas con 30 días post-ovariectomía posterior a un evento isquémico. Los asteriscos sobre el grupo que recibió el evento isquémico indican comparación con el grupo control, mientras que los asteriscos sobre la barra del grupo que recibió la P, indican comparación con el grupo isquémico. Prueba t-test. *** $P < 0.001$. Control (C), Isquemia (I), Isquemia + Progesterona (I+P).

La figura 11 muestra el número de células piramidales en la región CA2 del hipocampo posterior a un evento isquémico en hembras con 30 días post-ovariectomía. La administración de P no produjo un efecto neuroprotector significativo en células piramidales de la región CA2 del hipocampo posterior a un evento isquémico en comparación con las ratas del grupo control, así como las ratas del grupo que no recibió tratamiento.

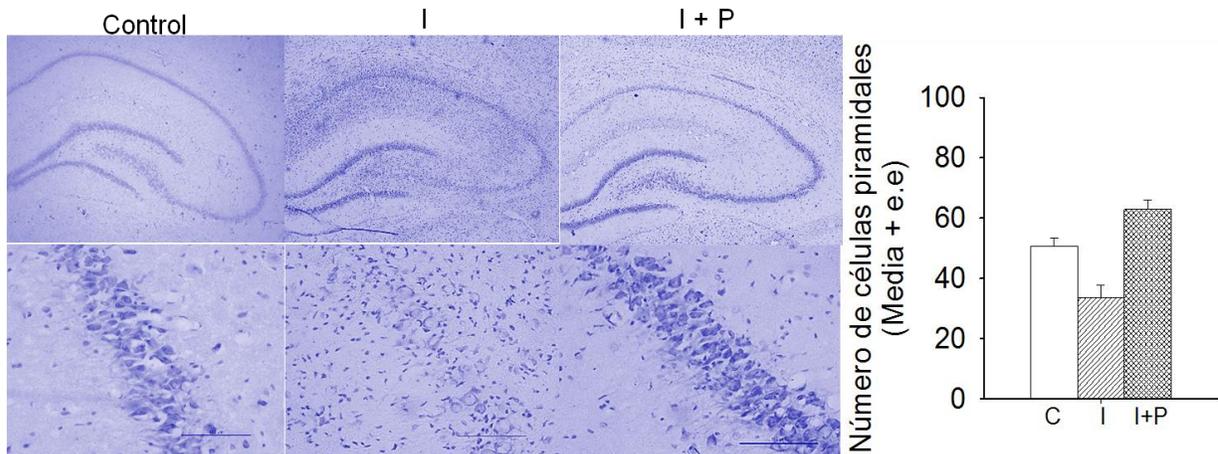


Figura 11. Efecto de la administración de 8mg/kg de P, sobre el número de células piramidales de la región CA2 del hipocampo en ratas con 30 días post-ovariectomía posterior a un evento isquémico. Control (C), Isquemia (I), Isquemia + Progesterona (I+P).

La figura 12 muestra el número de células piramidales en la región CA3 del hipocampo posterior a un evento isquémico en hembras con 30 días post-ovariectomía. La administración de P no produjo un efecto neuroprotector significativo en células piramidales de la región CA3 del hipocampo posterior a un evento isquémico en comparación con las ratas del grupo control, así como las ratas del grupo que no recibió tratamiento.

