



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

---

**“EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA  
NEUROGÉNESIS EN EL ESTRIADO  
LESIONADO CON ÁCIDO KAÍNICO EN LA  
RATA HEMBRA ADULTA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRIA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**BIOL. YOANA DANIELA CANO SOTOMAYOR**

TUTOR: Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola

Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2006

**INSTITUTO DE  
NEUROBIOLOGÍA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por Yoana Daniela Cano Sotomayor, cuyo título es: “Evaluación del efecto de la lesión con ácido kaínico sobre la neurogénesis en el estriado de la rata hembra” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero

\_\_\_\_\_

Secretario (Tutor)

Dra. María Magdalena Giordano Noyola

\_\_\_\_\_

Vocal

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

\_\_\_\_\_

Suplente

Dra. Carmen Mejía Vázquez

\_\_\_\_\_

Suplente

Dra. Elisa Tamariz Domínguez

\_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_

Coordinador del Programa

## AGRADECIMIENTOS.

Agradezco enormemente a la Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por brindarme su apoyo, comprensión y confianza, por sus consejos tanto en el ámbito profesional como en lo personal. Además de ser una excelente tutora y un buen ejemplo a seguir.

A los Doctores Raúl Paredes Guerrero y Alfredo Varela Echavarría por pertenecer a mi comité tutorial, por sus críticas constructivas, asesoría y consejos durante la realización de mi proyecto de investigación.

A el apoyo técnico y académico brindado por las unidades del Instituto de Neurobiología. Unidad de Análisis de Imágenes, a la ISC. Nydia Hernández y M. en C. Leopoldo González; Biblioteca, a Bib. Pilar Galarza, Bib. Rafael Silva Cruz y al Bib. Ignacio Caballero Navarro; Bioterio, al MVZ. Martín García y al Lab. Roman Pacheco; Enseñanza, a M. en C. Leonor Casanova Rico. Además del apoyo técnico brindado por la Biol. Soledad Mendoza Trejo, Lab. Fernando Rodríguez Flores y Lab. Francisco Camacho Barrios.

Un especial agradecimiento a la Biol. Soledad Mendoza Trejo, por todo su apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio, por sacarme de apuros, por sus enseñanzas y su paciencia, por su compañerismo y amistad, y sobre todo por tener ese don de gente.

A la ISC. Elsa Nydia Hernández Ríos, agradezco muy especialmente, por su apoyo técnico para llevar a cabo una parte muy importante de mi proyecto. Por sus enseñanzas, pero en especial por su amistad, por hacerme esas largas jornadas de captura de imágenes más ligeras y agradables. Por hacerme reír, por escucharme y por sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio: Abraham Márquez, a mi compañera de ñoñes, Jana Mejía, Sol Mendoza, Claudia Castillo, Vero Rodríguez y Fernando Onofre por hacer que el trabajo más agradable, por sus comentarios, apoyo, por su amistad y por siempre estar dispuestos a ayudarme. A Fernando Rodríguez por su apoyo técnico. Muchas gracias por todo chicos Giordano!!

A todos los buenos amigos que encontré en el INB por brindarme su amistad, apoyo y su agradable compañía. A todos los Paredes: Juan Pablo MacGregor, Juan Pablo Medina, Paty Horsman, Rebeca Corona y Gina De Gasperín; a los Arellano: Víctor Urbina y Carlos Saldaña. A

Fabiola Morales, Víctor Pérez, Adriana de León, Abraham Márquez, Soledad Mendoza, Nydia Hernández, Evangelina Delgado, Bere Salazar, Argel Estrada, a la comunidad del Pavo: Jimena Sandoval, Miriam Hernández, Berta G, Frankerberger y Jeans Fernández.

Un especial agradecimiento por brindarme una amistad tan sincera, por ser unas personas tan transparentes y fáciles de querer, por todas los buenos momentos, por esas largas platicas, vivencias y sentimientos compartidos. Por ir al final de este camino juntos y por sus buenos consejos, a Fernando Rosas Sánchez y al que quedo maravillado con el Dr. Cano, Abraham Rosas Arellano.

*Una especial dedicatoria a:*

*A mis papás, a las personas más maravillosas que he conocido, por todo el amor que me han dado, por su apoyo incondicional, su confianza y comprensión. Por hacerme ser quien soy, por todas sus buenas enseñanzas y consejos. Por tantas oportunidades que me han brindado y por alentarme a alcanzar mis metas. Resumo todo en agradecerles por hacerme feliz y sobre todo, por que más que ser mis papás, por ser mis “mejores amigos”.*

*A ti Omar, por ser mi principal motor y motivación. Por enseñarme el significado de “amar” y ser la persona más especial en mi vida. Por tanto amor y hacerme feliz todo este tiempo; por apoyarme a seguir adelante, por tus palabras, y por tu comprensión. Gracias por tantos años a tu lado, en los que cada instante ha sido maravilloso. Gracias por ser como eres...*

*“Te amo”*

A mis hermanos Armando, por estar tan loco y hacerme reír tanto, y Samantha Cano, a los dos por todo lo que hemos compartido juntos; por apoyarme siempre que los he necesitado. Un agradecimiento especial a mi abuelita, por estar siempre en todo momento de nuestras vidas. A los tres, por sus palabras, cariño, por todo lo que me han dado que los hace tan especiales y por ser mi familia.

Un enorme agradecimiento a mis maravillosos amigos, a la “hermandad Biopuerquil”, por ser una parte muy importante para sacar adelante este proyecto. Por estar siempre presentes a pesar de la distancia, por todo su cariño, sus porras y ánimos. Por convertirse en parte de mi familia lo que los hace ser muy importantes en mi vida. Gracias por tantos momentos compartidos y por todo lo que hemos conocido y aprendido juntos. Por todas las vivencias tan fabulosas que nunca olvidaré. Gracias por ser mi apoyo y por todos sus consejos. Los quiero muchísimo a todos!!!! A Noé Villalobos, Víctor Loera, Marco Plancarte, Miguel Escobar, Selma Reza, Mariana Chávez, Gilberto Cuellar, Fernanda Zavala, Arikiza Pineda, Melina del Real, Carlos Bautista, Fernando Prieto, Erendira Cano, Claudia Rojas, Mayra Esparza, David Magaña, Mónica Legaspi, Sandra Martínez.

A mis bros del alma, Denise Robles, Hetzel Neria y Fabiola de Vierna, y mi cuñis Janeth Zúñiga. Por ser unas excelentes personas, por su maravillosa y valiosa amistad. Por tantos buenos momentos juntos en los que nos hemos divertido de lo lindo; y por los malos momentos también, en los que nunca me han dejado caer. Por ser mis consejeros y confidentes, por estar ahí en todo momento que los he necesitado. Por sus enseñanzas en todos los sentidos, gracias por todo su apoyo, porras y regaños. No saben lo importantes en mi vida, los quiero muchisisimo!!! Aunque ahora que recapacito, ustedes me deberían de estar dando las gracias por darles honor en primera de dignarme a dirigirles la palabra y en segunda de tener una súper mega master Diosa como yo de amiga.

A todos ustedes, gracias por hacerme tan afortunada por contar con amigos “verdaderos” como ustedes.

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
<b>1-NEUROGÉNESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)</b>	<b>6</b>
A. FACTORES Y MECANISMOS REGULADORES	6
B. USO DEL BrdU (Bromodeoxiuridina) COMO MARCADOR DE PROLIFERACIÓN CELULAR	10
<b>2- ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL ESTRIADO</b>	<b>14</b>
A. NÚCLEO CAUDADO	15
B. PUTAMEN	16
C. CITOLOGIA	16
D. COMPARTIMIENTOS DEL NEOESTRIADO	17
<b>3-NEUROPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE HUNGTINGTON.</b>	<b>18</b>
A. VULNERABILIDAD SELECTIVA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	19
B. LOCALIZACIÓN DE LA HUNTINGTINA EN EL CEREBRO CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON Y EN CONTROLES.	21
<b>4- CICLO ESTRAL DE LA RATA Y ESTRÓGENOS</b>	<b>22</b>
A. CICLO ESTRAL	22
B. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS ESTROGENOS	25
C. BIOSÍNTESIS DE LOS ESTRÓGENOS	26
D. RECEPTORES A ESTROGENO	27
E. EFECTOS PROTECTORES DEL ESTROGENO	30
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>35</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>1- EXPERIMENTO A</b>	<b>36</b>
A. RESULTADOS MÉTODO A	39
B. DISCUSIÓN MÉTODO A	46
C. CONCLUSIONES MÉTODO A	46

<b>2- EXPERIMENTO B</b>	<b>47</b>
A. RESULTADOS MÉTODO B	49
B. CONCLUSIÓN MÉTODO B	57
<b>3- EXPERIMENTO C</b>	<b>59</b>
A. RESULTADOS MÉTODO C	64
B. DISCUSIÓN MÉTODO C	82
C. CONCLUSIÓN MÉTODO C	85
<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b>	<b>85</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>86</b>

## **RESUMEN.**

Hasta la década pasada se tenía la evidencia de que el sistema nervioso central en individuos adultos, no tenía la capacidad de regeneración. Sin embargo, estudios recientes han mostrado la existencia de dos zonas neurogénicas en el cerebro adulto de algunos mamíferos, la zona subgranular (SGZ) en giro dentado del hipocampo y la zona subventricular en los ventrículos laterales (SVZ), en donde continuamente se están generando nuevas neuronas a partir de precursores neuronales. Se ha mostrado que el estrógeno tiene efectos neuroprotectores y neurogénicos en modelos *in vivo* de lesión. En este trabajo examinamos el papel neurogénico del estradiol a diferentes dosis farmacológicas, 25µEB/rata y 100µgEB/rata, en el modelo de lesión con ácido kaínico (AK) de la enfermedad de Huntington en rata. La generación de nuevas células y el fenotipo celular de las mismas en el estriado de la rata hembra adulta, así como en el ventrículo lateral y en el cuerpo calloso en diferentes niveles, fue determinada mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos dirigidos contra bromodeoxiuridina (BrdU) doblecortina (DCX) y la proteína acídica fibrilar glial (GFAP). El análisis estadístico del número de células BrdU (+) en dichas estructuras, muestra que el estradiol al menos en este modelo de lesión no induce proliferación celular por encima de la que induce la lesión con ácido kaínico. Los grupos sometidos al tratamiento con estradiol no presentaron una diferencia significativa en el número de células BrdU(+) en el hemisferio lesionado en comparación con el grupo control (0µgEB/rata).

## **ABSTRACT.**

Until the last decade it was thought that the adult central nervous system did not have the ability to generate new cells. However, recent studies have showed the existence of two areas of neurogenesis in the mammal adult brain, the subgranular zone (SGZ) in the hippocampal dentate gyrus and the subventricular zone (SVZ) lining the lateral ventricles. In these areas neurogenesis is observed due to the persistence of neuronal progenitors throughout life. The neuroprotective and neurogenic properties of estrogen have been demonstrated *in vivo*, following lesion. We examined the role of estradiol in neuronal proliferation at different pharmacological doses, 25µg estradiol/rat and 100µg estradiol/rat, using the kainic acid (AK) lesion rat model of Huntington's disease. Cell proliferation and phenotype of newborn cells was assessed with immunofluorescence using antibodies against bromodeoxyuridine (BrdU) and for doublecortin (DCX) and the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the adult female rat striatum, lateral ventricle and corpus callosum, at different levels. The statistic analysis for the number of BrdU(+) cells in these cerebral regions showed that the estradiol, at least in this lesion model, did not increase cellular proliferation beyond that induced by the AK lesion. The experimental groups treated with estradiol did not present a significant difference in the number of BrdU(+) cells compared with the control group (0µgEB/rat).

## INTRODUCCIÓN

Hasta la década pasada se tenía la creencia que la capacidad de regeneración del sistema nervioso central (SNC) adulto de mamíferos era muy limitada. Hasta ese momento la evidencia indicaba que los mecanismos predominantes de reparación en el SNC eran postmitóticos, tales como la expansión de las terminales axónicas, cambios en la expresión de receptores de neurotransmisores y la reorganización sináptica. A pesar de que se conocía que la microglía, astrocitos y oligodendrocitos normalmente se dividen en el adulto y responden al daño en el SNC de la misma manera, se consideraba que las neuronas no se replicaban. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que estas concepciones aceptadas por un largo tiempo no eran completamente ciertas, ya que se ha descubierto la existencia de zonas restringidas del cerebro de algunos mamíferos, en donde constantemente se generan nuevas neuronas a partir de células neurales troncales (Gage, 2002). Las células neurales troncales que tienen el potencial de dar origen a nuevas neuronas, astrocitos y oligodendrocitos se encuentran en diferentes regiones del sistema nervioso central adulto. Por ello cabe la posibilidad de que las células troncales endógenas puedan ser movilizadas para reemplazar a las neuronas perdidas en enfermedades neurodegenerativas, y que este reemplazo pueda funcionar como una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades del SNC (Markakis & Gage, 1999; Ormerod, Lee & Galea, 2003). Hasta el momento, los reportes de trabajos realizados en modelos de lesión indican que el reemplazo neuronal en el SNC es limitado por lo que es importante determinar los factores que están involucrados en este proceso para así optimizar la formación de nuevas células (Lie, Song, Colamarino, Ming & Gage, 2004). Con este fin, en el presente trabajo se evaluó si las lesiones estriatales con ácido kaínico inducen proliferación de células troncales endógenas en ratas hembra adultas y si esta proliferación se relaciona con los cambios en los niveles de estrógeno.

## ANTECEDENTES.

Debido a las implicaciones que tiene el hecho de que pueda haber una recuperación funcional después de una lesión en el sistema nervioso central (SNC), es importante conocer si en el SNC del adulto existen poblaciones de células troncales o células progenitoras que puedan continuar dividiéndose a lo largo de la vida. Por célula troncal se entiende una célula multipotencial de renovación propia, la cual puede generar un amplio repertorio fenotípico a través de divisiones simétricas y/ o asimétricas; mientras que el término progenitor se refiere a un precursor celular que también puede renovarse por sí mismo pero el cual presenta un potencial fenotípico mas restringido (Brown, Keynes & Lunmsden, 2001). Las células neurales troncales son células que dan origen a los tres tipos celulares principales del SNC: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Las células proliferativas pueden ser identificadas con autorradiografía o por inmunohistoquímica después de un pulso de marcaje en el cerebro adulto con timidina tritiada ( $TH^3$ ), bromodeoxiuridina (BrdU) o con retrovirus de replicación alterada con el gen *lacZ*. La diferenciación de su progenie puede ser observada inmediatamente con marcadores específicos para cada fenotipo como la enolasa neurona-específica (NSE) o la proteína ácida fibrilar de glia (GFAP). Estos métodos han revelado una población progenitora en la capa de células granulares en el giro dentado de la rata, a partir de la cual se generan neuronas maduras.

Constantemente se ha reportado neurogénesis en el adulto en la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral y en la zona subgranular hipocampal (SGZ) (Alvarez-Buylla, Seri & Doetsch, 2002; Arvidsson, Collin, Kirik, Kokaia & Lindvall, 2002; Garcia-Verdugo et al., 2002; Tattersfield et al., 2004; Ormerod et al., 2003). Algunas de las células recién generadas en dicha región, migran hacia el bulbo olfatorio en cadenas (Alvarez-Buylla et al., 2002) a través de la corriente migratoria rostral diferenciándose en interneuronas; mientras que otras neuronas permanecen en la SVZ, dividiéndose asimétricamente, una célula se divide y la otra mantiene la población celular. También se ha observado neurogénesis en el hipocampo del adulto (Brown et al., 2001). Otras regiones del cerebro han sido identificadas como neurogénicas, entre ellas la amígdala, el hipotálamo en el perrito de la pradera y en hamsters; así como el estriado, el septum

y el tálamo en ratas, además de la corteza y la substancia nigra de otros mamíferos adultos. No solamente se ha demostrado generación de nuevas neuronas en roedores, sino también en humanos y en primates en los cuales se ha observado en el giro dentado del hipocampo, amígdala y en la neocorteza (Li & Shen, 2005; Fowler, Freeman & Wang, 2003).

Las células progenitoras de las células granulares de la formación hipocampal, y giro dentado, se originan de la zona ventricular durante periodos cortos del desarrollo embriogénico en la rata (antes del E14). Estas células migran posteriormente al giro dentado en crecimiento, en donde continúan produciendo neuronas durante el desarrollo embriogénico y aún durante la vida adulta (Lie et al., 2004; Martoncikova, Racekova & Orendacova, 2006). En el hipocampo adulto, los progenitores neuronales están localizados en la zona subgranular (SGZ) en donde dan lugar a neuronas inmaduras. Existe un aumento transitorio de la proliferación celular en la SGZ después de isquemia y de una lesión excitotóxica y mecánica en el giro dentado del hipocampo, lo que lleva a un incremento transitorio en la neurogénesis hipocampal. Sin embargo, un gran número de estas neuronas recién generadas muere durante la primera y segunda semanas (Kempermann, Gast, Kronenberg, Yamaguchi & Gage, 2003).

