



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**La activación de la vía de señalización PI3K-AKT mediada por el receptor
TrkB protege a la sinapsis fibra musgosa-CA3 durante la privación de
oxígeno y glucosa**

Tesis que presenta

M. En C. Carolina Tecuatl Tolama

Para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de tesis:

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada en su modalidad nacional y mixta con número de apoyo 366686, durante el periodo Septiembre de 2013 - Agosto 2017 para la realización de este proyecto de tesis.

Agradecimientos

Al Dr. Emilio J Galván por recibirme en su laboratorio, por enseñarme en cada momento los elementos necesarios para mi aprendizaje, formación académica, por su apoyo, atención hacia mi persona y proyecto de tesis.

A las doctoras María Elena Chanéz, Claudia González, Carolina López y Janet Murbartián que conformaron mi comité revisor, por dedicarme su valioso tiempo durante los avances, por sus aportaciones para la elaboración de esta tesis y crecimiento del proyecto.

A los doctores del departamento que me ayudaron en mi crecimiento profesional durante los cursos del doctorado, que me dieron nuevas herramientas y modificaron mi visión para poder solucionar, proponer y gestionar nuevas líneas de investigación. A la Dra. Gisela por su apoyo incondicional, por ayudarme en mi formación y orientarme experimentalmente, por todas las horas en el microscopio confocal.

Finalmente a mis amigos Diana, Carmen, Juan Javier, Guadalupe, Alberto y Erika que me han ayudado técnica, metodológica y experimentalmente. Que me han ayudado en cada paso durante mi travesía, han aligerado el estrés y me han dado buenos consejos.

Dedicatoria

Para ti hermana, que me has motivado en cada momento de mi vida, por ser un ejemplo de superación y constancia.

A mis grandes amores Elena y Aldo, que me hacen levantarme incluso en los días mas difíciles y seguir adelante.

A mi familia, por enseñarme que para el trabajo duro no hay metas inalcanzables, por apoyarme en cada paso y confiar en mi.

A ti amigo Eduardo Trujillo por apoyarme en todo momento y acompañarme en lo momentos cruciales de la vida, por sus buenos consejos.

Índice

Agradecimientos.....	II
Dedicatoria	III
Índice de tablas y figuras.....	VI
Abreviaturas	VIII
Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
Enfermedad vascular cerebral y su clasificación.	3
Mecanismos asociados al daño isquémico	4
Muerte celular	6
Modelos de estudio para la isquemia.....	7
Regiones susceptibles al daño isquémico	9
Hipocampo	9
Sinapsis de las fibras musgosas-CA3	12
Sinapsis de la colateral de Schaffer-CA1.....	13
Hipocampo e isquemia.....	14
Factores neurotróficos	15
Factor neurotrófico derivado del cerebro	16
Factor neurotrófico derivado del cerebro e isquemia	20
Justificación.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos	22
General	22
Particulares	22
Material y métodos	23
Privación de oxígeno y glucosa	23
Fármacos	23
Anticuerpos	24
Registros electrofisiológicos.....	24
Análisis de viabilidad.....	26

Análisis de muerte por apoptosis	26
Análisis estadístico.....	27
Resultados	28
Caracterización electrofisiológica y farmacológica de las respuestas evocadas en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.....	28
Efecto de la privación de oxígeno y glucosa en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.	31
Neuroprotección mediada por la activación del TrkB durante la supresión de oxígeno y glucosa.	34
Neuroprotección mediada por la activación del TrkB dependiente de la vía de señalización PI3K/AKT.....	42
La privación de oxígeno y glucosa incrementa el número de células positivas a PI y Caspasa-3.....	44
Discusión.....	49
Efecto de la privación de oxígeno y glucosa	50
Efecto diferencial de la supresión de oxígeno y glucosa.....	51
Efecto neuroprotector del BDNF en la región CA3	52
Neuroprotección endógena del BDNF en la región CA3.....	54
Vías de señalización relacionadas con la activación de TrkB	55
Implicaciones de la activación de la vía PI3k/AKT	56
Mecanismo intrínseco de resistencia al daño isquémico en la región CA3.....	57
Falla en la neuroprotección de la región CA1	59
El 7,8-DHF como potente agente neuroprotector	61
Conclusión.....	63
Perspectivas.....	64
Bibliografía	65
Anexos	79

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Características de los principales modelos empleados para el estudio de la isquemia.....	8
Tabla 2. Condiciones reportadas durante o posterior al periodo isquémico en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.	15
Tabla 3. Características electrofisiológicas y farmacológicas de las respuestas evocadas en la región CA3 y CA1 del hipocampo.	29
Figura 1. Secuencia de acontecimientos de la lesión isquémica.....	5
Figura 2. Tinción de Nissl de una sección horizontal de la formación hipocampal.....	10
Figura 3. Circuito trisináptico clásico.	12
Figura 4. Vías de señalización acopladas a la activación del receptor TrkB.	19
Figura 5. Esquemas y sensibilidad farmacológica de las respuestas electrofisiológicas evocadas en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.	30
Figura 6. La privación de oxígeno y glucosa suprime la actividad electrofisiológica en la región CA3 del hipocampo.....	32
Figura 7. La privación de oxígeno y glucosa suprime la transmisión evocada en la región CA1 del hipocampo.....	33
Figura 8. El BDNF revierte el daño inducido por la privación de oxígeno y glucosa en la región CA3 del hipocampo.....	36
Figura 9. El BDNF no protege a la región CA1 del daño inducido por privación de oxígeno y glucosa.....	37
Figura 10. Efecto del bloqueo del TrkB durante la privación de oxígeno y glucosa en rebanadas frescas de hipocampo.....	38
Figura 11. La activación del receptor TrkB con 7,8-DHF revierte el daño inducido por la privación de oxígeno y glucosa en la región CA3 del hipocampo.....	40
Figura 12. La activación del TrkB con el agonista 7,8-DHF no protege a la región CA1 del daño inducido por privación de oxígeno y glucosa.....	41
Figura 13. La neuroprotección de BDNF depende de la activación de la vía de señalización PI-3-K/AKT.....	43
Figura 14. El BDNF disminuye el número de células positivas a PI y Caspasa-3 en la región CA3 del hipocampo.....	47

Figura 15. El BDNF no disminuye el número de células positivas a Caspasa-3 en la región CA1 del hipocampo.....	48
Figura 16. Representación esquemática del mecanismo de protección intrínseco de la región CA3 ante la privación de oxígeno y glucosa.	58
Figura 17. Representación esquemática de los mecanismos activados de la región CA1 ante la privación de oxígeno y glucosa.	60
Figura 18. Registros de célula completa y extracelulares de la región CA3 del Hipocampo.....	79
Figura 19. La privación de oxígeno y glucosa induce la activación de los receptores TrkB en el Hipocampo.	80
Figura 20. Vías de señalización activadas por el TrkB en la región CA3 y CA1 del Hipocampo.....	81

Abreviaturas

7,8-DHF	7,8-Dihidroxi flavona
AKT	Protein cinasa B
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ANA-12	N-[2-[[[(Hexahidro-2-oxo-1H-azepin-3-yl)amino] carbonyl]fenil]-benzo[b]tiofeno-2-carboxamida
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CA	Comisural de Asociación
CA1	Cuerno de Ammon 1
CA2	Cuerno de Ammon 2
CA3	Cuerno de Ammon 3
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaMK	Cinasa dependiente de calcio/calmodulina
CREB	Elementos de respuesta a AMPc
DCG IV	(2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxiciclopropil) glicina
DG	Giro dentado
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC	Corteza entorrinal
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
EVC	Enfermedad vascular cerebral
fEPSP	Potencial postsináptico excitador de campo
FR	Radicales libres
Gab	Proteína de unión asociada a GRB2
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
HIC	Hemorragia intracerebral
HIF	Factor inducible de Hipoxia
HREs	Elementos de respuesta a hipoxia
HSA	Hemorragia subaracnoidea

KN 93	N-[2-[[[3-(4-Chlorophenyl)-2-propenyl]methylamino]methyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulphonamide
Kyn	Ácido kinurénico
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
LTD	Depresión de largo plazo
LTP	Potenciación de largo plazo
MCA	Arteria cerebral media
MCP	Muerte celular programada
MF	Fibra musgosa
mGluR	Receptor metabotrópico a glutamato
mTOR	Diana de rapamicina de células de mamífero
NeuN	Proteína nuclear neuronal
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDG	N-metil D-glucamina
NT3	Neurotrofina 3
NT4/5	Neurotrofina 4/5
OGD	Privación de oxígeno y glucosa
p75	Receptor de neurotrofinas
PBS	Buffer de fosfatos
PI	Yoduro de propidio
PI3	Fosfatidil-inositol 3-fosfato
PI3K	Fosfoinositol 3 Cinasa
PLC	Fosfolipasa C
PS	Espiga poblacional
PTEN	Homologo de tensina y fosfatasa
RP	Reperfusión
S	Subículo
Sch	Colateral de Schaffer
SD	Sprague Dawley
sl	<i>Stratum lucidum</i>

so	<i>Stratum oriens</i>
sp	<i>Stratum pyramidale</i>
sr	<i>Stratum radiatum</i>
TrkA	Receptor de Tropomiosina Cinasa A
TrkB	Receptor de Tropomiosina Cinasa B
TrkC	Receptor de Tropomiosina Cinasa C
TVC	Trombosis venosa cerebral

Resumen

La isquemia cerebral se debe a la interrupción total o parcial del flujo sanguíneo generando una disminución de oxígeno y glucosa principalmente. Uno de los modelos empleados para el estudio de la isquemia es la supresión de oxígeno y glucosa-reperfusión (OGD-RP), el cual consiste en la exposición por tiempos controlados de una solución libre de oxígeno y glucosa. La vulnerabilidad ante el daño isquémico es un fenómeno bien conocido en las diferentes regiones del hipocampo. Sin embargo, los mecanismos que confieren resistencia a la región CA3 han sido poco explorados. En este proyecto evaluamos el mecanismo por el cual el factor derivado del cerebro (BDNF) a través de la activación del receptor de tropomiosina B (TrkB), confiere neuroprotección a la región CA3 en respuesta a la OGD-RP. En condiciones basales, el bloqueo del TrkB acelera la pérdida de las respuestas evocadas tanto del potencial post-sináptico excitador de las fibras musgosas y la espiga poblacional antidrómica causadas por la OGD-RP en rebanadas hipocampales. La preincubación de las rebanadas hipocampales con agonistas del TrkB: BDNF o 7,8-DHF revierte los efectos de la OGD-RP. Además, la activación del TrkB favorece la activación de proteínas adaptadoras Shc y Gab, así como la cinasa de serina/treonina AKT, miembros de la vía de señalización fosfoinositol 3-cinasa/AKT, involucrada en la supervivencia celular. Por lo tanto, las rebanadas preincubadas en presencia del antagonista de AKT el MK-2206, en combinación con BDNF no presentan recuperación de la actividad eléctrica evocada después de la OGD-RP. Las células piramidales de la región CA3 muestran una menor marca de yoduro de propidio y caspasa-3 en las rebanadas que fueron preincubadas con BDNF y expuesta a la OGD-RP. El efecto neuroprotector que ejerce la activación del TrkB es un mecanismo exclusivo de la región CA3, ya que la preincubación con los fármacos no revertió la pérdida de respuestas evocadas en la región CA1 del hipocampo. Concluimos que la activación del receptor TrkB en la región CA3 representan un mecanismo endógeno de neuroprotección ante el daño isquémico y la activación previa a la privación de oxígeno y glucosa favorece la recuperación de las respuestas evocadas, disminuye el número de células y neuronas dañadas y, en consecuencia, el proceso de apoptosis.

Abstract

Cerebral ischemia is caused by a total or partial interruption of blood flow causing a decreased of oxygen and glucose levels. One of the most used models for the study of ischemia is the oxygen-glucose deprivation-reperfusion (OGD-RP), an *in vitro* model that consists of a controlled time exposure of an oxygen and glucose-free solution. The selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-induced injury is a well-known phenomenon. However, the intrinsic mechanisms that confer resilience to CA3 area remain elusive. Here, we investigated the mechanism by which Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-mediated activation of the Tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor, confers neuroprotection to CA3 area in response to OGD-RP. In basal conditions, the blockade of TrkB accelerates the suppression that OGD-RP caused on both, Mossy Fiber evoked excitatory postsynaptic potentials and antidromic CA3 population spikes in acute hippocampal slices. Hippocampal slices preincubated with BDNF or 7,8-DHF reverts the adverse effects of OGD-RP. Furthermore, TrkB activation leads to phosphorylation of the adapter proteins SHC and Gab as well as the serine/threonine kinase AKT, members of the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway, a cascade involved in cell survival. Hence, slices pretreated with the AKT antagonist MK2206 in combination with BDNF did not exhibit a recovery of electrical activity following OGD-RP. At the cellular level, CA3 pyramidal cells exhibited reduced propidium iodide uptake and caspase-3 activity in slices pre-treated with BDNF and exposed to OGD-RP. The neuroprotective effect of BDNF-TrkB is a unique mechanism of CA3 area in response to ischemic damage, the same experiments performed with CA1 area did not exhibit any recovery during OGD-RP.

We conclude that the neuroprotective activation of TrkB receptor is due to an intrinsic mechanism underlying the resilience of CA3 area in response to ischemic damage that leads to the recuperation of electrical responses and decreases the number of damaged cells.

1. Introducción

1.1 Enfermedad vascular cerebral y su clasificación

La enfermedad vascular cerebral (EVC) se define como el desarrollo rápido de síntomas clínicos indicativos de un trastorno local o generalizado de la función cerebral, cuya persistencia es por 24 horas o más, o que conducen a la muerte por causa vascular (Organización Mundial de la Salud, OMS). El origen más común de la EVC es la oclusión repentina de un vaso sanguíneo por un trombo (Hofmeijer y van Putten, 2012), seguida por la obstrucción con un émbolo o un derrame cerebral (Lipton, 1999; Lui y McCullough, 2014).

Según su naturaleza, la EVC se clasifica en isquémica o hemorrágica, con una proporción de aparición en humanos de 85% y 15%, respectivamente. La isquemia se produce por la disminución del aporte sanguíneo cerebral de forma total (isquemia global) o parcial (isquemia focal). A su vez, el proceso isquémico focal se divide en accidente isquémico transitorio (AIT) e infarto cerebral. Mientras que el infarto se produce cuando la isquemia cerebral es lo suficientemente prolongada en el tiempo como para producir un área de necrosis tisular; el AIT es un episodio breve de disfunción neurológica, con síntomas clínicos que duran menos de una hora, sin evidencia de infarto en las técnicas de neuroimagen (Cantú-Brito y cols., 2011). La hemorragia, por su parte, es la extravasación de sangre dentro del encéfalo como consecuencia de la rotura de un vaso. Según su localización puede ser cerebral (intraparenquimatosa o ventricular) o subaracnoidea.

Las secuelas asociadas a la EVC representan un problema de salud pública y son la causa más frecuente de incapacidad en adultos a nivel mundial. Sus manifestaciones clínicas consisten en trastornos del lenguaje, déficit motor y cognitivo, ceguera transitoria, entre otros (Liu, Sheng y Qin, 2009). Ciertas afecciones y situaciones pueden aumentar el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular. Al abordar estas situaciones con modificaciones del estilo de vida, medicamentos u operaciones se puede disminuir el riesgo. En México, las lesiones tipo isquémico (AIT e infarto cerebral) representan la segunda causa de muerte en la población económicamente activa (Cantú-Brito y cols., 2011).

1.2 Mecanismos asociados al daño isquémico

La muerte celular durante el daño isquémico se caracteriza por un retraso largo entre el daño y la manifestación del daño celular. Temporalmente ha sido clasificado en tres etapas: el desarrollo temprano, cambios en estructuras y funciones críticas y muerte celular.

Algunos de los mecanismos asociados al daño isquémico se resumen a continuación:

Durante la fase temprana del daño isquémico la escasez de oxígeno tiene su primer punto de ataque en la respiración aerobia. Es decir, en la fosforilación oxidativa por las mitocondrias. A partir de este momento, se produce una caída de la bomba de Na^+ (debido a la falta de síntesis de ATP). El Na^+ se acumula dentro de la célula, mientras el K^+ sale al torrente sanguíneo. Estos cambios iónicos subyacen a alteraciones celulares como tumefacción celular con pérdida de las microvellosidades y de las crestas mitocondriales, formación de depósitos de mielina y vacuolización como se resume en la Figura 1 (Kalogeris, Bao y Korthuis, 2014).

La célula entonces busca energía por vía anaerobia. En esta etapa el glucógeno se degrada para utilizar la glucosa, y poco a poco van disminuyendo las reservas. Al mismo tiempo la célula se acidifica por la acumulación de ácido láctico, lo cual es el resultado final de la oxidación anaerobia de la glucosa. Finalmente se produce una alteración y pérdida de los ribosomas que, junto con la falta de ATP disminuye la síntesis de proteínas, con lo que se dificulta la movilización de los lípidos (que van unidos a proteínas para su transporte), acumulándose dentro de la célula (Lipton, 1999; Lui y Mccullough, 2014).

En este punto, las lesiones aún son reversibles. Sin embargo, si el tiempo transcurrido de hipoxia persiste, se llega a lesiones irreversibles que conducen a la muerte celular debido a:

- La afectación de proteínas citoplasmáticas por liberación de enzimas lisosomales que autodestruyen la célula.
- El daño en la integridad de la membrana plasmática.

- Pérdida de fosfolípidos dado que aumenta su degradación y disminuye su síntesis por el aumento del Ca^{2+} intracelular.
- Alteraciones en el citoesqueleto producidas por activación de las proteasas lisosomales.
- La presencia de radicales libres, producto de la degradación y degeneración de las células.

En cuanto a los cambios morfológicos se observa la proliferación masiva del retículo endoplásmico, acumulación del retículo endoplásmico con lisosomas cerca del núcleo, formación de autofagosomas y un incremento en las proteasas lisosomales y catepsinas, entre otras.

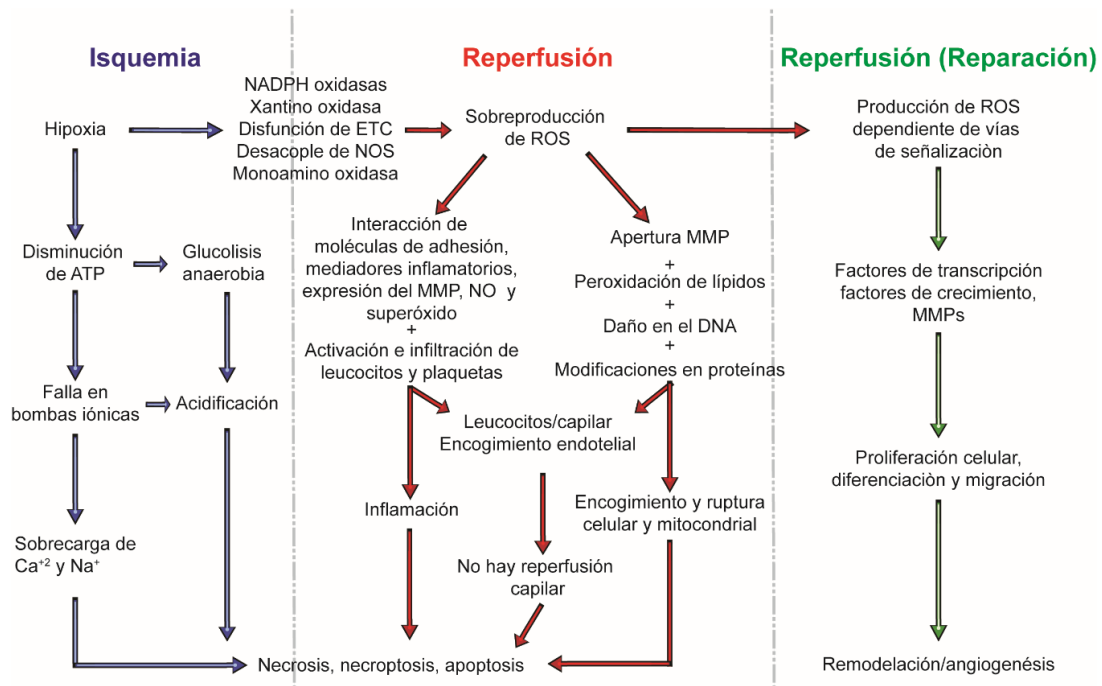


Figura 1. Secuencia de acontecimientos de la lesión isquémica.

La hipoxia generada por el proceso isquémico reduce la producción de ATP, la cual causa fallas en las bombas electrogénicas permitiendo la acumulación de cationes y la acidificación intracelular por el cambio metabólico (aeróbico-anaeróbico). Además se lleva a cabo la activación y regulación hacia arriba de la expresión de enzimas involucradas en la producción de radicales libres (ROS) y fallas en la cadena transportadora de electrones. Estos eventos son el escenario para la generación de ROS cuando el oxígeno es nuevamente incorporado durante la reperusión. Los ROS actúan como un estímulo inflamatorio para la infiltración y activación de neutrófilos, células T y monocitos. Esto conduce a la producción de superóxido que magnifica el estrés oxidativo y favorece la muerte celular por apoptosis y necrosis. La producción de ROS post isquemia también activa metaloproteasas de la matriz que conducen a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) que contribuye al hinchamiento y lisis celular. Sin embargo, la producción de ROS ocurre a una tasa baja de producción y esto no permite que sirvan como moléculas de señalización que participen en la activación transcripcional de factores de crecimiento y promuevan la proliferación, diferenciación y migración celular. El efecto final de esta señalización es la remodelación del tejido y vasos sanguíneos, incluso angiogénesis. Tomado y modificado (Kalogeris, Bao y Korthuis, 2014).

Muerte celular

La muerte celular es un proceso activo derivado de una completa y permanente inhibición del metabolismo energético (Lipton, 1999). Ésta puede ser de dos tipos: no programada y programada (MCP, muerte celular programada). La MCP ocurre de manera fisiológica, particularmente en el desarrollo embrionario; pero también puede producirse por estímulos externos. A diferencia de la no programada, la MCP involucra la participación activa del metabolismo celular y se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas, permitiendo así su eliminación por fagocitosis (Lipton, 1999; Mehta, Manhas y Raghubir, 2007). La MCP puede ser de dos tipos: apoptótica y autofágica.

La apoptosis, desde el punto de vista morfológico, se caracteriza por la desintegración del citoesqueleto, compactación y fragmentación de la cromatina, condensación citoplasmática, fragmentación nuclear y formación de dilataciones globulares que derivan en la formación de cuerpos apoptóticos. Éstos últimos son fagocitados y digeridos por las células adyacentes. Desde el punto de vista bioquímico, consiste en la fragmentación del DNA, activación de caspasas, exposición de fosfatidilserina al exterior celular, síntesis de proteínas pro-apoptóticas (como Bax), así como enzimas como COX-2 e iNOS, culminando con la muerte celular (Choi, 1992; Nagayama y cols., 1999; Sattler y Tymianski, 2001). Durante el evento isquémico existen muchas de estas condiciones haciendo inespecífica su activación.

La muerte por autofagia comprende la formación de autofagosomas que son producto de la fusión de lisosomas con vesículas en regiones cercanas al citoplasma, los cuales usualmente incluyen organelos. Estos parecen proliferar, ya que presentan núcleos picnóticos y poco densos. Estas estructuras están rodeadas por múltiples membranas que contienen organelos y catepsinas. Se ha documentado que durante este proceso hay alteraciones en la integridad y transporte membranal, daño mitocondrial (inhibición de la fosforilación oxidativa, apertura del poro mitocondrial y producción de radicales libres).

La muerte celular no programada o necrosis solo ocurre por un daño externo y no hay elaboración de nuevas estructuras; por lo tanto no es considerada como

un proceso fisiológico. Es identificada morfológicamente por dos tipos de cambios morfológicos, el primero incluye una reducción dramática en el tamaño celular y se vuelve electrodensa. La segunda variación morfológica menos frecuente incluye un cambio edematoso y los organelos pierden su forma, el citoplasma se aprecia casi transparente y la membrana celular no es regular y presenta algunas interrupciones. Esta es activada en respuesta a niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Esta es favorecida en un ambiente proinflamatorio y estrés oxidativo que ejercen un efecto inhibitor sobre la acción de las caspasas y la falta de producción energética.

1.3 Modelos de estudio para la isquemia

El estudio del daño celular inducido por el proceso isquémico ha sido abordado con diversos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Las tres principales clases de modelos comprenden la isquemia global, la focal o la hipoxia-isquemia. Las características de estos abordajes experimentales se resumen en la Tabla 1.

Los modelos *in vivo* utilizan principalmente roedores y se basan en la oclusión vascular para disminuir la irrigación cerebral, esta es clasificada como global cuando se reduce de manera completa la irrigación (<3% del flujo sanguíneo) o focal (núcleo isquémico <15%, penumbra <40% del flujo sanguíneo) si se realiza la oclusión específica de un vaso sanguíneo, o en otros casos la combinación de la oclusión con asfixia (modelo de hipoxia-isquemia) (Nitsch y cols., 1989; Lipton, 1999; Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Aguilar-Alonso y cols., 2008). El uso de modelos animales permite estudiar las alteraciones que se generan durante la isquemia a diferentes tiempos de reperfusión, con ello se puede estudiar de forma precisa cambios electrofisiológicos, histológicos, bioquímicos, funcionales y conductuales asociados al daño isquémico.

Respecto a los modelos *in vitro*, éstos utilizan rebanadas frescas, cultivos organotípicos o células disociadas. En estas preparaciones la isquemia ha sido mimetizada exitosamente mediante la exposición controlada de anoxia (ausencia de oxígeno), bloqueadores de la cadena respiratoria (Citrocromo C) o isquemia (supresión de glucosa y oxígeno) (Zhao y Flavin, 2000; Xie y cols., 2007; Zhang y

cols., 2009; Ziobro, Deshpande y DeLorenzo, 2011). Estos modelos han expuesto las alteraciones celulares que subyacen a los procesos patofisiológicos asociados a la isquemia. Las alteraciones observadas *in vitro* se replican en los modelos *in vivo* (Lipton, 1999; Zhao y Flavin, 2000; Ziobro, Deshpande y DeLorenzo, 2011), lo que ha facilitado el desarrollo de terapias a individuos con infarto cerebral.

Uno de los modelos *in vitro* más utilizado para el estudio del proceso isquémico es la privación transitoria de oxígeno y glucosa (Oxygen and Glucose Deprivation, OGD por sus siglas en inglés). Este modelo consiste en la exposición controlada de los tejidos o cultivos a una solución de líquido ceforraquídeo artificial (LCRa) en la que se sustituye el contenido de D-glucosa con una concentración equimolar de sacarosa y se reemplaza el oxígeno por una mezcla de nitrógeno, con el fin de simular las condiciones que se presentan durante la isquemia (Gee y cols., 2006; Xie y cols., 2007; Jones, Novak y Elliott, 2011). Este modelo, además de reducir los tiempos de exposición isquémica, tiene el beneficio adicional de que permite determinar las alteraciones electrofisiológicas asociadas a los periodos en que los circuitos neuronales están desprovistos de intermediarios energéticos y oxígeno, siendo de gran utilidad para explorar los mecanismos que se activan durante el proceso isquémico.

Tabla 1. Características de los principales modelos empleados para el estudio de la isquemia.