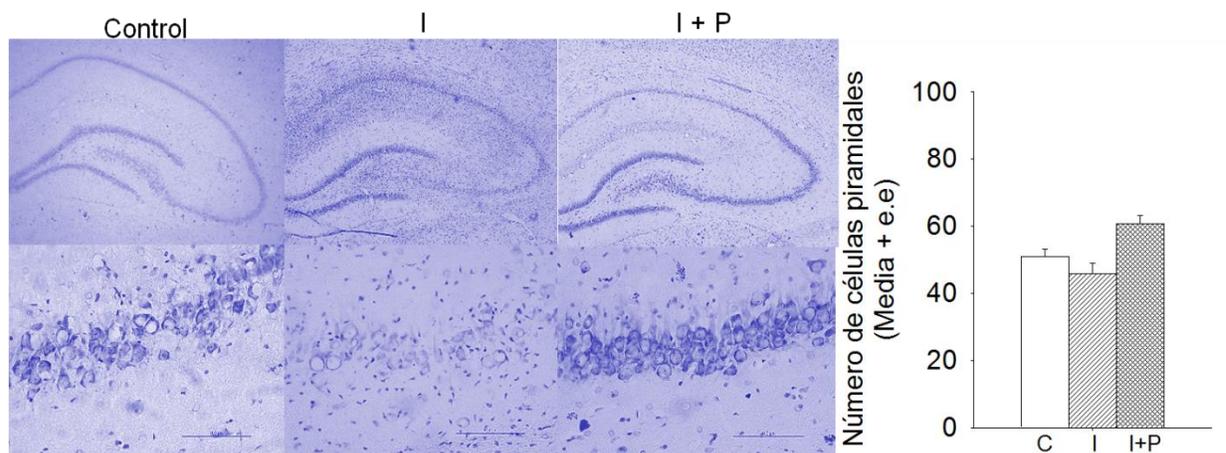


Figura 12. Efecto de la administración de 8mg/kg de P, sobre el número de células piramidales de la región CA3 del hipocampo en ratas con 30 días post-ovariectomía posterior a un evento isquémico. Control (C), Isquemia (I), Isquemia + Progesterona (I+P).

La figura 13 muestra la comparación del número de células piramidales en la región CA1 del hipocampo, entre las hembras con 15 y 30 días post-ovariectomía posterior a un evento isquémico y que recibieron el tratamiento de 8mg/kg de P. Es interesante señalar que la administración de P produjo un mayor efecto neuroprotector ($p \leq 0.001$) en células piramidales de la región CA1 del hipocampo posterior a un evento isquémico, en las ratas con 15 días post-ovariectomía en comparación con las ratas del grupo con 30 días post-ovariectomía. El análisis de los datos normalizados y de la tasa de sobrevivencia celular confirman que existe una diferencia significativa entre los grupos Isq + P con 15 y 30 días post ovariectomía, Véase (Tabla 1)

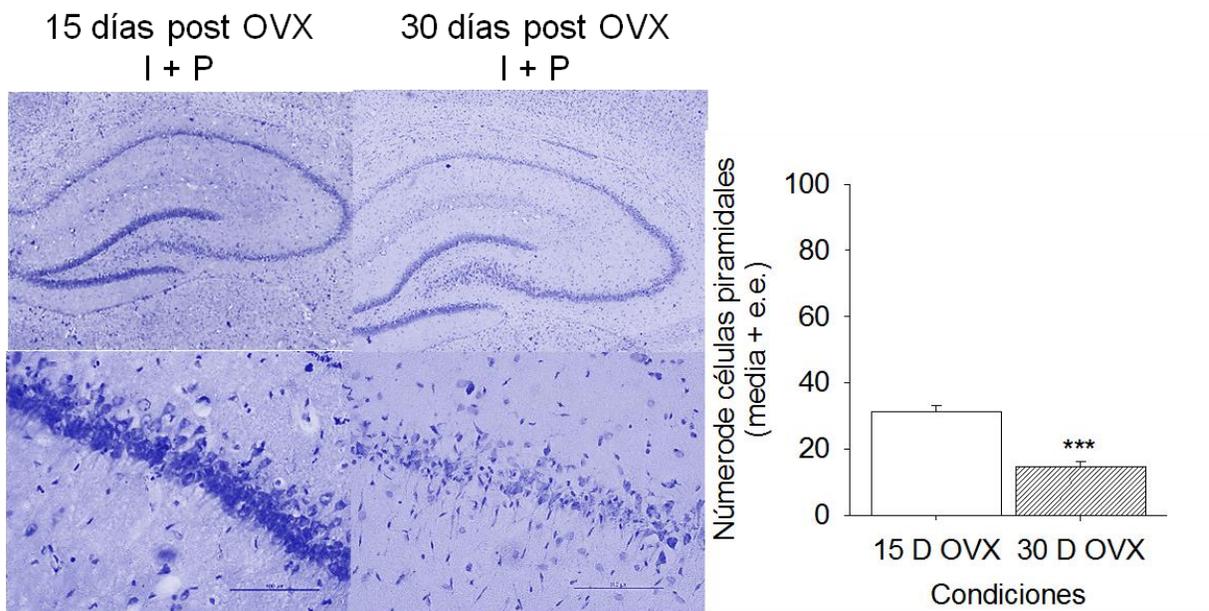


Figura 13 Efecto de la administración de 8mg/kg de P, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas con 15 y 30 días post-ovariectomía posterior a un evento isquémico. Los asteriscos sobre el grupo de 30 días indican comparación con el grupo de 15 días post-ovariectomía. Prueba t-test. *** $P < 0.001$. Isquemia (I), Isquemia + Progesterona (I+P).

Tabla 1. Resultados normalizados y tasa de sobrevivencia de los grupos experimentales con 15 y 30 días post-ovariectomía.