Álvarez- Buylla y colaboradores (2002) han observado que los precursores primarios de neuronas tienen propiedades de astrocitos en mamíferos adultos y de glia radial en aves. Para que ocurra la neurogénesis en el adulto, los precursores primarios deben permanecer en las zonas germinales. Se cree que tanto los astrocitos como la glia radial no sólo tienen capacidad germinativa, sino también funciones estructurales y bioquímicas de apoyo para el neuroepitelio, ya que estudios recientes de desarrollo en aves y mamíferos, indican que la glia radial funciona como progenitor neuronal y quizá represente células troncales. La glia radial se ha considerado como progenitor de los astrocitos y sirve de guía para la migración de neuronas jóvenes desde la zona subventricular.

La composición celular de la SVZ en el cerebro adulto se ha descrito de la siguiente manera: los neuroblastos de la SVZ (células tipo A) migran en cadenas a través de un sistema de vías distribuidas a lo largo de la pared de los ventrículos laterales. Estas cadenas están rodeadas por células tipo B de lenta proliferación que tienen propiedades de astrocitos. Además, alrededor

de las cadenas de células tipo A, existen agrupaciones dispersas de células de división rápida tipo C. La SVZ se encuentra separada de la luz del ventrículo por una capa de células endodiales ciliadas. Varias de las cadenas de células tipo A se unen en la SVZ anterior y dorsal formando una vía restringida llamada vía o corriente migratoria rostral (RMS, por sus siglas en inglés). La RMS es la vía a través de la cual los neuroblastos migran de la SVZ al bulbo olfatorio, en donde los neuroblastos se diferencian en neuronas granulares y periglomerulares (Alvarez-Buylla et al., 2002).

Se ha observado que después de la infusión de la droga antimetabólica, citosina- $\beta$ -D arabinofuranosida (Ara-C) dentro del cerebro adulto de ratón, los neuroblastos (células A) y las células C de división rápida son eliminadas. Al retirar dicha droga antimetabólica los astrocitos comienzan a dividirse dando lugar a las células tipo C, las cuales a su vez generan a los neuroblastos, lo cual es otra evidencia que los astrocitos en la SVZ actúan como precursores neuronales (Alvarez-Buylla et al., 2002; Tattersfield et al., 2004).

Avances recientes en la identificación de los tipos celulares que contribuyen al ambiente neurogénico han permitido estudiar la relación entre diferentes señales implicadas en la regulación de la neurogénesis en el adulto. Los aspectos de la neurogénesis que se han estudiado incluyen el tamaño de la reserva proliferativa, el destino de las células troncales adultas, y la sobrevivencia de las neuronas recién generadas. Los factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores son algunas de las señales implicadas en esta regulación. La relación entre estos diferentes factores no está clara, no se sabe si éstos juegan un papel fisiológico en la regulación de la neurogénesis o si actúan sobre las células progenitoras a través de señales secundarias (Lie et al., 2004). Los mecanismos por medio de los cuales los esteroides regulan la proliferación celular en el adulto aún no se conocen del todo; sin embargo, ya que las hormonas esteroides son capaces de alterar la transcripción genética, se podría especular que el estrógeno puede inducir o facilitar la proliferación celular de manera directa o indirecta. Por ejemplo Fowler y cols. (Fowler et al., 2003) mostraron que en respuesta a hormonas esteroides, los astrocitos pueden secretar factores neurotróficos como el BDNF el cual, aumenta la proliferación y sobrevivencia celular en el cerebro adulto.

Se ha observado que en la enfermedad de Huntington (EH) en el humano, se presenta un incremento de la proliferación celular en la capa subependimal (Curtis et al., 2003). En esta enfermedad neurodegenerativa existe un defecto genético en el gen IT15, presente en el cromosoma 4, el cual codifica para la proteína llamada huntingtina. Dicha mutación consiste en que se presenta un número mayor de repeticiones del triplete CAG, más de 40, del que se encuentra en individuos sin la enfermedad. El número de repeticiones, se relaciona con la edad de inicio y con la severidad de la enfermedad. La huntingtina es una proteína predominantemente citosólica, la cual se expresa ampliamente en el cerebro y está altamente conservada filogenéticamente. Esto indica que la huntingtina juega un papel importante durante el desarrollo embrionario incluyendo neurogénesis, gastrulación y la formación de tejido extraneuronal, sin embargo, necesita aclararse el rol preciso de la huntingtina (Wanker & Dröge, 2002). Con el propósito de entender si en los modelos de desórdenes neurodegenerativos se presenta la neurogénesis en respuesta a la pérdida celular y el posible papel de estas nuevas células se han llevado a cabo estudios en ratas adultas. Estos estudios revelan que la lesión estriatal con ácido quinolínico (AQ) produce un incremento significativo en la proliferación en la SVZ ipsilateral (Tattersfield et al., 2004).

Existen otros tipos de insultos en el estriado que también estimulan la proliferación celular. Así, Arvidsson y cols. (2002) han demostrado que un infarto provocado por la oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas adultas, provoca un incremento marcado en la proliferación celular en la SVZ. Las nuevas neuronas generadas como consecuencia del infarto, así como neuroblastos (probablemente formados antes del insulto) migran hacia el área dañada en el estriado, donde expresan marcadores de neuronas estriatales medianas espinosas. Estos autores proponen que las neuronas que han muerto por isquemia, transmiten señales a nuevas neuronas para que migren hacia el área dañada del estriado. Sin embargo, la naturaleza de las moléculas señalizadoras es desconocida. También es de notar que existe una baja sobrevivencia de las neuronas recién formadas que migran hacia el estriado, esto pudiera deberse a un ambiente desfavorable con poco soporte trófico y pocas conexiones y/o a acciones nocivas del tejido severamente dañado.

Es prematuro concluir que el incremento de la neurogénesis es suficiente para regenerar el circuito lesionado a través del reemplazo celular. No existe evidencia directa de que las neuronas recién generadas estén reemplazando a las neuronas que degeneran debido a la lesión y por otro lado no ha sido probado que la generación de nuevas neuronas en áreas neurogénicas esté o no relacionada con la recuperación funcional (Lie et al., 2004).

Para que la neurogénesis inducida por una lesión sea ventajosa, las neuronas recién generadas deberían sobrevivir, integrarse apropiadamente dentro del circuito neuronal lesionado, llevar a cabo funciones similares a las neuronas que se han perdido debido a la enfermedad y ser generadas en cantidades comparables al número de neuronas que se han perdido. Varios estudios sugieren que los factores y mecanismos reguladores de la proliferación, migración neuronal, diferenciación, sobrevivencia y conectividad presentes durante el desarrollo son reactivados en el ambiente lesionado del adulto lo que podría favorecer la integración de las nuevas células (Lie et al., 2004).

## **1- NEUROGÉNESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)**

### **A- FACTORES Y MECANISMOS REGULADORES.**

Murashov y cols. (2004) han demostrado que existe una regulación substrato dependiente del estrógeno en la inducción de la diferenciación neuronal de células troncales embriogénicas. Por otro lado, estudios recientes sugieren que el estrógeno puede influir sobre el incremento celular alterando el rango de proliferación, desarrollo, maduración sobrevivencia y función (Brannvall, Korhonen & Lindholm, 2002) de varios tipos de neuronas recién generadas. El estrógeno puede jugar un papel en la plasticidad sináptica (densidad y complejidad sináptica) y modulación de corrientes iónicas en neuronas y células gliales (Azcoitia, Fernandez-Galaz, Sierra & Garcia-Segura, 1999). En ratas hembra adultas, el estrógeno incrementa la formación de espinas dendríticas, sinaptogénesis y neurogénesis en la formación del hipocampo (Ormerod et al., 2003; Smith, Pencea, Wang, Luskin & Insel, 2001). El incremento de neurogénesis debido al estrógeno, se ha demostrado en experimentos con ratas ovariectomizadas en donde el grado de

neurogénesis se ve disminuido, en comparación con ratas intactas durante la fase de proestro cuando los niveles de estrógeno son los más altos (Ormerod et al., 2003; Smith et al., 2001). Como ya se mencionó anteriormente, el estrógeno regula la expresión del (BDNF) y posiblemente otras neurotrofinas las cuales fomentan la proliferación y sobrevivencia de células derivadas de la SVZ en ratas adultas (Smith et al., 2001). Por otro lado, Azcoitia y cols (1999) han observado que las lesiones con ácido kaínico (KA) producen la muerte de neuronas sensibles como las interneuronas musgosas y neuronas somatostatinérgicas del hilus del giro dentado y que la administración de estradiol en ratas hembra protege de la acción excitotóxica del KA, observándose una acción neuroprotectora por parte del estrógeno.

Ormerod y cols. (Ormerod et al., 2003) observaron que en el giro dentado del perrito de la pradera (*Microtus pennsylvanicus*) y en ratas hembra adultas, que el número de células en división marcadas con bromodeoxiuridina (BrdU) incrementa a las 4 hr, y disminuye a las 48 hr después de la administración de estradiol a una dosis de 10µg. Aparentemente, el estradiol incrementa la proliferación celular. Aunque estos autores proponen que la reducción en el número de células en proliferación a las 48 hr puede estar mediada por los niveles circulantes de corticoesterona (CORT), sus resultados no son concluyentes y es posible que la reducción se deba a que el efecto del estradiol cesa.

Existe evidencia de que el estradiol aumenta la proliferación celular mediante la activación de la serotonina (5-HT), estudios realizados por Banasr y cols. (2001) sugieren que la 5-HT regula la estimulación de la proliferación celular en el giro dentado de la rata hembra adulta inducida por estrógenos, ya que la administración del precursor de serotonina restablece la proliferación celular, reducida como resultado de la ovariectomía, mientras que el estradiol por sí mismo no es capaz de revertir la disminución inducida por la ovariectomía en animales tratados con el inhibidor de la síntesis de serotonina (*p*-clorofenilalanina, PCPA).

Estudios en el perrito de la pradera (*Microtus ochrogaster*) adulto, han demostrado que las células recién generadas, marcadas con BrdU son principalmente células con fenotipo neuronal en vez de fenotipo glial. Se ha sugerido que los niveles elevados de estrógeno en suero están asociados con la inducción del estro y son responsables del incremento en el número de

células marcadas con BrdU en la SVZ, así como de favorecer la sobrevivencia de las células que migran hacia el bulbo olfatorio a través de la corriente migratoria rostral (Smith et al., 2001).

Como se ha mencionado, estos estudios sugieren una correlación positiva entre los niveles de estrógeno circulante y la proliferación celular. Tanapat y cols. (1999) mostraron que el número de células en proliferación fluctúa a lo largo del ciclo estral, siendo mayor en el proestro. Además encontraron una correlación negativa entre los niveles circulantes de estrógeno y el número de células picnóticas, lo que sugiera que el estrógeno también tiene efectos sobre la sobrevivencia celular. No sólo estimula la proliferación neuronal sino también tiene importantes efectos en la sobrevivencia. García Segura y cols (2001), proponen que el estradiol puede afectar directamente la sobrevivencia celular a través de diversas rutas. Entre ellas al actuar sobre cascadas de señalización relacionadas con la muerte celular, a través de su actividad antioxidante celular o mediante la inducción de brotes axonales en axones lesionados.

Es probable que la vasculatura o factores sanguíneos sean reguladores de la neurogénesis, ya que análisis anatómicos han identificado a la vasculatura como un candidato para constituir un nicho neurogénico; se han encontrado agrupaciones de células proliferativas próximas a los vasos sanguíneos (Palmer, Willhoite & Gage, 2000). El descubrimiento de que factores que promueven la proliferación de células del endotelio, también incrementan la neurogénesis en el cerebro anterior de mamíferos, sugiere una importante relación entre estos dos procesos, angiogénesis y neurogénesis, los cuales están estrechamente relacionados en el hipocampo (Zhu, Jin, Mao & Greenberg, 2003). Las hormonas como la testosterona y el estrógeno también están relacionadas con la angiogénesis. La testosterona en particular induce la división de células endoteliales, las cuales, representan una fuente importante de factores trófico, entre los cuales están el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-1) que son potentes mitogénicos para las células progenitoras neurales así como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor angiogénico interleucina-8 (IL-8), los cuales actúan como factores de sobrevivencia para las neuronas recién generadas. Las neuronas endoteliales humanas secretan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en cantidades suficientes para llevar a cabo la diferenciación neuronal en la zona ventricular adulta (Louissaint, Rao, Leventhal & Goldman, 2002).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína angiogénica con efectos neurotróficos y neuroprotectores. Jin y cols. (2002) reportan que además, estimula la proliferación de precursores neuronales obtenidos de cultivos de células corticales (E-16) e *in vivo* en la rata adulta. La administración intracerebroventricular de VEGF en la rata incrementa el número de células marcadas con BrdU en la SVZ y en la SGZ del giro dentado del hipocampo, incluyendo neuronas inmaduras, glia y células endoteliales. El VEGF actúa directamente sobre las neuronas teniendo efectos neurotróficos y neuroprotectores (Jin et al., 2002). Estimula el crecimiento axonal y mejora la sobrevivencia de neuronas de la raíz dorsal de los ganglios basales, aumenta la sobrevivencia de neuronas mesencefálicas en explantes organotípicos, reduce la muerte por hipoxia, además se ha observado en cultivos de neuronas hipocampales que tiene efectos neuroprotectores contra la toxicidad glutamatérgica, por otro lado se ha mostrado que la inhibición de VEGF conduce a la apoptosis en cultivos de células corticales. También se ha observado que el VEGF estimula la neurogénesis *in vitro* e *in vivo*. Su efecto *in vitro* parece estar mediado por los receptores VEGFR2/Flk-1, su efecto *in vivo* se ha observado en las principales regiones neurogénica, la SVZ y SGZ, en donde también predominan dichos receptores (Jin et al., 2002). La capacidad del VEGF en la inducción de proliferación neuronal puede ser de gran ayuda lesiones cerebrales, particularmente en lesiones isquémicas en donde la expresión de VEGF se incrementa lo que lleva a la angiogénesis y neurogénesis promoviendo una recuperación y reparación cerebral (Jin et al., 2002).

Por otro lado, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) también es capaz de estimular la proliferación, Palmer y cols. (1995) reportan que dicho factor induce proliferación de progenitores neuronales y gliales aislados del septum y del estriado de la rata adulta, los cuales son similares de aquellos aislados de la zona ventricular y el hipocampo adulto. El FGF-2 *in vitro*, juega un papel muy importante como mitogénico en reclutar y mantener las células progenitoras como una población proliferativa; además de modular el destino celular de células comprometidas. La amplia distribución de FGF y su receptor en regiones proliferantes y no proliferantes apoya el papel pleiotrópico en el SNC (Palmer et al., 1995).

Otro factor con efectos mitogénicos en el cerebro adulto, es el factor de crecimiento endotelial (EGF). La administración intracerebroventricular en la rata adulta induce un gran

aumento en la proliferación de células precursoras en la SVZ, a lo largo de todo el ventrículo lateral, así como en áreas adyacentes, particularmente en el estriado, la corteza y el septum. Este factor parece favorecer la generación de células gliales (Kuhn, Winkler, Kempermann, Thal & Gage, 1997).

Por otro lado, Lim y cols. (2000) reportan que las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) que junto con sus receptores (BMPRs) se expresan en las células de la SVZ inhiben la neurogénesis *in vivo* e *in vitro*, al bloquear la producción de neuronas y favorecer la diferenciación glial. Este efecto se bloquea con el polipéptido Noggin que se une a las BMPs inhibiendo su unión con el receptor correspondiente. Por consiguiente proponen que la producción de Noggin crea un ambiente neurogénico en la región adyacente a la SVZ a través del bloqueo de la señalización endógena de las BMP (Lim et al., 2000).

Se ha sugerido que las características de la población local de astrocitos juega también un papel importante en la creación de un ambiente neurogénico. En el hipocampo adulto, los astrocitos regulan activamente la neurogénesis promoviendo la proliferación de células progenitoras neuronales. Además de la regulación de la proliferación y el destino específico de las células troncales adultas, los astrocitos del hipocampo también contribuyen a la maduración y formación de sinapsis de las neuronas recién generadas (Song, Stevens & Gage, 2002).

## B- USO DEL BrdU (Bromodeoxiuridina) COMO MARCADOR DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

El BrdU es un marcador de división celular (fase S del ciclo celular) el cual ha sido utilizado ampliamente para detectar neurogénesis en el adulto. Es un análogo de la timina, reemplazando en la división celular la timina por la uridina. El BrdU en contraste con otras técnicas las cuales se basan en la identificación de proteínas relacionadas con el ciclo celular, captura el momento en que el compuesto se encuentra circulando en el torrente sanguíneo, no las condiciones cuando el animal es sacrificado. Lo que permite identificar las nuevas células postmitóticas, las cuales se están dividiendo en el momento de la inyección de BrdU.