Modelo	Isquemia	Procedimiento	Características	Ventajas	Desventajas
<i>In vivo</i>	Global	Oclusión de 4 vasos sanguíneos.	Mimetizan un infarto cerebral debido a alguna falla cardíaca, ligadura de las arterias cardíacas	Estudio de síntesis de proteínas Producción de ATP Reducción de pH	No hay mucha producción de radicales libres
		Oclusión de 2 vasos sanguíneos más hipertensión.			
	Focal	MCA (permanente)	Mecanismo más complejo, dos regiones: núcleo isquémico y penumbra	Permite la formación de FR, síntesis de proteínas, ATP, pH	Hay variaciones en las regiones dañadas y sus mecanismos
		MCA (Transitoria)			

<i>In vitro</i>	Global	Intercambio equimolar: sacarosa-glucosa 95% N ₂ / 5% CO ₂ por tiempos controlados	Rebanadas	Mimetizan mejor las condiciones del tejido, disminución de ATP, síntesis de proteínas, pH, FR	Más susceptibles al daño isquémico (morfología, transmisión sináptica)
			Cultivos organotípicos	Permiten estudiar los mecanismos del retraso de la muerte celular, disminución de ATP, síntesis de proteínas, pH, FR	Más tiempo de exposición

1.4 Regiones susceptibles al daño isquémico

Estudios previos han demostrado que el proceso isquémico afecta de forma diferencial a las regiones cerebrales, encontrándose mayor susceptibilidad en la corteza, el hipocampo y el estriado. La afectación selectiva de estas regiones correlaciona con la disminución de procesos cognitivos y motores que presentan los pacientes. Es importante mencionar que dentro de estas regiones, el daño isquémico también es selectivo. Por ejemplo, el proceso isquémico dentro del hipocampo, demostró que sus diferentes regiones que lo conforman presentan diferente grado de daño ante la isquemia, siendo más vulnerable el área CA1, seguida de CA3 y el DG.

1.5 Hipocampo

El hipocampo es una de las áreas más estudiadas del sistema nervioso central de los mamíferos. Su nombre obedece a la forma del hipocampo humano cuya estructura asemeja un caballito de mar; además de ser una estructura fácil de identificar y estar involucrada en procesos de aprendizaje y memoria (Scoville y Milner, 1957). Etimológicamente proviene del griego *hippo* que significa “caballo” y *kamos* que significa “monstruo acuático”. En algunos otros casos el hipocampo se le llama Asta de Ammon (Cornu Ammonis; debido al dios egipcio Ammon que es un carnero). El hipocampo es una estructura del sistema límbico ampliamente relacionada con varios núcleos del sistema nervioso central entre los cuales se

encuentran; la corteza media prefrontal, NAc, amígdala y área ventral tegmental, que en conjunto forman el sistema mesocorticolímbico que está implicado en la regulación de conductas motivadas.

Estructuralmente está conformado por un grupo de regiones incluidas en el sistema límbico llamado comúnmente formación hipocampal; que incluyen el giro dentado (DG), el hipocampo, el subículo (S), el presubículo (PrS), el parasubículo (PaS) y la corteza entorrinal (EC) como se muestra en la Figura 2. El hipocampo propiamente dicho puede dividirse de acuerdo con la terminología de Lorente de Nó en tres regiones (CA1, CA2 y CA3). La región CA2 originalmente fue descrita por Lorente de Nó, y es una región intermedia entre CA1 y CA3, con largos cuerpos celulares como las de CA3 pero no reciben inervación de las fibras musgosas como la región CA1.

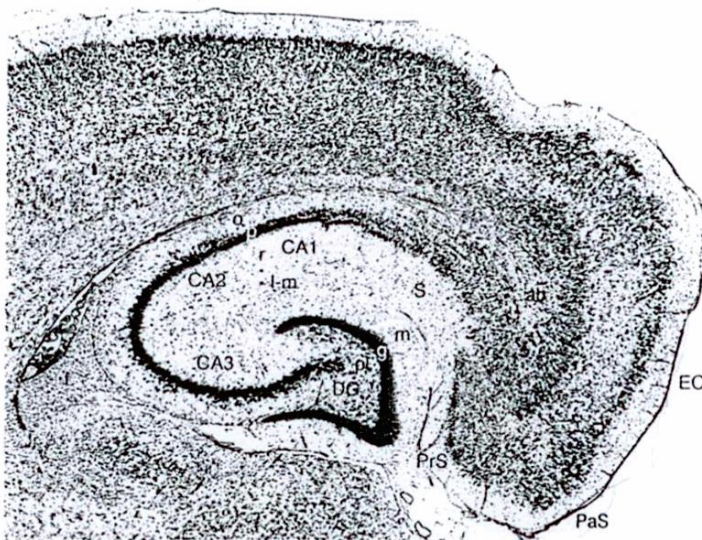


Figura 2. Tinción de Nissl de una sección horizontal de la formación hipocampal.

Las regiones oscuras son somas teñidos. La región acelular contiene dendritas de las neuronas hipocampales y axones de origen intrínseco y extrínseco. El giro dentado (DG) tiene tres capas: la capa molecular (m), la capa de neuronas granulares (g) y la capa de neuronas polimórficas (pl). El hipocampo es dividido en tres regiones CA3, CA2 y CA1. La capa ocupada por dendritas

basales de las neuronas piramidales stratum oriens (SO), está seguida por la capa piramidal (SP), la capa celular superficial o stratum radiatum (SR) y el stratum lacunosum-moleculare (L-M) donde se ubica la dendrita apical. El subículo (S), presubículo (Prs), parasubículo (PaS) y la corteza entorrinal (EC) también están ilustrados. La fimbria (f) consiste en un gran número de fibras aferentes y eferentes. El conjunto angular (ab) es una región de fibras en la cual las fibras de la vía perforante viajan de la corteza entorrinal a otros campos de la corteza entorrinal. (Amaral y Witter, 1989).

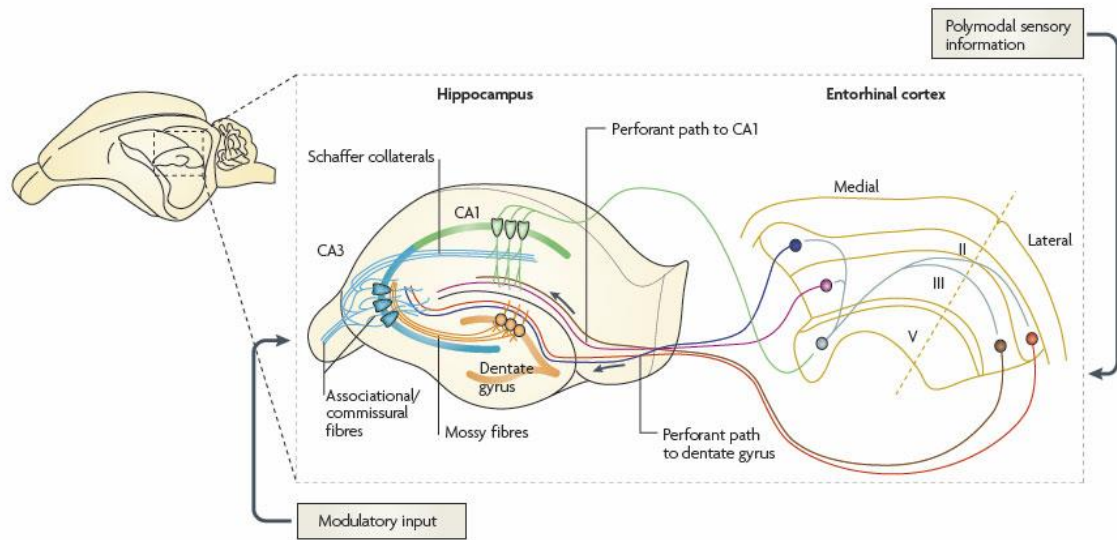
Cada región involucra la interacción de neuronas principales (excitadoras) y accesorias (inhibidoras) que modulan la actividad de las principales para mantener su actividad dentro de niveles fisiológicos (Freund, 2007; Campanac y cols., 2013).

Sin embargo, durante procesos de aprendizaje este balance se pierde transitoriamente, originando procesos de plasticidad de largo y corto plazo; es decir, que se construyen nuevos circuitos neuronales (Bliss y Collingridge, 1993). Por lo tanto estos procesos de plasticidad son propuestos como el mecanismo celular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria (Martinez y Derrick, 1996).

El DG está compuesto principalmente por las neuronas granulares ubicadas en la capa granular. Éstas son definidas como monopolares de acuerdo a su morfología y su árbol dendrítico se extiende hacia la capa molecular. Por otra parte su axón conocido como fibras musgosas se extiende en dirección opuesta para inervar a la región CA3.

Las neuronas del hipocampo se encuentran organizadas en una capa laminar denominada *stratum pyramidale (sp)*, exhiben árboles dendríticos elaborados que se extienden perpendicularmente a la capa celular en ambas direcciones y son consideradas como neuronas multipolares, comúnmente son llamadas neuronas piramidales debido a su soma con forma de pirámide. Hay referencias de diferentes tamaños entre las neuronas piramidales de CA1 y CA3; esto se debe a sus diferentes conexiones sinápticas. Las dendritas de las neuronas piramidales están cubiertas con espinas lugar donde las sinapsis tienen lugar.

La ventaja de estudiar los circuitos neuronales que conforman al hipocampo reside en que solo presentan una capa de células principales; además, las fibras aferentes que provienen de diferentes regiones terminan organizadas en sus distintas capas sin solapamiento, esto permite el estudio específico de alguna sinapsis (Förster, Zhao y Frotscher, 2006). Aunado a este fenómeno se sabe que la transmisión de la información de las vías excitadoras dentro del hipocampo es unidireccional. Esto implica que la activación de la EC involucra la activación de regiones adyacentes que dan origen al circuito trisináptico del hipocampo (ver Figura 3) (Andersen, Bliss y Skrede, 1971). Por lo tanto, cualquier interrupción en el flujo de información dentro del circuito irrumpe la formación del aprendizaje y la memoria; aunque se ha observado que las lesiones focales no afectan completamente, puesto que estas regiones están conectadas de forma directa e indirecta (Blackstad, 1956; Steward, 1976).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 3. Circuito trisináptico clásico.

1.-La información viaja de la capa II de la corteza entorrinal hacia la capa granular del giro dentado activando a las células granulares a través de la vía perforante. 2.- La activación de las células granulares envía la información al stratum lucidum activando a las células piramidales de la región CA3 mediante las fibras musgosas. 3.- A su vez la región de CA3, a través de la colateral de Schaffer, envía la información a la región CA1. 4.- Las neuronas piramidales de la región CA1 envían la información hacia el subículo vía alveus y finalmente ésta regresa a la capa V de la corteza entorrinal. Tomado de Neves, Cooke y Bliss, 2008.

1.5.1 Sinapsis de las fibras musgosas-CA3

La sinapsis de las fibras musgosas-CA3 se debe a la interacción química y eléctrica entre las células del giro dentado y sus neuronas blanco ubicadas en la región CA3 del hipocampo. Posee terminales presinápticas grandes que incluyen múltiples sitios de liberación ubicados en la porción proximal del árbol dendrítico de las neuronas piramidales (s) (Amaral y Witter, 1989; Blackstad y Kjaerheim, 1961; Urban, Henze y Barrionuevo, 2001); por lo tanto, ejerce un papel importante en la excitabilidad de las mismas. Se denomina a esta sinapsis como detonante o maestra en referencia a que una sola sinapsis es capaz de generar el disparo de una neurona piramidal y así instruir la entrada de información al hipocampo (McNaughton y Morris, 1987; Rolls y Treves, 1994). Sin embargo, se sabe que las neuronas piramidales no son el único blanco de las fibras musgosas; y éstas hacen contacto con interneuronas de forma preferencial. Se propone que cada célula granular contacta con 15 neuronas piramidales mediante botones musgosos, y con

50 interneuronas por medio de terminaciones en *passant* y extensiones filipodiales (Acsády y cols., 1998).

Funcionalmente, la sinapsis fibras musgosas-CA3 está asociada a la memoria de trabajo, separación de patrones, la adquisición de nueva información espacial (escenas, espacio, cambios en el medio) (Hagena y Manahan-vaughan, 2005), entre otros. Ésta es una sinapsis de baja probabilidad de liberación, debido a los niveles bajos de disparo de las células granulares (Jung y McNaughton, 1993). Como consecuencia presenta una marcada facilitación por pulso pareado y por frecuencia, fenómenos conocidos como mecanismos de plasticidad a corto plazo (Salin y cols., 1996), que participan en la integración de la información. Ambos fenómenos dependen de la concentración de Ca^{2+} (Regehr, Delaney y Tank, 1994) y al número de zonas activas en la terminal presináptica (Chamberland, Evstratova y Tóth, 2014). Una de las características principales de las MF es su abundante expresión del receptor metabotrópico de glutamato del tipo 2 (mGluR2), que funciona como autoreceptor, por ende la activación del mismo suprime la liberación de glutamato.

En cuanto a los procesos de plasticidad de largo plazo (LTP) de esta región, se propone que la LTP depende de la activación de receptores opioides μ . Los péptidos opioides son coliberados de las fibras musgosas y su liberación depende de la frecuencia de estimulación (Jin y Chavkin, 1999; Martinez, Do y Derrick, 2011), y de la activación de receptores de tipo AMPA y del receptor mGluR5 (Hagena y Manahan-vaughan, 2005). Esto se ha observado durante periodos de actividad repetida de las células granulares, por ejemplo, durante la actividad exploratoria (Martinez y Derrick, 1996). La exposición a nuevos espacios o cambios de escenas facilitan la entrada específica de LTP; en contraste, la exploración de un nuevo espacio favorece la depresión a largo plazo (LTD) (Hagena y Manahan-vaughan, 2005).

1.5.2 Sinapsis de la colateral de Schaffer-CA1

La sinapsis de la colateral de Schaffer-CA1 involucra los axones que vienen de la región CA3 denominados colaterales de Schaffer (Sch) y las neuronas

piramidales de la región CA1. Esta sinapsis está asociada funcionalmente con la formación de nuevas memorias.

Los procesos de plasticidad a largo plazo LTP y LTD en esta región dependen de la actividad del receptor NMDA, que actúa como un detector de coincidencia molecular y que requiere una despolarización de la membrana para remover el bloqueo de Mg^{2+} y la unión de glutamato al mismo tiempo (Bliss y Collingridge, 1993; Salin y cols., 1996). La LTP involucra un incremento en la entrada de Ca^{2+} a través del receptor NMDA. Éste actúa como segundo mensajero para activar a la CaMKII y a PKC (Malenka y cols., 1989). Posteriormente estas cinasas activan a sus blancos en la vía de señalización como a los receptores AMPA, resultando en un aumento en el tráfico e inserción de estos receptores favoreciendo su activación. Experimentalmente se ha demostrado que la activación de los receptores de tipo NMDA está asociada con procesos de aprendizaje; ya que el bloqueo farmacológico del receptor con D-APV daña el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris (Morris y cols., 1986).

1.6 Hipocampo e isquemia

Se ha reportado que el daño isquémico tiene un efecto diferencial, incluso dentro de una misma región cerebral (Pulsinelli, 1985; Graham y cols., 1992). Una de las estructuras donde podemos observar este fenómeno es el hipocampo (Schmidt-Katsner y Freund, 1991). La literatura reporta que las neuronas de la región CA1 son altamente sensibles al daño isquémico, mientras que las neuronas localizadas en el DG y la región CA3 se consideran resistentes a la isquemia, considerando el tiempo de muerte post-isquemia (Choi y Rothman, 1990; Schmidt-Katsner y Freund, 1991; Howard y cols., 1998). Los principales hallazgos experimentales se enlistan en la Tabla 2.

Una posible explicación reside en el tipo de receptores de glutamato expresados en el hipocampo. Sobre esto, la literatura indica que en la región CA1 la transmisión sináptica está mediada principalmente por receptores NMDA. Mientras tanto, en las regiones CA3 y DG, la transmisión es mayormente por receptores AMPA y Kainato (Harris y Cotman, 1986). Durante años el daño

isquémico ha sido asociado con una sobreactivación de los receptores de glutamato tipo NMDA (excitotoxicidad); por lo cual se ha postulado que la resiliencia natural de las regiones CA3 y DG, es consecuencia de la baja densidad de este tipo de receptores. Además, se ha reportado que hay diferencias en el metabolismo de estas regiones que incluyen diferencias en la síntesis de proteínas.

Tabla 2. Condiciones reportadas durante o posterior al periodo isquémico en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.

Región CA1	Región CA3
Incremento en los niveles del RNAm de caspasa	Síntesis de proteínas de genes de expresión temprana
Depresión de la síntesis de proteínas	Síntesis de BDNF
Pérdida de BDNF y PIP, PIP2	Síntesis e incremento de TrkBIn
Recuperación lenta del pH	Síntesis de Bcl-2
Pérdida permanente de ubiquitina	Síntesis de proteínas de Shock térmico
Vulnerabilidad a radicales superóxido	
Elevación de ácidos grasos libres	
Acumulación de Zinc	
Incremento de Ca ²⁺ intracelular	
Disminución de la actividad de CaMKII	

1.7 Factores neurotróficos

Es bien conocido que las células secretan una gran cantidad y variedad de sustancias que regulan sus funciones incluyendo hormonas, citosinas, neurotransmisores y factores neurotróficos. Los factores neurotróficos o neurotrofinas son una familia de proteínas del desarrollo del sistema nervioso, que influyen en procesos de plasticidad, diferenciación, supervivencia y muerte celular (Nagappan y Lu, 2005).

En mamíferos, la familia de neurotrofinas incluye al factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3), la neurotrofina 4 (NT4) y la neurotrofina 5 (NT5). Sus acciones tróficas son

mediadas principalmente por los receptores de la familia Trk (A, B y C). Los efectos del NGF son mediados por el receptor TrkA, la NT3 activa al TrkC con mayor afinidad y finalmente el BDNF, NT3 y NT4/5 ejercen sus efectos al activar el TrkB. Cuando el ligando se une a su receptor, este se dimeriza y ocurre la transfosforilación de los residuos de tirosina intracelulares lo conlleva a la activación de vías de señalización como Ras/Raf/MAPK (Sommerfeld y cols., 2000).

1.8 Factor neurotrófico derivado del cerebro

El BDNF es la neurotrofina más estudiada del sistema nervioso central. Históricamente fue aislada del cerebro de cerdo gracias a su acción de promover la supervivencia de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Barde, Edgar y Thoenen, 1982). Estructuralmente comparte gran homología con el NGF y su estructura ha sido conservada durante la evolución, ya que la forma madura es idéntica en el cerdo, rata y ratón.

El BDNF es expresado abundantemente en el sistema nervioso central, especialmente en la formación hipocampal (Beck y cols., 1994; Kokaia y cols., 1996; Spencer-Segal y cols., 2011), corteza cerebral y complejo amigdalino (Murer, Yan y Raisman-Vozari, 2001). Se sabe que la forma inmadura (pro-BDNF) y madura (BDNF) activan una gran cantidad de receptores y vías de señalización intracelulares que modulan procesos de plasticidad, crecimiento axonal y dendrítico, sobrevivencia y muerte celular. El BDNF es sintetizado como un precursor glucosilado que es convertido a su forma madura de forma postraduccional. El pro-BDNF es rápidamente convertido a BDNF de forma intracelular y no de forma extracelular como se proponía anteriormente (Matsumoto y cols., 2008).

Se sabe que la activación sináptica de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA y NMDA incrementa la expresión de BDNF, el cual se acumula en las neuronas y es secretado ante la estimulación repetida (Lauterborn y cols., 2000; Matsumoto y cols., 2008). En el hipocampo, la regulación de la respuesta sináptica para la liberación de BDNF solo ocurre cuando las neuronas presinápticas son estimuladas de manera repetida a frecuencias mayores a 50 Hz y solo en sinapsis activas (Nagappan y Lu, 2005).

Por otro lado, el BDNF no sólo activa al receptor TrkB, sino también al receptor p75 con diferente afinidad, mostrando mayor afinidad por el TrkB ($K_d \sim 10^{-11}M$), en comparación al p75 ($K_d \sim 10^{-9}M$). Cuando ambos receptores se encuentran expresados, la afinidad del BDNF por su receptor TrkB incrementa (Murer, Yan y Raisman-Vozari, 2001). La expresión de este receptor ha sido detectada en terminales axónicas, espinas dendríticas de neuronas piramidales y células granulares en el hipocampo (Drake, Milner y Patterson, 1999; Pereira y cols., 2006).

La activación del TrkB por su ligando endógeno (BDNF) desencadena varias vías de señalización río abajo. Estas incluyen a MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT y PLC γ 1. Dentro de las vías que han sido asociadas directamente a la supervivencia celular se encuentran la vía de ERK y PI3K/AKT (Leal, Bramham y Duarte, 2017). La activación del receptor y sus vías de señalización se resumen en la Figura 4.

La unión del BDNF a su receptor TrkB se da en los residuos de aminoácidos 103-118, un motivo rico en leucina, el dominio Ig2 y CC2 del receptor; esta unión favorece su dimerización y la autofosforilación de sus residuos de tirosina en el dominio intracelular (Tyr 515, Tyr 816), que activa las vías de señalización río abajo (Haniu y cols., 1997). La autofosforilación de estos residuos de tirosina sirve de anclaje a proteínas accesorias que inician la cascada de señalización Shc y PLC γ respectivamente. La forma fosforilada de Shc recluta a GRB2 y al factor de intercambio de guanina (SOS), resultando en la activación de la vía Ras-MAPK. Ésta vía está acoplada a la activación de elementos de respuesta a AMP cíclico (CREB), que incrementa la transcripción de genes de supervivencia esenciales y otros blancos. Esta vía de señalización es requerida para la inducción de LTP en el DG *in vivo*.

Además, la fosforilación en el residuo de tirosina 816 recluta a la PLC γ 1 que es fosforilada por el receptor activo. PLC γ 1 hidroliza al fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) para generar inositol 1,4,5,-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). A su vez el IP3 favorece la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, el Ca^{2+} liberado activa enzimas dependientes de Ca^{2+} como la Ca^{2+} /Calmodulina cinasa. Esta vía de señalización controla la expresión y la actividad de diversas proteínas como canales

iónicos, factores de transcripción involucrados en procesos de plasticidad en la sinapsis CA3-CA1.

Finalmente, la activación de Shc también está acoplada a la otra vía de señalización mediante la activación de GRB2 y otras proteínas adaptadoras (Sos, GAB1). La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR está bien caracterizada y es reconocida por jugar un papel importante en la función celular normal, incluyendo el balance energético y nutricional, síntesis de proteínas y el control de crecimiento en mamíferos (Owonikoko y Khuri, 2013). PI3K pertenece a una familia de lípidos y proteín-cinasas que son activadas por receptores asociados a tirosina-cinasas, su función recae en la formación de fosfatidil inositol 3, 4, 5- trifosfato (PIP3). PIP3 actúa como segundo mensajero y media la activación de la cinasa PDK1 y AKT para la supervivencia y crecimiento celular, es regulada negativamente por PTEN mediante su defosforilación.

AKT puede ser fosforilada por PDK1, PDK2 o por PI3K directamente (Horn y cols., 2005). La forma activa de AKT media sus efectos anti-apoptóticos mediante la fosforilación de proteínas como Bad, caspasa-9, factores de transcripción como FOXO e inhibe su habilidad para inducción de la expresión de genes de muerte, GSK3 β y factores de supervivencia celular como: NF- κ B y CREB (Horn y cols., 2005; Wu y cols., 2014), mediante la activación de la diana de rapamicina de células de mamífero (mTOR). mTOR es una cinasa de serina-treonina, que actúa como un regulador de la síntesis de proteínas involucradas en el crecimiento y supervivencia celular. Esta puede ser activada de forma dependiente de la vía Ras/MEK/Erk (Karar y Maity, 2011).

Por otra parte AKT incrementa la señalización de HIF-1 mediante el incremento de los niveles de proteína de HIF-1 α que es estable en condiciones de hipoxia, posteriormente HIF-1 α se une a la subunidad β , el complejo resultante se une a numerosos promotores que contienen elementos de respuesta a hipoxia (HREs), favoreciendo la transcripción de docenas de genes como el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF), BDNF y su receptor TrkB (Martens y cols., 2007; Karar y Maity, 2011; Stegeman y cols., 2016). El factor de Hipoxia inducible 1 (HIF-1) es una importante vía de señalización para la supervivencia celular, induce

la transcripción de numerosos genes que regulan la proliferación celular, angiogénesis, metabolismo de la glucosa y apoptosis (Harris, 2002). Además AKT promueve la supervivencia hipocampal mediante la inhibición de la actividad de p53, que se sabe favorece la expresión de genes de muerte y proteínas pro-apoptóticas como BAX (Brunei y cols., 2011).

Se sabe que hay una regulación a la baja de la señalización del TrkB después de su activación con BDNF en cultivos corticales y neuronas hipocampales, mediante la endocitosis del receptor, fenómeno reflejado como una deficiencia de la hidrólisis de fosfatidilinositol o una disminución de la fosforilación de la fosfolipasa (PLC γ) (Sommerfeld y cols., 2000).

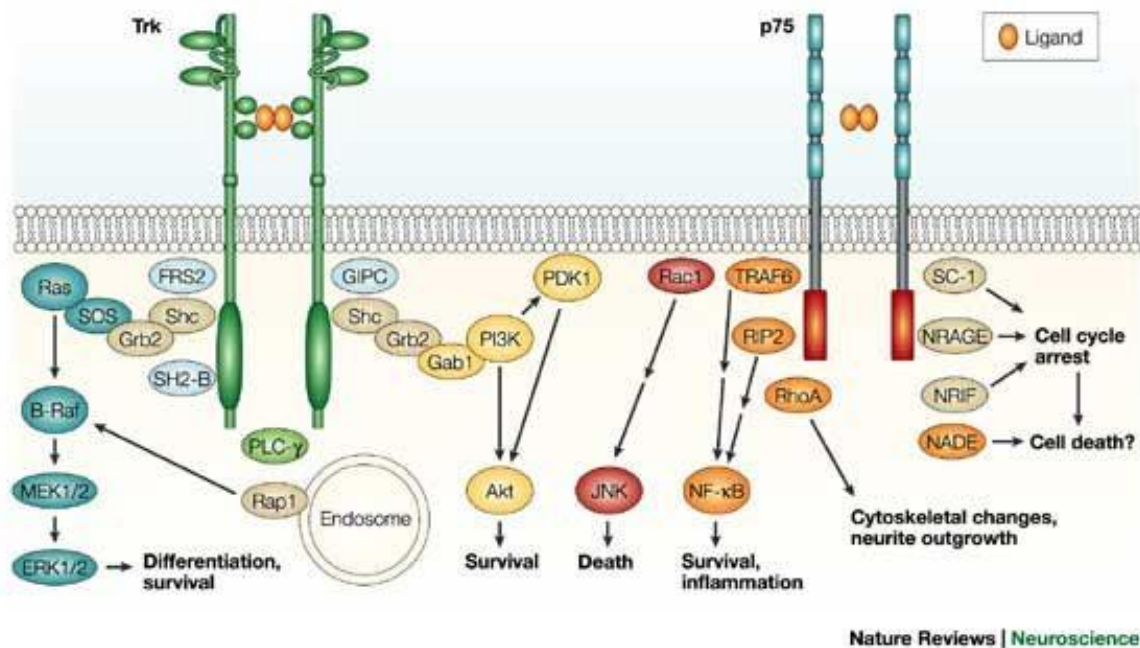


Figura 4. Vías de señalización acopladas a la activación del receptor TrkB.

El receptor TrkB está involucrado en la señalización de diferenciación y supervivencia celular a través de la activación de ERK, PI-3-K y PLC γ . Los miembros de la familia Trk reclutan e incrementan la fosforilación de PLC γ y Src, esto permite la activación de PI3K y ERK. El receptor p75 activa de forma predominante a NF- κ B y JNK y modula la actividad de RhoA. Estas respuestas son mediadas por proteínas adaptadoras que se unen en el dominio citoplasmático del receptor incluyendo NRIF, NADE, NRAGE, SC1 y RIP2, que promueven efectos en procesos como apoptosis, supervivencia, crecimiento dendrítico. Tomado de Chao, 2003.