Condición	Tratamiento	Media del conteo (1000 μm^2)	Media normalizada	Tasa de sobrevivencia (%)
15 días post OVX	Control	83	86.24	100
	Isq	16.35**	16.99**	15.3**
	Isq + P	31.22**	32.44**	37.62**
30 días post OVX	Control	71.19	85.72	100
	Isq	7.4**	7.26**	8.52**
	Isq + P	14.56**	18.84**	22**

Los asteriscos en los grupos isquémicos muestran la comparación con el grupo control, mientras que los ubicados en los grupos isquémicos más progesterona, muestran comparación con el grupo isquémico; ** $p < 0,01$.

8. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran que la implementación de un protocolo farmacológico de P, utilizando dosis de 8mg/kg para ratas que fueron ovariectomizadas 15 y 30 días previamente a ser sometidas a un proceso isquémico, les produjo una mayor neuroprotección hipocampal en contraparte con los grupos control a los que no se les administró la hormona. El efecto farmacológico neuroprotector de la P fue evidenciado en la supervivencia neural de las células piramidales que conforman la región CA1 del hipocampo. Nuestros resultados concuerdan con los expuestos por Morali y cols.⁷⁶, quienes reportaron la conservación de las poblaciones de células piramidales en la región CA1 del hipocampo en ratas que fueron sometidas a un evento isquémico y a quienes se les instauró un procedimiento farmacológico de P con una supervivencia de 21 días. En dicho estudio los autores mencionan que al examen histológico, los tejidos cerebrales de las ratas que fueron tratadas con el vehículo isquémico, exhibieron una sustancial reducción en el tamaño poblacional de las neuronas piramidales hipocampales de las regiones CA1 y CA2 (12% y 29% de neuronas sobrevivientes, respectivamente), así como una disminución menos crítica en las regiones CA3 y CA4 (68% y 63% de neuronas sobrevivientes, respectivamente), esto en comparación con las ratas de grupos expuestos a cirugías simuladas. Los resultados obtenidos por estos autores mostraron que el tratamiento con P culminó en una significativa preservación de las células piramidales en la región CA1 (40%) del hipocampo. Los autores concluyeron que la P probablemente pueda interferir con uno o varios de los diversos mecanismos fisiopatológicos isquémicos que producen el daño neural selectivo.

Para efecto de nuestro experimento, las regiones hipocampales CA2 y CA3 no mostraron diferencias significativas en el número de células piramidales para las ratas que recibieron el tratamiento farmacológico con P comparadas con los grupos control. Los resultados que obtuvimos en estas regiones se homologan con lo publicado por múltiples autores que utilizando P u otros compuestos neuroprotectores para daño isquémico han reportado efectos neuroprotectores significativos para la región CA1 pero no para CA2, CA3, CA4, Hilus o Giro Dentado, como lo descrito por Espinosa-García y cols.^{77,78}

Wass y cols.⁷⁹, señalan que el daño celular isquémico es consecuencia de un déficit en el aporte de glucosa y el oxígeno a través del flujo sanguíneo. Al ser las células piramidales de la región CA1 del hipocampo las neuronas que reciben una mayor cantidad de aferencias glutamatérgicas, esto les confiere una elevada demanda de glucosa y oxígeno, por lo tanto, una mayor susceptibilidad al daño celular una vez que son privados de esos elementos. De esta manera la región CA1 del hipocampo es más susceptible que las demás porciones hipocampales.

Aunque nuestros resultados muestran que existió una respuesta neuroprotectora significativa para la porción CA1 del hipocampo, cabe señalar que la supervivencia celular en ésta área fue mejor para los animales pertenecientes al experimento 1, conformado por las ratas que fueron ovariectomizadas con 15 días de antelación al proceso isquémico en comparación con las ratas que se asignaron al experimento 2, en el cual, tenían 30 días de haber sido ovariectomizadas antes de ser sometidas al evento isquémico; es decir, la neuroprotección por P ante isquemia, tuvo mayores beneficios en los animales que tenían menos tiempo de haber sido ovariectomizadas. Estos resultados son particularmente interesantes, ya que la asociación médica americana y Radley⁸⁰ describieron una respuesta semejante en la mujer, ya que, al administrar tratamientos de reemplazo hormonal ante patologías cerebrales, observaron que estos tratamientos sólo eran efectivos en mujeres que se encontraban en etapas perimenopausicas y no así para aquellas que ya se encontraban en edades post-menopausia, en las cuales incluso hubo efectos adversos. Lo anterior puede ser explicado por el estudio de Tameh y cols.⁸¹, en el que identifican al receptor de la P que se localiza en la región CA1 del hipocampo como estrógeno-dependiente, lo que implica que su biodisponibilidad y por tanto su capacidad de acción están directamente relacionados con los niveles estrogénicos circundantes. Esto es; a mayores concentraciones estrogénicas séricas mayor biodisponibilidad de receptor a P, lo que conlleva a mejores efectos farmacológicos e inversamente proporcional. Es por ello, que en mujeres perimenopausicas se manifiestan resultados más benéficos comparados con las mujeres en edades post-menopausia, así como para los animales del experimento 1 y 2 respectivamente. Esto debido a que se sabe que existe una reducción paulatina en los niveles circulantes estrogénicos al realizar la extirpación ovárica en ratas, dichos niveles decaen dos semanas

posteriores a la cirugía y a la cuarta semana post-ovariectomía las concentraciones estrogénicas séricas se encuentran en niveles basales.^{82,83,84,85}