Como se ha mencionado, nuevas neuronas se generan continuamente en el hipocampo, se han realizado estudios en el ratón marcando células en división con bromodeoxiuridina (BrdU) durante doce días y se encuentra que a partir de la última inyección del marcador, la población que lo expresa, se mantiene estable a lo largo de 11 meses (Kempermann et al., 2003) lo cual indica que la adición de nuevas neuronas no es transitoria, y que su número y localización final está determinada de manera temprana. Por el contrario, la expresión de marcadores neuronales inmaduros como  $\beta$ -III-tubulina y doblecortina (DCX) presentan su pico máximo inmediatamente después de la división y no es detectable después de cuatro semanas (Kempermann et al., 2003).

Cameron y cols (2001) han demostrado que administraciones únicas de BrdU en el giro dentado, a altas dosis el BrdU (300mg/kg) es un marcador específico, cuantitativo y no tóxico de células en división en ratas adultas, mientras que a bajas dosis, en una única administración (50 y 100mg/kg) solamente marca una fracción de las células en fase S, ambas dosis. Frecuentemente en estudios de neurogénesis, se emplean dosis bajas para detectar neurogénesis. Sin embargo, se ha observado que el número de células BrdU (+) incrementa conforme se aumenta la dosis (hasta 300mg/kg) 24 hrs después de la última inyección de BrdU, lo cual sugiere que las dosis de BrdU comúnmente empleadas no marcan visiblemente todas las células en fase S. No se ha observado la existencia de diferencias significativas entre dosis bajas de 50 y 100mg/kg en el número de células marcadas con BrdU, mientras que a una dosis de 300mg/kg de BrdU, el número de células que incorporan este marcador mitogénico es más del doble que el valor obtenido con 50mg/kg. Por otro lado, se ha observado que existe una meseta en el número de células marcadas con BrdU y que ésta puede ser detectada utilizando 300mg/kg, ya que no se han observado diferencias significativas en el número de células BrdU (+) a dosis mayores a esta concentración.

Se había pensado que el BrdU probablemente no era un marcador absolutamente específico para células en división, sino que podría estar marcando también neuronas que están reparando pequeñas cantidades de ADN. Sin embargo, se ha observado el doble del número de células BrdU (+) después de 24 hrs a una dosis de 300mg/kg y 600mg/kg, en comparación a las 2hr después de la última inyección con BrdU. La mayoría de estas células aparecen en parejas, lo cual sugiere la presencia de células hijas, esto argumenta en contra de la posibilidad que parte del marcaje con BrdU ocurra como resultado de la reparación de ADN en vez de la síntesis de ADN

(Cameron & McKay, 2001). Las pequeñas cantidades de BrdU que podrían estar incorporándose a las neuronas debido a la reparación de ADN, no es detectable utilizando altas dosis de BrdU. Además, se requieren altas dosis sistémicas de BrdU para un óptimo marcaje de células en fase S en el cerebro adulto en comparación al cerebro embriogénico, debido probablemente a la barrera hemato-encefálica, la cual se desarrolla alrededor del día postnatal 10 en la rata y limita la entrada de BrdU al cerebro. Dado que la barrera hemato-encefálica es muy selectiva en la rata en comparación con otras especies, se cree que el BrdU al igual que la timidina tritiada entran al cerebro a través de facilitación de baja afinidad y transporte activo (Cameron & McKay, 2001).

Ya que las técnicas para detectar neurogénesis tienen sus limitantes, como la pérdida de señal de BrdU con divisiones celulares subsecuentes, se han utilizado otro tipo de marcadores como la DCX en el adulto. La expresión de este marcador se mantiene dentro de las áreas de continua actividad neurogénica en el cerebro adulto. Se ha cuantificado el número de células BrdU (+) que coexpresan DCX dentro del giro dentado y a las dos horas después de la administración de BrdU, se observa un co-marcaje con DCX de alrededor del 60% de las neuronas recién generadas (Brown et al., 2003). Brown y cols (2003) observan el pico máximo (>90%) de células BrdU (+) que expresan DCX alrededor de los 4 y 7 días después de la administración. La expresión de DCX disminuye rápidamente, observándose en sólo el 2% de las células positivas a BrdU al mes y no siendo detectables a los dos meses después del marcaje (Brown et al., 2003).

En el estadio final de la diferenciación neuronal, las células recién generadas comienzan a expresar proteínas que se presentan típicamente en neuronas maduras como el marcador nuclear neuronal (NeuN), enolasa neuronal específica (NSE) o calbindina. Se han detectado células BrdU (+) e inmunorreactivas a NeuN en el hipocampo a los 10 días después de la inyección de BrdU. La mayoría de las células NeuN (+) coexpresan DCX entre los 10 y 14 días, posteriormente el co-marcaje no es detectable. El porcentaje de células BrdU (+) que expresan NeuN aumenta aproximadamente al 80% al mes después la administración y a más del 90% a los 6 meses (Fig, (1) (Brown et al., 2003).

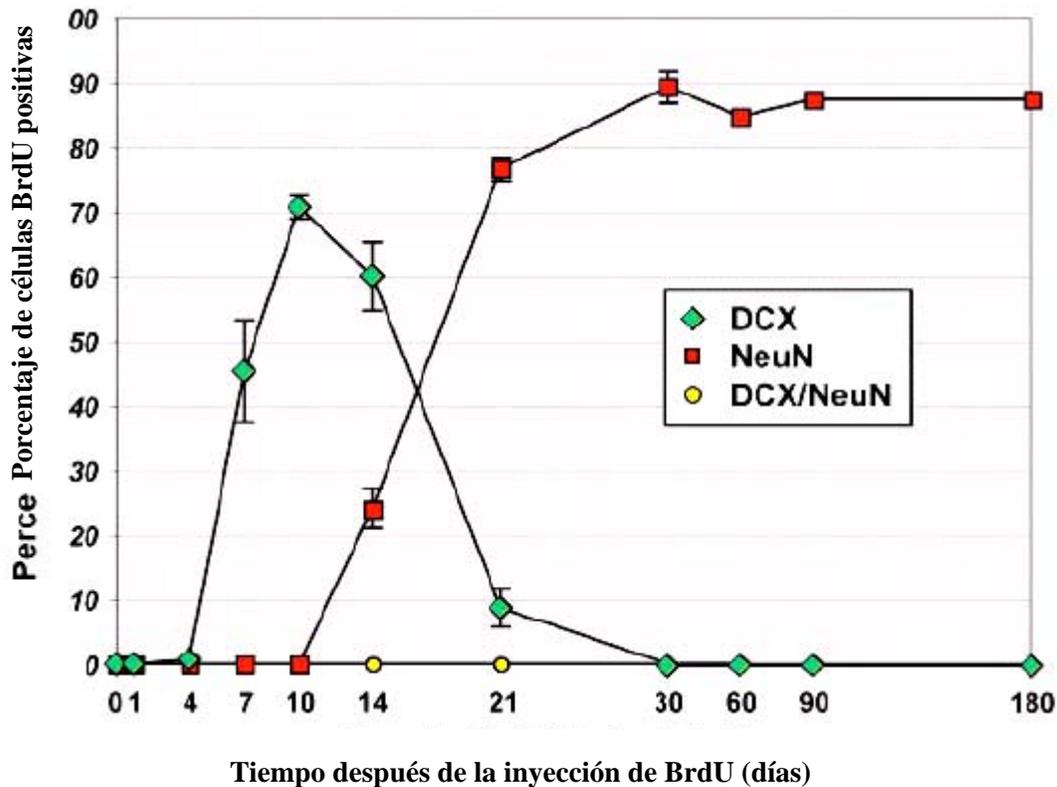


Fig (1). El curso temporal representa el porcentaje de células bromodeoxiuridina (BrdU)-inmunopositivas, comarcadas para doblecortina (DCX) solamente (rombos verdes), NeuN (marcador neuronal nuclear) solamente (cuadros rojos) o DCX y NeuN (círculos rojos) en el bulbo olfatorio de rata adulta. Tomada de (Brown et al., 2003).

Las neuroblastos recién generados del bulbo olfatorio provienen de la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral. Las nuevas células forman cadenas de migración celular, las cuales convergen en la vía migratoria rostral (RMS). Después de llegar al bulbo olfatorio, las células se integran a la capa granular y a la región periglomerular comenzando a expresar marcadores neuronales maduros. Las células BrdU (+) provenientes de la SVZ son detectadas en el bulbo olfatorio de manera inicial a los cuatro días después del marcaje con BrdU. Este intervalo refleja el tiempo que requieren los neuroblastos para migrar de la SVZ al bulbo olfatorio. A los 4 días después del marcaje, solamente el 2% de las células BrdU(+) en el bulbo olfatorio expresan

DCX. Este porcentaje es bajo ya que la mayoría de las células BrdU(+) observadas en el bulbo son resultado de la división *in situ* de células no neuronales. Durante los siguientes días, el porcentaje de células BrdU (+) que expresan DCX incrementa rápidamente. Diez días después del marcaje aproximadamente el 70% de las células BrdU(+) en el bulbo olfatorio expresan DCX. Al mes es muy difícil encontrar células BrdU(+) que expresen DCX en el bulbo olfatorio, mientras que la colocación de NeuN en células marcadas con BrdU es detectada a los 14 días después de la inyección de BrdU, en este momento es del 24%. El porcentaje de expresión de NeuN en células marcadas con BrdU incrementa hasta un 90% después de 1 mes de la administración de BrdU (Brown et al., 2003).

## **2- ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL ESTRIADO**

Dentro de los ganglios basales, los cuales son masas nucleares subcorticales derivadas principalmente del telencéfalo se encuentra el cuerpo estriado. En la rata el estriado es una gran masa gris que ocupa la región más profunda de los hemisferios cerebrales. El estriado está conformado por el núcleo caudado y el putamen. Además, los ganglios basales también están constituidos por el globo pálido, tálamo y el complejo nuclear amigdalino (Carpenter, 1994). Sin embargo, en la actualidad estas dos últimas estructuras se excluyen de los ganglios basales a pesar de que contribuyen directamente al control de la actividad motora. Mientras que el núcleo subtalámico y la sustancia nigra son considerados como parte de los ganglios basales ya que están relacionados con el circuito neuronal estriatopalidal (Heimer, Zahm & Alheid, 1995).

Estudios clínicos e investigaciones experimentales indican que los ganglios basales están relacionados con varios aspectos del comportamiento psicomotor en humanos, lesiones en los ganglios basales (GB) a diferentes niveles provocan varios desórdenes desde hipocinesia hasta hipercinesia, como la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington, además de un deterioro intelectual y emocional en esta última (Parent, Janumpalli, McNamara & Lowenstein, 1998). La enfermedad de Parkinson además se caracteriza por trastornos cognoscitivos y disfunción motora, lo cual se atribuye a la pérdida de células dopaminérgicas en los GB (Ostrosky-Solis, 2005).

La estructura del núcleo caudado en el humano presenta forma de “C” y se encuentra en relación con el ventrículo lateral. Los dos segmentos paralelos del globo pálido están dispuestos medialmente al putamen, y se encuentran separados entre sí por las láminas medulares que poseen neuronas colinérgicas (Carpenter, 1994).

El neostriado recibe aferencias de varias regiones, entre ellas la mayor parte de la corteza cerebral, el complejo nuclear centromediano-parafascicular (CM-PF) del tálamo, la sustancia nigra y algunas regiones de la amígdala central. Los sistemas aferentes al neostriado se relacionan con diferentes neurotransmisores. Entre ellos acetilcolina, monoaminas, péptidos y aminoácidos. La alteración de la síntesis y la transmisión de los neurotransmisores que intervienen en funciones del neostriado constituye una característica importante en los trastornos relacionados con dos formas de discinesia: el Parkinson y la enfermedad de Huntington (Carpenter, 1994).

#### A- NÚCLEO CAUDADO.

El núcleo caudado es una masa gris alargada y arqueada, relacionada en toda su extensión con la superficie del ventrículo lateral. Su porción anterior más ancha, denominada cabeza, se ubica rostralmente al tálamo y sobresale en el interior del asta anterior del ventrículo lateral. La cabeza del núcleo caudado y el putamen están separados por fibras del brazo anterior de la cápsula interna en algunos mamíferos, incluyendo los primates (Carpenter, 1994). En la rata y otros roedores, la cápsula interna está poco desarrollada observándose como un espacio uniforme de fibras en vez de capas continuas de fibras, lo que disminuye la diferenciación entre el núcleo caudado y el putamen (Heimer et al., 1995). El cuerpo del caudado se extiende a lo largo del borde dorso lateral del tálamo del cual está separado por la estría terminal y la vena terminal, por lo cual se considera esta parte del núcleo como supratalámica. La cola del núcleo caudado es la porción caudal afinada que se extiende dentro del lóbulo temporal en el techo del asta inferior del núcleo lateral y entra en relación con el núcleo central del complejo amigdalino (Carpenter, 1994).

## B- PUTAMEN.

Es un núcleo de gran tamaño y se encuentra dispuesto lateralmente dentro de los ganglios basales, entre la cápsula externa y la lámina medular lateral del globo pálido. A su vez el putamen se encuentra por debajo de la corteza insular separado por la cápsula extrema, el claustro y la cápsula externa. El putamen es atravesado por numerosos fascículos de fibras mielínicas que corren en dirección ventromedial hacia el globo pálido. El núcleo caudado y el putamen tienen continuidad rostroventral, por debajo del brazo posterior de la cápsula interna, y en regiones dorsales delgados puentes celulares grises atraviesan el brazo posterior de la cápsula interna. A nivel del septum, el núcleo accumbens se encuentra adyacente a las porciones ventromediales del estriado (Carpenter, 1994). En los roedores el núcleo caudado y el putamen no se encuentran separados por la cápsula interna y forman una sola estructura conocida como cuerpo estriado (Heimer et al., 1995).

## C- CITOLOGIA.

La citología del núcleo caudado y del putamen es idéntica, están compuestos por un gran número de células que no están laminadas ni muestran algún acomodo particular. El estriado no es tan uniforme como pareciera, ya que en su desarrollo células de diferentes tipos migran en grupos, los marcadores histoquímicos tienen una distribución irregular y las neuronas eferentes muestran cierta separación. Así, el estriado presenta una organización celular característica llamada parche-matriz, que se describirá con mayor detalle en los siguientes apartados. Las células del neostriado se dividen en dos grandes grupos: las neuronas medianas espinosas y las interneuronas (Carpenter, 1994; Gerfen, 1992).

Las neuronas medianas espinosas son las más abundantes en el neostriado (90- 95%), son redondas u ovals, de tamaño mediano, emiten numerosas dendritas primarias cubiertas con espinas, estas células poseen axones largos. Existen dos tipos de neuronas espinosas en el neostriado: las neuronas espinosas de tipo I, las cuales están presentes en grandes cantidades, tienen somas lisas y dendritas proximales espinosas, las dendritas irradian en un espacio esférico de 200µm. Los axones largos de estas células dan origen a colaterales proximales y distales. Las

neuronas de tipo II, suelen ser más grandes, con dendritas espinosas que se extienden 600µm desde los somas. Los axones de las neuronas espinosas tipo II son largos y emiten colaterales cerca de los somas. Las neuronas espinosas del estriado sirven como células receptoras y de proyección. La mayor parte de las aferentes de diversas procedencias terminan en las prolongaciones espinosas de estas neuronas. Todas las fibras que se proyectan fuera del neostriado se originan en neuronas espinosas del neostriado. Las neuronas espinosas del neostriado contienen ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), y un neuropéptido ya sea sustancia P o encefalina. Las neuronas del neostriado presentan más de un tipo de neurotransmisor y en diversas combinaciones. Sin embargo el GABA es el neurotransmisor predominante, a pesar de la heterogeneidad química (Carpenter, 1994; Gerfen, 1992; Parent & Hazrati, 1995).

Las neuronas no espinosas tienen axones cortos y no presentan proyecciones fuera del neostriado. Se han descrito tres tipos de neuronas Golgi tipo II de axón corto. La neurona no espinosa tipo I se distingue por su pequeño tamaño, dendritas varicosas y recurrentes y un axón corto muy ramificado. Un gran número de neuronas no espinosas tipo I son GABAérgicas, aunque muchas de estas neuronas son inmunorreactivas al neuropéptido Y, y a la somatostatina. Las neuronas no espinosas tipo II tienen somas grandes, núcleos excéntricos y dendritas que se prolongan más de 250 µm. Estas neuronas corresponden a una subpoblación de neuronas gigantes distribuidas uniformemente por todo el neostriado. Las neuronas no espinosas tipo II presentan colina acetiltransferasa y acetilcolinesterasa. Las neuronas no espinosas colinérgicas gigantes del neostriado, establecen sinapsis simétricas con neuronas medianas espinosas, que son el principal destino de las terminaciones dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra. El balance entre los niveles de dopamina y acetilcolina en el estriado parece ser necesario para el funcionamiento normal del estriado (Kawaguchi, 1993; Parent & Hazrati, 1995).