En cuanto a sus efectos biológicos se ha demostrado que es capaz de modular efectos de plasticidad de largo plazo como la LTP en el hipocampo sin afectar la LTD (Matsumoto y cols., 2008). Por otra parte se ha observado que el mRNA del BDNF incrementa durante algunos eventos como: convulsiones, actividad epileptiforme, entre otros.

1.9 Factor neurotrófico derivado del cerebro e isquemia

Otra explicación asociada a la susceptibilidad diferencial en el hipocampo, está asociada a las condiciones que se generan en dichas regiones del hipocampo post-isquemia. En la región CA1 se ha reportado un incremento en la expresión del mRNA de caspasas (enzimas involucradas en el proceso de muerte celular programada), disminución de síntesis de proteínas, pérdida del BDNF (Pandya, Kutiyawalla y Pillai, 2013; Park y Poo, 2013; Bekinschtein, Cammarota y Medina, 2014; Van Kanegan y cols., 2014; Shi, 2015); mientras que en las regiones CA3 y DG se ha reportado síntesis de genes de expresión temprana, síntesis de BDNF (Almeida y cols., 2005) y proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Lipton, 1999).

2. Justificación

El estudio experimental de la isquemia cerebral permite reproducir eventos isquémicos que ocurren en humanos, haciendo posible estudiar los mecanismos que llevan a la muerte celular. Por otro lado, también se conoce que el hipocampo es una de las áreas más vulnerables tras un evento isquémico. Sin embargo, su daño es selectivo, afectando principalmente a las neuronas localizadas en la región CA1, pero no a las neuronas de CA3. Un creciente número de publicaciones científicas ha descrito la vulnerabilidad de CA1, así como los mecanismos que subyacen al daño por isquemia en el hipocampo. No obstante, el proceso isquémico en CA3, así como los mecanismos responsables de su protección relativa (como la síntesis y liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro) son poco conocidos. La búsqueda de estos mecanismos, justifica la ejecución del presente trabajo, el cual describe el papel que juega la activación de TrkB en la resistencia de las regiones CA3 y CA1 ante el daño isquémico.

3. Hipótesis

Si la activación del receptor TrkB con BDNF juega un papel activo en la resiliencia ante el daño isquémico, entonces su activación, previa a la privación de oxígeno y glucosa revertirá el efecto inducido por OGD en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo.

4. Objetivos

General

Determinar si la activación del receptor TrkB juega un papel activo en la resistencia natural de las regiones CA3 y CA1 del hipocampo ante el daño isquémico, e identificar la vía de señalización involucrada.

Particulares

1. Caracterizar el efecto de la privación de oxígeno y glucosa sobre la transmisión sináptica en la región CA3 y CA1 de hipocampo.
2. Determinar si la activación del receptor TrkB previene la desaparición de la respuesta sináptica evocada de la región CA3 del hipocampo durante la privación de oxígeno y glucosa a través de la evaluación de:
 - A. Participación endógena de la activación del TrkB.
 - B. Activación de TrkB (BDNF o 7,8-DHF).
 - C. Activación/bloqueo de TrkB.
3. Determinar daño y muerte celular como resultado de la privación de oxígeno y glucosa, así como los tratamientos que presentaron recuperación posterior.

5. Material y métodos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley (SD) de cuatro semanas de edad, provenientes del bioterio del Cinvestav, las cuales fueron anestesiadas intraperitonealmente (i.p) con una sobredosis de pentobarbital sódico (50mg/kg), y sacrificadas por decapitación para la extracción del cerebro. Los hemisferios cerebrales fueron separados y posteriormente fijados en la plataforma de un vibratomo (Leica VT1000S). De los hemisferios, se obtuvieron rebanadas horizontales del hipocampo de 385 μm de grosor. Posteriormente, las rebanadas fueron incubadas en una solución de recuperación (125 NaCl, 2.5 KCl, 2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10 glucosa, 1 CaCl₂ y 4 MgCl₂ en mM), y se mantuvieron con gaseo (95% O₂ / 5% CO₂) y temperatura (33 \pm 2 °C) constantes durante 30 minutos, seguidos de 60 minutos a temperatura ambiente.

5.1 Privación de oxígeno y glucosa

Para mimetizar el proceso isquémico se sustituyó el LCRA durante 10 minutos, por una solución libre de oxígeno y glucosa (OGD, privación de oxígeno y glucosa por sus siglas en inglés); en la cual la glucosa fue sustituida con 10 mM de sacarosa y gaseada continuamente, por al menos 1 hora previa al experimento con una mezcla de 95%N₂/ 5%CO₂. Durante la perfusión, esta solución se burbujeó de manera continua con la mezcla de nitrógeno.

5.2 Fármacos

Los siguientes compuestos fueron adquiridos en sigma Aldrich: factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), 7,8-Dihydroxiflavona (7,8-DHF), monoetanolato U0126, Dimetilsulfóxido (DMSO), N-[2-[[[Hexahidro-2-oxo-1H-azepin-3-yl)amino] carbonyl]fenil]-benzo[b]tiofeno-2-carboxamida (ANA-12) y yoduro de propidio (PI). El DCG-IV (2S,1'R,2'R,3'R)-2 (2,3Dicarboxycyclopropyl glycine) y KN-93, fueron adquiridos en Tocris. El MK-2206 2HCl fue adquirido en Selleck Chemicals (Houston, TX). El 7,8-DHF, ANA-12, UO126, MK-2206 2HCl y PI fueron disueltos en DMSO con una concentración final menor o igual a 0.01% del

volumen final. Los fármacos restantes y alícuotas fueron disueltos en LCRa antes de iniciar los registros y protegidos de la luz en caso de ser necesario.

5.3 Anticuerpos

Para el análisis de muerte celular e identificación de neuronas en las regiones de interés se utilizó los anticuerpos anti-Caspasa-3 (Conejo) de *Cell Signaling* y anti-NeuN (Mouse) de *Merk Millipore*. Como control positivo de apoptosis, se incubaron rebanadas con NMDA durante 30 min. Como control negativo, se seleccionaron rebanadas de forma aleatoria y se procesaron en ausencia de los anticuerpos primarios. Para observar la marca correspondiente a estos anticuerpos, las rebanadas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios Cy5 anti conejo y Alexa Fluor 488 anti ratón (1:700) de Invitrogen.

5.4 Registros electrofisiológicos

Concluido el tiempo de incubación, se procedió a realizar los registros electrofisiológicos. Para ello, se transfirió una rebanada fresca a la cámara de registro. Esta rebanada fue perfundida con líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) con la siguiente composición (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1.25 Na₂HPO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glucosa), velocidad constante (4 ml/min), temperatura controlada (30±1 °C) y gaseo continuo (95%O₂ / 5%CO₂) durante el experimento.

Para cada región, se colocaron dos electrodos de estimulación. Dichos electrodos se fabricaron con dos alambres de nicromo con recubierta aislante de 50 µm de grosor. Mediante un estimulador Master-8 (*AMPI Tech*) y una unidad de aislamiento (A365, *World Precision Instruments*), se aplicaron dos pulsos cuadrados de corriente de 100 -110 µseg duración, con un intervalo inter estímulo de 60 ms y con una frecuencia de estimulación de 0.06 Hz para cada vía. Se utilizó un amplificador Dagan BVC-700A acoplado a un *headstage* con una ganancia adicional de 100x para la visualización de señales. Las respuestas electrofisiológicas de cada región fueron grabadas mediante un software de adquisición escrito en LabView 7.0 (*National Instruments*). Durante los registros, el ruido eléctrico (50/60 Hz) se eliminó con un filtro externo (*Humbug; Quest Scientific*).

Para los registros extracelulares de la región CA3, el primer electrodo de estimulación se colocó en la zona del hilus del DG para evocar potenciales postsinápticos excitadores de campo (MF fEPSP). El segundo electrodo fue colocado en la fimbria o directamente sobre el *stratum pyramidale* en el límite de las regiones CA3a-CAb, donde se evocaron espigas poblacionales antidrómicas (PS; por sus siglas en inglés y representan la suma de los potenciales de acción postsinápticos). Las respuestas se registraron con una pipeta de vidrio con una resistencia de 1-3 M Ω , la cual se llenó con una solución de NaCl 3M y se colocó sistemáticamente en el *stratum lucidum* del área CA3b.

Para los registros de la región CA1, el Sch-CA1 fEPSP se evocó con un electrodo colocado en el *stratum radiatum*, mientras que la espiga se obtuvo mediante la estimulación del *stratum pyramidale* de la región CA1, la pipeta de registro fue colocada en el *stratum radiatum*. Los sitios de estimulación y registro a cada vía y región se muestran en el panel A y C de la Figura 5.

Para los controles, el procedimiento de registro se llevó a cabo como sigue: se obtuvieron respuestas estables durante 25 minutos en condición control (LCRa, temperatura y flujo constante), seguidos de la perfusión de OGD durante 10 minutos. Posteriormente, se realizó la reperfusión durante 90 minutos. Concluido el tiempo de reperfusión, se procedió a realizar una curva entrada-salida para mostrar la desaparición o depresión transitoria de las respuestas.

Para la obtención de la curva entrada-salida se aplicaron dos pulsos cuadrados de corriente de 100 -110 μ seg duración, con un intervalo inter estímulo de 60 ms y con una frecuencia de estimulación de 0.06 Hz para cada vía, modificando la corriente de estimulación (0-140 μ A) hasta encontrar la saturación de las respuestas evocadas. Para cada corriente de estimulación, se adquirieron 5 barridos con incrementos de 10 μ A.

En algunos de los experimentos se realizaron preincubaciones con nuestros agentes y posteriormente fueron registrados con el protocolo previamente descrito, seguido del tiempo de reperfusión y la curva entrada-salida.

Para el análisis de las respuestas obtenidas se utilizó el software de adquisición escrito en labView, se analizaron la pendiente (durante el curso temporal

de los registros electrofisiológicos) y amplitud (solo para la curva entrada-salida) de los fEPSP. Se analizó la amplitud de las PS de ambas regiones, para lo cual se trazó una línea entre los picos superiores y sobre el pico inferior. Posteriormente, se trazó una línea perpendicular que interceptó ambas líneas, y el valor obtenido correspondió a la amplitud. Concluidos los registros electrofisiológicos, se procedió con el protocolo para el análisis de viabilidad y muerte celular que se describe a continuación.

5.5 Análisis de viabilidad

Las rebanadas registradas fueron incubadas con PI (2 μ M) durante 20 minutos, posteriormente se realizaron múltiples lavados con LCRa con gaseo constante (95% O₂, 5% CO₂), posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído (4%) y esta solución fue sustituida por sacarosa al 30%.

5.6 Análisis de muerte por apoptosis

Para la detección de caspasa-3 y del marcador neuronal (NeuN) se utilizó la técnica de inmunofluorescencia. Las rebanadas previamente teñidas con PI fueron re-seccionadas obteniendo tres rebanadas de 60 μ m de grosor de la parte central de la rebanada con ayuda de un criostato. Es importante mencionar que se descartaron las primeras y las últimas 100 μ m de la rebanada para evitar contar células dañadas por el proceso de corte.

Las rebanadas obtenidas fueron recuperadas y lavadas con PBS. Posteriormente, éstas fueron bloqueadas con solución de bloqueo preparada el mismo día (albúmina de suero bovino 5%, tween-20 0.2%, PBS), seguidas de la incubación con los anticuerpos primarios de anti-caspasa 3 (*Cell Signaling* 9662S, Lote 18) y anti NeuN (*Merck Millipore* MAB377, lote 2829834) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se realizaron múltiples lavados a las rebanadas, y se incubaron con los anticuerpos secundarios Cy5-anti conejo (conjugado para caspasa 3) y AF 488- anti ratón (conjugado para NeuN) con una dilución 1:700 a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación se realizaron múltiples lavados y se procedió a montar las rebanadas en laminillas. Se tiñeron los núcleos

de las células con DAPI incluido en el medio de montaje, con la finalidad de tener un control positivo sobre la presencia de las células.

Para la interpretación de la inmunofluorescencia se consideró a las células vivas como aquellas que se tiñeron únicamente con DAPI (azul). Las células dañadas, por su parte, son aquellas con DAPI (azul) y PI (rojo) co-localizando. Finalmente las células que están en proceso de muerte por apoptosis presentan la marca de DAPI, PI, caspasa 3 (rosa) y, si es de tipo neuronal, también serán positivas a NeuN (verde) de acuerdo a las condiciones previas.

Para la cuantificación se tomaron microfotografías seriadas cada 3 μm con el objetivo 63x con el láser para cada fluoróforo respectivamente, a cada una de las diferentes zonas del hipocampo (CA3, CA1). De estas fotos se cuantificó el número de células presentes y el número de células positivas a PI (Laake, 1999), NeuN y caspasa 3 por unidad de área. Por otro lado, se descartaron las células presentes en la primera fotografía, considerando sólo las de la segunda fotografía. Se contaron las células que convergieron con un borde, evitando su conteo cuando coincidió con más de un borde. No se contaron las células del plano focal anterior. Con estos datos se realizó un promedio por región para cada rebanada y estos datos fueron agrupados de acuerdo a las manipulaciones farmacológicas que recibieron, los datos obtenidos fueron utilizados para el análisis estadístico y determinar si alguno de los tratamientos reduce el número de células positivas a PI y caspasa 3.

6. Análisis estadístico

Para probar la diferencia estadística entre las condiciones experimentales, se utilizó una ANOVA de una vía, con análisis post varianza de Newman Keuls. Se consideró como significativo obtener el valor de $p < 0.05$. La significancia fue indicada con * si $p \leq 0.05$, ** si $p \leq 0.001$ y *** si $p \leq 0.0001$.

7. Resultados

7.1 Caracterización electrofisiológica y farmacológica de las respuestas evocadas en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.

Para demostrar la especificidad de las respuestas evocadas se realizó la caracterización cinética y farmacológica de las sinapsis de CA3 y CA1 del hipocampo. Se obtuvieron dos respuestas de la región CA3: potenciales postsinápticos excitadores de campo (MF fEPSP) y espiga poblacional (CA3 PS), (Figura 5, panel B y D). En CA1 se obtuvieron dos respuestas: un fEPSP al estimular la colateral de Schaffer-CA1 (Sch-CA1) y una espiga poblacional estimulando la comisural de asociación-CA1 (CA1 PS). Posteriormente, se realizó la caracterización siguiendo los criterios enlistados a continuación:

- Sinapsis de la fibra musgosa-CA3 (MF-CA3)
 - ✓ Respuesta obtenida al estimular los axones de las células granulares y registrar sobre el *stratum lucidum* de la región CA3.
 - ✓ Latencia de 3-5 ms posterior al estímulo.
 - ✓ Duración de 3-5 ms.
 - ✓ Facilitación por pulso pareado (Salin y cols., 1996).
 - ✓ Sensibilidad a DGC IV (Kamiya, Shinozaki y Yamamoto, 1996).
- Espiga poblacional antidrómica de la región CA3 (CA3 PS)
 - ✓ Respuesta obtenida al estimular los axones de las piramidales de la región CA3 y registrar sobre el *stratum lucidum* de la región CA3.
 - ✓ Latencia menor a 1 ms posterior al estímulo.
 - ✓ Duración de 2-3 ms.
 - ✓ Facilitación por pulso pareado entre 1-1.5.
 - ✓ No presenta cambios en su amplitud al ser perfundida con DGC IV, ácido kinurénico u otro agonista glutamatérgico.
 - ✓ Presenta una disminución en su amplitud al sustituir equimolarmente el Na⁺ extracelular por NMDG.

- Sinapsis colateral de Schaffer-CA1 (Sch-CA1)
 - ✓ Respuesta obtenida al estimular los axones de las neuronas piramidales de la región CA3 y registrar sobre el *stratum radiatum* de la región CA1.
 - ✓ Latencia de 4-5 ms posterior al estímulo.
 - ✓ Duración de 10-12 ms.
 - ✓ Sensibilidad a ácido kinurénico y agonistas del receptor NMDA.
- Espiga poblacional antidrómica de la región CA1 (CA1 PS)
 - ✓ Respuesta obtenida al estimular los axones de las piramidales de la región CA1 y registrar sobre el *stratum radiatum* de la región CA1.
 - ✓ Latencia menor a 1 ms posterior al estímulo.
 - ✓ Duración de 1-2 ms.
 - ✓ No presenta cambios en su amplitud al ser perfundida ácido kinurénico u otro agonista glutamatérgico.
 - ✓ Presenta una disminución en su amplitud al sustituir equimolarmente el Na⁺ extracelular por NMDG.

Los resultados obtenidos de este análisis se resumen en la Tabla 3 y se ilustran en la Figura 5 (B, D):

Tabla 3. Características electrofisiológicas y farmacológicas de las respuestas evocadas en la región CA3 y CA1 del hipocampo.

	MF fEPSP	CA3 PS	Sch fEPSP	CA1 PS
<i>Latencia</i>	3.5±0.3	0.08 ± 0.01	2.7 ± 0.3	0.08 ± 0.02
<i>Tau de decaimiento</i>	54.4 ± 0.4	359.45 ± 10.9	116.2 ± 1.7	403.9 ± 0.3
<i>Duración</i>	4.3±0.3	1.34 ± 0.2	11.6 ± 0.4	1.4 ± 0.04
<i>PPF</i>	2.4 ± 0.38	1.2 ± 0.03	1.5 ± 0.04	1.4 ± 0.02
<i>DCG IV</i>	4.7 ± 6.4	104.9 ± 11.70	N/A	N/A

Nota: Los datos resumidos en la tabla corresponden al análisis de las respuestas obtenidas durante el registro basal para cada región y sus respectivas respuestas. Se muestra el promedio obtenido ± error estándar. N/A no aplica.

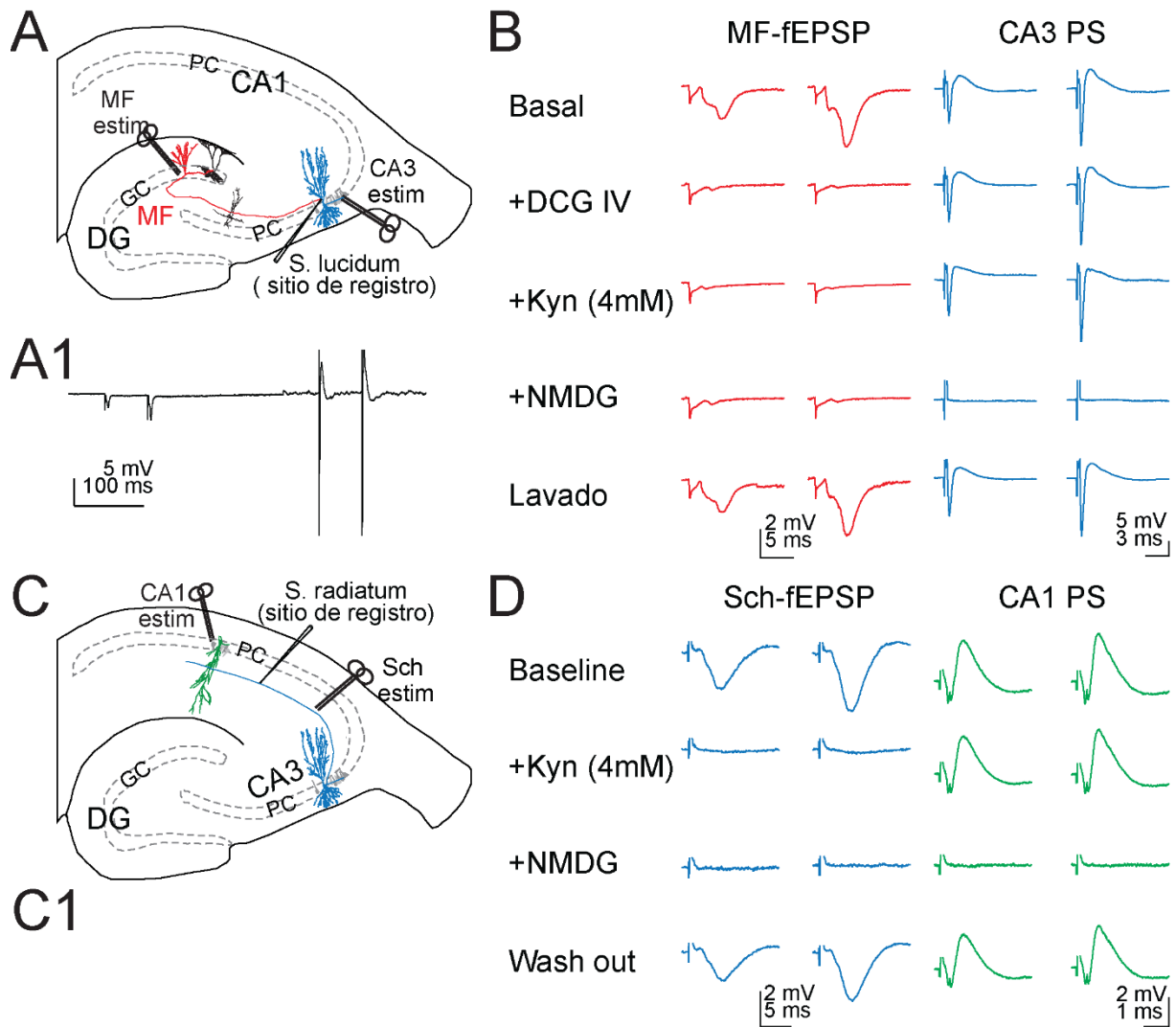


Figura 5. Esquemas y sensibilidad farmacológica de las respuestas electrofisiológicas evocadas en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.

A, C) Los esquemas muestran los sitios de colocación de los electrodos de estimulación y las pipetas de registro. B, D) Trazos representativos evocados en las regiones indicadas y su sensibilidad a diferentes fármacos. A1, C1) Ejemplo de la adquisición de los registros electrofisiológicos: Los fEPSP y las PS se adquirieron consecutivamente a lo largo de los experimentos.

7.2 Efecto de la privación de oxígeno y glucosa en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo.

Se obtuvieron respuestas estables (MF fEPSP y CA3 PS) por 25 minutos; posteriormente, el LCRA se sustituyó por la solución libre de oxígeno y glucosa (OGD) por 10min, seguidos de 90 min de reperfusión con LCRA. Al finalizar este protocolo se realizó una curva entrada-salida.

En la Figura 6, el efecto de la OGD sobre los MF fEPSPs se ilustra con círculos rojos y las CA3 PS en círculos negros. En el panel B además se muestra la curva de saturación de oxígeno a 150 μ M de profundidad. Se observa que la caída de las respuestas eléctricas coincide con la disminución de la saturación de oxígeno. Durante la RP las respuestas evocadas no se recuperaron (MF fEPSP a 10 min de OGD = $4.3 \pm 0.8\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $3.3 \pm 1\%$; $p < 0.001$. CA3 PS a 10 min de OGD = $22.6 \pm 14\%$; $p < 0.001$; CA3 PS a los 90 min de RP = $3.2 \pm 0.3 \%$; $p < 0.001$; $n=8$). Al concluir la RP se realizaron curvas entrada-salida. En control, las respuestas crecen hasta llegar a su saturación. En las rebanadas tratadas con OGD no se obtuvo respuesta. Estos resultados se resumen en el panel C de la Figura 6 (MF fEPSP control = $0.97 \pm 0.1\%$, MF fEPSP OGD = $0.07 \pm 0.01\%$, CA3 PS control = $1 \pm 0.15\%$, CA3 PS OGD = $0.04 \pm 0.007\%$; $n=8$).

En la Figura 7 se muestran los resultados correspondientes para la región CA1 del hipocampo. Similar a lo observado en CA3, el OGD suprime irreversiblemente las respuestas electrofisiológicas (Sch fEPSP a 10 min de OGD = $3.1 \pm 0.8\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $3.13 \pm 0.3\%$; $p < 0.001$. CA1 PS a 10 min de OGD = $17.7 \pm 16.3\%$; $p < 0.001$; CA1 PS a los 90 min de RP = $3.2 \pm 0.3 \%$; $p < 0.001$; $n=8$). Las gráficas de barras del panel B muestran el porcentaje de la amplitud para cada respuesta a los 90 min de reperfusión.

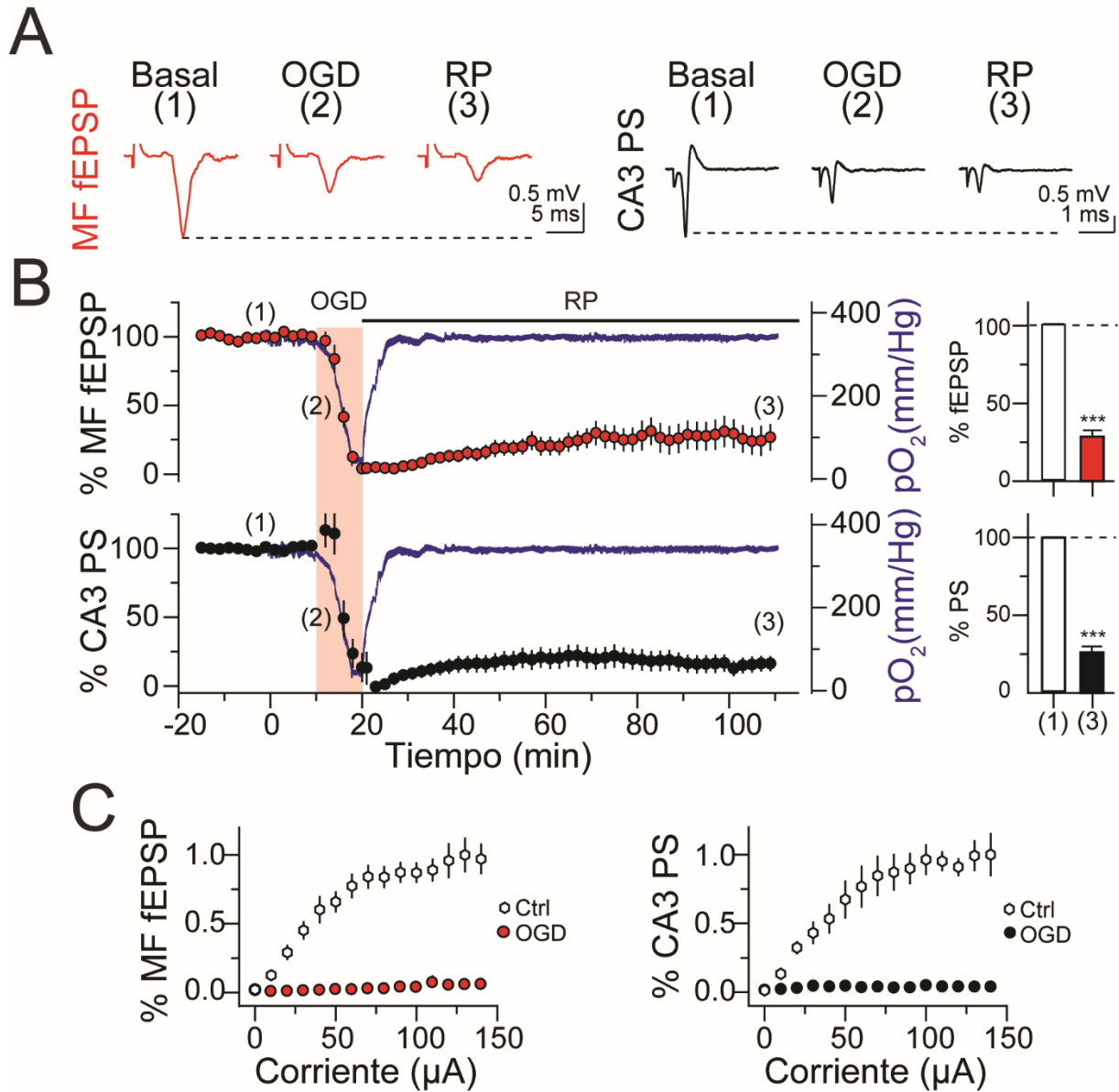


Figura 6. La privación de oxígeno y glucosa suprime la actividad electrofisiológica en la región CA3 del hipocampo.