El trabajo de Liu y cols.⁸⁶, apoya la teoría de que el efecto neuroprotector de la progesterona sea debido a su acción a través del receptor de la P, ya que al administrar P en animales KO para el receptor de P y animales silvestres, posterior a la oclusión de la arteria cerebral media se observó una mayor neuroprotección en los animales silvestres en comparación de los animales KO. Otros estudios en modelos isquémicos como los realizados por Bramlett y Dietrich⁸⁷ que fueron enfocados en la respuesta neuroprotectora de la P exógena en individuos con diversas concentraciones estrógenicas circundantes, demostraron que a menor concentración de estrógenos mayor era el daño isquémico.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir que:

- 1.- La administración de progesterona en hembras con 15 y 30 días post-ovariectomía, produjo un efecto neuroprotector significativo en células piramidales de la región CA1 del hipocampo posterior a un episodio isquémico. Dicho efecto puede estar relacionado con las concentraciones estrogénicas séricas.
- 2.- Los niveles estrogénicos séricos son mayores en hembras con 15 días post-ovariectomía, comparado con los del grupo de 30 días post-ovariectomía, lo que propicia una mayor y una menor biodisponibilidad del receptor a progesterona respectivamente.
- 3.- Los resultados obtenidos en este estudio, apoyan la teoría que señala al receptor a progesterona como el principal mediador en las respuestas neuroprotectoras de esta hormona en células piramidales del hipocampo ante daño isquémico.

10. PERSPECTIVAS

El presente estudio ha sido de gran relevancia para seguir esclareciendo los cambios fisiológicos que se generan durante los episodios isquémicos y es de utilidad para el entendimiento de los procesos neuroprotectores desencadenados por la presencia de hormonas gonadales como la progesterona. A pesar de que este tipo de estudios arrojan luz sobre los posibles tratamientos que pueden implementarse en la clínica humana, aún no existe ningún protocolo farmacológico o terapia realmente eficaz para prevenir o revertir los daños cerebrales causados por los eventos isquémicos. Para futuros estudios es importante implementar protocolos de investigación que nos permitan determinar la concentración y el efecto de las moléculas que generan el daño celular propiciadas por los ACV, esto con la finalidad de obtener un acercamiento más real del comportamiento de las mismas y de esta manera revertir o prevenir su daño.

11. REFERENCIAS

1. Easton J, Saver J, Albers et al G. 2009. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association stroke council. *Stroke*. 57:6-93.
2. Clark H. Millikan, Ad Hoc Committee. 1975. A classification and outline of cerebrovascular disease. *Stroke*. 6: 565-616.
3. López AD. 1990. A comparative analysis of mortality conditions in developed countries around 1987. *World Health Stat Q*. 43: 105-114.
4. Biller J, Ruland S, Schneck MJ. 2016. Ischemic cerebrovascular disease. In Daroff RB, Jankovic J, Mazziotta JC, Pomeroy SL, eds. *Bradley's Neurology in Clinical Practice*. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier. 65: 14-16.
5. Crocco TJ, Meurer WJ. *Stroke* 2018. Walls RM, Hockberger RS, Gausche-Hill M, eds. *Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice*. Philadelphia, PA: Elsevier. 43: 90-91.
6. Conditions NCCfC. 2018. National clinical guideline for diagnosis and initial management of acute stroke and transient ischaemic attack (TIA). London: Royal College of Psychiatrists, 1:1-23.
7. Rouvier J, Scazziota A. 1994. Factores y marcadores de riesgo de trombosis. *Rev Iberoam Tromb Hemost*. 7:192-209.
8. Brito MI, Gollo ME, Troccoli ML. 2003. Prevención de la enfermedad cerebrovascular o ictus isquémico. *Gac Méd Caracas*.
9. Krishnamurthi R, Feigin V, Forouzanfar M, Mensah G, Connor M, Bennet tD. 2013. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet Global Health*. 185-259.
10. Bonita R. Epidemiology of stroke. 1992. *Lancet*, 339: 342-4.
11. Jung-Testas, Schumacher M, Robel P, Bauliee. 1996. The neurosteroid progesterone increases the expression of mielin proteins (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture. *Cell Mol Neurobiol*, 16(3):439-443.