#### D- COMPARTIMENTOS DEL NEOESTRIADO.

El neostriado está organizado en compartimentos químicamente distinguibles relacionados con la organización de conexiones aferentes y eferentes, y con sustancias transmisoras particulares. La división histoquímica del neostriado se ha mostrado para diversos neuropéptidos y enzimas relacionadas con transmisores. La existencia de estos compartimientos se observó con el método

histoquímico de la acetilcolinesterasa. Se han descrito dos tipos de compartimientos en el estriado como “parche” (estriosomas) y la “matriz”. Los parches se caracterizan por un gran número de receptores a opiáceos, son inmunorreactivos a sustancia P, neurotensina y tirosina hidroxilasa. En la matriz se identifican altos niveles de acetilcolinesterasa, somatostatina, receptores de neurotensina y terminaciones de proyecciones talámicas. Las áreas corticales prefrontal, del cíngulo y motora envían proyecciones tanto a los parches como a la matriz (Gerfen, 1992).

Durante el desarrollo temprano se producen cambios en la organización de los compartimientos del neostriado. En el feto se presenta acetilcolinesterasa y dopamina en los parches, mientras que en el periodo postnatal la acetilcolinesterasa se encuentra principalmente en la matriz. Los receptores a opiáceos, se encuentran distribuidos difusamente en el periodo prenatal y posnatalmente se encuentran presentes en los parches (Carpenter, 1994).

### **3- NEUROPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.**

La neuropatología de la enfermedad de Huntington (EH) se caracteriza a nivel macroscópico en pacientes con EH avanzada por la presencia de leptomeninges adelgazadas y opacas; una reducción en el tamaño de los hemisferios cerebrales, diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral. También se observa un encogimiento del neostriado con una gran atrofia del putamen y el núcleo caudado acompañado de un ensanchamiento de los ventrículos laterales; perdiendo así el cerebro alrededor del 10- 20 % (Gutekunst, Norflus & Hersch, 2002).

A nivel microscópico, el neostriado lesionado presenta una importante pérdida neuronal y astrogliosis. En la EH la degeneración de las neuronas de proyección en el estriado resulta en una activación aberrante de las eferencias de los núcleos de los ganglios basales (Fig. 2) lo que provoca movimientos involuntarios (corea y distonía), alteraciones de planeación, comportamientos impulsivos y disminución en el control emocional. La pérdida celular estriatal determina el nivel de severidad de la enfermedad. Esta se clasifica en cinco grados (0-4) relacionados con la progresión clínica. Casos de grado 0 tiene un historial clínico y familiar que sugieren EH pero no presenta la neuropatología típica en la autopsia. En casos de grado 1, se observan cambios microscópicos, pérdida del 50% de las neuronas estriatales pero sin una atrofia

severa y visible. En los grados más avanzados (grados 2-4) comienza a ser evidente una atrofia severa, pérdida neuronal, gliosis progresivamente más pronunciada y patología palidal evidente. En los casos más severos (grado 4), más del 90% de las neuronas estriatales se pierden y estudios microscópicos muestran restos de astrocitos (Gutekunst et al., 2002; MacMilan & Quarrell, 1996).

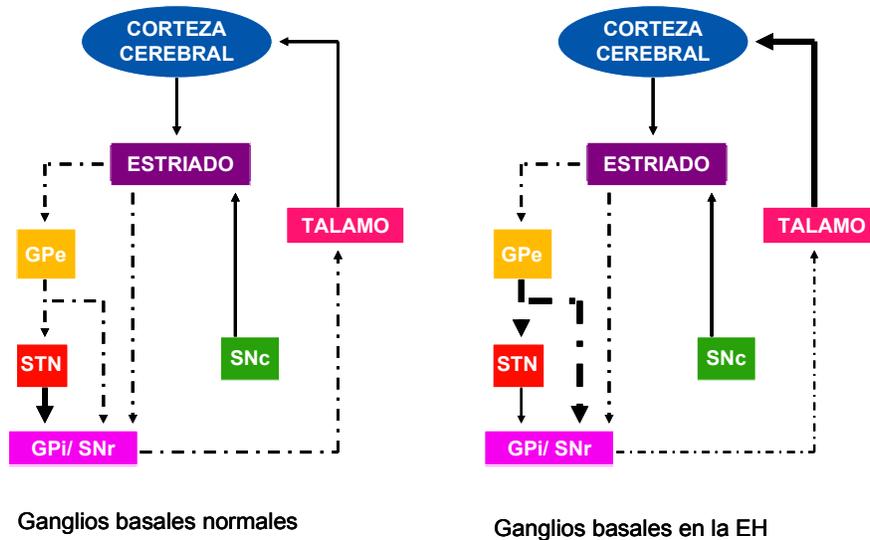


Fig (2). Vías de los ganglios basales. Interacciones de los ganglios basales bajo condiciones normales y en la enfermedad de Huntington. Las líneas continuas y punteadas indican vías excitadoras e inhibitoras respectivamente. El grosor de cada línea indica el nivel relativo de actividad de cada vía. Tomado de (Gutekunst et al., 2002).

#### A. VULNERABILIDAD SELECTIVA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.

Estudios microscópicos cuantitativos en la EH, han mostrado una relativa preservación de las neuronas estriatales grandes y una pérdida severa de las neuronas medianas espinosas del estriado. Estas neuronas medianas espinosas, son neuronas de proyección inhibitoras. Éstas proyectan al globo pálido y a la sustancia nigra utilizando GABA como neurotransmisor. Al degenerar estas células en la EH, los neurotransmisores y las enzimas que éstas contienen disminuyen, entre estos el ácido glutámico descarboxilasa (GAD), sustancia P, encefalina, calbindina, calcineurina, además de receptores a adenosina y dopamina. Las neuronas medianas espinosas que expresan los receptores a dopamina D1 proyectan al globo pálido interno (Gpi) y a

la sustancia nigra compacta (SNc), mientras que las que expresan receptores D2 y encefalina proyectan al globo pálido externo (Gpe). Ambas subpoblaciones de neuronas medianas espinosas degeneran en la EH; sin embargo, se ha demostrado que estas neuronas de proyección son afectadas de manera diferente durante el transcurso de la enfermedad (Gutkunst et al., 2002, MacMillan, 1996 #120).

Además de las neuronas medianas espinosas, existe una variedad de interneuronas que expresan otras sustancias neuroactivas y que hacen contacto con las medianas espinosas. Las interneuronas de particular interés en la EH son las neuronas grandes colinérgicas y las neuronas medianas espinosas que contienen somatostatina, neuropéptido Y, nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-d) ahora conocida como una forma de óxido nítrico sintasa (NOS). Estas poblaciones de interneuronas son altamente resistentes a procesos neurodegenerativos. La densidad de estas neuronas se ve incrementada en el estriado en la EH. La vulnerabilidad selectiva de las neuronas medianas espinosas y la resistencia a la degeneración de estas interneuronas estriatales puede estar relacionada a diferencias en la susceptibilidad a cambios en la respiración celular o quizás a bajos niveles de expresión de huntingtina endógena (Gutkunst et al., 2002; Curtis et al., 2003).

La neurodegeneración en la EH es un proceso gradual en el que las neuronas se encuentran bajo estrés, cambios estructurales, descompensación gradual en respuesta a la lesión, se atrofian y por último mueren y son removidas. Este tipo de estrés, lesión y compensación ocurre tanto en cuerpos celulares, axones y dendritas (Gutkunst et al., 2002).

Se ha encontrado microglia en el neostriado, corteza y globo pálido, así como en la materia blanca subcortical y en la cápsula interna, la cual se encuentra presente en todos los grados patológicos incrementándose conforme el grado de severidad aumenta. Su presencia en etapas tempranas de la enfermedad está en estrecha asociación con las neuronas que degeneran en la EH lo que sugiere un rol potencial de la microglia en la respuesta inflamatoria de la patogénesis de la EH (Gutkunst et al., 2002).

## B. LOCALIZACIÓN DE LA HUNTINGTINA EN EL CEREBRO CON ENFERMEDAD DE HUNTINGTON Y EN CONTROLES.

La huntingtina es una proteína de 340kDa citoplasmática, codificada por el gen IT15 del cromosoma 4, expresada en todo el cuerpo. Cuando se presentan un número de repeticiones por arriba de lo normal (más de 35) del triplete CGA que codifica para glutamina, se manifiesta la enfermedad de Huntington. La degeneración de las neuronas medianas espinosas del estriado y de neuronas corticales representan la típica patología de la enfermedad (Cattaneo, 2003). La región de la localización de la huntingtina ha sido sujeto de varios estudios en animales experimentales y líneas celulares. La inmunohistoquímica ha revelado que ésta se expresa normalmente en varios órganos del cuerpo y en el cerebro sobre todo en la corteza, caudado-putamen, tálamo, hipocampo y cerebelo (Jones, 1996).

Su expresión es heterogénea en humanos y se ha demostrado que, en el estriado, las regiones y las neuronas menos vulnerables para la neurodegeneración normalmente expresan los niveles más altos de huntingtina, mientras que las neuronas más vulnerables expresan los niveles menores (Fusco et al., 1999). Además, en las neuronas estriatales que proyectan al globo pálido expresan huntingtina en una proporción mayor que las que proyectan a la nigra (Fusco et al., 2003) Estas diferencias en los niveles endógenos de expresión de huntingtina probablemente estén contribuyendo a la vulnerabilidad selectiva. A nivel subcelular, la proteína se encuentra en el citoplasma en regiones somatodendríticas y en menor medida en los axones. La huntingtina normal está asociada a microtúbulos, organelos vesiculares, mitocondrias y se ha propuesto que juega un papel en el transporte de organelos (Borrell-Pages, Zala, Humbert & Saudou, 2006; Gutekunst et al., 2002).

Se pueden encontrar agregados de huntingtina mutada, es decir con la expansión de poliglutamina, en cualquier parte de la neurona, incluyendo el núcleo, soma, dendritas y axones (Borrell-Pages et al., 2006). Estos agregados son ubiquitinados, ya que se conoce que contienen proteínas mal conformadas que son blanco de degradación. Agregados de huntingtina N-terminal se distribuyen heterogéneamente en diferentes regiones del cerebro con EH. Inicialmente se observan sobre todo en la materia gris aunque también en la materia blanca. Estos agregados son

especialmente frecuentes en las capas V y VI de la corteza cerebral. Sin embargo, existen diferencias entre las áreas corticales de cerebros de individuos con EH, ya que la corteza insular y cingular presentan densidades de agregados más altas que la corteza prefrontal, temporal y corteza premotora. Estos agregados también han sido observados, aunque en menores cantidades, en el caudado, putamen, sustancia nigra, núcleo hipotalámico, tálamo y núcleos del tallo cerebral como el núcleo cuneatus. En el estriado no son comunes pero están extensamente dispersos sin mostrar compartimentalización en los parches o matriz. En la sustancia nigra, la mayoría de los agregados se encuentran en el neuropilo de la *pars compacta* y muy pocos en la *pars reticulata*. Estos agregados pocas veces se observan en el globo pálido, también se han observado en el hipocampo y en el cerebelo, siendo visibles en las capas molecular y granular de este último (Gutekunst et al., 2002).

#### **4- CICLO ESTRAL DE LA RATA Y ESTRÓGENOS.**

##### **A. CICLO ESTRAL.**

El ciclo estral incluye una cascada de eventos hormonales y de comportamiento los cuales son progresivos, altamente sincronizados y repetitivos (Kilen & Schwartz, 1998). Estos cambios inician con la pubertad y durante la vida reproductiva del animal, a menos que estos sean interrumpidos por preñez, lactancia o alguna anormalidad. Después que la lactancia ha cesado, los ciclos comienzan nuevamente (Arrington, 1978).

En la rata, la cual es un animal multiestral, no estacional y de ovulación espontánea, el ciclo estral tiene una duración de 4-5 días. Este ciclo está caracterizado por cuatro fases principales: proestro, estro, metaestro y diestro. El **proestro**, es el período de crecimiento folicular en el ovario. Es la fase en la cual la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) a partir de la pituitaria, estimulan al ovario para producir un incremento de la cantidad de estrógeno y progesterona. Estas dos últimas hormonas ocasionan un incremento en el desarrollo de los oviductos, útero y vagina. Los folículos en el ovario que contienen al óvulo incrementan su tamaño (Arrington, 1978).

El **estro**, es el periodo de receptividad hacia el macho o también llamado periodo de calor. La ovulación ocurre casi inmediatamente después de que esta fase ha terminado. Al darse la ruptura de los folículos durante la ovulación, los ovocitos son liberados hacia los oviductos. Después de la ruptura de los folículos, el cuerpo lúteo se forma en el lugar de cada folículo y funciona por un tiempo como una glándula endocrina produciendo progesterona. Si los huevos son fertilizados y la fecundación ocurre, el cuerpo lúteo continúa su función durante toda la gestación. Si la concepción no ocurre, el cuerpo lúteo funciona por un tiempo corto (Arrington, 1978).

El **metaestro**, es el estadio después del estro durante el cual el cuerpo lúteo continúa funcionando en el animal no preñado. Cuando este cuerpo cesa de producir progesterona, ocurre la siguiente fase del ciclo. Durante el metaestro, ocurren ciertos cambios en el útero preparándolo para la implantación y nutrición del embrión (Arrington, 1978).

El **diestro**, es la fase más larga del ciclo en la rata, es el periodo de inactividad del sistema reproductivo femenino. El cuerpo lúteo se reabsorbe, el útero es pequeño y los leucocitos son evidentes en un frotis vaginal. A lo largo periodo de inactividad se conoce como anestro (Arrington, 1978).

Los cambios citológicos del ciclo estral de la rata se caracterizan por diferencias específicas, determinadas mediante el monitoreo de frotis vaginales. Así, el **proestro** es la fase preparatoria, preliminar al estro, se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas, estas células se presentan tanto aisladas como agrupadas y aparecen en la cumbre del proestro mostrando un núcleo redondeado y fácilmente distinguible (Meza- Navarro, 2001). Esta fase estral tiene una duración relativa de 12-14 h aproximadamente. En esta fase el pH vaginal es de 5.4, al final de esta fase la vagina se torna seca y sus paredes comienzan a cornificarse, los ovarios están en plena producción folicular y el diámetro de la luz uterina es de 5mm. La siguiente fase del ciclo es el **estro**, caracterizada como el periodo de receptividad sexual cuando la hembra permite la cópula. En la rata el estro dura aproximadamente 12-15 h. Durante este tiempo se observan cambios conductuales como incremento en la actividad locomotora, muestra

sacudida de las orejas, y lordosis en presencia de otras ratas. Las células que se observan en esta fase son células cornificadas. La apariencia de la vagina es cornificada y seca, el pH vaginal es de 4.2, posteriormente aparece un flujo vaginal abundante y caseoso. Los estrógenos circulantes provocan cambios en el útero. Durante la última parte del estro las células parecen degenerar y en muchos casos forman agregados como masas de material celular. La ovulación ocurre de 8-11 h después de la aparición del estro (Meza- Navarro, 2001).

El **metaestro** es la fase que sigue al estro, la cual ocurre al poco tiempo de la ovulación. La citología del metaestro se caracteriza por la presencia de leucocitos y pocas células cornificadas, así como por un número insignificante de células epiteliales nucleadas. El metaestro dura 21 h y se divide en dos etapas. El metaestro I dura 15 h, se produce el pico de LH y la consecuente ovulación múltiple y espontánea, este pico está relacionado con las horas de luz y la temperatura del ambiente. El pico de LH determina el final de la producción de estrógeno y el comienzo de la producción de progesterona por el cuerpo lúteo, la progesterona determinará el comportamiento maternal de la rata. El metaestro II dura 6 h, en esta etapa la vagina se vuelve húmeda y los óvulos liberados se ven en el oviducto (Meza- Navarro, 2001).

La fase del **diestro**, que es la más larga, dura alrededor de 57 h y se caracteriza por una delgada capa de mucosa. En un frotis vaginal de esta fase se distinguen leucocitos. El pH vaginal es de 6.1, el diámetro de la luz uterina es de 2.5 mm. Los cuerpos lúteos producen abundante progesterona que desbloquea la producción de FSH y LH, esto inicia el desarrollo de nuevos folículos (Meza- Navarro, 2001).

Dentro de los factores que pueden afectar el ciclo estral están el fotoperiodo, y la dieta. La escasez de proteínas puede afectar severamente el ciclo estral. Dietas con niveles altos de proteínas en las ratas produce un incremento de las gonadotropinas hipofisarias, retarda el crecimiento de los ovarios y retarda el inicio del ciclo estral. El ciclo también puede ser modificado por una disminución o exceso de hormonas, por falta o malfuncionamiento de los órganos endocrinos o por administración hormonal exógena. En particular la alteración de la función tiroidea en la rata tiene un efecto adverso en el ciclo estral. La inhibición de la actividad tiroidea provoca ciclos irregulares, camadas pequeñas y combinado con gonadotropinas

administradas exógenamente induce ovarios poliquísticos. Otro factor relevante es la humedad relativa y la temperatura ambiental (Fox & Laird, 1970).