A) MF fEPSP (rojo) y PS (negro) en control (1), 4 min de perfusión con OGD (2), 90 min de reperusión (3). B) Gráfica curso-temporal de MF fEPSPs (% pendiente \pm error estándar) y de la CA3 PS (% amplitud \pm error estándar). En azul se presenta la saturación de oxígeno a 150 μ M de profundidad. La perfusión de OGD se indica en color rojo. Las gráficas de barras resumen el porcentaje de bloqueo de las respuestas evocadas. C) Curva entrada salida de la respuesta MF-CA3 y CA3 PS ($n=8$) para cada grupo experimental. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

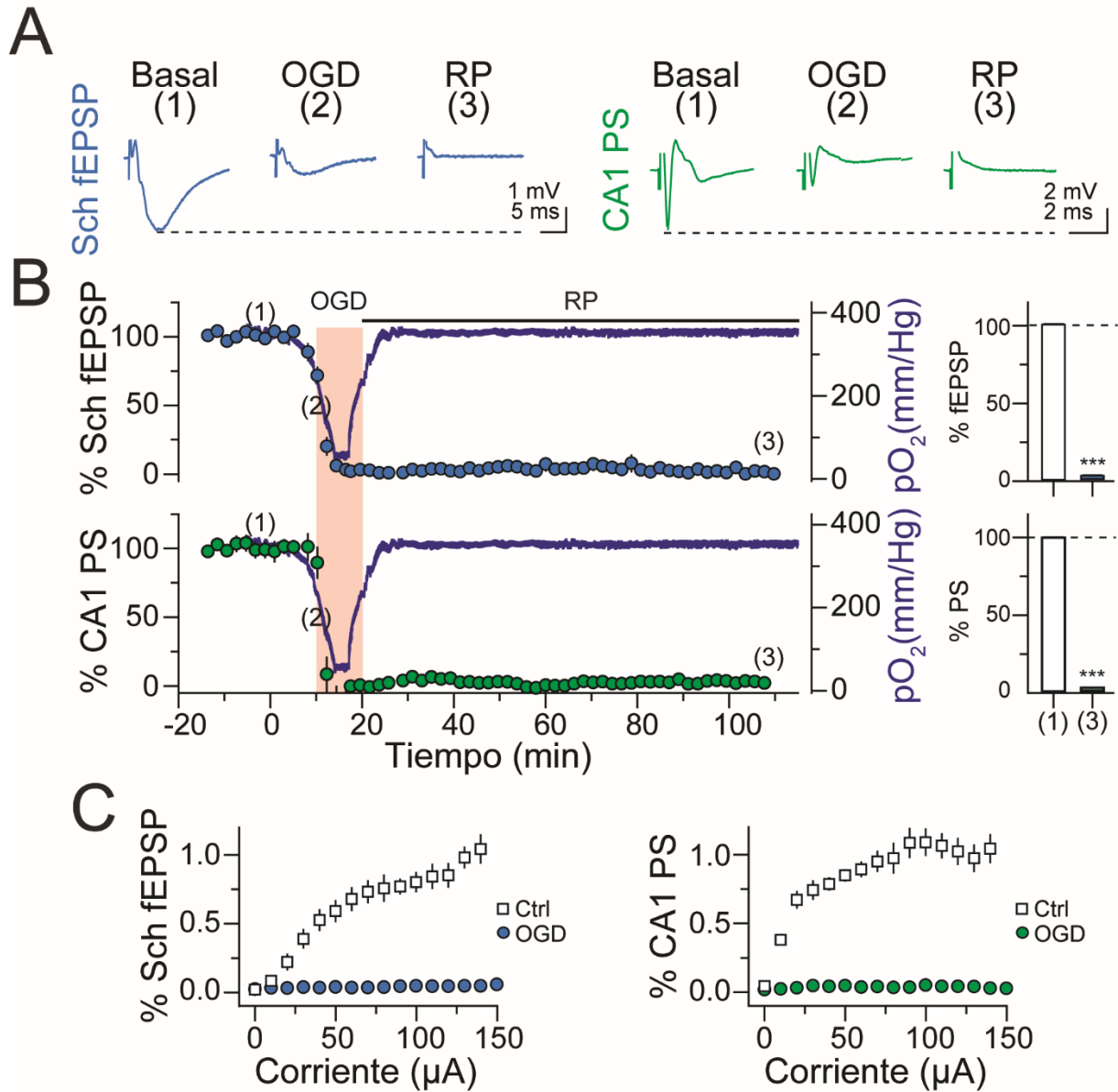


Figura 7. La privación de oxígeno y glucosa suprime la transmisión evocada en la región CA1 del hipocampo. A) CA1 fEPSPs (azul) y PS (verde) en las condiciones indicadas con los números. B) Gráfica curso temporal de CA1 EPSPs y CA1 PS; en azul, saturación de oxígeno a 150µM de profundidad. La perfusión de OGD se indica con la ventana de color gris y el periodo de reperusión con la barra negra. En la parte lateral derecha la gráfica de barras resume el porcentaje de cambio. C) Curva entrada salida de CA1 EPSPs y CA1 PS (n=8). Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

7.3 Neuroprotección mediada por la activación del TrkB durante la supresión de oxígeno y glucosa.

A continuación se evaluó si la activación del receptor TrkB tiene efecto neuroprotector ante el daño isquémico. Se preincubaron rebanadas con BDNF (15ng/ml) o con BDNF+ANA-12 (15ng/ml; 100 μ M, bloqueador del TrkB (Carzorla y cols., 2011; Otis, Fitzgerald y Mueller; 2014) por 45 min. La Figura 8 resume los resultados obtenidos. La preincubación con BDNF disminuyó el daño inducido por OGD en la región CA3 (MF fEPSP a 10 min de OGD = $34.8 \pm 11.5\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $42.7 \pm 1\%$; $p < 0.001$; CA3 PS a 10 min de OGD = $57.5 \pm 23.8\%$; $p < 0.001$; CA3 PS a los 90 min de RP = $61.3 \pm 1.3 \%$; $p < 0.001$; $n=8$). En cuatro de estos experimentos se perfundi6 DCG IV (5 μ M), y las respuestas se suprimieron, corroborando que el origen de las respuestas provenía de fibras musgosas (MF fEPSP DCGIV = $9.2 \pm 6.2\%$; $p < 0.001$; CA3 PS DCGIV = $52.6 \pm 11.3 \%$; $p < 0.001$; $n=4$). En cuatro rebanadas adicionales se realizó una curva entrada-salida que corroboraron la recuperación de las respuestas eléctricas (MF fEPSP control = $0.97 \pm 0.1\%$, MF fEPSP BDNF = $0.42 \pm 0.07\%$, CA3 PS control= $1 \pm 0.15\%$, CA3 PS BDNF= $0.67 \pm 0.1\%$; $n=8$).

Cuando las rebanadas se preincubaron con BDNF + ANA-12 (antagonista de los receptores TrkB), no observamos recuperación de las respuestas (MF fEPSP a 10 min de OGD = $1.8 \pm 5.1\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $2.4 \pm 0.6\%$; $p < 0.001$. CA3 PS a 10 min de OGD = $0.8 \pm 0.5\%$; $p < 0.001$; CA3 PS a los 90 min de RP = $4 \pm 3.6 \%$; $p < 0.001$; $n=8$). De igual manera, las curvas entrada-salida no desenmascararon respuestas deprimidas (MF fEPSP control = $0.97 \pm 0.1\%$, MF fEPSP BDNF+ANA-12 = $0.03 \pm 0.003\%$, CA3 PS control= $1 \pm 0.15\%$, CA3 PS BDNF+ANA-12 = $0.01 \pm 0.06\%$; $n=8$). Estos resultados nos indican que el BDNF ejerce un efecto protector en la región CA3 mediado por la activación del receptor TrkB.

Simultáneamente realizamos este protocolo en la región CA1, ya que se ha reportado que durante la isquemia esta región presenta una disminución de la síntesis y liberación de BDNF (Kokaia y cols., 1996). A diferencia de lo observado

en CA3, la preincubación con BDNF en CA1 no revirtió la supresión de las respuestas eléctricas por OGD (Sch fEPSP a 10 min de OGD = $17.7 \pm 16.3\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $1.7 \pm 0.3\%$; $p < 0.001$. CA1 PS a 10 min de OGD = $1.3 \pm 7.2\%$; $p < 0.001$; CA1 PS a los 90 min de RP = $5.2 \pm 0.9 \%$; $p < 0.001$; $n=8$). Por otra parte, las curvas entrada-salida no desenmascararon respuesta deprimidas (Sch fEPSP BDNF = $0.02 \pm 0.01\%$, CA1 PS BDNF= $0.03 \pm 0.004\%$; $n=8$). Estos resultados se resumen en la Figura 9. Los datos con BDNF en CA1 muestran la activación de este receptor no ejerce un efecto neuroprotector.

Si bien la activación del TrkB media un efecto neuroprotector ante la privación de oxígeno y glucosa; entonces el bloqueo del TrkB (ANA-12) reducirá el tiempo de pérdida de las respuestas evocadas en comparación a experimentos de la región CA3 y CA1. Nuestros resultados mostrados en la *Figura 10* indican que la región CA3 del hipocampo muestra un retraso en el tiempo que decae el 63.3% de la amplitud basal en ambas respuestas (fEPSP= 5.68 ± 0.07 , PS= 5.2 ± 0.11) en comparación a CA1 (fEPSP= 2.6 ± 0.07 PS= 3.6 ± 0.09) con una $p < 0.05$. El bloqueo del TrkB en la región CA3 del hipocampo reduce significativamente el tiempo que tarda en decaer la respuesta (fEPSP= 3.4 ± 0.06 , PS= 3.3 ± 0.08) y estos datos no difieren significativamente de los tiempos reportados para CA1; confirmando el efecto neuroprotector de la activación del TrkB durante la privación de oxígeno y glucosa.

En concordancia con nuestros datos experimentos realizados por el Dr. Ávila mostraron que la expresión basal del TrkB es mayor en la región CA3 en comparación a la región CA1, además de mostrar un incremento en la fosforilación de este receptor cuando las rebanadas fueron incubadas con una solución libre de oxígeno y glucosa durante 10 min en ambas regiones; este efecto es anulado cuando las rebanadas fueron incubadas en presencia del antagonista ANA-12.

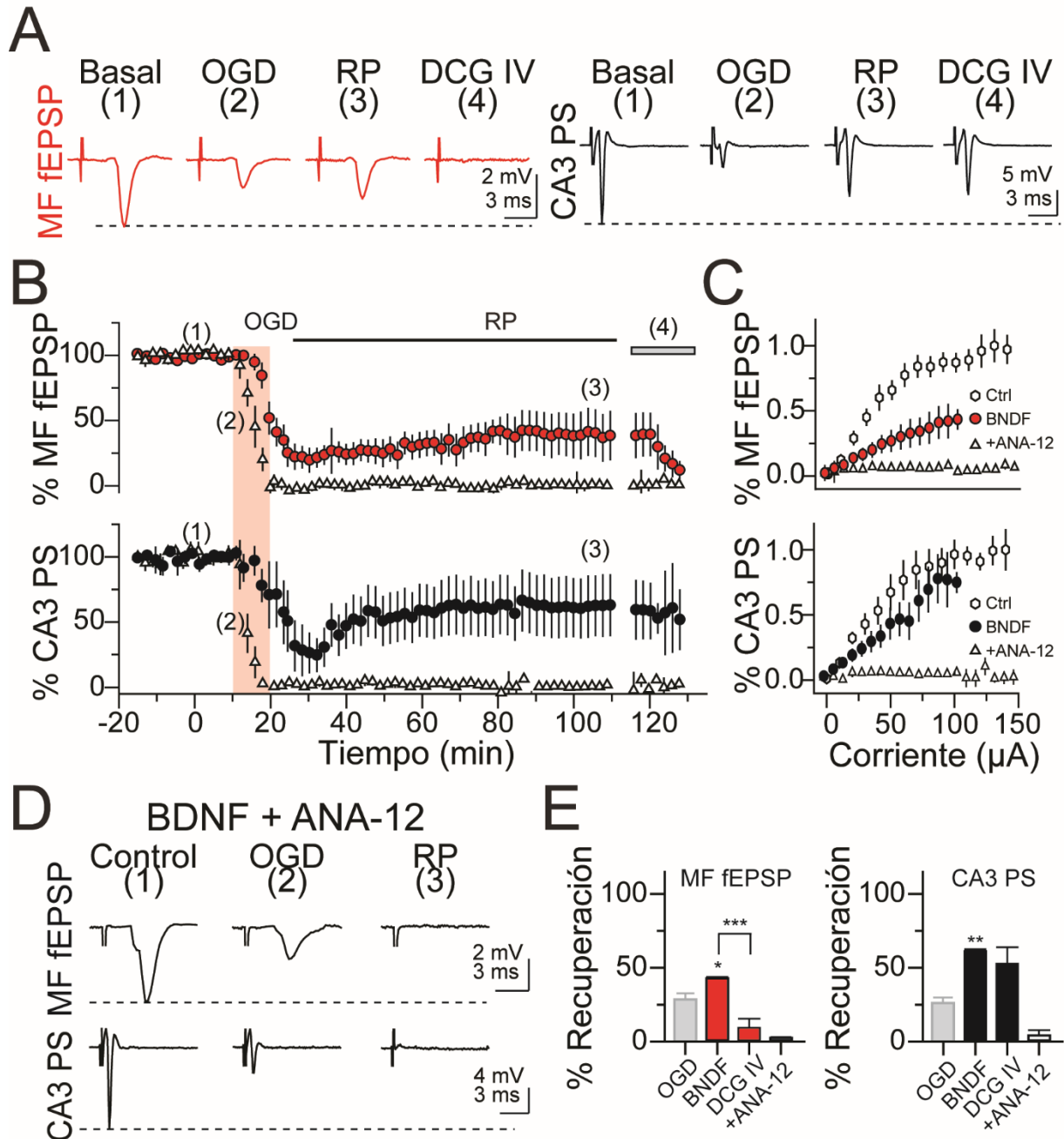


Figura 8. El BDNF revierte el daño inducido por la privación de oxígeno y glucosa en la región CA3 del hipocampo.

A) MF fEPSPs (rojo) y PS (negro) representativas en las condiciones indicadas. La rebanada fue pre-incubada con BDNF (15ng/ml, 45min). B) Gráfica curso-temporal promedio de MF fEPSPs y PS (% amplitud \pm error estándar) en las condiciones indicadas. El origen de las respuestas sinápticas fue corroborado aplicando DCG IV (5 μ M). C) Curvas I-O en las diferentes condiciones experimentales. D) Trazos representativos en presencia de BDNF+ANA-12. E) Resumen de resultados y recuperación tras la incubación con BDNF. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

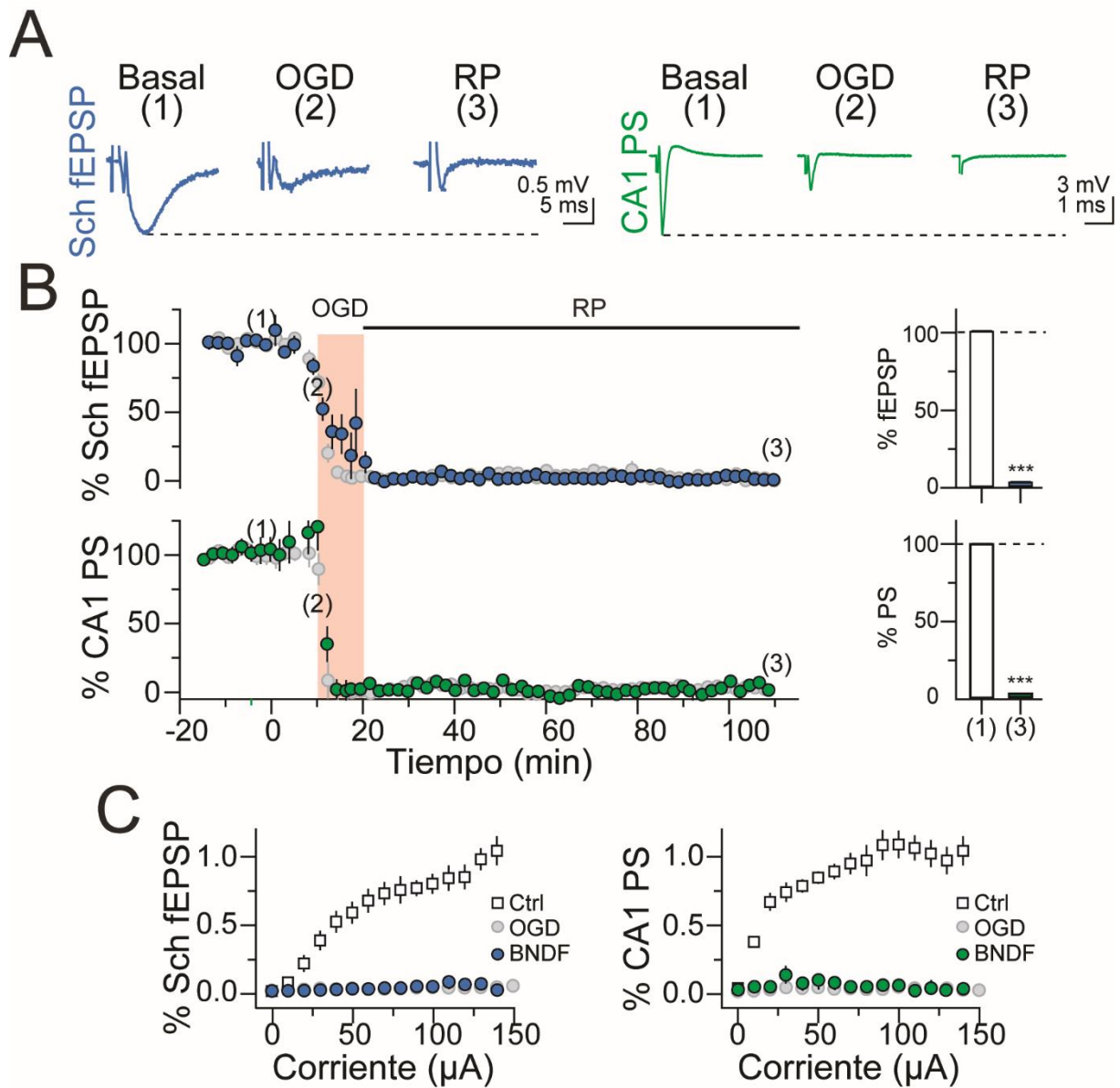


Figura 9. El BDNF no protege a la región CA1 del daño inducido por privación de oxígeno y glucosa.

A) Trazos representativos de CA1: fEPSPs (azul) y CA1 PS (verde) en las condiciones indicadas con los números. B) Gráfica curso-temporal de CA1 fEPSPs y CA1 PS (% amplitud \pm error estándar) en las condiciones indicadas. C) Curva entrada salida de CA1 fEPSPs y PS ($n=8$). Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

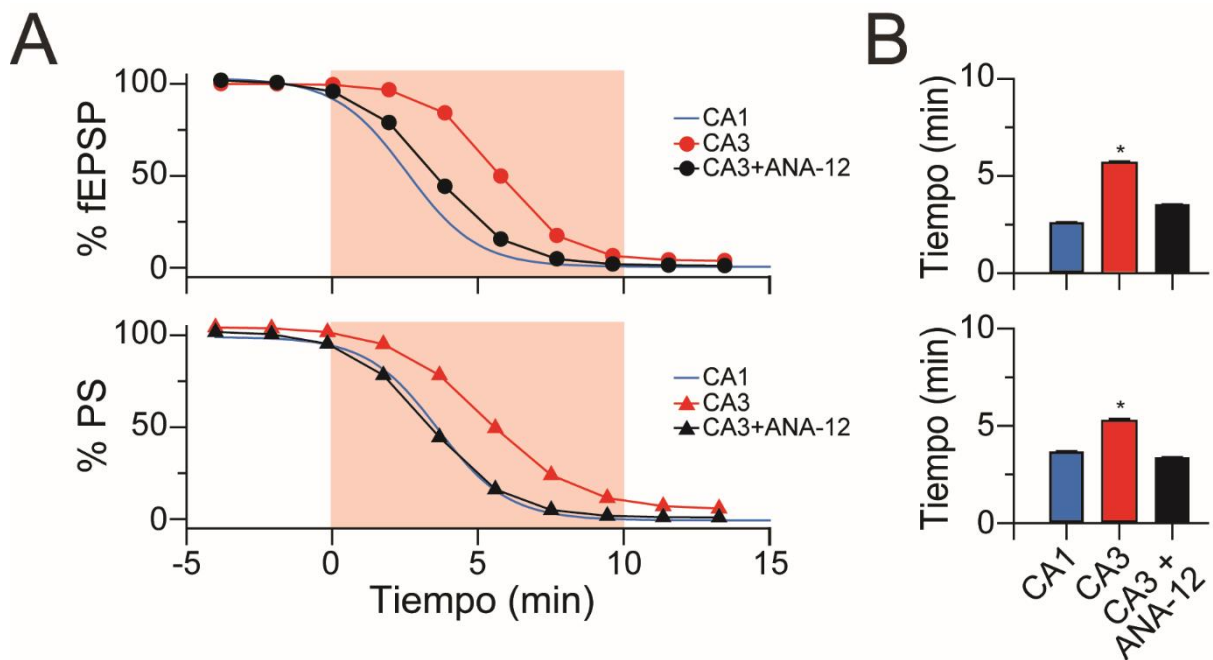


Figura 10. Efecto del bloqueo del TrkB durante la privación de oxígeno y glucosa en rebanadas frescas de hipocampo.

A y C) Curso temporal de las amplitudes normalizadas del fEPSP y la espiga poblacional (PS) respectivamente correspondiente a 5 min previos y seguidos de la privación de oxígeno y glucosa (10min). En azul se muestra la curva correspondiente a la región CA1, en rojo CA3 y en negro experimentos de la región CA3 en presencia de ANA-12. Cada curva fue ajustada con la ecuación de Boltzmann. Se muestra el promedio correspondiente a 8 experimentos en cada condición durante la privación de oxígeno y glucosa. B y D) Gráfica de barras indicando el tiempo al cual decae el 63.3% de la respuesta basal en cada una de las condiciones. Se utilizó como prueba estadística una ANOVA de una vía con análisis post-varianza de Newman-Keuls.* Indica un valor de $p < 0.05$.

A continuación se corroboró que el efecto observado por BDNF se replicaba en presencia de un agonista selectivo del receptor TrkB (Nakajima y cols., 2008). Las rebanadas fueron preincubadas con el agonista 7,8-dihidroxi flavona (7,8-DHF), un agonista sintético específico para activar al TrkB siguiendo el mismo protocolo de preincubación previamente descrito.

La Figura 11 resume los hallazgos. De manera similar a lo observado en las rebanadas preincubadas con BDNF, el 7,8-DHF revertió exitosamente la pérdida de las respuestas evocadas en CA3 (MF fEPSP a 10 min de OGD = $3.8 \pm 2.8\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $55.1 \pm 2.6\%$; $p < 0.001$. CA3 PS a 10 min de OGD = $1.9 \pm 1.2\%$; $p < 0.001$; CA3 PS a los 90 min de RP = $41.9 \pm 2.5\%$; $p < 0.001$; $n=8$). Las respuestas que experimentaron recuperación fueron sensibles a DCG IV, por lo

que se corroboró que su origen son las fibras musgosas (MF fEPSP DCGIV = $3.7 \pm 0.6\%$; CA3 PS DCGIV = $42.6 \pm 0.3\%$; $p < 0.001$; $n=4$). Las curvas entrada-salida nos permitieron determinar el porcentaje de recuperación de las respuestas evocadas en ambas vías (MF fEPSP 7,8-DHF = $0.61 \pm 0.2\%$, CA3 PS 7,8-DHF = $0.75 \pm 0.09\%$; $n=8$). Este efecto fue suprimido cuando las rebanadas fueron preincubadas con el antagonista ANA-12.

De manera opuesta a lo observado en CA3, nuestros experimentos mostraron que la preincubación con 7,8-DHF no revierte el daño que causa el OGD en la región CA1 del hipocampo a juzgar por la pérdida de ambas respuestas evocadas (Sch fEPSP 10 min de OGD = $2.2 \pm 0.6\%$, $p < 0.001$; Sch fEPSP 90 min de RP = $3 \pm 0.4\%$; CA1 PS 10 min de OGD = $3.4 \pm 2.2\%$, $p < 0.001$; CA1 PS 90min de RP = $3.3 \pm 0.3\%$, $p < 0.001$; $n=8$). De manera similar, las curvas entrada-salida no revelaron respuestas deprimidas (Sch fEPSP 7,8-DHF = $0.06 \pm 0.03\%$, CA1 PS 7,8-DHF = $0.01 \pm 0.003\%$; $n=8$) como se muestra en la Figura 12. Estos resultados indican que el BDNF ejerce neuroprotección únicamente en la región CA3 del hipocampo.

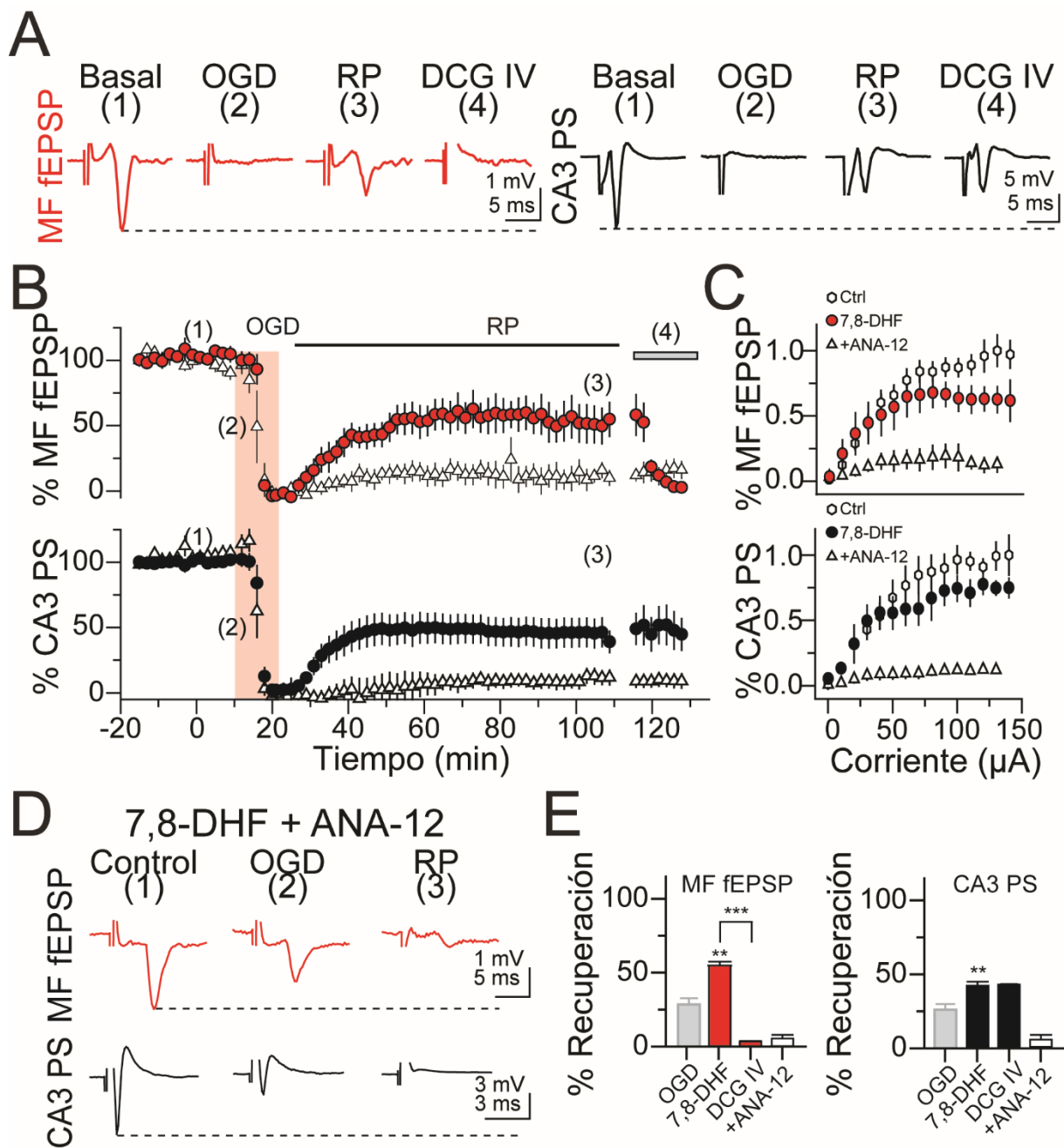


Figura 11. La activación del receptor TrkB con 7,8-DHF revierte el daño inducido por la privación de oxígeno y glucosa en la región CA3 del hipocampo.