12. Akwa, Sananes N, Guezou M, Robel P, Baulieu E, Goascogne CL. 1993. Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnanolone and dehydroepiandrosterone regulation by cell density. *J Cell Biol*, 121(1):135-143.
13. Robel O, Baulieu E: Neurosteroids. 1994. Biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab*, 5:1-8.
14. Mellon S: Neurosteroids. 1994. Biochemistry, modes of action and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab*, 78(2):1003-1008.
15. Nabekura J, Oomura, Minami T, Mizuno, Fukuda A. 1986. Mechanism of the rapid effect of 17 β -estradiol on medial amigdala neurons. *Science*, 233:226-228.
16. Mensah-Nyagan AG, Dorego JL, Beaujean D, Luu V, Pelletier G, Vaudry H: Neurosteroids. 1999. Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, 51(1):63-8.
17. Jung-Testas, Schumacher M, Robel P, Baulieu E. 1996. The neurosteroid progesterone increases the expression of myelin proteins (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture. *Cell Mol Neurobiol*, 16(3):439-443.
18. Majeswka MD. 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol*, 38:379-395.
19. Rosenblatt L, Mayer AD, Siegel HI. 1985. Maternal behavior among the nonprimate animals. En: Adler A, Pfaff D, Goy RG (eds). *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Plenum Press, 229-298.
20. McEwen BS, Davis P, Parsons B, Pfaff DW. 1979. The brain as a target for steroid hormone action. *Ann Rev Neurosci*, 2:65-112.
21. Majeswska MD, Harrinson NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232:1004-1007.
22. Root RL, Duvdevani R, Heyburn JW, Stein DG. 1996. Progesterone rapidly decreases brain edema; treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp Neurol*, 138:246-251.

23. Rupprecht R. 1997. The neuropsychopharmacological potential of neuroactive steroids. *J Psychiat Res*, 31(3):297- 314.
24. Vazquez J, Morn J, Motta E. 2010. Estudio del climaterio y la menopausia. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia, A.C. Actualización.
25. Guyton AC, Hall JE. 2011. *Fisiología Médica*. España: Elsevier, 12: 987-1002.
26. Rang H, Dale M. 2008. *Farmacología*. España: Elsevier, 6: 445-461.
27. Carranza S. 2011. *Introducción a la endocrinología ginecológica*. México: Trillas, 1: 23-24.
28. Moser, EI; Moser M-B. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8: 608-19,1098-1063.
29. Amaral, D; Lavenex P. 2006. Ch 3. Hippocampal Neuroanatomy. En Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
30. Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory». *Annu Rev Neurosci* 30: 123-52.
31. Von Bohlen und Halbach O. 2010. Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. *Front Aging Neurosci*, 2: 123-54.
32. Rakic P. 2010. DNA synthesis and cell division in the adult primate brain *Ann N Y Acad Sci* 1985;457:193-211.
33. Birbrair, Alexander; Zhang, Tan; Wang, Zhong-Min; Messi, Maria Laura; Enikolopov, Grigori N.; Mintz, Akiva; Delbono, Osvaldo. 2013. Skeletal muscle neural progenitor cells exhibit properties of NG2-glia. *Experimental Cell Research* 319 1: 45-63.
34. Faiz M, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. 2005. Proliferation dynamics of germinative zone cells in the intact and excitotoxically lesioned postnatal rat brain». *BMC Neurosci* 6: 26-28.
35. Vivar, C., Potter, M.C., Choi, J., Lee, J., Stringer, T.P., Callawy, E.M., Gage, F.H., Suh, H., van Praag, H. 2012. Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus.. *Nature Communications* 3: 10-38.
36. Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H. and Gage, F.H. 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience* 10-6: 727-734.