El ciclo estral en la rata es regular cuando los animales son mantenidos en un ciclo establecido de luz- oscuridad de 10 horas de oscuridad y 14 horas de luz. En la rata la luz continua produce estro persistente caracterizado por una cornificación vaginal prolongada y ovarios foliculares enquistados debido al cuerpo lúteo (Kilen & Schwartz, 1998).

En el ciclo estral de la rata, el estradiol está en sus niveles basales más bajos durante el estro y durante la mayor parte del metaestro. En la tarde del metaestro, el nivel en suero comienza a incrementarse y continúa incrementándose durante el diestro, llegando al pico más alto en las tardes del proestro. Como el incremento de las hormonas preovulatorias LH/ FSH se inicia en la tarde del proestro, el estrógeno cae dramáticamente y alcanza un nivel basal bajo en la mañana del estro (Kilen & Schwartz, 1998).

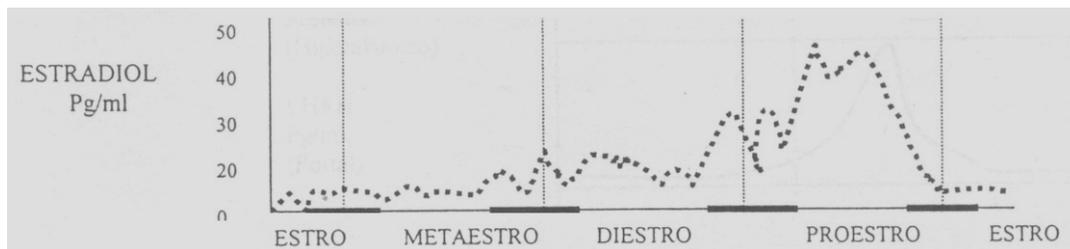


Fig (3). Niveles de estradiol (pg/ml) en la rata a lo largo del ciclo estral. Las barras oscuras indican la fase de oscuridad del ciclo luz-oscuridad. Tomada de (Meza- Navarro, 2001).

## B. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS ESTROGENOS

Los estrógenos son una clase de hormonas esteroides, llamados así debido a que inducen el estro. Juegan un papel importante en el proceso reproductivo de la hembra. Son producidos inicialmente en el ovario y ejercen sus efectos biológicos uniéndose y activando al receptor de estrógeno. (Smith, 1998).

Los estrógenos constan de una estructura de tipo ciclo pentanoperhidrofenantreno. El núcleo esteroide estrano, el cual es común en todos los estrógenos contiene 18 átomos de carbono arreglados dentro de cuatro anillos. Varias características de los estrógenos son críticas para su actividad hormonal, una de las más notables es el anillo fenólico (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en C3) y un grupo  $\beta$ -hidroxilo o cetona en el C17 (Smith, 1998).

El estrógeno natural más potente es el 17  $\beta$ -estradiol. La actividad biológica de los estrógenos está determinada en parte, por su habilidad para unirse y activar al receptor de estrógeno (ER) (Smith, 1998)

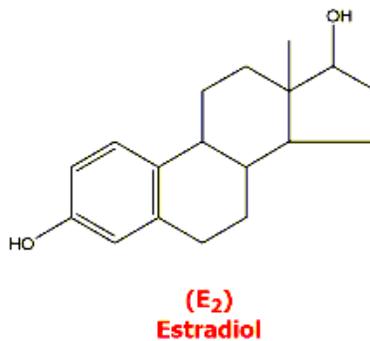


Fig (4). Estructura química del estradiol, mostrando el grupo hidroxilo (OH) en el carbono 3 y un  $\beta$ -hidroxilo o cetona en el carbono 17. Tomado de (Murad & Kurat, 1991).

### C. BIOSÍNTESIS DE LOS ESTROGENOS.

La síntesis de los diferentes estrógenos ocurre en una variedad de tejidos y el sitio de biosíntesis varía con el género y la edad. Los estrógenos como otros esteroides, son derivados del colesterol. La biosíntesis de los estrógenos (estrón, estriol, estradiol en el humano) requiere del complejo enzimático citocromo P450 y dos deshidrogenasas diferentes. Después de varias reacciones enzimáticas el estradiol se obtiene a partir de la androstenediona o testosterona, que son sus precursores inmediatos (ver Fig.5) (Murad & Kurat, 1991, Smith, 1998 #53).

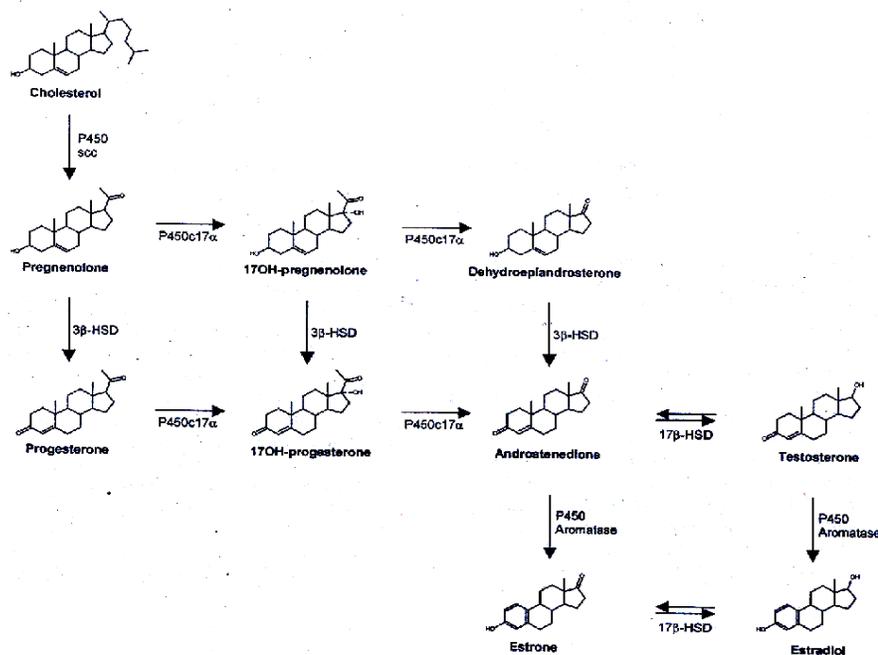


Fig (5). Vías principales de la biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario humano. Tomada de (Smith, 1998).

#### D. RECEPTORES A ESTRÓGENOS

Los estrógenos son sustancias lipofílicas, las cuales llevan a cabo sus acciones atravesando la membrana plasmática por difusión, y uniéndose a receptores proteicos de alta afinidad en la membrana nuclear. El receptor a estrógeno (ER) pertenece a la superfamilia de receptores nucleicos, es un ligando inducible de un factor de transcripción. Cuando éste se une a un agonista de estrógeno, es activado y puede regular positivamente la expresión de genes blanco. La modificación en la expresión de estos genes y las proteínas que éstos codifican, resulta en la respuesta al estrógeno dentro de la célula y/ o tejido (Smith, 1998).

El ER está compuesto por seis dominios funcionales, designados como A- F. El dominio A/B es el más variable, corresponde al extremo amino terminal y se encarga de la interacción con otras proteínas que participan en el proceso de transcripción. El dominio C es la región central de la proteína, a la cual se le conoce como “dominio de unión al ADN”. El dominio D representa una estructura flexible que actúa como bisagra del receptor. Al dominio E/F se le conoce como

“dominio de unión al ligando”, el cual está conformado por 302- 595 aminoácidos y está localizado en medio de la región carboxilo terminal del ER, esta región es suficiente para la unión al estradiol con alta afinidad. Algunos experimentos indican que al unirse la hormona, el dominio de unión al ligando provoca un cambio conformacional que comprende un plegamiento a una estructura más compacta. Este cambio en el dominio de unión al ligando varía de acuerdo a la naturaleza del ligando (agonista o antagonista), se cree que esto facilita las interacciones del ER con otras proteínas necesarias para la activación del gen blanco (Smith, 1998).

Existen dos isoformas del receptor de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$ ; estudios recientes con animales hembra y macho carentes del ER $\beta$  (knockout ER $\beta$ ) parecen desarrollarse normalmente, muestran comportamiento sexual normal y son reproductivamente competentes, aunque las hembras muestran fertilidad reducida. Esto contrasta ampliamente con los ratones carentes de ER $\alpha$  (knockout ER $\alpha$ ), los cuales son estériles y no presentan un comportamiento sexual normal. Parece ser que el ER $\alpha$ , más que el ER $\beta$ , es necesario para la regulación de la fisiología reproductiva, además de los componentes de comportamiento (McEwen & Alves, 1999).

Los ER $\alpha$  y ER $\beta$  se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos en patrones específicos celulares tanto en roedores como en humanos. El ER $\alpha$  se expresa a altos niveles en los tejidos blanco “clásicos” como el útero, la glándula mamaria, placenta, hígado, hueso y sistema cardio-vascular. Por otro lado el ER $\beta$  se expresa principalmente en los tejidos blanco “no clásicos” como el cerebro, próstata, ovario, pulmones, músculo y vía urinarias, en donde los niveles de ER $\alpha$  son muy bajos y no mensurables. En el cerebro los ERs son especie y región específico dependientes. Por ejemplo, los ER $\alpha$  y ER $\beta$  se coexpresan en regiones específicas del cerebro como el área preóptica, el núcleo del lecho de la estría terminal y el núcleo amigdalino medial y cortical. Otras regiones expresan solamente el ER $\alpha$  como son el núcleo ventral hipotalámico y el órgano subfornical; o solamente ER $\beta$ , como en la corteza cerebral y el hipocampo. El ER $\alpha$  se detecta principalmente en el hipocampo. El ER $\beta$  se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro embriogénico en neuronas corticales y células gliales, y su expresión puede ser regulada por 17- $\beta$  estradiol, lo que indica que el estrógeno juega un papel importante en el desarrollo del SNC, mediado por el ER $\beta$  (Zhao & Brinton, 2006).

La expresión de los ERs en el cerebro parece estar modulada por factores relacionados con la edad e insultos cerebrales. Por ejemplo, en ciertas regiones corticales del cerebro de la rata la expresión celular del ARNm del ER $\alpha$  se regula dramáticamente a la alta en respuesta a una lesión isquémica mientras que la expresión de ARNm del ER $\beta$  después de una lesión disminuye relativamente un 50% en comparación con los grupos control. En cerebros de rata hembra se ha encontrado que los niveles de ARNm del ER $\beta$  en la corteza cerebral, como en otras regiones, disminuye con la edad. En cerebros humanos, a pesar que ambos ERs sean expresados predominantemente en áreas relacionadas con el sistema límbico, la expresión más alta del ARNm del ER $\alpha$  está restringida a áreas como la amígdala y el hipotálamo, mientras que el ARNm del ER $\beta$  es más abundante en la formación hipocampal, la corteza cerebral y el tálamo. También se ha observado que factores relacionados a la edad y el estado de salud del cerebro humano tiene un gran impacto en la expresión de los ERs; sin embargo, hasta el momento la inmunolocalización de los ERs en humano no está muy clara ya que esta varía de acuerdo a los anticuerpos que se utilizan en los diferentes laboratorios (Zhao & Brinton, 2006).

Existen varias isoformas del ER $\beta$  que han sido clonadas, de las cuales la mejor caracterizada es la ER $\beta$ 2. El ER $\beta$ 2 se encuentra a los mismos niveles que ER $\beta$ 1 en el ovario, próstata, hipófisis y músculo; en el cerebro se expresa en corteza, hipotálamo e hipocampo, aunque en menor medida que ER $\beta$ 1. ER $\beta$ 2 parece tener menor afinidad por el estrógeno tal vez por la inserción de 18 amino ácidos en el dominio de unión a ligando a pesar de esto, el ER $\beta$ 2 puede unirse al elemento responsivo del estrógeno en el ADN, actuando como un regulador negativo de la acción del estrógeno. Pues se ha encontrado que suprime la activación transcripcional mediada por ER $\alpha$  y ER $\beta$ 1 de manera dosis dependiente. Además se ha observado que el ER $\alpha$  y ER $\beta$ 1 interactúan con un coactivador estrógeno dependiente, mientras que ER $\beta$ 2 no lo hace. Además el ER $\beta$ 2 requiere concentraciones 100-1000 veces más altas de 17 $\beta$ -estradiol para activar al promotor que contiene al elemento responsivo al estrógeno (McEwen & Alves, 1999).

Al parecer los estrógenos pueden también ejercer acciones que no están mediadas por mecanismos genómicos. Becker (2002) reporta que el estrógeno ejerce efectos sobre el estriado especialmente en la liberación de dopamina y modulando su actividad neuronal. Esto a pesar de

que en el estriado no se encuentran presentes ni ER $\alpha$  ni ER $\beta$ . Esto sugiere que el estrógeno y otras hormonas esteroideas pueden estar llevando a cabo sus efectos sobre la actividad celular del estriado uniéndose a receptores localizados sobre o dentro de la membrana plasmática. En cuanto a la distribución subcelular de los ERs en el cerebro, hay cada vez más evidencia de que tanto ER $\alpha$  como ER $\beta$  se expresan también en regiones no nucleares. Por ejemplo ambos receptores se han encontrado en regiones citoplasmáticas y en procesos neuronales de neuronas hipocámpales de rata. Se ha reportado que el ER $\beta$  se localiza ampliamente (en comparación a su localización nuclear) en neuronas hipocámpales, además de su localización en el sinaptosomas y en la membrana sináptica en neuronas hipocámpales de ratón. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de ER $\alpha$  y ER $\beta$  en mitocondria de cerebro de rata adulta. (Zhao & Brinton, 2006). Los ERs están involucrados en una variedad de cascadas de señalización membranales y citoplasmáticas no genómicas, las cuales contribuyen a regular los efectos del estrógeno en el cerebro. De acuerdo a Becker (2002), los estrógenos pueden estar llevando a cabo sus rápidos efectos en las células estriatales como resultado de la acción de segundos mensajeros asociados a un receptor de membrana, activando estos sistemas de señalización intracelular.

## E. EFECTOS PROTECTORES DEL ESTRÓGENO

Durante la década pasada paulatinamente se ha aceptado el concepto del estradiol como un potente factor protector en varios sistemas fisiológicos. Además de los efectos conocidos del estradiol en el eje reproductivo y en los órganos reproductores blanco, el estradiol es una hormona pleiotrópica que influye en muchas funciones no reproductoras, como el metabolismo mineral y del hueso, funciones cardiacas y vasculares, memoria, cognición y humor, y en la incidencia y evolución de algunas enfermedades relacionadas con la edad (Wise, Dubal, Wilson & Rau, 2000; Wise, Dubal, Wilson, Rau & Bottner, 2001).

La evidencia clínica y epidemiológica ha contribuido también con información sobre el efecto neuroprotector del estrógeno. Así, se ha encontrado que las hormonas sexuales femeninas incrementan las funciones cognoscitivas y reducen el riesgo o retardan el establecimiento de desórdenes neurológicos y mentales. Se ha observado que los estrógenos y el 17  $\beta$ -estradiol, muestran una amplia variedad de acciones en el cerebro, afectan la conducta, la cognición y la

viabilidad celular. Numerosos estudios en humanos y en modelos animales han demostrado que los estrógenos tienen efectos benéficos en ciertas formas de memoria, especialmente en la memoria de trabajo, aunque también favorecen otras formas de memoria como la memoria de referencia (Papalex, Antoniou & Kitraki, 2005). La diversidad de estos efectos implica la participación de diversas regiones cerebrales. La influencia hormonal del estrógeno en el proceso de memoria podría relacionarse con sus efectos sobre el hipocampo y el cerebro basal anterior, mientras que los efectos sobre la actividad motora normal o anormal indudablemente están relacionados con estructuras como el caudado y el putamen, el núcleo accumbens, la sustancia nigra y el núcleo dopaminérgico del cerebro medio (McEwen & Alves, 1999).

Se han descrito efectos protectores del estrógeno en varios modelos animales de lesión cerebral, como son los modelos neurotóxicos de la enfermedad de Huntington, la oclusión de la arteria media cerebral, la cual remeda el infarto cardiovascular, o la lesión por contusión la cual imita una lesión traumática cerebral. En estos estudios se ha encontrado que las hembras son menos vulnerables a la lesión cerebral isquémica en comparación con los machos y que el estradiol es el factor crítico que brinda protección a las hembras (Azcoitia, Sierra, Veiga & Garcia-Segura, 2005; Wise et al., 2000).