A y D) Trazos representativos MF fEPSPs (rojo) y CA3 PS (negro) en las condiciones indicadas de rebanadas preincubadas con 7,8-DHF (25 μ M, 45min) o 7,8-DHF + ANA-12 respectivamente. B) Gráficas curso-temporal de MF fEPSPs y CA3 PS en las condiciones indicadas. C) Curva entrada salida en las condiciones indicadas. E) Resumen del porcentaje de recuperación (n=8) para cada grupo experimental. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) p < 0.05, (**) p < 0.001 y (***) p < 0.0001.

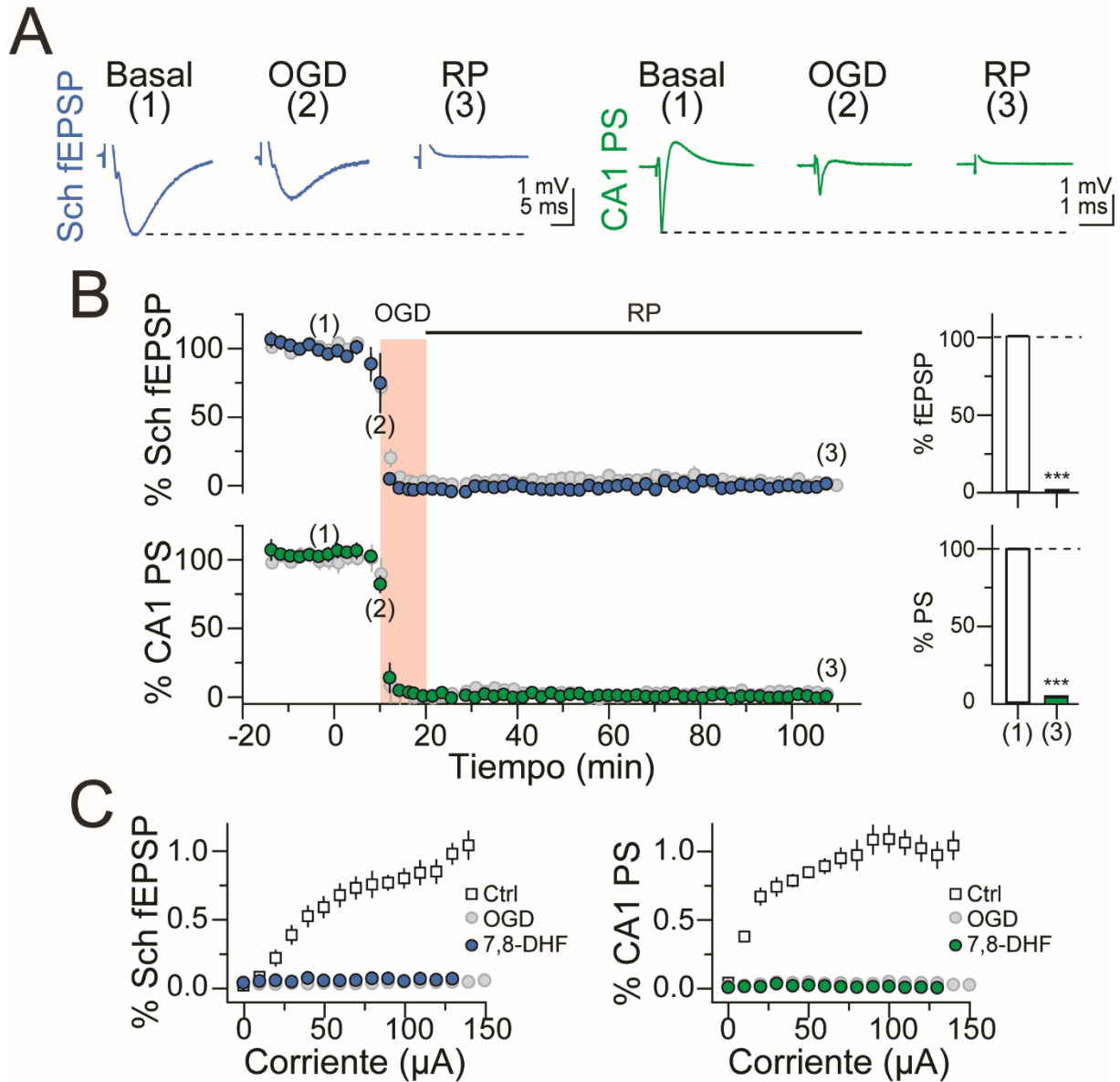


Figura 12. La activación del TrkB con el agonista 7,8-DHF no protege a la región CA1 del daño inducido por privación de oxígeno y glucosa.

A) Trazos representativos CA1 fEPSPs (azul) y CA1 PS (verde) de una rebanada preincubada con 7,8-DHF (25μM, 45min) en las condición indicadas. B) Gráficas curso-temporal de CA1 fEPSPs y CA1 PS (% amplitud ± error estándar) en las diferentes condiciones experimentales. C) Curvas entrada salida (n=8) para cada grupo experimental. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

7.4 Neuroprotección mediada por la activación del TrkB dependiente de la vía de señalización PI3K/AKT.

Los datos previos demuestran que el BDNF tiene efecto neuroprotector en la región CA3 del hipocampo. A continuación se investigaron las vías de señalización mediadas por la activación del TrkB.

Se exploraron tres vías de señalización que son activadas por el TrkB. El antagonista MK-2206 (10nM) para bloquear la vía de señalización PI-3-K/AKT; KN-93 (10 μ M) para bloquear la vía de señalización de CAMKII y finalmente UO126 (100nM) para bloquear la vía MAPK/ERK1/2. Las rebanadas se preincubaron por 45 min (BNDF + MK-2206; BNDF + KN-93 ó BNDF + UO126).

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos. El bloqueo de ERK 1/2 con UO-126 no interfirió con la recuperación que ejerce el BDNF (MF fEPSP a 10 min de OGD = $2.6 \pm 4.1\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $48.4 \pm 2.3\%$; $p < 0.001$. CA3 PS a 10 min de OGD = $3.1 \pm 14.3\%$; $p < 0.001$; CA3 PS a los 90 min de RP = $45.6 \pm 0.4 \%$; $p < 0.001$; $n=8$). De manera similar el bloqueo de CAMK con KN-93 indujo una pérdida transitoria de las respuestas durante la perfusión con OGD. Pero tras 90 min de reperusión se observó recuperación de las respuestas evocadas (MF fEPSP a 10 min de OGD = $8.2 \pm 3.4\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $42.9 \pm 0.8\%$; $p < 0.001$. CA3 PS a 10 min de OGD = $5.4 \pm 2.9\%$; $p < 0.001$; CA3 PS a los 90 min de RP = $52.3 \pm 0.3 \%$; $p < 0.001$; $n=8$).

En el último experimento se realizó el bloqueo de AKT. En esta condición hubo pérdida de las respuestas evocadas sin recuperación durante la reperusión (MF fEPSP a 10 min de OGD = $4.0 \pm 2.3\%$; $p < 0.001$; a los 90 min de RP = $3.2 \pm 1.4\%$; $p < 0.001$. CA3 PS a 10 min de OGD = $5.3 \pm 6.2\%$; $p < 0.001$; CA3 PS a los 90 min de RP = $3.1 \pm 0.7 \%$; $p < 0.001$; $n=8$). Las curvas entrada-salida no desenmascararon respuestas deprimidas (MF fEPSP = $0.07 \pm 0.01\%$; $p < 0.001$; CA3 PS = $0.06 \pm 0.001 \%$; $p < 0.001$; $n=4$).

Los datos experimentales indican que en CA3, las vías de señalización de MAPK y CAMKII no están involucradas en el efecto neuroprotector del TrkB. Los

datos también muestran que es la vía PI3K/AKT la cascada involucrada en la resistencia de la región CA3 al daño inducido por OGD.

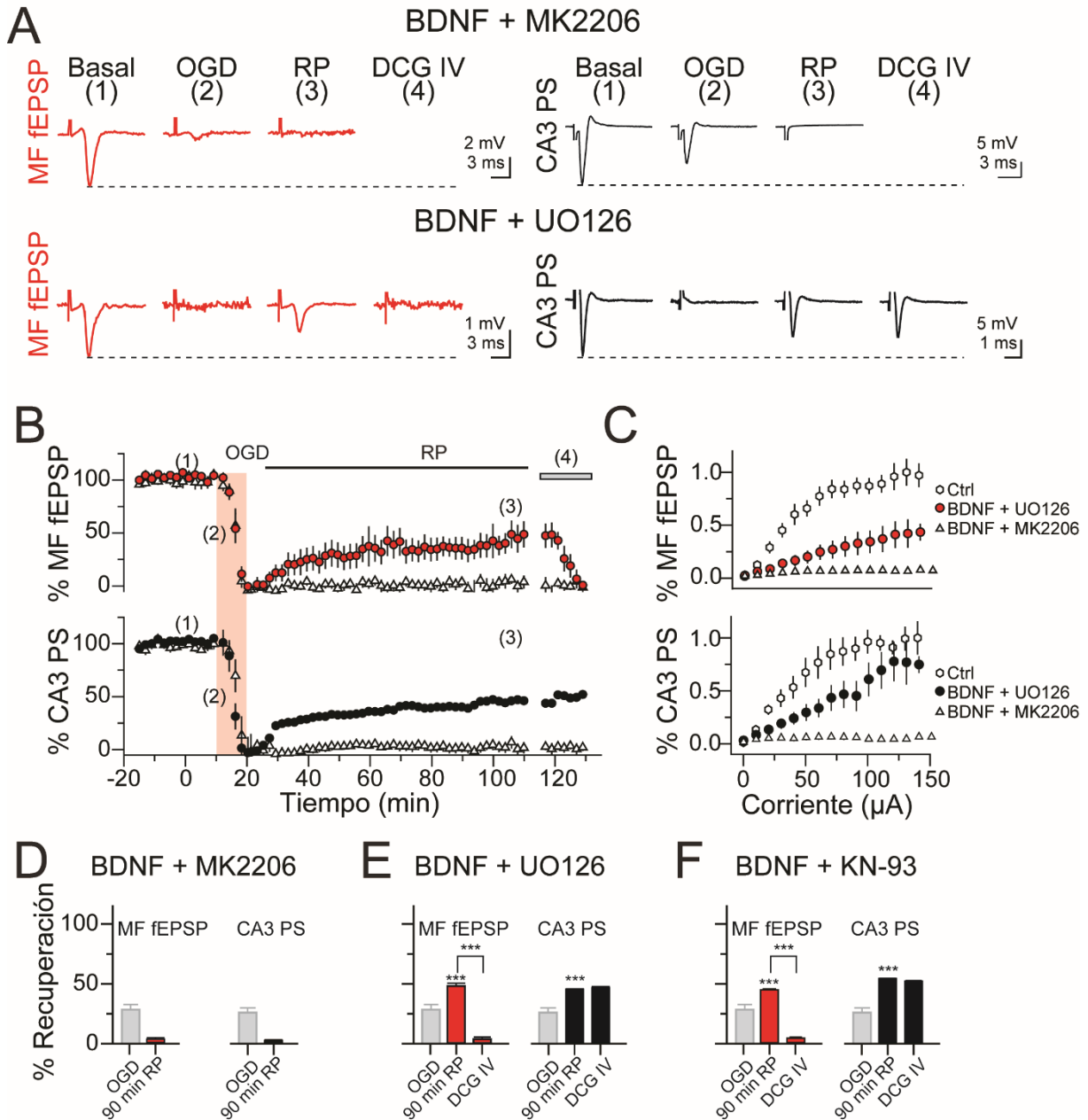


Figura 13. La neuroprotección de BDNF depende de la activación de la vía de señalización PI-3-K/AKT.

A) Trazos representativos de MF fEPSPs (rojo) y CA3 PS (negro) de una rebanada preincubada con BDNF + MK2206 (15 ng, 10nM, 45min) o BDNF + UO126 (15 ng, 100nM, 45min) en las diferentes condiciones experimentales indicadas con los números. B) Gráfica curso-temporal promedio de MF fEPSPs o CA3 PS (% amplitud \pm error estándar). C) Curvas entrada-salida de las diferentes respuestas evocadas. D-E) Resumen del porcentaje de recuperación en las diferentes condiciones experimentales ($n=8$) para cada grupo experimental. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

7.5 La privación de oxígeno y glucosa incrementa el número de células positivas a PI y Caspasa-3.

En los siguientes experimentos se evaluó el daño neuronal inducido por OGD y el efecto que tiene la activación del TrkB sobre la morfología celular.

En el presente trabajo, la tinción con PI se llevó a cabo con la finalidad de evaluar si alguno de nuestros tratamientos favorecía la viabilidad neuronal posterior al proceso isquémico. El PI es un fluoróforo que en condiciones normales no atraviesa la membrana celular, únicamente las células con alteraciones en la permeabilidad de membrana, permiten su paso al citoplasma. Dentro de las células, el PI se une a los ácidos nucleicos y emite un color rojo fluorescente (Noraberg, Kristensen y Zimmer, 1999; Hassen y cols., 2004). Este fluoróforo no es tóxico para las neuronas y por lo tanto, es utilizado como un indicador de la integridad y viabilidad neuronal (Abdel-Hamid y Tymianski, 1997; Laake, 1999; Stork y Li, 2006; Voytenko y cols., 2015).

Sin embargo el marcaje de PI no es específico para determinar si las neuronas mueren por apoptosis o necrosis. Por lo tanto el uso de enzimas específicas involucradas en la muerte celular programada, como la caspasa-3, enzima es determinante para inducir la cascada de señalización apoptótica. Finalmente para identificar si las células dañadas durante la privación de oxígeno y glucosa eran neuronas, se incluyó NeuN como como segundo marcaje. NeuN es una proteína soluble que se encuentra expresada en el soma de las neuronas maduras de la mayoría de los tipos neuronales

Se utilizaron cuatro rebanadas escogidas aleatoriamente correspondientes a cada tratamiento y se realizó una tinción con PI e inmunofluorescencia contra NeuN y Caspasa-3 para cuantificar el daño neuronal. Para el conteo celular por unidad de área se consideraron las subregiones *sp-sl* de la región CA3 y el *sp-sr* de la región CA1 del hipocampo de cada uno de los tratamientos realizados. En los paneles superiores de la Figura 14 y de la Figura 15 se muestran microfotografías representativas para cada marcaje. En la primera columna se muestra la señal para los núcleos y el marcador NeuN, seguido de la marca correspondiente a PI,

Caspasa-3 y el solapamiento de las se\u00f1ales mencionadas, en A1 para corresponde a rebanadas control, A2 para rebanadas privadas por 10 minutos de ox\u00edgeno y glucosa, A3 para rebanadas preincubadas con BDNF y A4 para rebanadas preincubadas con BDNF + ANA-12 para cada regi\u00f3n del hipocampo.

Los datos de CA3 se muestran en la Figura 14. En el panel C podemos observar el n\u00famero de c\u00e9lulas positivas a PI. En el control se observa ausencia de PI. Cuando las rebanadas fueron expuestas a OGD el n\u00famero de c\u00e9lulas positivas a PI aument\u00f3 y se redujo cuando la rebanada fue preincubada con BDNF. El efecto se revirti\u00f3 en presencia de ANA-12 (Control = $2.8 \pm 0.3\%$; OGD = $81.5 \pm 3.1\%$; BDNF = $32.4 \pm 2.6\%$; BDNF + ANA-12 $79.5 \pm 5.2\%$). Esto fen\u00f3meno fue similar para la expresi\u00f3n de caspasa-3 (Control = $0.2 \pm 0.1\%$; OGD = $53.2 \pm 4.1\%$; BDNF = $14.4 \pm 2.3\%$; BDNF + ANA-12 $46.5 \pm 4\%$).

Dado que nuestros registros se basan en la actividad neuronal, decidimos incluir marcaje neuronal (NeuN) para hacer una correlaci\u00f3n directa entre el n\u00famero de neuronas y los efectos observados en los registros electrofisiol\u00f3gicos. Los datos mostrados en los paneles E y F de la Figura 14 corresponden a datos normalizados con respecto al n\u00famero total de neuronas presentes en las rebanadas. De igual forma que en el conteo celular, se observa que la OGD increment\u00f3 el n\u00famero de neuronas positivas a PI. Cuando las rebanadas fueron preincubadas con BDNF se observan menos c\u00e9lulas positivas a PI y este efecto fue revertido con el antagonista ANA-12 (Control = $3.7 \pm 0.3\%$; OGD = $79 \pm 5.8\%$; BDNF = $43.7 \pm 7\%$; BDNF + ANA-12 $79.6 \pm 3.8\%$). Lo mismo ocurre para el marcaje de Caspasa-3 (Control = $0.5 \pm 0.2\%$; OGD = $50.4 \pm 3.4\%$; BDNF = $21.4 \pm 4.5\%$; BDNF + ANA-12 $48.8 \pm 3.7\%$).

Los resultados obtenidos para la regi\u00f3n CA1 se resumen en la Figura 15, en el panel B podemos observar que el n\u00famero de n\u00facleos en el an\u00e1lisis no se modific\u00f3 de acuerdo al tratamiento (OGD = $98 \pm 1.7\%$; BDNF = $97.5 \pm 3.6\%$; BDNF + ANA-12 $96.7 \pm 3.2\%$; se muestran los datos normalizados con respecto al control). Por su parte, los resultados del an\u00e1lisis en la regi\u00f3n CA1 muestran que la privaci\u00f3n de ox\u00edgeno y glucosa increment\u00f3 el n\u00famero de c\u00e9lulas positivas a PI. La preincubaci\u00f3n con BDNF y BDNF + ANA-12 no modific\u00f3 el n\u00famero de c\u00e9lulas positivas (Control = $5.9 \pm 1\%$; OGD = $89.6 \pm 2.3\%$; BDNF = $84.9 \pm 2.4\%$; BDNF + ANA-12 $87.7 \pm 1\%$).

Estos datos correlacionan con el incremento de células positivas a caspasa-3. Sin embargo, podemos observar que la preincubación con BDNF disminuye el número de células positivas a caspasa-3 (Control = $3.7 \pm 0.8\%$; OGD = $83.8 \pm 5.8\%$; BDNF = $58.2 \pm 2.1\%$; BDNF + ANA-12 $78.1 \pm 5.3\%$).

Cuando refinamos nuestro análisis y consideramos solo las neuronas presentes en las rebanadas se observó un comportamiento similar al del conteo celular. Los resultados muestran que la preincubación con BDNF no modificó el número de neuronas positivas a PI (Control = $7.9 \pm 1.1\%$; OGD = $91.6 \pm 1.1\%$; BDNF = $86.2 \pm 3.9\%$; BDNF + ANA-12 $87.8 \pm 1.7\%$). Por el contrario la preincubación con BDNF sí disminuyó el número de neuronas positivas a caspasa-3 (Control = $4.5 \pm 0.8\%$; OGD = $79.1 \pm 5.8\%$; BDNF = $55.9 \pm 3.6\%$; BDNF + ANA-12 $75.3 \pm 2.1\%$).

En concordancia con los registros electrofisiológicos las rebanadas expuestas a la privación de oxígeno y glucosa muestran un incremento en la cantidad de células positivas a PI y caspasa-3. La preincubación con BDNF no redujo el número de células positivas a PI; pero si redujo el número de células positivas a caspasa-3, sugiriendo un efecto anti-apoptótico y el bloqueo del TrkB con ANA-12 restablece el número de células y neuronas positivas a caspasa-3.

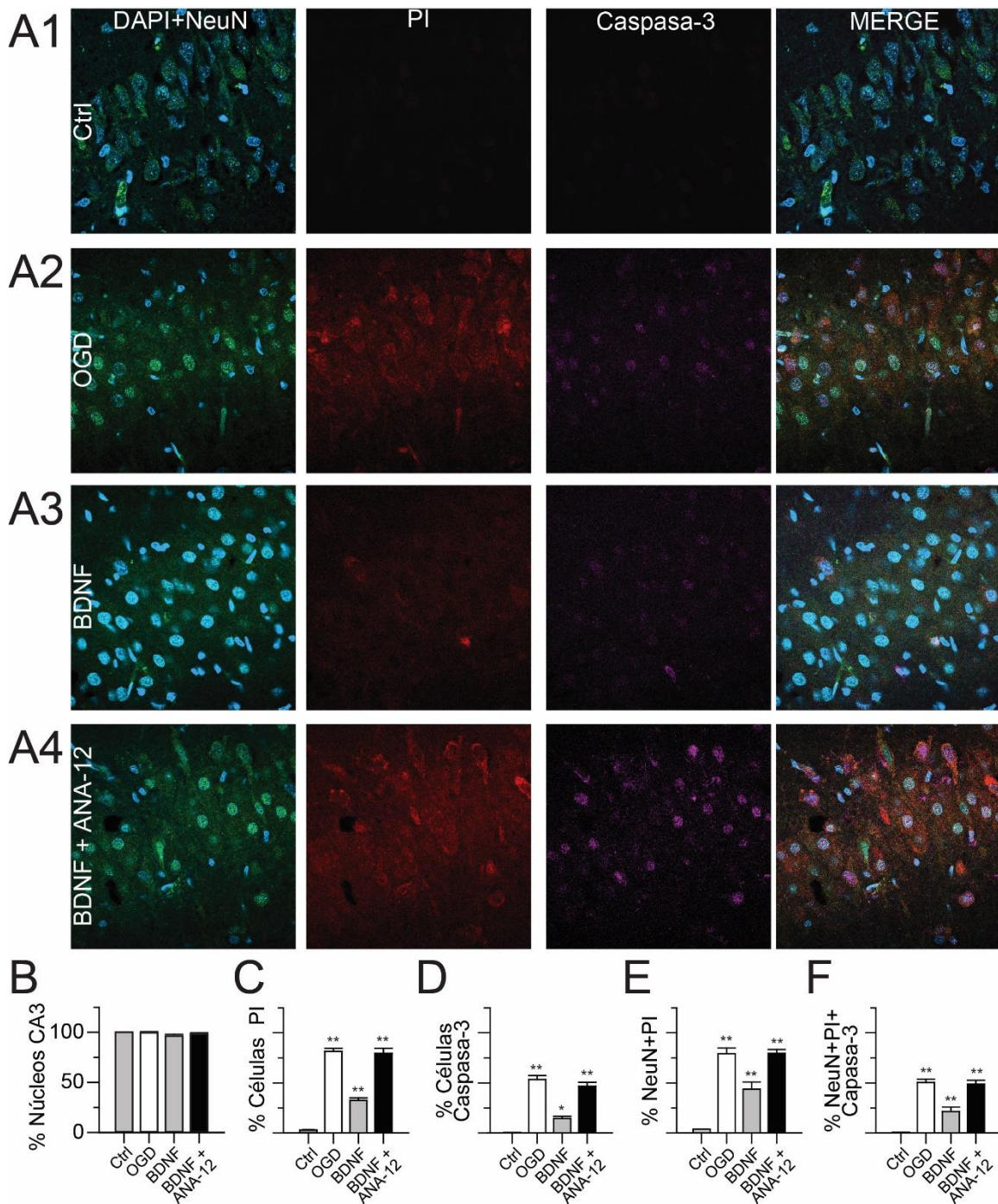


Figura 14. El BDNF disminuye el número de células positivas a PI y Caspasa-3 en la región CA3 del hipocampo. A1-A4) Microfotografías correspondientes a la marca neuronal NeuN, PI y Caspasa-3 en las diferentes condiciones experimentales. B) Gráfica de barras mostrando que el número de núcleos no cambia de acuerdo al tratamiento farmacológico. C-E) Gráfica de barras del número de células y neuronas positivas a PI respectivamente. D-F) Gráfica de barras del número de células y neuronas positivas a Caspasa-3 respectivamente. Escala=20 μ m. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

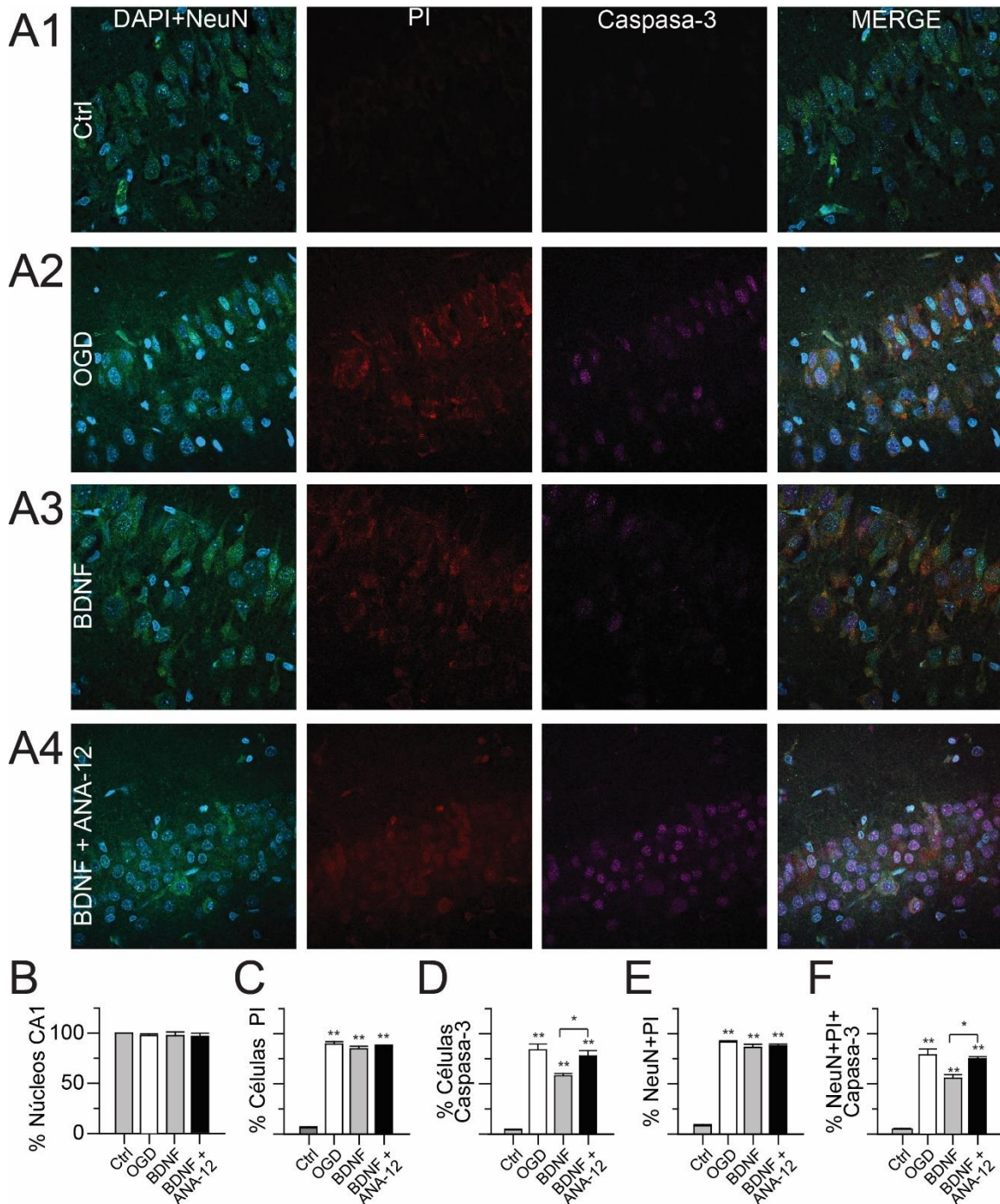


Figura 15. El BDNF no disminuye el número de células positivas a Caspasa-3 en la región CA1 del hipocampo. A) Microfotografías correspondientes a la marca neuronal (NeuN), PI como indicador de viabilidad celular, Caspasa-3 como marcador apoptótico y el sobrelapamiento en condición control (A1), rebanadas con 10 min de OGD (A2), preincubadas con BDNF (A3) y con BDNF + ANA-12 (A4). B Gráfica de barras donde se muestra que el número de núcleos no cambia de acuerdo al tratamiento. C y E) Gráfica de barras del número de células y neuronas positivas a PI respectivamente. D y F) Gráfica de barras del número de células y neuronas positivas a Caspasa-3 respectivamente. Escala=20 μ m. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

8. Discusión

Este trabajo muestra que el mecanismo de protección endógeno de la región CA3 ante la OGD-RP en rebanadas frescas de hipocampo está mediado por la activación del receptor TrkB y la subsecuente activación de la vía de señalización PI3K/AKT. Nuestros datos experimentales demuestran que la activación del TrkB por su ligando endógeno (BDNF) o específico (7,8-DHF) induce la activación de la vía de señalización PI3K/AKT y ésta es capaz de eliminar la supresión de la actividad eléctrica, contribuye a la preservación de la integridad membranal y reduce la expresión de caspasa-3 como indicador de muerte apóptotica. Además, se observó que estos efectos son específicos y dependen de la activación del TrkB, ya que cuando los experimentos se realizan en presencia del antagonista (ANA-12) el efecto neuroprotector es anulado. Por su parte el bloqueo de AKT en presencia de BDNF previene el efecto neuroprotector, haciendo así específica esta vía de señalización para los efectos observados. Nuestros datos concuerdan con estudios previos, donde se hizo evidente el efecto neuroprotector del BDNF en situaciones isquémicas (Beck y cols., 1994; Kokaia y cols., 1996; Schäbitz y cols., 2000; Neumann y cols., 2014).