37. Finger, Stanley. 2001. *Origins of neuroscience: a history of explorations into brain function*. Oxford University Press. 363.
38. Gray, JA; McNaughton N. 2000. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*. Oxford University Press.
39. Best PJ, White AM. 1999. Placing hippocampal single-unit studies in a historical context. *Hippocampus* 9: 1063-1098.
40. O'Keefe, J; Nadel L *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press.1978.
41. Scoville, WB; Milner B. 1997. Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 20: 11-21.
42. Eichenbaum, H; Otto TA, Wible CG, Piper JM.. *Building a model of the hippocampus in olfaction and memory*. *Olfaction*. 7, 1991.
43. Squire LR. 1999. The legacy of patient H.M. for neuroscience. 6:61.
44. Moser, EI; Kropf E, Moser M-B. 2008. Place Cells, Grid Cells, and the Brain's Spatial Representation System». *Ann. Rev. Neurosci.* 31-69.
45. Peña-Casanova J. In *Neurología de la conducta y neuropsicología*. 2007. Bases neurobiológicas de las funciones cognitivas: hacia una integración de niveles. Madrid. Ed. Médica Panamericana. 1:13-15.
46. Bramlett HM, Dietrich WD. 2004. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2: 133-50.
47. I Ciriza, I Azcoitia, L M Garcia-Segura. 2004. Reduced Progesterone Metabolites Protect Rat Hippocampal Neurons From Kainic Acid Excitotoxicity in Vivo. *Neuroendocrinology*, 16: 58-63.
48. Moralí G, Montes P, Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Monfil T, Cervantes M. 2009. Progesterone treatment in rats after severe global cerebral ischemia promotes hippocampal dentate gyrus neurogenesis and functional recovery. *Neurol Res*, 5: 429-436.
49. Moralí G, Montes P, González-Burgos I, Velázquez-Zamora DA, Cervantes M. 2012. Cytoarchitectural characteristics of hippocampal CA1 pyramidal neurons of rats, four months after global cerebral ischemia and progesterone treatment. *Restor Neurol Neurosci.*, 1: 1-8.

50. Ozacmak VH, Sayan H. 2008. 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*, 6-58.
51. Carswell HV1, Anderson NH, Morton JJ, McCulloch J, Dominiczak AF, Macrae IM. 2000. Investigation of estrogen status and increased stroke sensitivity on cerebral blood flow after a focal ischemic insult. *Sage Journals*, 2: 6-7.
52. M. Schumacher, C. Mattern, A. Ghomari, J.P. Oudinet, P. Liere, F. Labombarda, R. Sitruk-Ware, A.F. De Nicola, R. 2008. Guennoun Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors.
53. Liao CL1, Lee MY, Tyan YS, Kok LF, Wu TS, Koo CL, Wang PH, Chao KC, Han CP. 2009. Progesterone receptor does not improve the performance and test effectiveness of the conventional 3-marker panel, consisting of estrogen receptor, vimentin and carcinoembryonic antigen in distinguishing between primary endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray extension study. *Medline*. 1: 7-8.
54. Rafael Bandeira Fabres, Luciana Abreu da Rosa, Samir Khal de Souza, Ana Lucia Ceconello Amanda Stapenhorst Azambuja, Eduardo Farias Sanches, Maria Flavia Marques Ribeiro, Luciano Stürmer de Fraga. 2018. Effects of Progesterone on the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia. *Metab Brain*. 7: 018-019.
55. J Surg Res Sehajpal J1, Kaur T2, Bhatti R1, Singh AP3. 2014. Role of progesterone in melatonin-mediated protection against acute kidney injury. *Medline*, 2: 4-6.
56. Arbo BD1, Andrade S, Osterkamp G, Gomez R, Ribeiro MF. 2014. Asymmetric effects of low doses of progesterone on GABA(A) receptor $\alpha 4$ subunit protein expression in the olfactory bulb of female rats. *Physiol Pharmacol*. 12: 2-3.
57. Aggarwal R1, Medhi B, Pathak A, Dhawan V, Chakrabarti A. 2008. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice.. *Pharm Pharmacol*. 7: 4-7.
58. Sayeed I, Guo Q, Hoffman SW, Stein DG. 2006. Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion. *Ann Emerg Med* 47:381–389.