Por otro lado, otros resultados muestran que tanto el ER $\alpha$  como el ER $\beta$  median la neuroprotección inducida por el estrógeno. Sin embargo, esto sigue siendo controversial ya que por un lado Dubal y cols. (2001) estudiando las lesiones de tipo isquémico reportan que mediante estudios realizados en ratones ER $\alpha$  y ER $\beta$  knockout la neuroprotección inducida por el 17- $\beta$  estradiol se mantiene en ratones ER $\beta$  knockout mientras que ésta se pierde en ratones ER $\alpha$  knockout, lo cual indica que es requerida la activación del ER $\alpha$  mas no del ER $\beta$  por parte del 17- $\beta$  estradiol para inducir neuroprotección. Sin embargo, otros estudios indican que después de una isquemia global la protección inducida por el estrógeno es mediada por la activación del ER $\beta$  (Wise et al., 2000). La evidencia sugiere que tanto el ER $\alpha$  como el ER $\beta$  contribuyen a los efectos antiapoptóticos, antioxidantes y anti inflamatorios del estrógeno y sugieren la posibilidad de que el estrógeno sea un neuroprotector contra el trauma neuronal (Sribnick, Ray & Banik, 2004). Los estrógenos también parecen determinar la neuroprotección a través de mecanismos independientes de la activación de ER intracelulares clásicos, incluyendo la interacción con sitios

de unión a membrana, lo cual provoca una rápida modulación de neurotransmisión y excitabilidad neuronal (Amantea, Russo, Bagetta & Corasaniti, 2005).

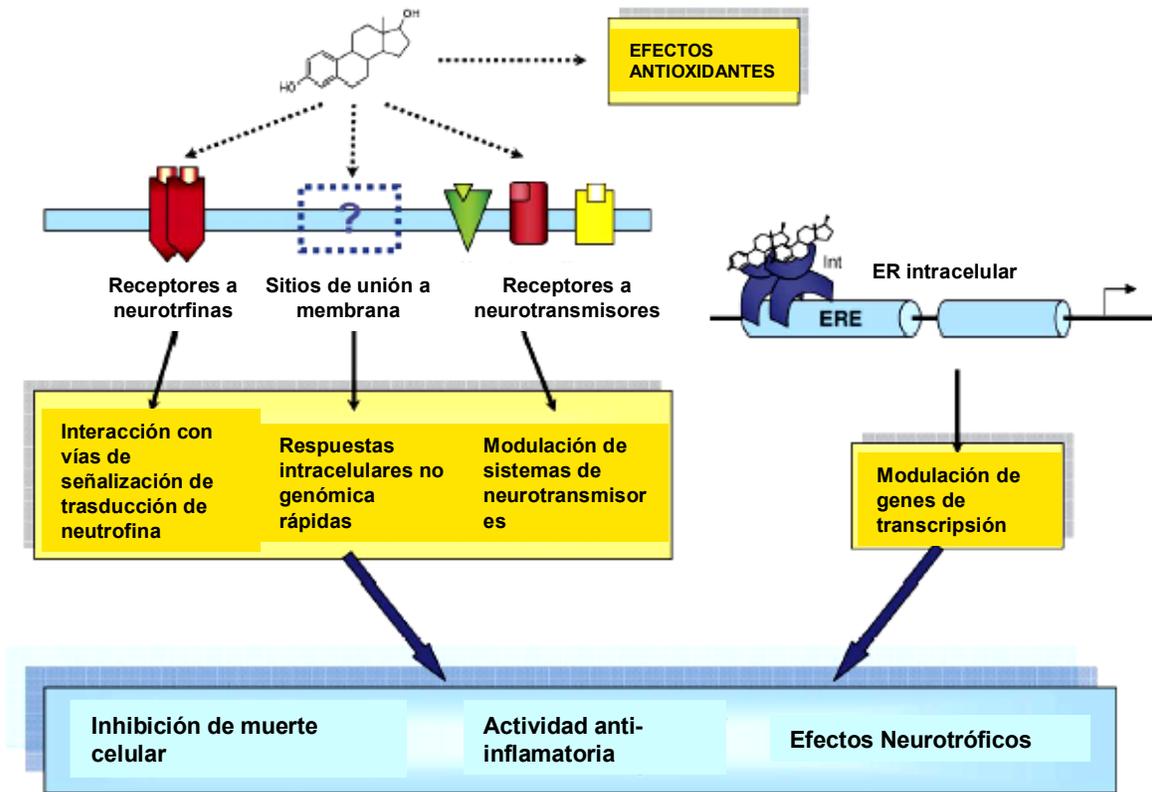


Fig (6). Mecanismos por medio de los cuales el estrógeno lleva a cabo su efecto neuroprotector .  
Tomado de Amantea, Russo, Baggeta & Corasaniti, 2005).

Estudios recientes sugieren que el estrógeno probablemente medie sus efectos antiapoptóticos al incrementar la expresión de  $ER\alpha$  y la proteína antiapoptótica Bcl-xL, ya que el estrógeno regula la expresión de los genes implicados en el control de la muerte celular, activando la transcripción de los genes antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-XL (Amantea et al., 2005). Además el estrógeno modula los canales de calcio y modula la entrada de calcio a la célula, la cual es determinante para la sobrevivencia de la célula. Se ha observado que el incremento de la entrada de calcio en lesiones de la médula espinal ocasiona la activación de lipasas, proteasas, promueve la generación de radicales libres y la degradación de proteínas del citoesqueleto (Sribnick et al., 2004).

Por otro lado, la base molecular de las propiedades antioxidantes del estrógeno se cree que se debe a su estructura de anillo fenólico, a su grupo hidroxilo en el C3 del anillo A, y a la presencia de otros anillos en la molécula. El estrógeno podría prevenir la peroxidación lipídica debido a su liposolubilidad pues tiene la capacidad de asociarse e intercalarse en la membrana plasmática. Con lo que respecta al estrógeno como agente antiinflamatorio, éste limita la expresión de mediadores neuroinflamatorios como enzimas lisosomales, además de prevenir cambios en la microglia durante la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado en traumatismos en médula espinal que el estrógeno atenúa la infiltración y la actividad de células inflamatorias, mientras que en lesiones isquémicas, el estrógeno limita la adherencia de leucocitos a las vénulas piales (Sribnick et al., 2004).

El tiempo de administración así como la duración del tratamiento con estrógenos son críticos para producir el efecto deseado en respuestas conductuales específicas y esto podría explicar la controversia que existe en la literatura sobre sus efectos. Estudios en animales y experimentos *in vitro* han demostrado que el estradiol previene la muerte neuronal inducida por agentes excitotóxicos, como en la isquemia, el estrés oxidativo, la neurotoxicidad provocada por el  $\beta$ -amiloide y pueden aminorar algunos de los efectos de la edad en la degeneración hipocampal y en la disfunción cognoscitiva. Tal es el caso del ácido kaínico como inductor de neurotoxicidad es un modelo ampliamente usado para estudiar las acciones neuroprotectoras de los estrógenos. El ácido kaínico es un análogo estructural del glutamato que dependiendo de la dosis usada puede o no inducir convulsiones relacionadas con el sistema límbico, conduciendo a estados epilépticos o fenotipos que no llegan a convulsionar. En este modelo, el daño neuronal extensivo afecta en particular la región hilar del hipocampo y se ha reportado que la administración adecuada de estradiol previene este daño (Papalexi et al., 2005).

También se ha demostrado que el estrógeno, así como otras hormonas gonadales, tiene un papel modulador de la neurogénesis en el adulto, principalmente en el giro dentado de roedores. Considerando que la neurogénesis es un proceso que consiste tanto en la proliferación de nuevas células, como en la sobrevivencia celular (Galea, Spritzer, Barker & Pawluski, 2006). Estos efectos dependen del tiempo de exposición al estradiol, de la cantidad de estradiol, presencia de progesterona, especie y sexo del sujeto entre otros.

La mayoría de las investigaciones acerca del efecto neurogénico del estradiol se han llevado a cabo en roedores hembra, por lo que poco se sabe acerca del efecto de la exposición del hipocampo a estradiol en roedores machos. Se ha observado que los niveles hormonales son de gran importancia, ya que resultados de los estudios en roedores muestran que las hembras presentan un mayor nivel de proliferación celular, pero no de sobrevivencia celular, en comparación con los machos, dependiendo del estado endocrino de la hembra. Tanapat y colaboradores (1999), mostraron mediante la cuantificación de células BrdU(+) en diferentes estadios del ciclo estral, que las hembras en proestro tienen mayores niveles de proliferación celular en el giro dentado mas no en la zona subventricular (SVZ) en comparación con machos, es durante el proestro cuando se observa el pico máximo de nivel de estrógeno. Del mismo modo se observa una fluctuación a través del ciclo estral en la proliferación celular, hembras en proestro muestran una proliferación celular del 50% mayor en comparación con hembras en estadio de estro y diestro (Tanapat et al., 1999).

En las ratas hembra inyectadas con BrdU durante el proestro y el estro el número total de células marcadas en el giro dentado incrementa a las 2 y 4 hrs después del marcaje con BrdU. El número total de células BrdU (+) muestran un pico máximo a los 7 días y gradualmente decrece. El número de células BrdU (+) en ratas en proestro es mayor que las observadas en ratas en estro después de los 14 días del marcaje con BrdU. En este periodo las células adquieren características morfológicas de neuronas granulares maduras y la expresión de calbindina (35%). A los 21 días del marcaje con BrdU, no existe diferencia detectable en el número de células BrdU(+) entre las ratas inyectadas durante el proestro y el estro (Tanapat et al., 1999).

Por otro lado se ha observado que la exposición a estradiol por periodos largos, en roedores hembra adultas, incrementa la proliferación celular comparada con la observada en los grupos ovariectomizados (Galea et al., 2006; Tanapat et al., 1999). La ovariectomía produce un decremento del 60% en el número de células marcadas con BrdU, además las ratas ovariectomizadas presentan el doble de células picnóticas, en comparación con las ratas falso operadas y con aquellas a las que se les sometió a terapia de reemplazo de estrógeno. Esto sugiere que el estrógeno puede actuar como tratamiento efectivo y preventivo para enfermedades neurológicas (Amantea et al., 2005).

La mayoría de las investigaciones acerca del efecto neurogénico del estradiol se han llevado a cabo en roedores hembra, por lo que poco se sabe acerca del efecto de la exposición del hipocampo a estradiol en roedores machos. Se ha observado que los niveles hormonales son de gran importancia, ya que resultados de los estudios en roedores muestran que las hembras presentan un mayor nivel de proliferación celular, pero no de sobrevivencia celular, en comparación con los machos, dependiendo del estado endocrino de la hembra. Tanapat y colaboradores (1999), mostraron mediante la cuantificación de células BrdU(+) en diferentes estadios del ciclo estral, que las hembras en proestro tienen mayores niveles de proliferación celular en el giro dentado mas no en la zona subventricular (SVZ) en comparación con machos, es durante el proestro cuando se observa el pico máximo de nivel de estrógeno. Del mismo modo se observa una fluctuación a través del ciclo estral en la proliferación celular, hembras en proestro muestran una proliferación celular del 50% mayor en comparación con hembras en estadio de estro y diestro (Tanapat et al., 1999).

En las ratas hembra inyectadas con BrdU durante el proestro y el estro el número total de células marcadas en el giro dentado incrementa a las 2 y 4 hrs después del marcaje con BrdU. El número total de células BrdU (+) muestran un pico máximo a los 7 días y gradualmente decrece. El número de células BrdU (+) en ratas en proestro es mayor que las observadas en ratas en estro después de los 14 días del marcaje con BrdU. En este periodo las células adquieren características morfológicas de neuronas granulares maduras y la expresión de calbindina (35%). A los 21 días del marcaje con BrdU, no existe diferencia detectable en el número de células BrdU(+) entre las ratas inyectadas durante el proestro y el estro (Tanapat et al., 1999).

Por otro lado se ha observado que la exposición a estradiol por periodos largos, en roedores hembra adultas, incrementa la proliferación celular comparada con la observada en los grupos ovariectomizados (Galea et al., 2006; Tanapat et al., 1999). La ovariectomía produce un decremento del 60% en el número de células marcadas con BrdU, además las ratas ovariectomizadas presentan el doble de células picnóticas, en comparación con las ratas falso operadas y con aquellas a las que se les sometió a terapia de reemplazo de estrógeno. Esto sugiere que el estrógeno puede actuar como tratamiento efectivo y preventivo para enfermedades neurológicas (Amantea et al., 2005).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.**

En estudios previos se ha demostrado un incremento en la proliferación neuronal tanto en la zona subventricular como en el estriado después de un insulto excitotóxico, como es el caso de lesiones intraestriatales con ácido quinolínico en ratas adultas, así como lesiones isquémicas, además en algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington. Por otra parte se sabe que el estrógeno juega un papel importante en la regulación de la proliferación neuronal, por lo que este trabajo plantea la pregunta de si el incremento de la proliferación celular provocado por una lesión excitotóxica intraestriatal con ácido kaínico en ratas hembra adultas, será modulada por la concentración de estrógeno presente a lo largo del ciclo estral y de acuerdo a la concentración de estradiol administrado exógenamente. De esta manera se presentan las siguientes hipótesis.

### **HIPOTESIS**

- 1.- La lesión intraestriatal con ácido kaínico en ratas hembra inducirá un incremento en la neurogénesis.
- 2.- El incremento en la neurogénesis en el estriado lesionado con ácido kaínico, estará relacionado positivamente con los niveles fisiológicos de estrógeno presentes en el animal.
- 3.- El incremento en la neurogénesis en el estriado lesionado con ácido kaínico, estará relacionado positivamente con los niveles de estrógeno administrados exógenamente.

### **OBJETIVOS.**

- 1.- Determinar la existencia de neurogénesis en el estriado lesionado con ácido kaínico en la rata hembra adulta y su relación con el ciclo estral.
- 2.- Determinar si diferentes concentraciones de estrógeno administrado exógenamente modifican los niveles de proliferación celular en el estriado después de una lesión intraestriatal con ácido kaínico en ratas hembra adultas ovariectomizadas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1. EXPERIMENTO A**

#### **Sujetos**

Se utilizaron 20 ratas hembra adultas en edad reproductiva de entre 250- 300 gr de la cepa Sprague Dawley, las cuales fueron mantenidas en un ciclo luz- oscuridad (14:10 hrs) con libre acceso a agua y alimento. El ciclo estral de las ratas fue monitoreado continuamente pre- y postlesión, mediante un frotis vaginal con solución salina (0.9 %). Una vez detectadas tanto la fase del proestro y del estro se formaron dos grupos de ratas.

#### **Lesión intraestriatal**

Posteriormente las ratas fueron lesionadas unilateral e intraestriatalmente (hemisferio derecho) con ácido kaínico (5nm/ 0.5µl) (Ocean Produce International, Nova Scotia, Canadá) disuelto en amortiguador de fosfatos (pH 7.4). A esta dosis de AK se han observado efectos conductuales sobre la actividad locomotora espontánea. Ya que de acuerdo con Giordano y cols. (2001), la lesión intraestriatal con AK a una dosis de 5nm, induce hiperactividad además de cambios en la citoarquitectura, como pérdida celular dentro del estriado y dilatación de los ventrículos. Se efectuó una lesión intraestriatal mecánica contralateral, la cual consiste en introducir y sacar un inyector sin la administración de fármaco y/o vehículo. El neurotóxico se administró al estriado mediante una bomba de infusión (KD Scientific) a una velocidad de 0.1µl/ min en las coordenadas AP +1.2, ML +2.6 y DV -4.5 respecto a bregma y la línea media. El inyector se mantuvo en su sitio por dos minutos más permitiendo la difusión del fármaco. Después de la cirugía a los animales se les administró 0.5 ml de ampicilina y 0.1 ml de Diazepam (5mg/ ml).

#### **Inyección de BrdU**

Para marcar las células en proliferación, alrededor de 10-15 días (dos ciclos estrales aproximadamente) postlesión, a los sujetos se les administró por vía intraperitoneal el marcador

mitogénico 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (200mg/kg) (Sigma, St. Louis, USA) en 0.9% NaCl, cada 24h durante dos días, cuando las ratas se encontraran nuevamente en proestro o en estro. A las 24h después de la última inyección con BrdU los animales fueron sacrificados.

### **Perfusión cerebral/ Fijación**

Los sujetos fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital (0.3ml/ kg) (Cheminova, México, DF) y perfundidas vía intracardiaca con PBS (0.1 M) y paraformaldehído (4% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4). Los cerebros fueron extraídos y fijados en paraformaldehído 4% y se criopreservaron en sacarosa al 30%. Posteriormente se hicieron cortes coronales de 40  $\mu$ m (seriales) en el microtomo. Los cortes fueron almacenados a -20°C en una solución anticongelante en amortiguador de fosfatos hasta su procesamiento.