De manera interesante se observó que estos efectos protectores son evidentes cuando realizamos la aplicación exógena de BDNF durante la OGD-RP. Muchos trabajos previos han mostrado que la región CA3 es altamente resistente al daño isquémico (Cherubini, Ben-Ari y Krnjevic, 1989; Gee y cols., 2006; Dennis y cols., 2011). Adicionalmente se sabe que la región CA3 presenta una gran expresión de BDNF y su receptor TrkB (Beck y cols., 1994; Kokaia y cols., 1996; Spencer-Segal y cols., 2011); entonces porque exhibe una supresión de la actividad eléctrica. En este sentido se ha reportado que durante la preparación de rebanadas hay cambios en la distribución iónica, una reducción en la expresión y composición de receptores AMPA, liberación de algunos metabolitos, neurotransmisores y factores de crecimiento, tales como el BDNF. Estos factores se ha propuesto como los responsables de las alteraciones de la integridad de la rebanada, fallando en replicar las condiciones intactas de las neuronas (Taubenfeld y cols., 2002). Por lo que

proponemos que la aplicación exógena de BDNF podría compensar la pérdida de este factor neurotrófico durante la preparación de las rebanadas y por ello tener un efecto mayor en las rebanadas perincubadas con BDNF.

8.1 Efecto de la privación de oxígeno y glucosa

La supresión transitoria de oxígeno y glucosa suprime las respuestas eléctricas evocadas en la región CA1 y una pérdida parcial en la región CA3 del hipocampo, corroborando la susceptibilidad diferencial previamente reportada. La pérdida de la actividad eléctrica coincide con la caída en la saturación de oxígeno en ambos casos. En este sentido Dennis y colaboradores (2011) mostraron que el OGD únicamente causa una depresión parcial de las respuestas eléctricas de CA3, sin embargo bajo nuestras condiciones experimentales encontramos un porcentaje menor de recuperación. Además sus experimentos muestran que los efectos dependen del tiempo de perfusión con OGD. Las diferencias reportadas por estos autores y nuestro trabajo podrían deberse a diferencias en las condiciones experimentales, incluida la edad de los animales y la cepa. Mientras nosotros ocupamos ratas Sprague Dawley de 30 días de edad, los experimentos Dennis y colaboradores se hicieron en ratas Wistar, con edades entre 12-16 días. En este sentido se ha reportado que las ratas de la cepa SD son más resistentes al daño isquémico que las ratas Wistar y por ello los modelos animales *in vivo* ocupan ratas de la cepa Wistar (para incrementar la tasa de éxito). Aunado a esto también se ha reportado que la susceptibilidad al daño isquémico aumenta con la edad de los animales (Nabetani y cols., 1995; Bae y cols., 2015).

La diferencia en las respuestas obtenidas también pueden deberse a la velocidad de perfusión con la que se baña a la rebanada de cerebro. En el trabajo ya citado, se aplicó una velocidad de 8-10ml/min para asegurar el intercambio gaseoso y eliminar el oxígeno durante los registros, mientras que nuestros registros se realizan con la mitad de velocidad (4ml/min). En nuestro caso, el gaseo de la solución con la mezcla de N₂/CO₂ (solución de OGD) fue constante por lo menos 1 hora antes de la realización de los experimentos. Por otra parte, pudimos corroborar

los cambios en la saturación de oxígeno y que esta coincidió con la pérdida de las respuestas evocadas. Estos resultados validan nuestras observaciones, ya que podemos garantizar que la saturación de oxígeno disminuye y regresa a niveles basales, fenómeno que ha sido reportado previamente y que ha sido utilizado como indicativo de este fenómeno a nivel de flujo cerebral (McBean y cols., 1995; Yonekura y cols., 2004,2006).

Por otra parte, durante los primeros minutos de isquemia se genera una despolarización sostenida (Gao, Howard y Xu, 1998; Müller y Somjen, 1998; Dzhala y cols., 2001). Nuestros datos mostraron que en los primeros minutos de perfusión con OGD hay fluctuaciones en la amplitud de nuestras respuestas con tendencia al incremento y que este efecto es más visible en las espigas poblacionales (Ver Figura 6).

La aparición de los efectos deletéreos del OGD aparece más pronto en modelos *in vitro* que en los modelos *in vivo*, probablemente esto es debido a que las condiciones del modelo son estresantes para las células y se pueden activar otras vías de señalización diferentes a las que son activadas *in vivo* (Horn y cols., 2005).

8.2 Efecto diferencial de la supresión de oxígeno y glucosa

Como se pudo observar en los cursos temporales, la región CA3 presenta una recuperación parcial de las respuestas, sin observar recuperación en la región CA1. Además nuestro análisis de la caída temporal de las respuestas evocadas reveló que las respuestas de la región CA1 desaparecen más rápido en comparación con CA3 durante la perfusión con OGD. Estos resultados en conjunto corroboran que la región CA1 es más vulnerable ante la privación de oxígeno y glucosa que la región CA3 (Laake, 1999; Noraberg y cols., 2005; Dennis y cols., 2011). Por ejemplo, se ha reportado que los primeros indicios de daño se presentan en la región CA1 seguido de la neocorteza, la región CA3 y finalmente el DG (Kokaia y cols., 1996). Nuestros datos coinciden con que las respuestas son perdidas más rápido en la región CA1 que en la región CA3.

Uno de los principales mecanismos propuestos que confiere mayor resistencia ante el daño isquémico es la baja expresión de receptores de tipo NMDA en la región CA3 hipocampal (Laake, 1999; Cyr y cols., 2001). Durante mucho tiempo se ha propuesto que los efectos del daño isquémico se deben a la sobreactivación de los receptores de tipo NMDA (Gee y cols., 2006); sin embargo, la terapia farmacológica utilizando como blanco a este receptor no ha sido efectiva sugiriendo la participación de otros perpetradores de daño durante la isquemia. Aunado a este fenómeno, también se ha reportado que el bloqueo de los receptores ionotrópicos de glutamato AMPA y kainato disminuye los efectos reportados en la región CA3. Además, diversos estudios han encontrado que en esta región se incrementa la síntesis de genes de expresión temprana, síntesis y liberación de factores tróficos, síntesis de proteínas de choque térmico, y síntesis de Bcl-2 (anti-apóptica) en respuesta a la isquemia (Lipton, 1999).

8.3 Efecto neuroprotector del BDNF en la región CA3

La preincubación con BDNF (15mg/ml; 45 min) no modificó la cinética de los registros electrofisiológicos; esto hallazgo concuerda con trabajos previos que demostraron que la preincubación con BDNF no modifica la transmisión sináptica basal (Schildt y cols., 2013). En nuestros registros (preincubados con BDNF) pudimos observar que la OGD-RP solo causa una supresión temporal de las respuestas evocadas. Además, reduce el número de células positivas a PI y caspasa-3. Estos datos demuestran que el BDNF ejerce un efecto protector. En CA3, el BDNF juega un papel importante en procesos de plasticidad sináptica y neuroprotección ante diversos daños y su disminución está asociada con procesos neurodegenerativos (Almeida y cols., 2005; Nakajima y cols., 2008; Lu y cols., 2013).

Por otra parte, el BDNF no solo puede activar al TrkB sino que puede activar al receptor p75 con menor afinidad. En este sentido, se ha reportado que cuando ambos receptores se expresan de manera simultánea, la afinidad del BDNF incrementa (Murer, Yan y Raisman-Vozari, 2001). Para confirmar que los efectos

observados se debieron a la activación del TrkB y no del p75, utilizamos el antagonista selectivo de los TrkB, ANA-12; además, la estimulación del TrkB también se realizó con su agonista selectivo el 7,8-DHF (Liu y cols., 2010; Marongiu, Imbrosci y Mittmann, 2013; Uluc y cols., 2013; Han y cols., 2014; Tian y cols., 2015). En ambos casos, los resultados son consistentes, ya que la activación del TrkB con 7,8-DHF revierte el daño causado por el OGD y la inclusión de ANA-12, suprime sus efectos protectores, siendo más evidente el efecto protector de la activación del TrkB en las rebanadas que no fueron preincubadas con BDNF o 7,8-DHF.

Además se ha demostrado que el BDNF a pesar de modular la transmisión GABAérgica y glutamatérgica, no modifica la amplitud y frecuencia de la cinética de las corrientes mediadas por los receptores AMPA y NMDA (Marongiu, Imbrosci y Mittmann, 2013). Estudios previos confirman nuestro hallazgo evidenciando que la neuroprotección es mediada por la activación del receptor TrkB.

En concordancia con nuestros resultados, el 7,8-DHF es capaz de prevenir el proceso de apoptosis inducido por la privación de oxígeno y glucosa (37°C, 3 horas) en cultivos organotípicos y su efecto depende de la concentración (Liu y cols., 2010). Finalmente, se ha reportado que esta molécula es capaz de disminuir el daño neuronal; inducir activación de células gliales, reducir el daño neuronal y favorecer la recuperación del aprendizaje y memoria de largo plazo en un modelo de hipoxia-Isquemia neonatal (Uluc y cols., 2013). Adicionalmente se ha demostrado que el tratamiento previo (2h, 5 mg/kg) a la oclusión de la arteria cerebral media reduce el volumen del infarto y además la muerte celular por apoptosis después de 48 horas de reperusión (Liu y cols., 2010).

Los efectos neurotróficos del BDNF son dependientes de la activación del receptor completo, sin embargo también existen formas truncadas que actúan como moduladores negativos de la señalización del receptor completo. La disminución del radio de la forma completa/truncada de este receptor están asociadas con fallas en la memoria espacial y el aumento de este radio con la mejora de la memoria espacial (Jerónimo-Santos y cols., 2014). Las calpaínas están involucradas en la ruptura de la forma completa a truncada de este receptor, el sitio de corte se encuentra cerca del sitio de unión a Shc. Se ha reportado que en condiciones patológicas hay una

sobreactivación de estas calpaínas como en la isquemia o excitotoxicidad favoreciendo la forma truncada y los posibles efectos degenerativos en la memoria (Gomes y cols., 2012; Vidaurre y cols., 2012).

Adicionalmente se sabe que la fosforilación del TrkB puede ocurrir en ausencia de su ligando (BDNF) en neuronas hipocampales. Este mecanismo depende de los receptores de adenosina A2 y adenosina, estos involucran la activación de la vía de señalización PI3K/AKT. Se ha reportado que estos receptores están altamente expresados en las fibras musgosas y que de manera fisiológica contribuyen con un tono inhibitor sobre la transmisión glutamatérgica (Moore, Nicoll y Schmitz, 2003). Debido a esto, nosotros no podemos descartar la posible activación del receptor TrkB por adenosina; ya que durante el periodo de OGD se genera una despolarización sostenida que favorece la liberación de neurotransmisor y otros moduladores tales como la adenosina.

8.4 Neuroprotección endógena del BDNF en la región CA3

El bloqueo de TrkB con ANA-12 mostró una aceleración en la pérdida de las respuestas evocadas sin recuperación alguna en rebandas tratadas por 10 min con OGD. Estos resultados implican que bajo nuestras condiciones experimentales, hay liberación de BDNF y activación de TrkB; fenómenos que favorecen la resistencia ante el daño isquémico.

En este sentido, se ha reportado que en condiciones basales la liberación de BDNF es mayor en el DG seguido de la región CA3 y por último, la región CA1, que presenta los niveles más bajos de este factor en el hipocampo (Kokaia y cols., 1996). Aunado a esto se sabe que para que el BDNF sea liberado de las neuronas, éstas deben ser activadas por una despolarización sostenida y sólo en sinapsis activas (Nagappan y Lu, 2005) o bien mediante el bloqueo farmacológico de los receptores GABA_A (Matsumoto y cols., 2008). Aunado a esto, se ha reportado que durante el proceso isquémico se genera una despolarización sostenida que precede a la muerte celular y esta se ha observado tanto en modelos *in vivo* e *in vitro*. En un modelo de isquemia global se encontró que a las 24 horas post-reperfusión (Kokaia

y cols., 1996), isquemia transitoria (Beck y cols., 1994) y activación de receptores glutamatérgicos (Lauterborn y cols., 2000; Matsumoto y cols., 2008), hay un incremento en el mRNA para BDNF en la región CA3 y una disminución de los niveles en la región CA1. Finalmente se ha demostrado en líneas celulares murinas T48 y T62 transfectados con el receptor TrkB que la sola sobreexpresión del receptor es capaz de reducir la muerte por apoptosis en ausencia del BDNF, mediante la reducción de la activación de caspasas (Jang y cols., 2009).

8.5 Vías de señalización relacionadas con la activación de TrkB

Con los experimentos previos demostramos que el efecto protector de BDNF estaba ligado a la activación del receptor TrkB. Los siguientes experimentos revelaron la vía de señalización a través de la cual el TrkB ejerce sus efectos neuroprotectores. Los resultados mostraron que ni CaMKII ni ERK1/2 juegan un papel importante en la neuroprotección. A diferencia de estos, la vía PI3K/AKT resultó crítica para revertir el daño causado por OGD.

La vía de señalización de ERK juega un papel importante en cambios asociados a la actividad en la fuerza de la transmisión sináptica en el hipocampo. Múltiples estudios muestran que la alteración de la función normal de ERK causa deficiencias en procesos de plasticidad en la región CA1 del hipocampo (Kanterewicz y cols., 2000). Estudios conductuales resaltan la importancia de esta vía de señalización en procesos de aprendizaje y memoria. Se sabe que la forma fosforilada de ERK se transloca al núcleo y regula la expresión de genes en respuesta a la actividad sináptica mediante la fosforilación directa o indirecta de factores de transcripción, incluso de proteínas localizadas tanto en axones como dendritas (Almeida y cols., 2005). A pesar de que la vía de señalización de ERK está asociada con neuroprotección, hay estudios crecientes donde se comprueba que la activación de ERK o PI3K depende del tipo de daño celular (Hetman y cols., 1999). Aunado a este efecto hay evidencia controversial que muestra que la activación de ERK está asociada con neurodegeneración en el traumatismo cerebral, isquemia y Alzheimer (Chu y cols., 2004).

8.6 Implicaciones de la activación de la vía PI3K/AKT

Existe evidencia creciente de que la muerte celular durante la isquemia es debida a una pérdida del balance de las vías de señalización involucradas en procesos anti-apoptóticos neuronales tales como la vía de señalización de PI3K/AKT (Horn y cols., 2005).

En concordancia con nuestros datos obtenidos experimentalmente, Horn y cols., 2005 utilizando cultivos organotípicos hipocámpales tratados con OGD durante 1 hora, observan los efectos deletéreos en DG y CA1. Sus resultados muestran que con el bloqueador de AKT se observa un incremento en la muerte celular y en la cantidad de células positivas a PI, y que este efecto es dependiente del tiempo y concentración del bloqueador en ambas regiones. Indicando que esta vía de señalización es necesaria para la supervivencia, sin embargo las células del DG tienen un adelanto en la muerte celular, demostrando que esta vía es importante para la supervivencia en el DG; pero con menor efecto en la región CA1 indicando que existen otras vías relevantes para la supervivencia en esta región. Sin embargo estos datos no se correlacionan con un incremento en la fosforilación de AKT (Ser-473) en ambas regiones posterior a la OGD-RP. Además demuestran que esta vía de señalización no es inhibida durante el OGD en el DG, los efectos diferenciales del OGD pueden deberse a cambios en la expresión de receptores, canales iónicos, o proteínas reguladoras de la apoptosis post-isquemia (Horn y cols., 2005).

Si bien es cierto que esta vía de señalización es importante para la supervivencia, puesto que la mayoría de sus efectos es a través de la inhibición de proteínas apoptóticas, estabilización de mediadores ante la hipoxia (HIF 1), incremento en la secreción de factores tróficos (BDNF, VEGF, entre otros), aumento en procesos de degradación. Esta vía también está asociada a procesos de crecimiento tumoral, que involucra cambios en la permeabilidad capilar, generación de nuevos vasos sanguíneos aberrantes, crecimiento celular desmedido, entre otros.

8.7 Mecanismo intrínseco de resistencia al daño isquémico en la región CA3

La Figura 16 se resume el mecanismo de protección endógena ejercido por BDNF. Durante OGD se genera una despolarización sostenida en las células piramidales (CA3 PC), con ello incrementa la actividad sináptica espontánea que es seguida de ráfagas de potenciales de acción como se ha demostrado en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio (Anexos, Figura 18) y en otros trabajos. El incremento en el disparo neuronal provoca la liberación de glutamato y BDNF. La liberación de BDNF puede ser de botones musgosos, extensiones filipodiales (Danzer y McNamara, 2004), árboles dendríticos de las células piramidales (Kuczewski y cols., 2008), incluso astrocitos (Alderson y cols., 2000; Condorelli y cols., 2002; Danzer y McNamara, 2004).

En respuesta a la despolarización, las interneuronas de disparo rápido (FS In) activadas por el glutamato liberado de las CA3 PC liberan GABA al medio extracelular, disminuyendo la excitabilidad neuronal (Freund, 2007). Por otra parte el BDNF liberado activa a su receptor ubicado en la superficie de las células piramidales, activando la vía de señalización PI3K/AKT y la posible activación de mTOR para promover la supervivencia celular al inhibir enzimas involucradas en el proceso apoptótico y preservando la integridad membranal reduciendo la entrada de PI al interior celular. Al mismo tiempo la activación del TrkB induce la activación de CaMKII y la regulación a la baja de MAPK-ERK1/2, involucradas en procesos de plasticidad sináptica (Salin y cols., 1996).

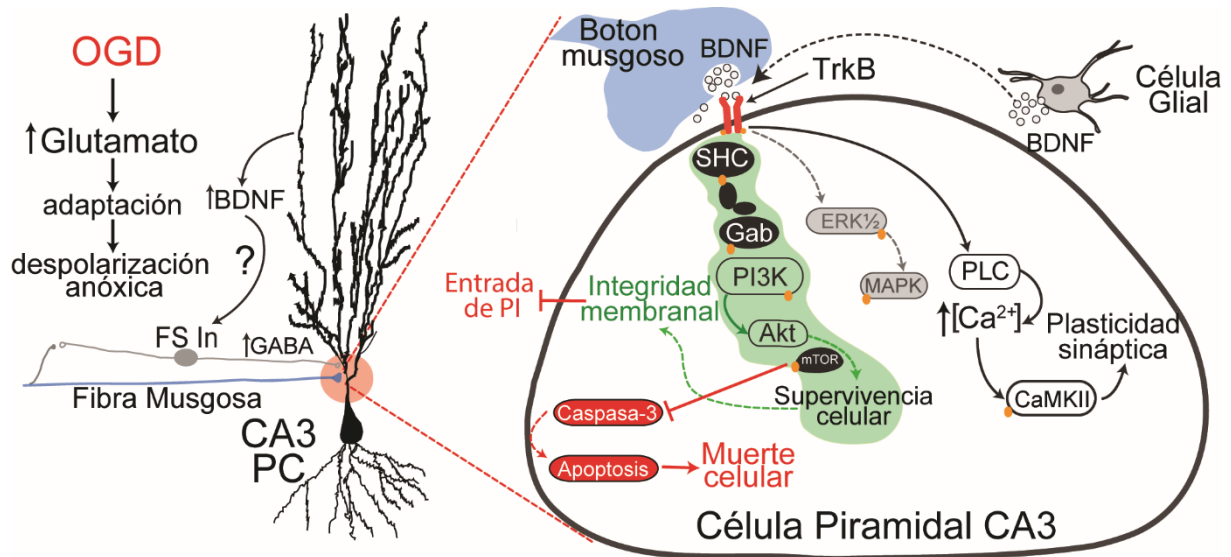


Figura 16. Representación esquemática del mecanismo de protección intrínseco de la región CA3 ante la privación de oxígeno y glucosa.

Durante la privación de oxígeno y glucosa se genera una despolarización sostenida en las células piramidales (CA3 PC), con ello incrementa la actividad sináptica espontánea que es seguida de ráfagas de potenciales de acción. El incremento en el disparo neuronal provoca la liberación de glutamato y BDNF. En respuesta las interneuronas de disparo rápido (FS In) activadas por el glutamato liberado de las CA3 PC liberan GABA al medio extracelular, disminuyendo la excitabilidad neuronal. Por otra parte el BDNF liberado activa a su receptor ubicado en la superficie de las células piramidales, activando la vía de señalización PI3-K/AKT y la posible activación de mTOR para promover la supervivencia celular al inhibir enzimas involucradas en el proceso apoptótico y preservando la integridad membranal reduciendo la entrada de PI al interior celular. Al mismo tiempo la activación del TrkB induce la activación de CaMKII y la regulación a la baja de MAPK-ERK1/2, involucradas en procesos de plasticidad sináptica.

8.8 Falla en la neuroprotección de la región CA1

Las principales explicaciones para la falla en la neuroprotección en CA1 se resumen en la Figura 17. A pesar de las preincubaciones con BDNF o 7,8-DHF, la región CA1 no experimenta neuroprotección por activación de TrkB. Estudios previos han demostrado que el BDNF (20ng/ml) no modifica la actividad sináptica basal y solo ejerce control de la transmisión inhibitoria (Frerking, Malenka y Nicoll, 1998). Se ha reportado previamente el efecto protector del BDNF en diversos modelos experimentales en esta región (Boening y cols., 1989; Gao, Pulsinelli y Xu, 1999; Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Yonekura y cols., 2006). Sin embargo, nosotros no encontramos estos efectos.

Una posible explicación es que durante la isquemia se ha reportado una reducción en la síntesis y expresión del receptor TrkB en la región CA1 del hipocampo (Cherubini, Ben-Ari y Krnjevic, 1989; Schmidt-Kastner y Freund, 1991; Yonekura y cols., 2006), de tal forma que aunque realicemos la preincubación con el factor trófico este podría no ejercer sus efectos al no tener expresado este receptor para ser activado.

Otra posible explicación para estos resultados podría deberse a que los efectos protectores del BDNF son dependientes de la síntesis de proteínas. Se sabe que la síntesis de proteínas es un proceso dependiente de ATP y durante el evento isquémico se ha reportado una disminución en la síntesis de fosfatos de alta energía (ATP y fosfocreatina). Además se ha probado que la síntesis de proteínas no se recupera, aún cuando los niveles de energía regresan a condiciones basales, la recuperación de la síntesis de proteínas se reestablece hasta 12-48 horas posteriores al evento isquémico (Araki y cols., 1990; Furuta y cols., 1993). Por otra parte estudios donde se evalúa el efecto protector del BDNF ante la excitotoxicidad por glutamato, muestran que el efecto protector se anula cuando ocupan un inhibidor de la síntesis de proteínas (anisomicina 5 μ M) (Almeida y cols., 2005), estos datos concuerdan con nuestro hallazgo.

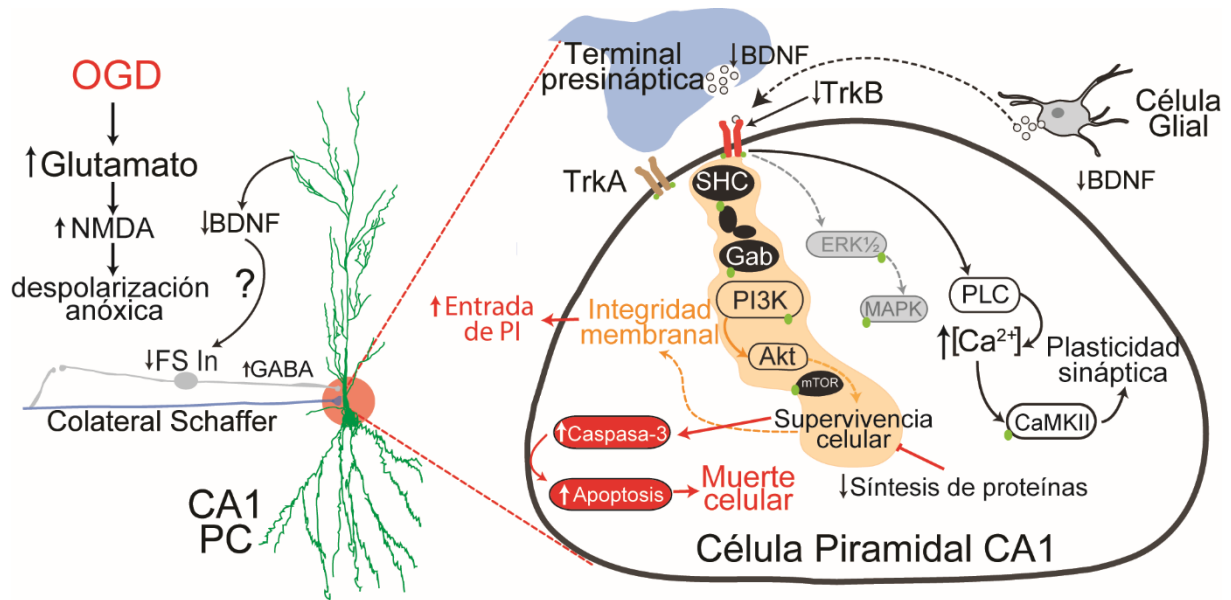


Figura 17. Representación esquemática de los mecanismos activados de la región CA1 ante la privación de oxígeno y glucosa.