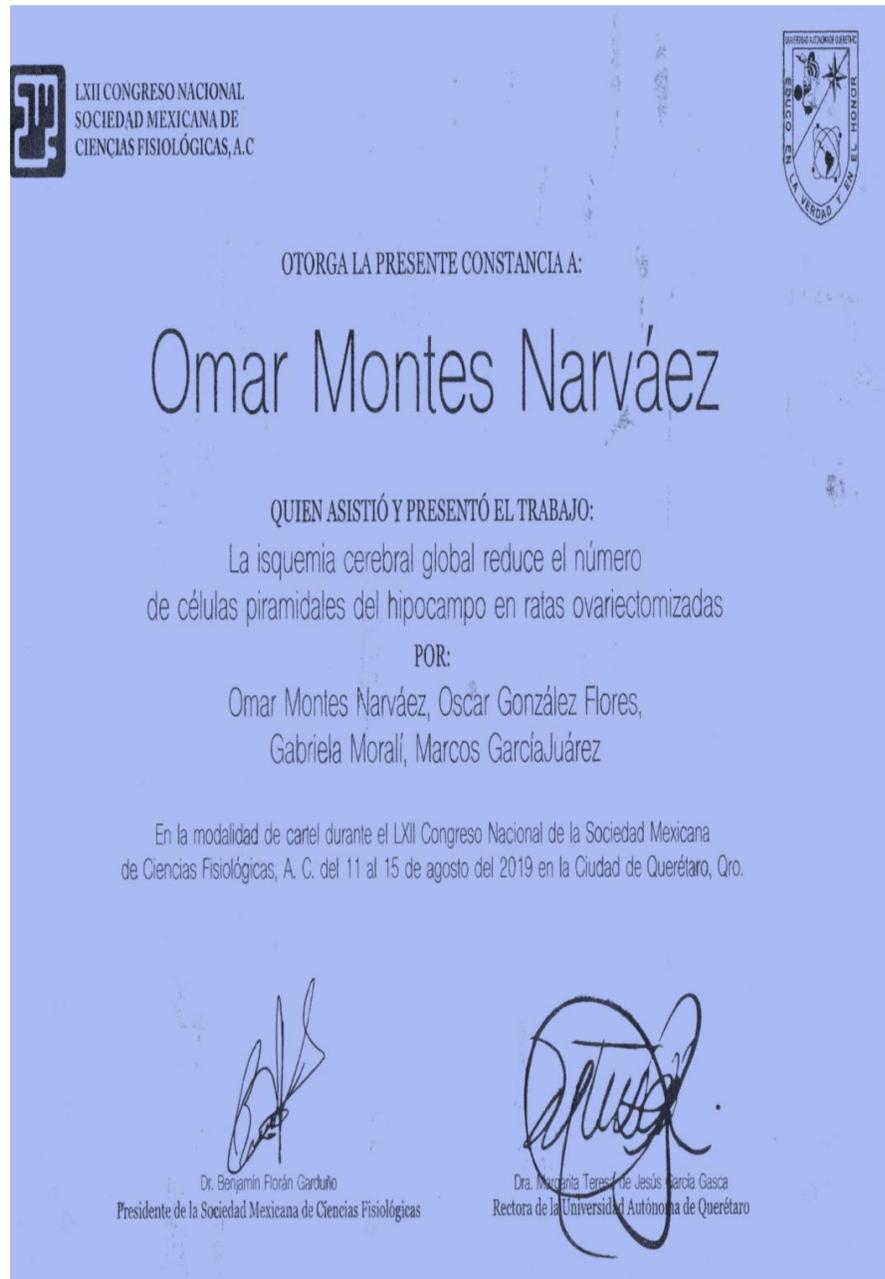
59. A. Liu, I. Margail, S. Zhang, F. Labombarda, B. Coqueran, B. Delespierre, P. Liere, C. Marchand-Leroux, B.W. O'Malley, J.P. Lydon, A.F. De Nicola, R. Sitruk-Ware, C. Mattern, M. Plotkine, M. Schumacher, R. Guennoun. 2012. Progesterone receptors: a key for neuroprotection in experimental stroke *Endocrinology*. 153: 3747-3757.
60. M. Schumacher, C. Mattern, A. Ghomari, J.P. Oudinet, P. Liere, F. Labombarda, R. Sitruk-Ware, A.F. De Nicola, R. Guennoun. 2008. Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors.
61. Jordi Peña Casanova, María J González-Moneo, Gonzalo Sánchez-Benavides, José M Verdu-Rotellar, Mercé Cladellas, Jordi Bruguera, Sonia Quiñones-Ubeda, Cristina Enjuanes. 2016. Ischemic Aetiology, Self-Reported Frailty, and Gender With Respect to Cognitive Impairment in Chronic Heart Failure Patients. *BMC*. 163: 3-5.
62. X. Zhu, M. Fréchou, P. Liere, S. Zhang, A. Pianos, F. Neiké, C. Denier, C. Mattern, M. Schumacher, R. Guennoun. 2017. A role of endogenous progesterone in stroke cerebroprotection revealed by the neural-specific deletion of its intracellular receptors *J. Neurosci.*, 37: 10998-11020.
63. Diebaili M1, Hoffman SW, Stein DG. 2004. Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience*, 123: 2-3.
64. Vazquez J, Morn J, Motta E. 2010. Estudio del climaterio y la menopausia. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia, A.C. Actualización.
65. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. 2002. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 57:339–355.
66. Güleç Başer B, İslimye Taşkın M, Adalı E, Öztürk E, Hısmıoğulları AA, Yay A. 2018. Does progesterone have protective effects on ovarian ischemia-reperfusion injury? *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 19: 2-4.
67. Westberry JM, Prewitt AK, Wilson ME. 2008. Epigenetic regulation of the estrogen receptor alpha promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats. *Neuroscience*. 152: 4.