### **Inmunohistoquímica**

Se llevó a cabo la técnica inmunohistoquímica contra BrdU en los cortes cerebrales para determinar la existencia de proliferación celular, para posteriormente cuantificar los núcleos celulares BruU (+). Con el propósito de una mejor penetración de los anticuerpos en el tejido en libre en flotación, inicialmente los cortes fueron lavados con TBS (0.05M, pH 7.6) (15 min x 2). Posteriormente se mantuvieron en borohidrato de sodio 0.5% por 15 min, seguidos de tres lavados con TBS. Se desactivó la peroxidasa endógena del tejido (1% Triton X, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en TBS por 30 min) se efectuaron tres lavados en TBS (10 min) cada uno, posteriormente los cortes se sometieron a 1% DMSO en TBS y nuevamente fueron lavados en TBS (3 veces por 15 min). Para permitir el inmunomarcaje con BrdU los cortes se incubaron en HCl 2N por 60 min, seguidos de lavados en TBS por 15 min e incubados por 15 min en frío en la solución de bloqueo (20% Suero de caballo, 0.3% Triton X en TBS). Los tejidos se incubaron en el anticuerpo primario Anti BrdU (1:250, BD Bioscience) en 3% Suero de caballo, 0.32% Triton X en TBS por 72 h a 4°C. Posteriormente se bloqueó con 3 lavados de 15 min con 0.02% Triton X, 1% suero de caballo en TBS, seguido de una incubación por 2h con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA.) en suero de caballo y TBS. Posteriormente los cortes fueron lavados (15 min x 4) con 0.02% Triton X en TBS. Se incubó

con el reactivo comercial ABC (Vector Laboratorios, Inc. Burlingame, CA.) (el cual se preparó 30 min previos) para amplificar la reacción a temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con TBS cada uno de 25 min. Para visualizar y revelar el inmunomarcaje los cortes se incubaron con DAB por 10 min o hasta que se desarrollara la reacción. Por último se efectuaron dos lavados con TBS (10 min c/u).

## **Histología**

Otra serie de cortes se utilizaron para evaluar la actividad metabólica celular, mediante la tinción de citocromo oxidasa, con el propósito de determinar la zona la lesión en el cuerpo estriado, además de una tinción de Nissl, con el fin de confirmar la existencia de muerte celular.

### TÉCNICA DE CITOCROMO OXIDASA.

En 180 ml de amortiguador de fosfatos (PB) 0.1 M, pH 7.4 a 37°C se diluyeron 8 gr de sacarosa y 0.10 gr de DAB. Esta solución se incubò por lo menos 30 min y no fue expuesta a la luz. Posteriormente se agregaron 5mg de citocromo oxidasa C. El tejido se incubó en esta solución durante toda la noche en oscuridad. La reacción se detuvo con tres lavados de agua destilada. Los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar.

Deshidratar el tejido: alcohol 75%	3 min
alcohol 95%	3min
alcohol 100%	3 min
xileno	5min
xileno	10 min

Se cubrieron y sellaron las laminillas con resina. .

### TINCIÓN DE NISSL.

Se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados y dejaron secar de 3 a 5 días y transfiriéndose a través de las siguientes soluciones:

- 1) Cloroformo absoluto 30 min
- 2) Alcohol 25% 2 min
- 3) Violeta de Cresilo (0.25g en 100ml de alcohol al 25%) 7 min

4) Alcohol al 50%	1 min
5) Alcohol al 70%	5 min
6) Solución diferenciadora (300ml de alcohol al 70% con 10 gotas de ácido acético)	30 seg
7) Alcohol al 95%	1 min
8) Alcohol absoluto	30 seg
9) Alcohol- xilol	2 min
10) Xilol	2min

Por último se cubrieron y sellaron con resina.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTO A

Las 20 ratas quedaron distribuidas en los diferentes grupos como se muestra a continuación.

LESIÓN	INYECCIÓN DE BrdU			
	ESTRO	PROESTRO	ESTRO	PROESTRO
ESTRO	<b>6</b>			
ESTRO		<b>3</b>		
PROESTRO			<b>8</b>	
PROESTRO				<b>1</b>

n= 18 (2 ratas murieron durante el experimento).

A las 24 horas después de la última inyección con BrdU las ratas fueron sacrificadas; una vez obtenidos los cerebros, se cortaron a 40  $\mu$ m de grosor y se llevó a cabo ya una vez estandarizada la inmunohistoquímica contra BrdU (fig.7 y 8); reacción histoquímica de la citocromo oxidasa (fig.9 y 10) y la tinción de Nissl (fig.11 y 12) obteniéndose los siguientes resultados:

- |   |        |
|---|--------|
| 4) Alcohol al 50%   | 1 min  |
| 5) Alcohol al 70%   | 5 min  |
| 6) Solución diferenciadora<br>(300ml de alcohol al 70% con 10 gotas de ácido acético) | 30 seg |
| 7) Alcohol al 95%   | 1 min  |
| 8) Alcohol absoluto   | 30 seg |
| 9) Alcohol- xilol   | 2 min  |
| 10) Xilol   | 2min   |

Por último se cubrieron y sellaron con resina.

### A. RESULTADOS EXPERIMENTO A

Las 20 ratas quedaron distribuidas en los diferentes grupos como se muestra a continuación.

LESIÓN	INYECCIÓN DE BrdU			
	ESTRO	PROESTRO	ESTRO	PROESTRO
ESTRO	<b>6</b>			
ESTRO		<b>3</b>		
PROESTRO			<b>8</b>	
PROESTRO				<b>1</b>

n= 18 (2 ratas murieron durante el experimento).

A las 24 horas después de la última inyección con BrdU las ratas fueron sacrificadas; una vez obtenidos los cerebros, se cortaron a 40  $\mu$ m de grosor y se llevó a cabo ya una vez estandarizada la inmunohistoquímica contra BrdU (fig.7 y 8); reacción histoquímica de la citocromo oxidasa (fig.9 y 10) y la tinción de Nissl (fig.11 y 12) obteniéndose los siguientes resultados:

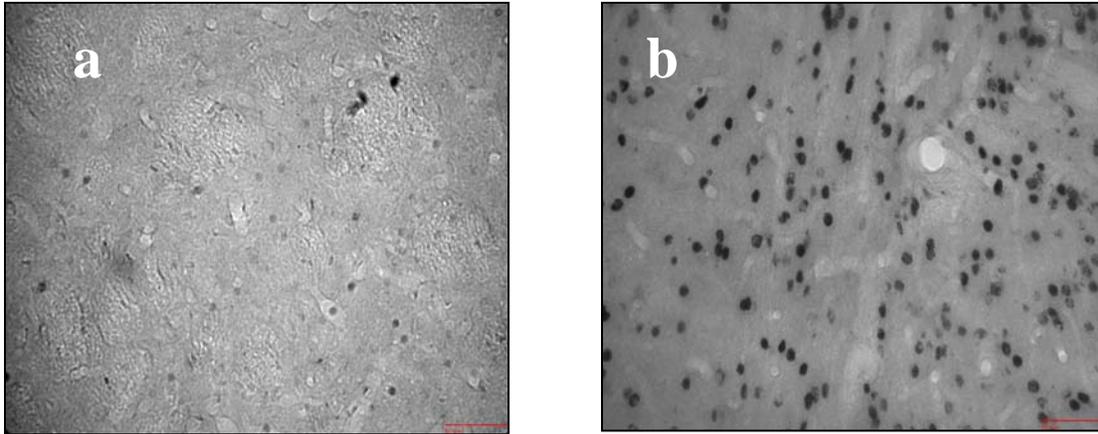


Fig (7). Estandarización de la Inmunohistoquímica para BrdU, Estriado Postnatal. **a.** Control negativo. **b.** Control positivo. Amplificación 40X

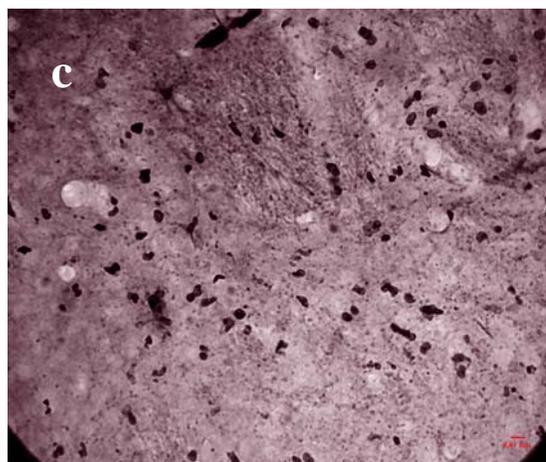
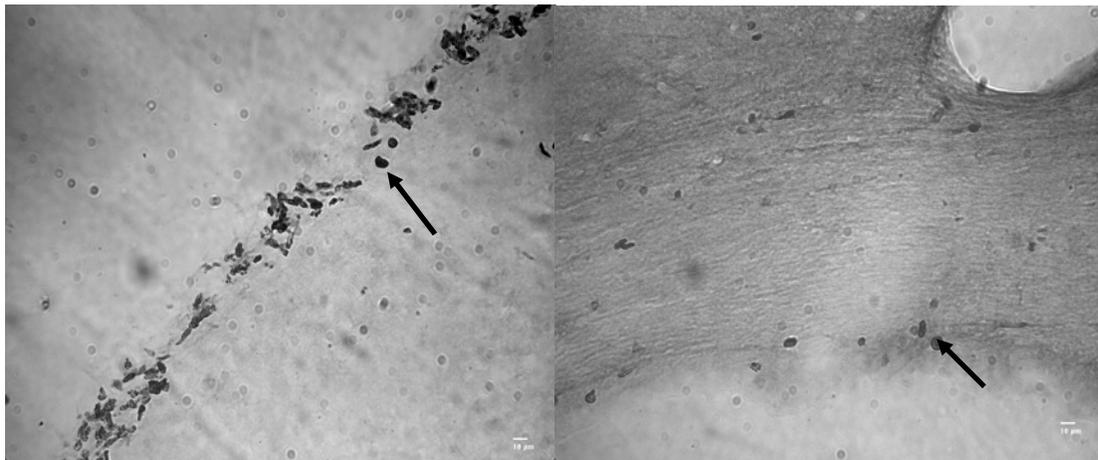


Fig (8). Inmunohistoquímica contra BrdU en rata hembra adulta. **a.** Células BrdU positivas en el cuerpo calloso, **b.** Células BrdU positivas en ventrículo lateral, **c.** Células BrdU positivas en estriado. Amplificación 20X.

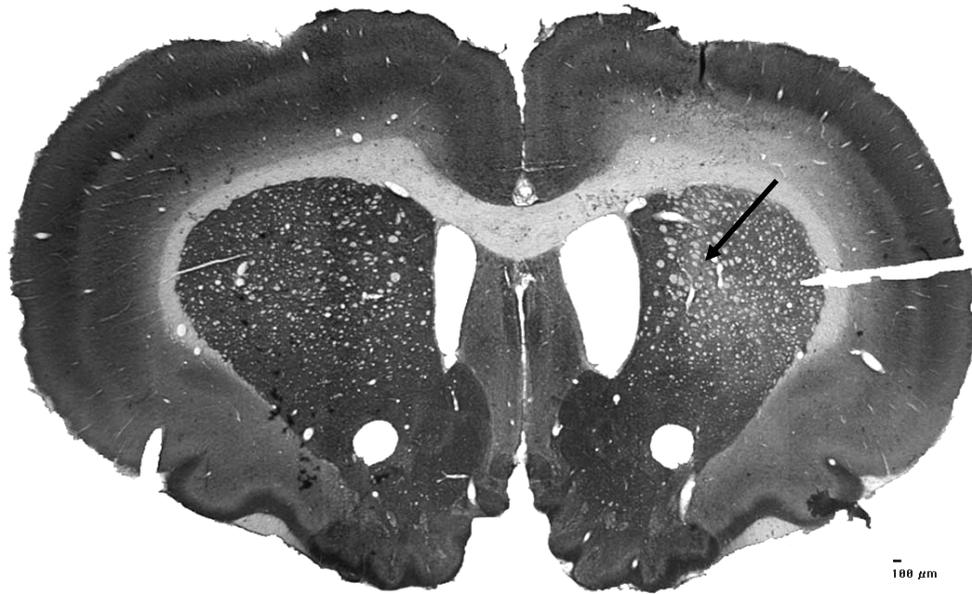


Fig (9). Corte coronal de cerebro de rata adulta teñido con citocromo oxidasa (Barra=100 $\mu$ m). En el cuerpo estriado derecho (muesca) se observa la disminución en la tinción de citocromo oxidasa, indicador de una disminución de la actividad metabólica por la muerte celular. También es evidente la dilatación ventricular en este hemisferio.

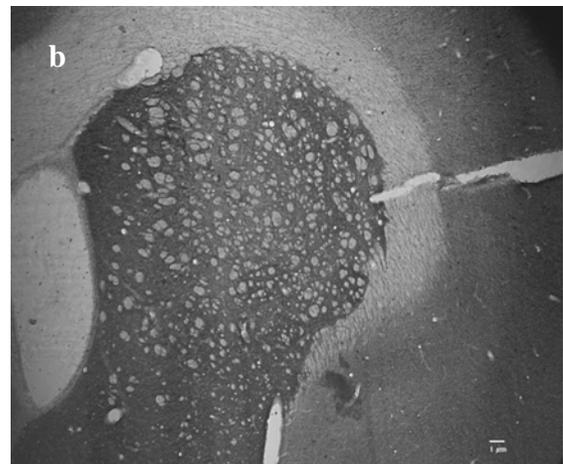
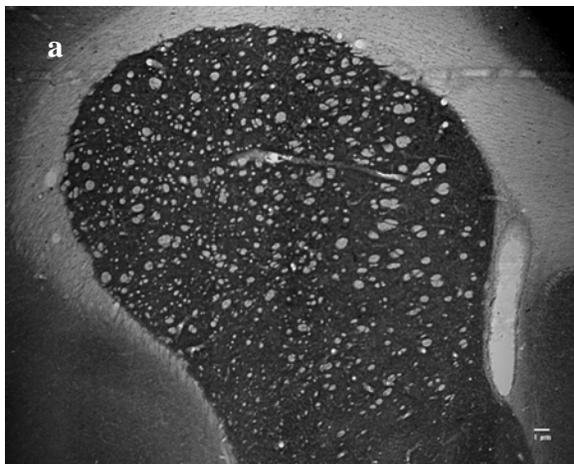


Fig (10). Corte coronal de cerebro de rata adulta teñido con citocromo oxidasa (Barra=1 $\mu$ m). **a.** Hemisferio izquierdo control (lesión mecánica) **b.** Hemisferio derecho lesionado con ácido kaínico donde se muestra la disminución de la actividad metabólica.

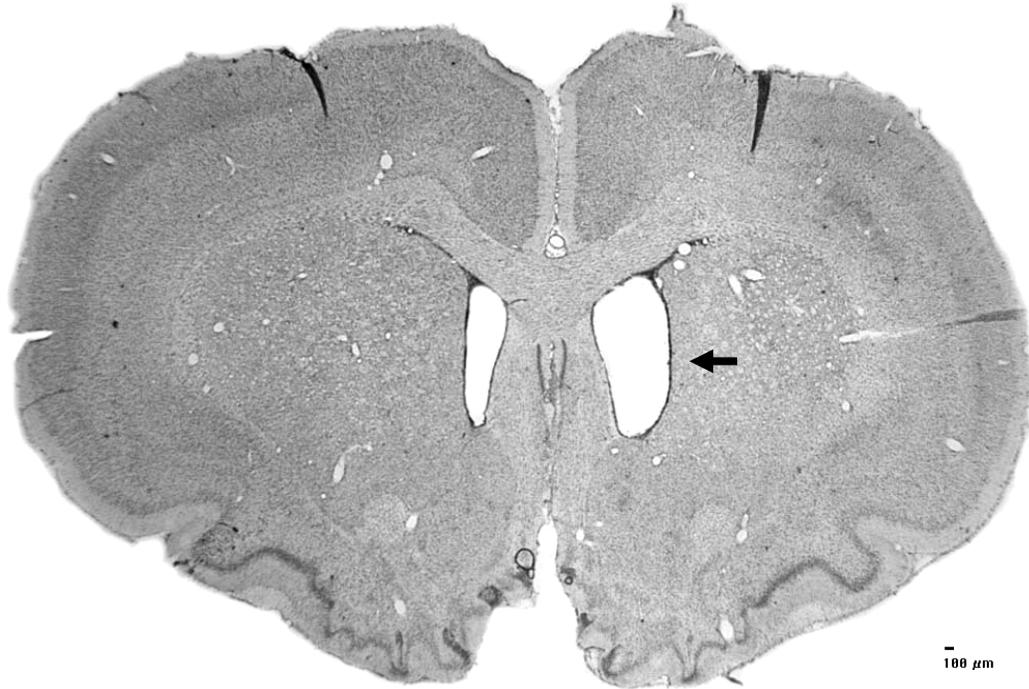


Fig (11). Tinción de Nissl de cerebro de rata adulta. Barra 100 $\mu$ m Se muestra la lesión en el hemisferio derecho y el ventrículo lateral derecho dilatado como síntoma de lesión (flecha).