Durante la privación de oxígeno y glucosa se genera una despolarización sostenida en las células piramidales (CA1 PC), con ello incrementa la actividad sináptica espontánea que es seguida de ráfagas de potenciales de acción. El incremento en el disparo neuronal provoca la liberación de glutamato, activación sostenida de receptores NMDA y liberación en menor cantidad de BDNF. Se ha reportado que durante el daño isquémico hay una disminución en la síntesis y liberación de BDNF y su receptor TrkB, el cual también es endocitado para su degradación. En respuesta a la activación de las CA1 PC las interneuronas de disparo rápido (FS In) liberan GABA al medio extracelular, disminuyendo la excitabilidad neuronal con menor eficiencia que en la región CA3. Por otra parte el BDNF liberado activa a su receptor ubicado en la superficie de las células piramidales, activando la vía de señalización PI3-K/AKT y la posible activación de mTOR para promover la supervivencia celular al inhibir enzimas involucradas en el proceso apoptótico y preservando la integridad membranal reduciendo la entrada de PI al interior celular, pero durante la isquemia se ha reportado que hay una disminución en la síntesis de proteínas limitando los efectos protectores de la activación de esta vía. Al mismo tiempo la activación del TrkB induce la activación de CaMKII y la regulación a la baja de MAPK-ERK1/2, involucradas en procesos de plasticidad sináptica. Finalmente se ha reportado que la expresión basal de TrkB en CA1 es menor, teniendo mayor expresión de TrkA y que este pueda participar de mejor manera en la protección durante el daño isquémico.

8.9 El 7,8-DHF como potente agente neuroprotector

La interacción entre el BDNF y su receptor de alta afinidad (TrkB) inicia una vía de señalización río abajo que es crítica para los procesos de plasticidad y memoria (Leal, Bramham y Duarte, 2017). Se ha demostrado previamente que aumentar la señalización BDNF/TrkB es una estrategia efectiva para revertir los efectos cognitivos asociados a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Blurton-Jones y cols., 2009; Nagahara y cols., 2009; Iwasaki y cols., 2012; Devi y Ohno, 2012), excitotoxicidad por glutamato (Lindholm y cols., 1993) e isquemia (Schâbitz y cols., 2000).

Lamentablemente una de las principales desventajas de utilizar al BDNF como posible agente farmacológico es su baja penetración a la barrera hematoencefálica y su corta vida media (Poduslo y Curran, 1996). Las estrategias en investigación clínica han utilizado agentes que contienen precursores de factores tróficos con mayor permeabilidad y vida media obteniendo resultados prometedores (cita cerebrolisyn). En preclínica se ha utilizado la sobreexpresión del BDNF mediante el uso de virus o bien mediante infusión directa sobre el área de interés (Nagahara y cols., 2009; Iwasaki y cols., 2012; Radecki y cols., 2005), estos últimos a pesar de ser más efectivos son métodos invasivos que limitan explotar los efectos de la activación del TrkB en la clínica. Por lo tanto se han identificado nuevas moléculas agonistas del TrkB como el 7,8-DHF que ha mostrado efectos protectores prometedores en modelos de envejecimiento, Parkinson y Alzheimer (Devi y Ohno, 2012; Jang y cols., 2010; Zeng y cols., 2012).

El 7,8-DHF es una molécula de menor tamaño (254 Da), con mayor permeabilidad a la BHE, con un tiempo mayor de vida media, que activa rápida y selectivamente al TrkB que mimetiza y supera los efectos fisiológicos del BDNF durante tiempos prolongados; ya que evita la degradación del receptor (Liu y cols., 2014), favorece la neurogénesis, disminuye la apoptosis mediante la reducción de la activación de las caspasas y ha mostrado tener efectos antidepresivos (Jang y cols., 2009; Liu y cols., 2010).

Este se une con gran afinidad al BDNF ($K_d=10$ nM, BDNF: $K_d=1.7$ nM) en el dominio extracelular del TrkB y favorece la dimerización y autofosforilación del

receptor favoreciendo la activación de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK y Erk1/2, estos efectos son comparables con los tiempos de activación reportados para el BDNF y su activación es dependiente del estado de glucosilación del receptor TrkB (Jang y cols, 2009; Liu y cols., 2014). Como se demostró en los experimentos de WB para estudiar la activación del TrkB bajo nuestras condiciones experimentales. Por otra parte se ha demostrado que el 7,8-DHF activa de forma selectiva al TrkB, si tener efectos sobre la activación del TrkA y TrkC (Jang y cols., 2009).

Adicionalmente el 7,8-DHF pertenece a la familia de los flavonoides, estos son compuestos aromáticos polifenólicos que contienen un núcleo básico de flavona y dos anillos aromáticos interconectados por tres átomos de carbono. Los flavonoides poseen diversos efectos biológicos que incluyen efectos como agentes antioxidantes y preventivos contra cáncer, mejoramiento de la memoria, estimulan la regeneración neuronal, entre otros (Liu y cols., 2014). Se ha demostrado en modelo de traumatismo cerebral que la administración de 7,8-DHF disminuye el área lesionada y el volumen de infarto (Wu y cols., 2014; Zhao y cols., 2016). Durante el periodo de reperfusión post-isquemia se ha demostrado que se generan las condiciones necesaria para la formación de radicales libres, favoreciendo la degeneración neuronal (Lipton, 1999). En este sentido se ha demostrado que el 7,8-DHF ejerce un papel neuroprotector antioxidante en un modelo de toxicidad por glutamato (Chen y cols., 2011) y en un modelo de isquemia focal (Wang y cols., 2014). Sin embargo debido a sus múltiples acciones es difícil establecer una factible relación estructura-función. Finalmente el uso del 7,8-DHF permite el uso de tratamientos crónicos, incluso por vía oral (Liu y cols., 2010; Castello y cols., 2014), se ha demostrado que la administración de este no modifica el peso corporal, ni alteraciones en la función renal o hepática (Wu y cols., 2014). Con esta evidencia experimental proponemos al 7,8-DHF como un potente agente farmacológico para el tratamiento de la isquemia.

9. Conclusión

La activación del receptor TrkB representa un mecanismo endógeno de neuroprotección de CA3. La protección ejercida por este factor trófico involucra la vía de señalización PI3K/AKT, favoreciendo la integridad de las membranas neuronales y reduciendo la actividad de cascadas apoptóticas sin tener efecto en la región CA1.

10. Perspectivas

1. Explorar si las respuestas recuperadas posteriores a la privación de oxígeno y glucosa se mantienen durante tiempos prolongados de forma estable.
2. Estudiar si los efectos reportados en esta tesis pueden ser replicados cuando la preincubación con BDNF es posterior al periodo de perfusión con OGD.
3. Evaluar en un modelo animal, el efecto protector mediado por la activación del TrkB con el flavonoide 7,8-DHF con pruebas conductuales asociadas a la actividad hipocampal, histología y electrofisiología.

11. Bibliografía

- Abdel-Hamid K y Tymianski M. “*Mechanisms and Effects of Intracellular Calcium Buffering on Neuronal Survival in Organotypic Hippocampal Cultures Exposed to Anoxia/Aglycemia or to Excitotoxins*”. The Journal of Neuroscience, 1997, vol 17 (10), pp: 3538-3553.
- Acsády L, Kamondi A, Sík A, Freund T y Buzsáki G. “*GABAergic Cells Are the Major Postsynaptic Targets of Mossy Fibers in the Rat Hippocampus*”. The Journal of Neuroscience, 1998, vol 18 (9), pp: 3386-3403.
- Aguilar-Alonso P, Martinez-Fong D, Pazos-Salazar N. G, Brambila E, Gonzalez-Barrios J. A, Mejorada A, Flores G, Millan-Perez Peña L, Rubio H y Leon-Chavez B. A. “*The increase in Zinc levels and upregulation of Zinc transporters are mediated by nitric oxide in the cerebral cortex after transient ischemia in the rat*”. Brain Research, 2008, vol 1200, pp: 89-98.
- Alderson R. F, Curtis R, Alterman A, Lindsay R M y DiStefano P. S. “*Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and Schwann cells in vitro*”. Brain Research, 2000, vol 871, pp: 210-222.
- Almeida R. D, Manadas B. J, Melo C. V, Gomes J. R, Mendes C. S, Graos M. M Carvalho R. F, Carvalho A. P y Duarte C. B. “*Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways*”. Cell Death and Differentiation, 2005, vol 12, pp: 1329–1343.
- Amaral D. G y Witter M. P. “*The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data*”. Neuroscience, 1989, vol 31 (3), pp: 571-591.
- Andersen P, Bliss T. V. P y Skrede K. K. “*Lamellar organization of Hippocampal excitatory pathways*”. Experimental Brain Research, 1971, Volume 13 (2), pp: 222–238.
- Araki T, Kato H, Inoue T y Kogure K. “*Regional impairment of protein synthesis following brief cerebral ischemia in the gerbil*”. Acta Neuropathologica, 1990, vol 79 (5), pp: 501-505.
- Bae E. J, Chen B. H, Yan B. C, Shin B. N, Cho J. H, Kim I. H, Ahn J. H, Lee J. C, Tae H. J, Hong S, Kin D. W, Lee Y. L, Woo M. H y Park J. H. “*Delayed hippocampal neuronal death in young gerbil following transient global cerebral ischemia is related to higher and longer-term expression of p63 in the ischemic hippocampus*”. Neural Regeneration Research, 2015, vol 10 (6), pp: 944-950.

- Barde Y. A, Edgar D y Thoenen H. "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain". The EMBO Journal, 1982, vol 1 (5), pp: 549-553.
- Beck T, Lindholm D, Castrén E y Wree A. "Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus". Journal of cerebral blood flow and metabolism, 1994, vol 14 (4), pp: 689-92.
- Bekinschtein P, Cammarota M y Medina J. H. "BDNF and memory processing". Neuropharmacology, 2014, vol 76, pp: 677-83.
- Blackstad T. W y Kjaerheim A. "Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: Electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers". The journal of comparative Neurology, 1961, vol 117 (2), pp: 133-159.
- Blackstad T. W. "Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination". The Journal of Comparative Neurology, 1956, vol 105 (3), pp: 417-537.
- Bliss T. V. P y Collingridge G. L. "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus". Nature, 1993, vol 361, pp: 31-39.
- Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello N. A, Müller F-J, Loring J. F, Yamasaki T. R, Poon W. W, Green K. N, y LaFerla F. M. "Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, vol 106, pp: 13594-13599.
- Boening J. A, Kass I. S, Cottrell J. E y Chambers G. "The effect of blocking sodium influx on anoxic damage in the rat hippocampal slice". Neuroscience, 1989, vol 33 (2), pp: 263-268.
- Brunet A, Datta S-R y Greenberg M. "Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by PI3K-Akt signaling pathway". Current Opinion in Neurobiology, 2011, vol 11, pp: 297-305.
- Campanac E, Gasselín C, Baude A, Rama S, Ankri N y Debanne D. "Enhanced Intrinsic Excitability in Basket Cells Maintains Excitatory-Inhibitory Balance in Hippocampal Circuits". Neuron, 2013, vol 77 (4), pp: 712-722.
- Cantú-Brito C, Ruiz-Sandoval J. L, Chuiquete E, Arauz A, León-Jimenez C, Murillo-Bonilla L. M, Villarreal-Careaga J, Barinagarrementería F, Fernández J. A, Torres B, Rodríguez-Leyva I y Rangel-Guerra R. "Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: Estudio RENAMEVASC". Revista Mexicana de Neurociencia, 2011, vol 5 (12), pp: 224-234.

- Carzorla M, Prémont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C y Rognan D. *“Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice”*. The Journal of Clinical Investigation, 2011, vol 121 (5), pp: 1846-1857.
- Castello N, Nguyen M. H, Tran J. D, Cheng D, Green K. N y LaFerla F. M. *“7,8-dihydroxyflavone, a small molecule TrkB agonist, improves spatial memory and increases thin spine density in a mouse model of Alzheimer disease-like neuronal loss”*. PLOS ONE, 2014, vol 9 (3).
- Chamberland S, Evstratova A y Tóth K. *“Interplay between Synchronization of Multivesicular Release and Recruitment of Additional Release Sites Support Short-Term Facilitation at Hippocampal Mossy Fiber to CA3 Pyramidal Cells Synapses”*. The Journal of Neuroscience, 2014, vol 34, pp: 11032-11047.
- Chao M. V. *“Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways”*. Nature Reviews Neuroscience, 2003, vol 4, pp: 299-309.
- Chen A, Xiong L-J, Tong Y y Mao M. *“Neuroprotective effect of brain derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway”*. Molecular Medicine Reports, 2013, vol 8, pp: 1011-1016.
- Chen J, Chua K-W, Chua C. C, Yu H, Pei A, Chua B, Hamdy R. C, Xu X y Liu C-F. *“Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity”*. Neuroscience letters, 2011, vol 499 (3), pp: 181-185.
- Cherubini E, Ben-Ari Y y Krnjevic K. *“Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential, and input resistance in immature rat hippocampus”*. Journal of Neurophysiology, 1989, vol 62 (4), pp: 882-895.
- Choi D. W y Rothman S. M. *“The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death”*. Annual Review of Neuroscience, 1990, vol 13 (1), pp: 171-182.
- Choi D. W. *“Excitotoxic cell death”*. Journal of Neurobiology, 1992, vol 23 (9), pp: 1261–1276.
- Chu C. T, Levinthal D. J, Kulich S. M, Chalovich E. M, DeFranco D. B. *“Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2”*. European Journal of Biochemistry, 2004, vol 271, pp: 2060–2066.
- Condorelli D. F, Dell'Albani P, Mudò G, Timmusk T y Belluardo N. *“Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Primary Astroglial Cultures: Induction by Cyclic AMP-Elevating Agents”*. Journal of Neurochemistry, 2002, vol 63 (2), pp: 509-516.

- Cyr M, Thibault C, Morissette M, Landry M y Di Paolo T. *“Estrogen-like activity of tamoxifen and raloxifene on NMDA receptor binding and expression of its subunits in rat brain”*. *Neuropsychopharmacology*, 1999, vol 25 (2), pp: 242-257.
- Danzer S. C y McNamara J. O. *“Localization of Brain-Derived Neurotrophic Factor to Distinct Terminals of Mossy Fiber Axons Implies Regulation of Both Excitation and Feedforward Inhibition of CA3 Pyramidal Cells”*. *The Journal of Neuroscience*, 2004, vol 24 (50), pp: 11346-11355.
- Dennis S, Jaafari N, Cimarosti H, Hanley J. G, Henley J. M, y Mellor J. R. *“Oxygen/Glucose Deprivation Induces a Reduction in Synaptic AMPA Receptors on Hippocampal CA3 Neurons Mediated by mGluR1 and Adenosine A3 Receptors”*. *The Journal of neuroscience*, 2011, vol 31 (33), pp: 11941-11952.
- Devi L y Ohno M. *“7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE 1 elevation in a mouse model of Alzheimer’s disease”*. *Neuropsychopharmacology*, vol 37, pp: 572-580.
- Drake C. T, Milner T. A y Patterson S. L. *“Ultrastructural Localization of Full-Length trkB Immunoreactivity in Rat Hippocampus Suggests Multiple Roles in Modulating Activity-Dependent Synaptic Plasticity”*. *The Journal of Neuroscience*, 1999, vol 19 (18), pp: 8009-8026.
- Dzhala V, Khalilov G, Ben-Ari Y y Khazipov R. *“Neuronal mechanisms of the anoxia-induced network oscillations in the rat hippocampus in vitro”*. *Journal of Physiology-London*, 2001, vol 536 (2), pp: 521-531.
- Förster E, Zhao S y Frotscher M. *“Laminating the hippocampus”*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006, vol 7, pp: 259–268.
- Frerking M, Malenka R. C y Nicoll R. A. *“Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Modulates Inhibitory, But Not Excitatory, Transmission in the CA1 Region of the Hippocampus”*. *Journal of Neurophysiology*, 1998, vol 80 (6), pp: 3383-3386.
- Freund T. F y Katona I. *“Perisomatic Inhibition”*. *Neuron Review*, 2007, vol 56 (1), pp: 33-42.
- Furuta S, Ohta S, Hatakeyama T, Nakamura K y Sakaki S. *“Recovery of protein synthesis in tolerance-induced hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia”*. *Acta Neuropathologica*, 1993, vol 86 (4), pp: 329-336.
- Gao T. M, Howard E. M, y Xu Z. C. *“Transient neurophysiological changes in CA3 neurons and dentate granule cells after severe forebrain ischemia in vivo”*. *Journal of neurophysiology*, 1998, vol 80 (6), pp: 2860-2869.

- Gao T. M, Pulsinelli W. A y Xu Z. C. “*Changes in membrane properties of CA1 pyramidal neurons after transient forebrain ischemia in vivo*”. *Neuroscience*, 1999, vol 90 (3), pp: 771-780.
- Gee C. E, Benquet P, Raineteau O, Rietschin L, Kirbach S. W y Gerber U. “NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons”. *European Journal of Neuroscience*, 2006, vol 23 (10), pp: 2595-2603.
- Gomes J. R, Costa J. T, Melo C. V, Felizzi F, Monteiro P, Pinto M. J, Inacio A. R, Wieloch T, Almeida R. D, Graos M y Duarte C. B. “*Excitotoxicity downregulates TrkB.FL signaling and upregulates the neuroprotective truncated TrkB receptors in cultured hippocampal and striatal neurons*”. *Journal of Neuroscience*, 2012, vol 32, pp: 4610-4622.
- Graham G. D, Blamire A. M, Howseman A. M, Rothman D. L, Fayad P. B, Brass L. M y Petroff O. A. “*Proton magnetic resonance spectroscopy of cerebral lactate and other metabolites in stroke patients*”. *Stroke*, 1992, vol 23 (3), pp: 333-340.
- Hagena H y Manahan-vaughan D. “*mGlu5 Acts As a Switch for Opposing Forms of Synaptic Plasticity at Mossy Fiber – CA3 and Commissural Associational – CA3 Synapses*”. *The Journal of Neuroscience*, 2015, vol 35 (12), pp: 4999–5006.
- Han X, Cheng M, Chen L, Fang H, Wang L, Li X y Qu Z. “*7,8-dihydroxyflavone protects PC12 cells against 6-hydroxydopamine-induced cell death through modulating PI3K/Akt and JNK pathways*”. *Neuroscience letters*, 2014, vol 581, pp: 85-88.
- Haniu M, Montestruque S, Bures E. J, Talvenheimo J, Toso R, Lewis-Sandy S, Welcher A. A, Rohde M. F. “*Interactions between brain-derived neurotrophic factor and the TrkB receptor. Identification of two ligand binding domains in soluble TrkB by affinity separation and chemical cross-linking*”. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol 272 (40), pp: 25296-25303-
- Harris AL. “Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth”. *Nature Review Cancer*, 2002, vol 2(1), pp: 38–47.
- Harris E y Cotman C. “*Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl d-aspartate antagonists*”. *Neuroscience Letters*, 1986, vol 70 (1), pp: 132-137.
- Hassen G. W, Tian D, Ding D y Bergold P. “*A new model of ischemic preconditioning using young adult hippocampal slice cultures*”. *Brain Research Protocols*, 2004, vol 13 (3), pp: 135-143.

- Hetman M, Kanning K, Cavanaugh J. E, Xia Z. "Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase". *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol 274, pp: 22569–22580.
- Hofmeijer J y van Putten M. J.A.M. "*Ischemic Cerebral Damage: An Appraisal of Synaptic Failure*". *Stroke*, 2012, vol 43, pp: 607-615
- Horn A. P, Gehardt D, Geyer A. B, Valentim L, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G y Salbego C. "Cellular death in hippocampus in Response to PI3K Pathway Inhibition and Oxygen and Glucose Deprivation". *Neurochemical Research*, 2005, vol 30 (3), pp: 355-361.
- Howard E. M, Gao T. M, Pulsicelli W y Xu Z. C. "*Electrophysiological changes of CA3 neurons and dentate granule cells following transient forebrain ischemia*". *Brain research*, 1998, vol 798, pp: 109-118.
- Iwasaki Y, Negishi T, Inoue M, Tashiro T, Tabira T, . "*Sendai virus vector-mediated brain-derived neurotrophic factor expression ameliorates memory deficits and synaptic degeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*". *Journal of Neuroscience Research*, 2012, vol 90, pp: 981-989.
- Jang S-W, Liu X, Yepes M, Shepherd K, Miller g. W, Liu Y, Wilson D, Xiao G, Blenchi B, Sun Y. E y Ye K. "*A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone*". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol 25, pp: 2687-2692.
- Jerónimo-Santos A, Henriques Vaz S, Parreira S, Rapaz-Lérias S, Caetano A. P, Buée-Scherrer V, Castrén E, Valente C. A, Blum D, Sebastiao A. M y Diógenes M. J. "*Dysregulation of TrkB Receptors and BDNF Function by Amyloid- β Peptide is Mediated by Calpain*". *Cerebral Cortex*, 2014, vol 25 (9), pp: 1-15.
- Jin W y Chavkin C. "*Mu opioids enhance mossy fiber synaptic transmission indirectly by reducing GABA B receptor activation*". *Brain Research*, 1999, vol 821, pp: 286-293.
- Jones S. M Novak A. E y Elliott J. P. "*Primary culture of cellular subtypes from postnatal mouse for in vitro studies of oxygen glucose deprivation*". *Journal of Neuroscience Methods*, 2011, vol 199 (2), pp: 241-248.
- Jung M. W y McNaughton B. L. "*Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer*". *Hippocampus*, 1993, vol 3 (2), pp: 165-182.

- Kalogeris T, Bao Y y Korthis R. J. "*Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning*". Redox Biology, 2014, vol 2, pp: 702-714.
- Kamiya H, Shinozaki H y Yamamoto C. "*Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses*". , The Journal of Physiology, 1996, vol 493 (2), pp: 447-455.
- Kanterewicz B, Urban N. N, McMahon D. B. T, Norman E. D, Giffen L. J, Favata M. F, Scherle P. A, Trzaskos J. M, Barrionuevo G y Klann E. "*The Extracellular Signal-Regulated Kinase Cascade Is Required for NMDA Receptor-Independent LTP in Area CA1 But Not Area CA3 of the Hippocampus*". The Journal of Neuroscience, 2000, vol 20 (9), pp: 3057-3066.
- Karar J y Maity A. "PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis". Frontiers in Molecular Neuroscience, 2011, vol 4, pp: 1-7.
- Kokaia Z, Nawa H, Uchino H, Elmér E, Kokaia M, Carnahan J, Smith M. L, Siesjö B. K y Lindvall O. "*Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat*". Molecular Brain Research, 1996, vol 38 (1), pp: 139-144.
- Kuczewski N, Porcher C, Lessmann V, Medina I y Gauarsa J. "*Back-propagating action potential: A key contributor in activity-dependent dendritic release of BDNF*". Communicative & Integrative Biology, 2008, vol 1 (2), pp: 153-155.
- Laake J. H. "*A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence*". Brain Research Protocols, 1999, vol 4, pp: 173-184.
- Lauterborn J. C, Lynch G, Vanderklish P, Arai A y Gall C. M. "*Positive Modulation of AMPA Receptors Increases Neurotrophin Expression by Hippocampal and Cortical Neurons*". The Journal of Neuroscience, 2000, vol 20 (1), pp: 8-21.
- Leal G, Bramham C. R y Duarte C. B. "*Chapter Eight: BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity*". Vitamins and Hormones, 2017, vol 104, pp: 153-195.
- Lindholm D, Dechant G, Heisenberg C. P y Thoenen H. "*Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity*". European Journal of Neuroscience, 1993, vol 5, pp: 1455-1464.
- Lipton P. "*Ischemic Cell Death in Brain Neurons*". Physiological Reviews, 1999, vol 79 (4), pp: 1431-1568.

- Liu F y McCullough L. D. “Chapter 7: The Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Transient Focal Cerebral Ischemia”. Cerebral Angiogenesis Methods and Protocols, 2014, pp: 81-93.
- Liu X, Chan C-B, Jang S-W, Pradoldej S, Huang J, He K, Phun L. H, France S, Xiao G, Jia Y, Luo H. R y Ye K. “A Synthetic 7,8-Dihydroxyflavone Derivate Promotes Neurogenesis and Exhibits Potent Antidepressant Effect”. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, vol 53, pp: 8274-8286.
- Liu X, Sheng R y Qin Z. “The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning”. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009, vol 30, pp: 1071–1080.
- Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan P. J y Wren P. “BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases”. *Nature Reviews Neuroscience*, 2013, vol 14 (6), pp: 401-416.
- Lu X, Obianyo O, Chan C. B, Huang J, Xue S, Yang J. J, Zeng F, Goodman M y Ye K. “Biochemical and biophysical investigation of the Brain-derived Neurotrophic Factor Mimetic 7,8-Dihydroxyflavone in the Binding and Activation of the TrkB Receptor”. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol 289, pp: 27571-27584.
- Malenka R. C, Kauer J. A, Perkel D. J y Nicoll R. A. “The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission — its role in long-term potentiation”. *Trends in Neurosciences*, 1989, vol 12 (11), pp: 444-450.
- Marongiu D, Imbrosci B y Mittmann T. “Modulatory effects of the novel TrkB receptor agonist 7,8-dihydroxyflavone on synaptic transmission and intrinsic neuronal excitability in mouse visual cortex *in vitro*”. *European journal of pharmacology*, 2013, vol 709, pp: 64-71.
- Martens L. K, Kirschner K. M, Warnecke C y Scholz H. “Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1) Is a Transcriptional Activator of the TrkB Neurotrophin Receptor Gene”. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol 282, pp: 14379-14388.
- Martinez C. O, Do V. H y Derrick B. E. “Neurobiology of Learning and Memory Endogenous opioid peptides contribute to associative LTP in the hippocampal CA3 region”. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2011, vol 96 (2), pp: 207-217.
- Martinez J L, y Derrick B. E. “LONG-TERM POTENTIATION AND LEARNING”. *Annual Review Psychology*, 1996, vol 47, pp: 173–203.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte R y Barde Y. A. “Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF”. *Nature Neuroscience*, 2008, vol 11 (2), pp: 131-133.