68. I. Camacho-Arroyo, C. Guerra-Araiza, M.A. Cerbon. 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain Neuroreport. 93-96.
69. Thomas J. Toung, Tsung-Ying Chen, Marguerite T. Littleton-Kearney, Patricia D. Hurn, and Stephanie J. Murphy. 2004. Effects of Combined Estrogen and Progesterone on Brain Infarction in Reproductively Senescent Female Rats. The International Society for Cerebral Blood Flow and Metabolism. 24: 1-5.
70. Yousuf S, Atif F, Sayeed I, Tang H, Stein DG. 2104. Progesterone in transient ischemic stroke: a dose-response study. Psychopharmacology Berl. 231: 17-18.
71. Brotfain E, Gruenbaum SE, Boyko M, Kutz R, Zlotnik A, Klein M. 2016. Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury. Curr Neuropharmacol. 14: 6-7.
72. Grelli KN, Palubinsky AM, Kale AC, Lizama-Manibusan BN, Stankowski JN, Milne GL, Singer R, McLaughlin B. 2013. Alteration of isocitrate dehydrogenase following acute ischemic injury as a means to improve cellular energetic status in neuroadaptation.. CNS Neurol Disord Drug Targets. 12: 5-6.
73. S.K. Mani. 2006. Signaling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions Neuroscience. 773-781.
74. Zhao Y, Li J, Li J, Xu L, Lian W. 2020. The decreased circular RNA hsa_circ_0072309 promotes cell apoptosis of ischemic stroke by sponging miR-100. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 24-8.
75. Espinosa-Garcia C, Sayeed I, Yousuf S, Atif F, Sergeeva EG, Neigh GN, Stein DG. Stress primes microglial polarization after global ischemia. 2017. Therapeutic potential of progesterone.. Brain Behav Immun, 66: 1-2.
76. Morali G, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Montes P, Hernández-Morales L, Cervantes M. 2005. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus.. Neurosci Lett. 382: 3-5.
77. Espinosa García C, Viguera-Villaseñor, RM Rojas-Castañeda JC, Aguilar-Hernández A, Monfil, Cervantes M, Morali G. 2014. Post-ischemic administration of progesterone

- reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*. 550: 98-103.
78. Espinosa-García C, Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Aguilar-Hernández A, Monfil T, Cervantes M, Morali G. 2013. Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia.. *Neurosci Lett*. 98: 9.
79. Wass CT, Lanier WL. 1996. Glucose modulation of ischemic brain injury: review and clinical recommendations. *Mayo Clin Proc*. 71: 8-9.
80. Radley E, Akram A, Grubb BD, Gibson CL. 2012. Investigation of the mechanisms of progesterone protection following oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett*. 131: 5-6.
81. Tameh AA, Karimian M, Zare-Dehghanani Z, Aftabi Y, Beyer C. 2018. Role of Steroid Therapy after Ischemic Stroke by n-Methyl-d-Aspartate Receptor Gene Regulation.. *Stroke Cerebrovasc* , 11: 7-9.
82. Toung TJ, Chen TY, Littleton-Kearney MT, Hurn PD, Murphy SJ. 2004. Effects of combined estrogen and progesterone on brain infarction in reproductively senescent female rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24: 10.
83. N.J. MacLusky, B.S. McEwen O. 1978. Estrogen modulates progestin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others *Nature*. 274:276-278.
84. Alkayed NJ, Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD, Miller VM. 2000. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke*. 161: 8-9.
85. Rupprecht R. 2003. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*. 2: 1-2.
86. Liu H, Wu, Wang, Guo, Pan . 2019. A protective effect of baicalin on cerebral ischemic rats is related to the improvement of serum progesterone level in serum.. *Neuroreport*. 30: 5.
87. Bramlett HM, Dietrich WD. 2004. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences.. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2: 133-50.

12. Publicaciones

Cartel: La isquemia cerebral global reduce el número de células piramidales del hipocampo en ratas ovariectomizadas. Presentado en el LXII congreso nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas en la Ciudad de Querétaro del 11-15 de Agosto de 2019.



Cartel: Acute global ischemia decreases the pyramidal cells population in the CA1 region of the hippocampus in female rats with 15 and 30 days post-ovariectomy. Presentado en la ciudad de Chicago IL, en la reunión anual de la Society for Neuroscience del 19-23 de Octubre de 2019.



CHICAGO, IL
OCTOBER 19-23



Neuroscience 2019
October 19 - 23
Chicago, IL

Please let this serve to certify that

Omar Montes-Narvaez

has attended Neuroscience 2019, the 49th Annual Meeting of the Society for Neuroscience at McCormick Place in Chicago, IL.

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Sincerely,

A handwritten signature in cursive script that reads "Kyle Hayden".

Kyle Hayden, CMP
Director, Meeting Programs and Attendee Services
Society for Neuroscience

Date: October 21, 2019