- McBean D. E, Winters V, Wilson A. D, Oswald C. B, Alps B. J, y Armstrong J. M. *“Neuroprotective efficacy of lifarizine (RS-87476) in a simplified rat survival model of 2 vessel occlusion”*. British Journal of Pharmacology, 1995, vol 116, pp: 3093-3098.
- McNaughton B. L y Morris R. G. M. *“Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system”*. Trends in Neurosciences, 1987, vol 10, pp: 408-415.
- Mehta S. L, Manhas N y Raghubir R. *“Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics”*. Brain Research Reviews, 2007, vol 54 (1), pp: 34-66.
- Moore K. A, Nicoll R. A y Schmitz D. *“Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses”*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, vol 100 (24), pp: 14397-14402.
- Morris R. G. M, Anderson E, Lynch G. S y Baudry M. *“Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5”*. Nature, 1986, vol 319, pp: 774-776.
- Müller M y Somjen G. G. *“Inhibition of major cationic inward currents prevents spreading depression-like hypoxic depolarization in rat hippocampal tissue slices”*. Brain Research, 1998, vol 812, pp: 1-13.
- Murer M. G, Yan Q y Raisman-Vozari R. *“Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease”*. Progress in Neurobiology, 2001, vol 63 (1), pp: 71-124.
- Nabetani M, Okada M, Kawai S y Nakamura H. *“NEURAL ACTIVITY AND THE LEVELS OF HIGH ENERGY PHOSPHATES DURING DEPRIVATION OF OXYGEN AND/OR GLUCOSE IN HIPPOCAMPAL SLICES OF IMMATURE AND ADULT RATS”*. Int. Z Devl Neuroscience, 1995, vol 13 (1), pp: 3-12.
- Nagahara A. H, Merrill D. A, Coppola G, Tsukada S, Schroeder B. E, Shaked G. M, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner J. M, Rockenstein E, Chao M. V, Koo E. H, Geschwind D, Masliah E, Chiba A. A, y Tuszynski M. H. *“Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer’s disease”*. Nature Medicine, 2009, vol 15, pp: 331-337.
- Nagappan G y Lu B. *“Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications”*. Trends in Neurosciences, 2005, vol 28 (9), pp: 464-471.

- Nagayama T, Sinor A. D, Simon R. P, Chen J, Graham S. H, Jin K y Greenberg D. A. "*Cannabinoids and Neuroprotection in Global and Focal Cerebral Ischemia and in Neuronal Cultures*". Journal of Neuroscience, 1999, vol 19 (8); pp: 2987-2995.
- Nakajima T, Sato M, Akaza N y Umezawa Y. "*Cell-Based Fluorescent Indicator To Visualize Brain-Derived Neurotrophic Factor Secreted from Living Neurons*". ACS Chemical Biology, 2008, vol 3 (6), pp: 352-358.
- Neumann J. T, Thompson J. W, Rayal A. P, Cohan C. H, Koronowski K. B y Perez-Pinzon M. A. "*Increased BDNF protein expression after ischemic or PKC epsilon preconditioning promotes electrophysiologic changes that lead to neuroprotection*". Journal of cerebral blood flow and metabolism, 2014, vol 35 (1), pp: 121-130.
- Neves G, Cooke S y Bliss T. V. P. "*Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality*". Nature Reviews Neuroscience, 2008, vol 9, pp: 65-75.
- Nitsch C, Scotti A, Sommacal A y Kalt G. "*GABAergic hippocampal neurons resistant to ischemia-induced neuronal death contain the Ca²⁺-binding protein parvalbumin*". Neuroscience Letters, 1989, vol 105(3), pp: 263-268.
- Noraberg J, Kristensen B. W y Zimmer J. "*Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures*". Brain Research Protocols, 1999, vol 3, pp: 278-290.
- Noraberg J, Poulsen F. R, Blaabjerg M, Kristensen B. W, Bonde C, Montero M, Meyer M, Gramsbergen J. B y Zimmer J. "*Organotypic Hippocampal Slice Cultures for Studies of Brain Damage, Neuroprotection and Neurorepair*". Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders, 2005, vol 4, pp: 435-452.
- Otis J. M, Fitzgerald M. K y Mueller D. "*Infralimbic BDNF/TrkB Enhancement of GluN2B Currents Facilitates Extinction of a Cocaine-Conditioned Place Preference*". The Journal of Neuroscience, 2014, vol 34 (17), pp: 6057-6064.
- Owonikoko T. K y Khuri F. R. "Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway: Biomarkers of Success and Tribulation". ASCO EDUCATIONAL BOOK, 2013, vol , pp: e395-e402.
- Pandya C. D, Kutiyawalla A y Pillai A. "*BDNF-TrkB signaling and neuroprotection in schizophrenia*". Asian journal of psychiatry, 2013, vol 6 (1), pp: 22-28.
- Park H y Poo M. "*Neurotrophin regulation of neural circuit development and function*". Nature Reviews Neuroscience, 2013, vol 14 (1), pp: 7-23.
- Pereira D. B, Rebola N, Rodrigues R. J, Cunha R. A; Carvalho A. P y Duarte C. B. "*TrkB receptors modulation of glutamate release is limited to a subset of nerve terminals*".

- in the adult rat hippocampus*". Journal of Neuroscience Research, 2006, vol 83 (5), pp: 832-844.
- Poduslo J. F y Curran G. L. "*Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF*". Molecular Brain Research, 1996, vol 36, pp: 280-286.
- Pulsinelli W. A. "*Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics*". Progress in brain research, 1985, vol 63, pp: 29-37.
- Radecki D. T, Brown L. M, Martinez J, y Teyler T. J. "*BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LTP*". Hippocampus, 2005, vol 15, pp: 246-253.
- Regehr W. G, Delaney K. R y Tank D. W. "*The role of presynaptic calcium in short-term enhancement at the hippocampal mossy fiber synapse*". The Journal of Neuroscience, 1994, vol 14 (2), pp: 523-537.
- Rolls E. T y Treves A. "*Neural networks in the brain involved in memory and recall*". Progress in Brain Research, 1994, pp: 335-341.
- Salin P. A, Scanziani M, Malenka R. C y Nicoll R. A. "*Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus*". Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, vol 93 (23), pp: 13304-13309.
- Sattler R y Tymianski M. "*Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death*". Molecular Neurobiology, 2001, vol 24: 107-129.
- Schäbitz W, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M y Schwab S. "*Intravenous Brain-Derived Neurotrophic Factor Reduces Infarct Size and Counterregulates Bax and Bcl-2 Expression After Temporary Focal Cerebral Ischemia*". Stroke, 2000, vol 31 (9), pp: 2212-2217.
- Schildt S, Endres T, Lessmann V y Edelman E. "*Neuropharmacology Acute and chronic interference with BDNF / TrkB-signaling impair LTP selectively at mossy fiber synapses in the CA3 region of mouse hippocampus*". Neuropharmacology, 2013, vol 71, pp: 247-254.
- Schmidt-Kastner R y Freund T. F. "*Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia*". Neuroscience, 1991, vol 40 (3), pp: 599-636.
- Scoville WB, Milner B. "*Loss of recent memory after bilateral Hippocampal lesions*". Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1957, vol 20, pp: 11-21.
- Shi J. "*Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers*". Acta Pharmacologica Sinica, 2015, vol 36 (2), pp: 149-157.

- Sommerfeld M. T, Schweigreiter R, Barde Y. A y Hoppe E. “Down-regulation of the Neurotrophin Receptor TrkB following Ligand Binding: EVIDENCE FOR AN INVOLVEMENT OF THE PROTEASOME AND DIFFERENTIAL REGULATION OF TrkA AND TrkB”. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol 275 (12), pp: 8982-8990.
- Spencer-Segal J. L, Waters E. M. Bath K. G, Chao M. V, McEwen B. S y Milner T. A. “Distribution of Phosphorylated TrkB Receptor in the Mouse Hippocampal Formation Depends on Sex and Estrous Cycle Stage”. *The Journal of Neuroscience*, 2011, vol 31 (18), pp: 6780-6790.
- Stegeman H, Span P-N, Peeters W. JM, Verheijen M. MG, Grénman R, Meijer T. WH, Kaanders J. HAM y Bussink J. “Interaction between hypoxia, AKT and HIF-1 signaling in HNSCC and NSCLC: implications for future treatment strategies”. *Future Science OA*, 2016, vol 2.
- Steward O. “Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat”. *The Journal of Comparative Neurology*, 1976, vol 167 (3), pp: 285-314.
- Stork C. J y Li Y. V. “Measuring cell viability with membrane impermeable zinc fluorescent indicator”. *Journal of Neuroscience Methods*, 2006, vol 155 (2), pp: 180-186.
- Taubenfeld S. M, Stevens K. A, Pollonini G, Ruggiero J y Alberini C. M. “Profound molecular changes following hippocampal slice preparation: loss of AMPA receptor subunits and uncoupled mRNA/protein expression”. *Journal of Neurochemistry*, 2002, vol81, pp: 1348-1360.
- Tian M, Zeng Y, Hu Y, Yuan X, Liu S, Li J, Lu P, Sun Y, Gao L, Fu D, Li Y, Wang S y McClintock S. M. “7, 8-Dihydroxyflavone induces synapse expression of AMPA GluA1 and ameliorates cognitive and spine abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome”. *Neuropharmacology*, 2015, vol 89, pp: 43-53
- Uluc K, Kendigelen P, Fidan E, Zhang L, Chanana V, Kintner D, Akture E, Song C, Ye K, Sun D, Ferrazzano P y Cengiz P. “TrkB receptor agonist 7, 8 dihydroxyflavone triggers profound gender- dependent neuroprotection in mice after perinatal hypoxia and ischemia”. *CNS & neurological disorders drug targets*, 2013, vol 12 (3), pp: 360-370.
- Urban N. N, Henze D y Barrionuevo G. “Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse”. *Hippocampus*, 2001, vol 11, pp: 408-417.

- Van Kanegan M. J, He D. N, Dunn D. E, Yang P, Newman R. A, West A. E y Lo D. C. "*BDNF Mediates Neuroprotection against Oxygen-Glucose Deprivation by the Cardiac Glycoside Oleandrin*". Journal of Neuroscience, 2014, vol 34 (3), pp: 963-968.
- Vidaurre O. G, Gascon S, Deogracias R, Sobrado M, Cuadrado E, Montaner J, Rodriguez-Pena A y Diaz-Guerra M. "*Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity*". Cell Death Disease, 2012, vol 3, pp: 1-12.
- Voytenko L. P, Lushnikova I. V, Savotchenko A. V, Isaeva E. V, Skok M. V, Lykhmus O. Y, Patseva M. A y Skibo G. G. "*Hippocampal GABAergic interneurons coexpressing alpha7-nicotinic receptors and connexin-36 are able to improve neuronal viability under oxygen-glucose deprivation*". Brain research, 2015, vol 1616, pp: 134-145.
- Wang B, Wu N, Liang F, Zhang S, Ni W, Cao Y, Xia D y Xi H. "*7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule tropomyosin-related kinase B (TrkB) agonist, attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury in rats*". Journal of Molecular Histology, 2014, vol 45 (2), pp: 129-140.
- Wu C-H, Hung T-H, Chen C-C, Ke C-H, Lee C-Y, Wang P-Y y Chen S-F. "*Post-Injury Treatment with 7,8-Dihydroxyflavone, a TrkB Receptor Agonist, Protects against Experimental Traumatic Brain Injury via PI-K/Akt Signaling*". PLOS ONE, 2014, vol 9 (11), pp: 1-25.
- Wu C-H, Hung T-H, Chen C-C, Ke C-H, Lee C-Y, Wang P-Y y Chen S-F. "Post-Injury Treatment with 7,8-Dihydroxyflavone, a TrkB Receptor Agonist, Protects against Experimental Traumatic Brain Injury via PI3K/Akt Signaling". PLoS ONE, 2014, vol 9(11), pp: 1-25.
- Xie M, Wang W, Kimelberg H K y Zhou M. "*Oxygen and Glucose Deprivation-Induced Changes in Astrocyte Membrane Potential and Their Underlying Mechanisms in Acute Rat Hippocampal Slices*". Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2007, vol 28 (3), pp: 456-467.
- Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, Furuya K y Kirino T. "*A Model of Global Cerebral Ischemia in C57 BL/6 Mice*". Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2004, vol 24 (2), pp: 151-158.
- Yonekura I, Takai K, Asai A, Kawahara N y Kirino T. "p53 Potentiates Hippocampal Neuronal Death Caused by Global Ischemia". Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2006, vol 26 (10), pp: 1332-1340.

- Zeng Y, Liu Y, Wu M, Liu J y Hu Q. *“Activation of TrkB by 7,8-Dihydroxyflavone Prevents Fear Memory Defects and Facilitates Amygdalar Synaptic Plasticity in Aging”*. Journal of Alzheimers Disease, 2012, vol 31, pp: 765-778.
- Zhang H, Xie M, Schools G. P, Feustel P. F, Wang W, Lei T, Kimelberg H. K y Zhou M. *“Tamoxifen mediated estrogen receptor activation protects against early impairment of hippocampal neuron excitability in an oxygen/glucose deprivation brain slice ischemia model”*. Brain Research, 2009, vol 1247, pp: 196-211.
- Zhao G y Flavin M. P. *“Differential sensitivity of rat hippocampal and cortical astrocytes to oxygen-glucose deprivation injury”*. Neuroscience Letters, 2000, vol 285 (3), pp: 177-180.
- Zhao S, Gao X, Dong W y Chen J. *“The Role of 7,8-Dihydroxyflavone in Preventing Dendrite Degeneration in Cortex after Moderate Traumatic Brain Injury”*. Molecular Neurobiology, 2016, vol 53 (3), pp: 1884-1895.
- Ziobro J. M, Deshpande L. S y DeLorenzo R. J. *“An organotypic hippocampal slice culture model of excitotoxic injury induced spontaneous recurrent epileptiform discharges”*. Brain Research, 2011, vol 1371, pp: 110-120.

12. Anexos

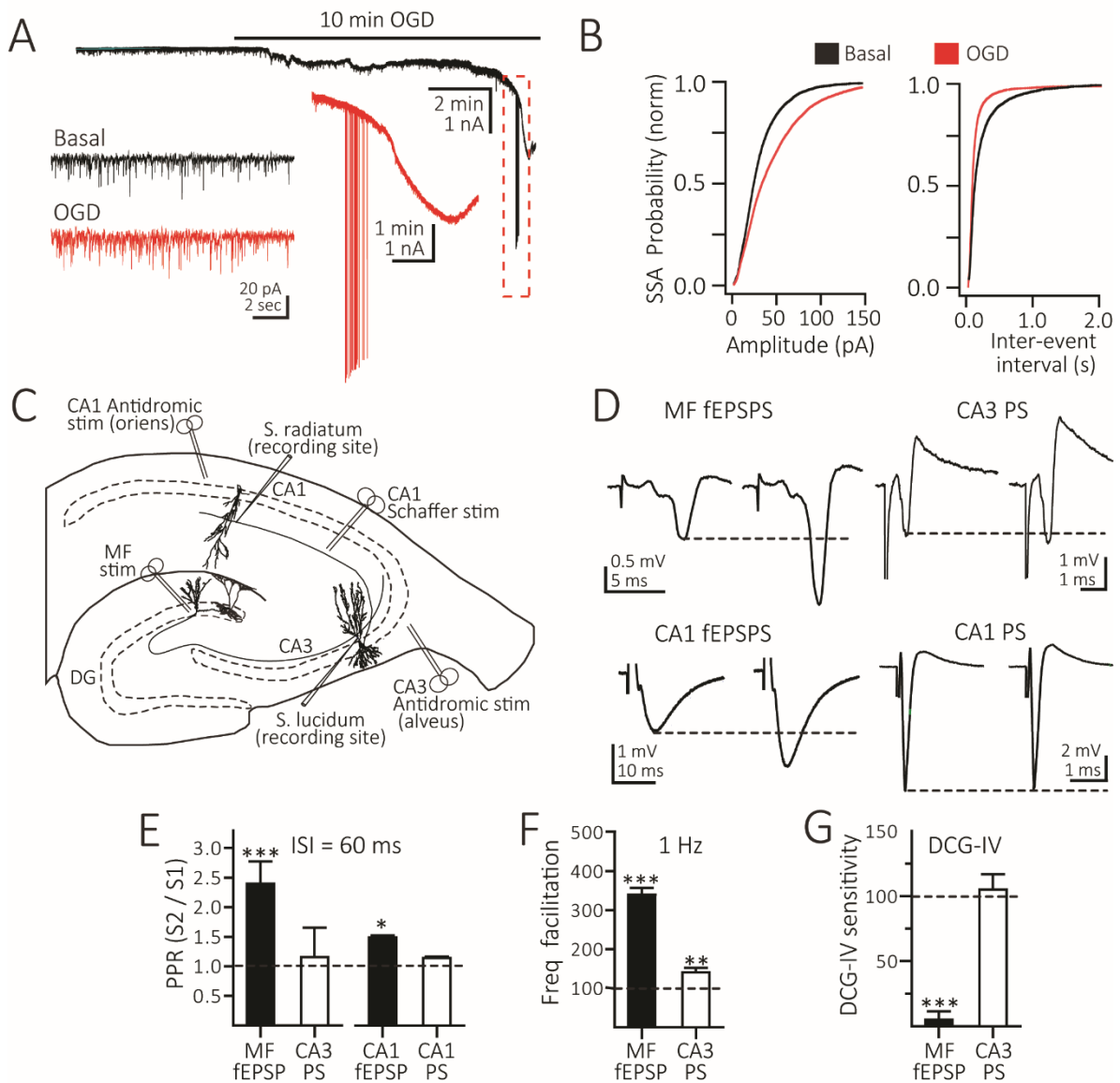


Figura 18. Registros de célula completa y extracelulares de la región CA3 del Hipocampo.

A) Registros continuos del voltaje de membrana de una célula piramidal de CA3b en condición basal, durante OGD (rojo) y reperusión. La interrupción en el trazo de voltaje muestra la despolarización irreversible de la célula piramidal de CA3 durante la reperusión. La ampliación superior ilustra la ráfaga de potenciales de acción observados durante OGD. El inserto de abajo a la derecha muestra trazos de voltaje de la actividad sináptica basal, su incremento durante OGD (rojo). **B)** Gráfica de la probabilidad acumulada de los eventos espontáneos registrados en fijación de voltaje durante OGD en células piramidales de CA3 ($n=26$). **C)** Representación esquemática de los sitios de colocación de los electrodos de estimulación y registro. **D)** Trazos representativos de las respuestas evocadas para las regiones CA3 y CA1 del hipocampo. Para diferenciar las respuestas obtenidas al estimular las fibras musgosas (MF fEPSP) se consideraron los siguientes criterios: **E)** Fuerte facilitación por pulso pareado ($S2/S1 > 2$), **F)** Marcada facilitación por frecuencia durante la estimulación a 1 Hz (incremento del 300-400% de la respuesta basal); **G)** Sensibilidad a DCG IV. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post varianza de Newman-Keuls indicado con (*) una $p < 0.05$, (**) un valor de $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

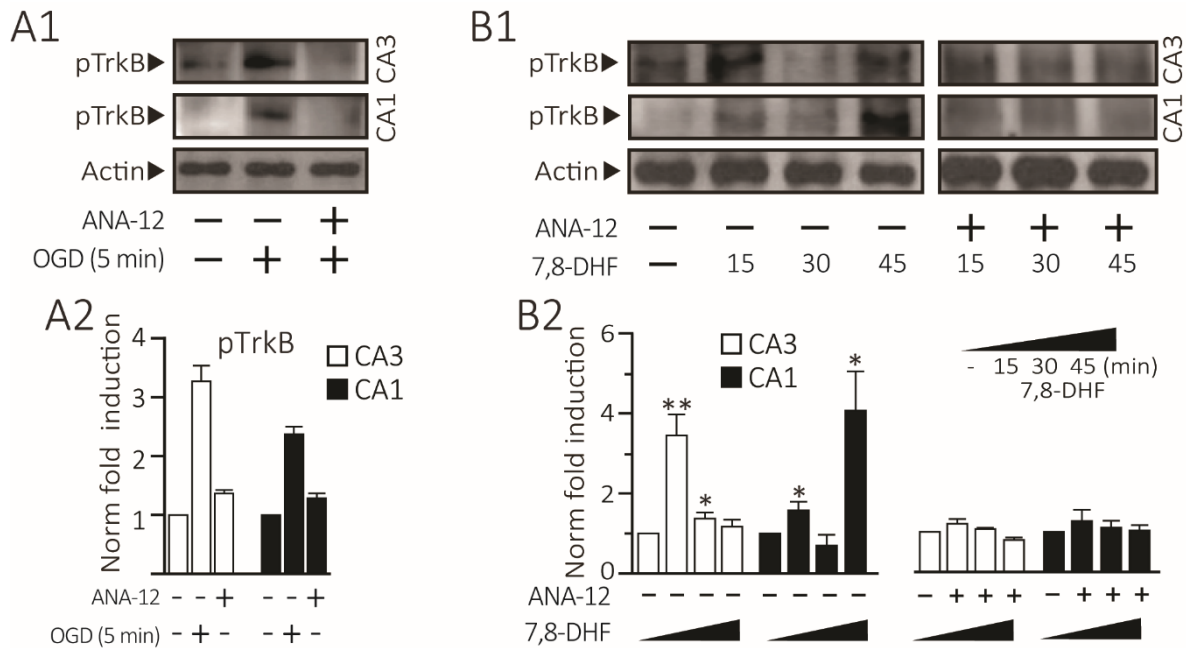


Figura 19. La privación de oxígeno y glucosa induce la activación de los receptores TrkB en el Hipocampo.

A1) Western Blot representativo de la región CA3 y CA1 mostrando la fosforilación de receptor TrkB (pTrkB) y su control (β -actina). En condición basal la pTrkB es mayor en la región CA3. La OGD aumenta la pTrkB en la región CA3 y este efecto es revertido cuando las rebanadas fueron preincubadas con ANA-12. **A2)** Gráfica de barras del análisis cuantitativo de A1 ($n=6$, experimentos independientes). **B1)** Curso temporal de la activación de TrkB por su agonista 7,8-DHF solo o en presencia de ANA-12. **B2)** Gráfica de barras del análisis cuantitativo de la fosforilación del TrkB de B1 a los tiempos indicados. Análisis estadístico T de Student indicado con (*) una $p < 0.05$, (**) un valor de $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

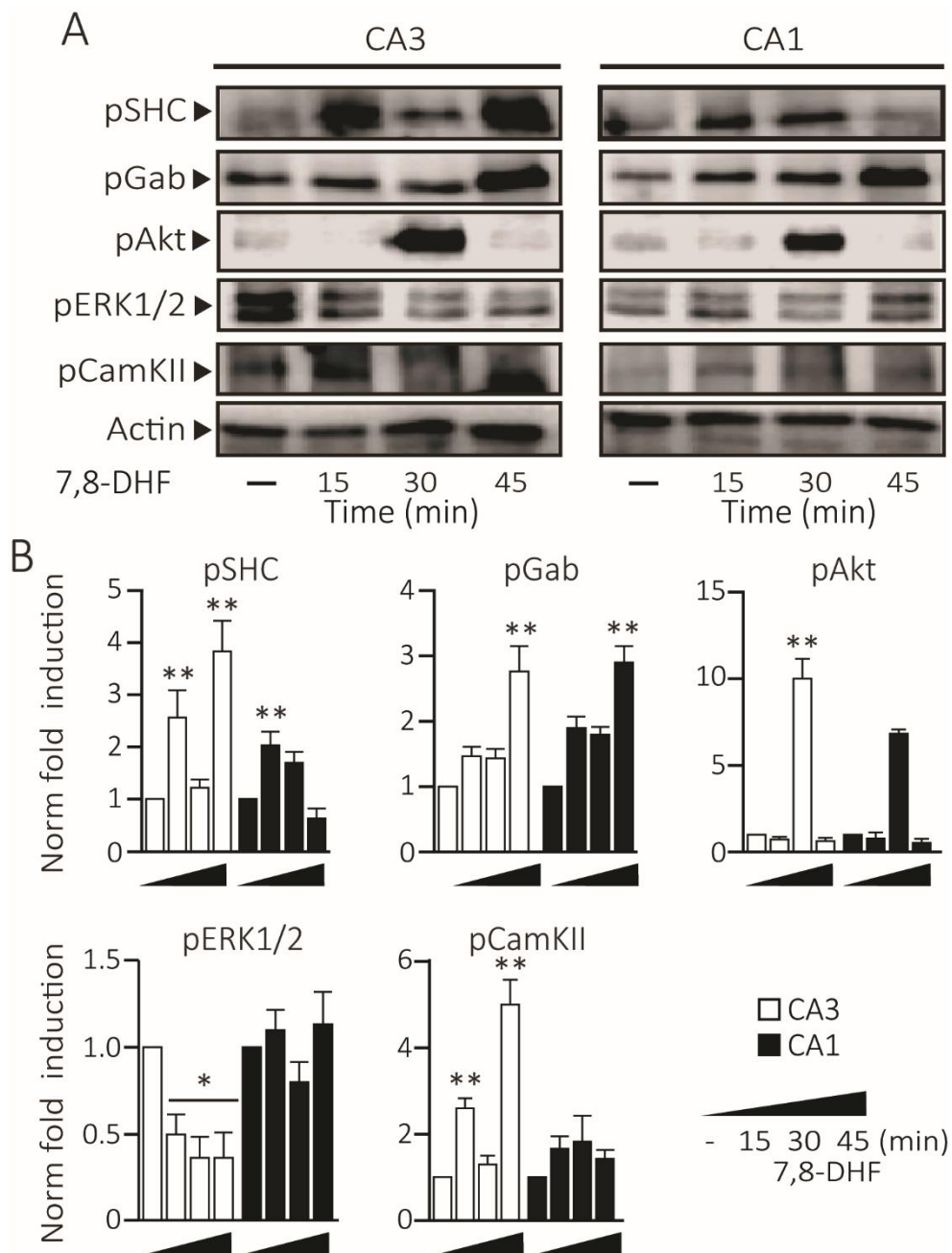


Figura 20. Vías de señalización activadas por el TrkB en la región CA3 y CA1 del Hipocampo.

A1) Western Blot representativo de lisados de la región CA3 y CA1 obtenidos de rebanadas preincubadas con 7,8-DHF mostrando el perfil de fosforilación de las proteínas SHC, Gab, AKT, CaMKII y ERK 1/2. **B2)** Gráfica de barras de la cuantificación por densitometría de los niveles de proteína de las diferentes vías de señalización ($n=4$, experimentos independientes). Análisis estadístico *T* de Student indicado con (*) una $p < 0.05$, (**) un valor de $p < 0.001$ y (***) $p < 0.0001$.

DR. EMILIO JAVIER GALVAN (Orcid ID : 0000-0002-9820-302X)

Article type : Research Report

Reviewers:

J. Josh Lawrence, Texas Tech University Health Sciences Center, USA [assisted by Karina Alvina] Sonia Gasparini, Louisiana State University Health Sciences Center, USA

Journal section: Clinical and Translational Neuroscience & Molecular & Synaptic Mechanisms

TrkB-mediated activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt cascade reduces the damage inflicted by oxygen-glucose deprivation in area CA3 of the rat hippocampus

Carolina Tecuatl,¹ Gabriel Herrera-López¹, Alejandro Martín-Ávila,^{1,2} Bocheng Yin,^{3,4} Stephen Weber,³ Germán Barrionuevo⁵ and Emilio J. Galván¹

¹Departamento de Farmacobiología
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
Calzada de los Tenorios No. 235, México City, 14330, México.

² Present address: Department of Neuroscience and Physiology, Skirball Institute, New York University School of Medicine. New York, NY. 10016, United States.

³Department of Chemistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania 15260, United States.

⁴Present address: Carter Immunology Center. University of Virginia School of Medicine, Charlottesville VA 22908

⁵Department of Neuroscience, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania 15260, United States

Running title: TrkB mediated-resistance to oxygen-glucose deprivation

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Emilio J. Galván

Departamento de Farmacobiología

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
Calzada de los Tenorios No. 235, Col. Granjas Coapa C.P. 14330

Phone/fax: (5255)54832878

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/ejn.13880

This article is protected by copyright. All rights reserved.