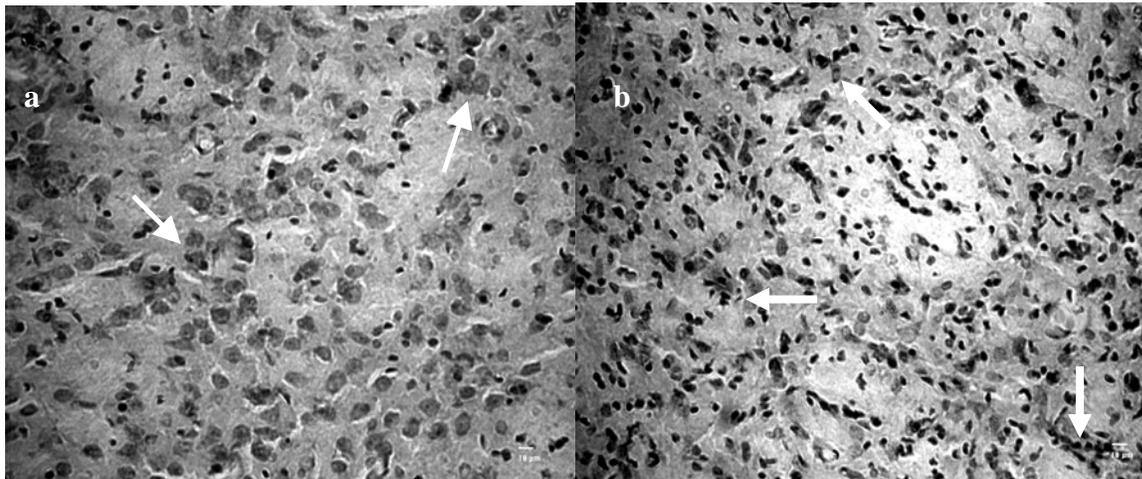


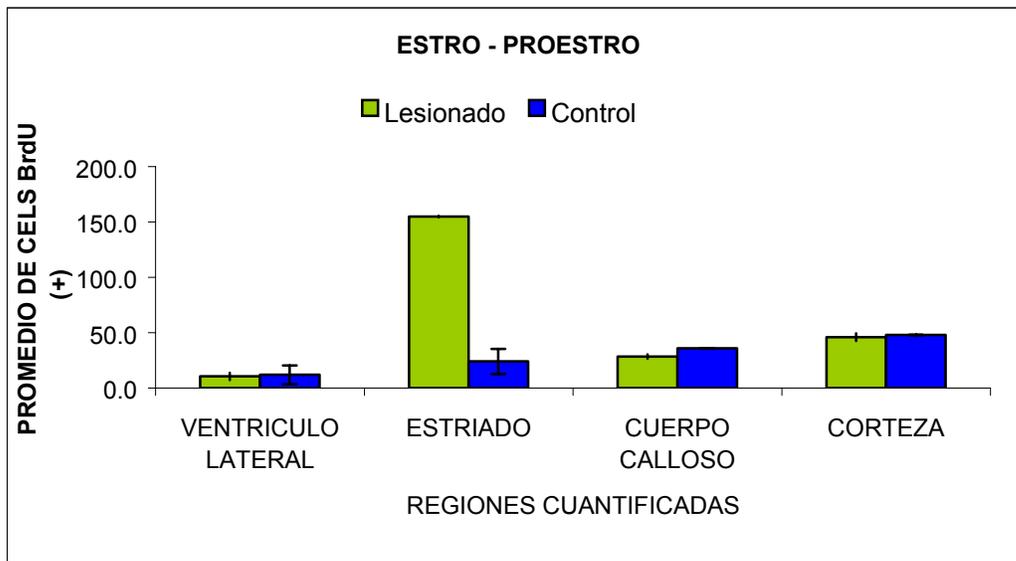
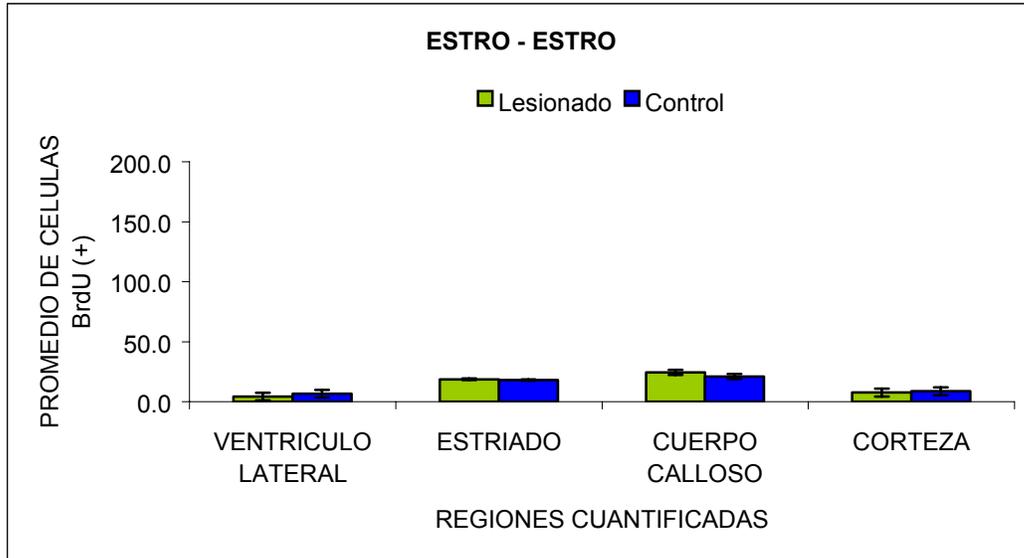
Fig (12). Tinción de Nissl. Barra 18 $\mu$ m. **a.** Lado contralateral a la lesión, no se observa cambio en la citoarquitectura del estriado. **b.** Lado ipsilateral, se observa pérdida celular, células picnóticas y pérdida de la citoarquitectura estriatal (flechas).

En una segunda fase del experimento A, se utilizaron 20 ratas con las mismas características antes mencionadas las cuales fueron sometidas a la misma metodología descrita anteriormente, con el propósito de completar la n de los grupos anteriores. Sin embargo, no fue posible administrarles el BrdU después de la lesión, ya que no se presentaron fases del proestro y/o estro para incluirlas en los grupos ya establecidos. Obteniéndose las siguientes condiciones:

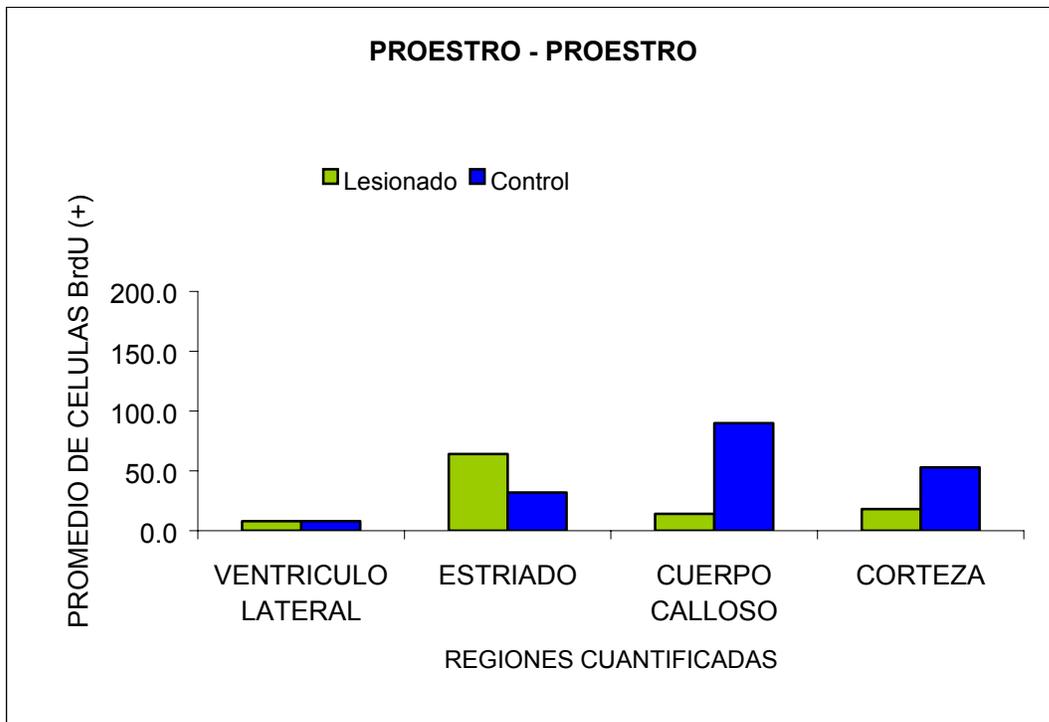
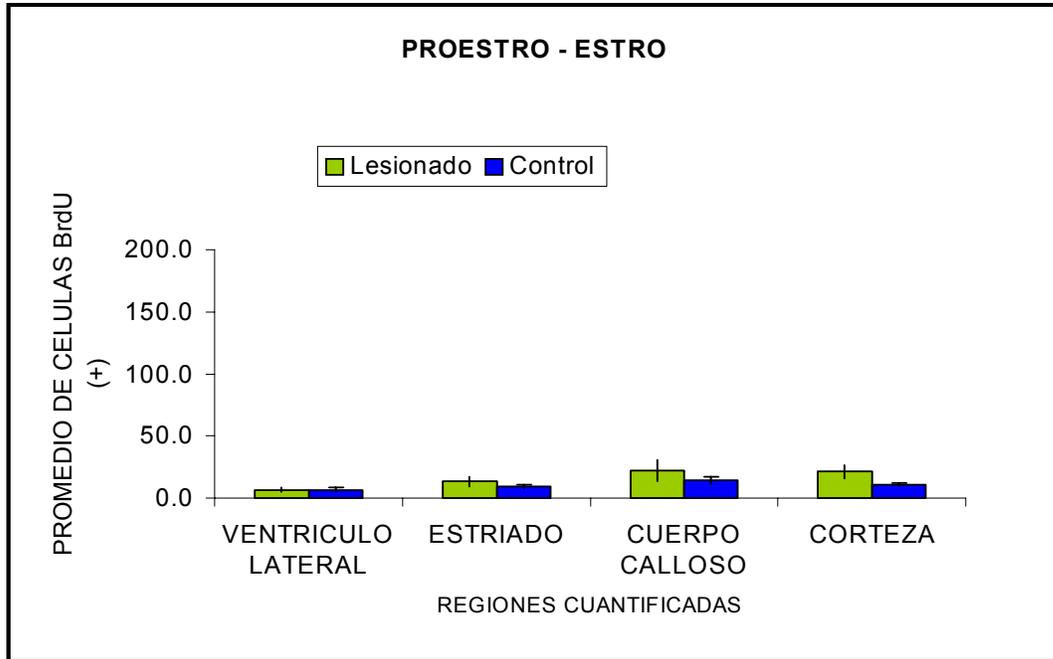
<b>LESIÓN</b>	<b>CONDICIÓN</b>	
<b>ESTRO</b>	<b>6</b>	<b>SACRIFICADAS</b>
<b>PROESTRO</b>	<b>8</b>	<b>5 (SACRIFICADAS) 3 (EN ESPERA DEL SIGUIENTE PROESTRO)</b>

n=14

Por tal motivo sólo se determinó el grado de proliferación celular en diferentes regiones cerebrales, mediante la cuantificación de células BrdU positivas, en aquellos animales que pudieron ser incluidos en los grupos establecidos. El conteo celular positivo a BrdU, se realizó en todos los cortes desde 2.20mm hasta -3.30mm respecto a Bregma según el atlas de Watson y Paxinos (1986) en todo el estriado, ventrículo lateral, cuerpo caloso y corteza, bajo el objetivo de 40X. Posteriormente se promedió el número de células BrdU positivas (Graf. 1 y 2) para cada uno de los grupos experimentales en cada una de las regiones cerebrales antes mencionadas, obteniéndose los siguientes resultados:



Grafica 1. Promedio de células BrdU (+) en el ventrículo lateral, estriado, cuerpo calloso y corteza. Gráfica superior muestra el promedio de células BrdU (+) en aquellos sujetos a los que se les lesionó y administró BrdU en la fase de estro. Gráfica inferior muestra el promedio de células BrdU (+) en los sujetos lesionados en la fase de estro y se les administro BrdU en la fase de proestro.



Grafica 2. Promedio de células BrdU (+) en el ventrículo lateral, estriado, cuerpo calloso y corteza. Grafica superior muestra el promedio de células BrdU (+) en los sujetos lesionados en proestro y a los que se les administró BrdU en estro. La grafica inferior muestra el promedio de células BrdU (+) en aquellos sujetos a los que se les lesionó y administró BrdU en proestro.

## **B. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO A**

De acuerdo con los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la proliferación celular en los diferentes grupos, puede observarse que tanto el grupo de estro-proestro como el grupo proestro-proestro tuvieron un promedio mayor de células BrdU (+).

Para el caso del grupo estro-proestro, en el estriado ipsilateral se encontró un mayor número de células BrdU (+) en comparación con su propio control y a las demás regiones analizadas. Del mismo modo, en el grupo proestro-proestro se encontró un mayor número de células BrdU (+) tanto en el estriado como en el cuerpo calloso.

Tanto para el primer como para el segundo grupo antes mencionados, estos resultados pueden adjudicarse al efecto del estrógeno, ya que en el ciclo estral de la rata el pico más alto de estrógeno se presenta durante la fase del proestro. Es decir cuando dicha hormona, de acuerdo a lo mencionado con la bibliografía, está regulando la inducción de la neurogénesis, así como la sobrevivencia celular.

El alto número de células BrdU (+) en el cuerpo calloso puede deberse probablemente a que las células recién generadas en el cuerpo calloso contralateral están migrando hacia la zona de lesión en el estriado ipsilateral. Como mencionan Modo y cols. (2004), en ratas que han sido transplantadas con células troncales en el hemisferio contralateral al sitio de lesión por infarto unilateral. Las células migran hacia el hemisferio lesionado desde el sitio de inyección principalmente a través del cuerpo calloso y se instalan en el área alrededor del área de lesión.

## **C. CONCLUSIONES EXPERIMENTO A**

Probablemente la lesión unilateral e intraestriatal con ácido kaínico 5nm/ 0.5µl y/o la sobre estimulación cervico-vaginal al estar monitoreando la fase del ciclo estral en la que se encontraban las ratas, produce cambios en el ciclo estral provocando un pseudo embarazo, ya que después de esto, la mayoría de las ratas entran en diestro por un largo periodo. Esta situación no nos permitió completar las condiciones de los grupos programados (estro-estro, estro-proestro,

proestro-estro y proestro-proestro) por tal motivo se decidió replantear la metodología como se describe a continuación:

## **2. EXPERIMENTO B**

### **Sujetos**

Se utilizaron 20 ratas hembra de la cepa Sprague Dawley en edad reproductiva entre 200 y 300 kg de peso, las cuales se mantuvieron en un ciclo de luz- oscuridad (10- 14 hrs) con libre acceso a agua y alimento. Los animales fueron ovariectomizados y mantenidos en recuperación durante siete días.

### **Grupos tratamiento/ Lesión**

En el día ocho post cirugía se administró estradiol por vía subcutánea ( $\beta$ -Estradiol 3-Benzoato, Sigma) ( $0\mu\text{g}/\text{rata}$ ,  $25\mu\text{g}/\text{rata}$  y  $100\mu\text{g}/\text{rata}$ ) y simultáneamente se efectuó la lesión intraestriatal unilateral con ácido kaínico ( $5\text{nm}/0.5\mu\text{l}$ ) (Ocean Produce International, Nova Scotia, Canadá) disuelto en amortiguador de fosfatos (pH 7.4). En el lado contralateral se efectuó una lesión intraestriatal mecánica de acuerdo con las coordenadas AP +1.2, ML +2.6 y DV -4.5 respecto a bregma y la línea media. Después de la lesión a los animales se les administró 0.5 ml de ampicilina y 0.1 ml de Diazepam ( $5\text{mg}/\text{ml}$ ). Durante los días tres y cinco post lesión, nuevamente se administró estradiol vía subcutánea.

### **Inyección de BrdU**

En el día cuatro y cinco post lesión, las ratas recibieron una inyección diaria del marcador mitogénico 5'bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) ( $200\text{mg}/\text{kg}$ ) (Sigma, St. Louis, USA) en 0.9% NaCl, por vía intraperitoneal, al séptimo día las ratas fueron sacrificadas utilizando una sobredosis de pentobarbital ( $0.3\text{ml}/\text{kg}$ ) (Cheminova, México, DF), perfundidas vía intracardiaca con PBS (0.1 M) y paraformaldehído (4% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4).

proestro-estro y proestro-proestro) por tal motivo se decidió replantear la metodología como se describe a continuación:

## **2. EXPERIMENTO B**

### **Sujetos**

Se utilizaron 20 ratas hembra de la cepa Sprague Dawley en edad reproductiva entre 200 y 300 kg de peso, las cuales se mantuvieron en un ciclo de luz- oscuridad (10- 14 hrs) con libre acceso a agua y alimento. Los animales fueron ovariectomizados y mantenidos en recuperación durante siete días.

### **Grupos tratamiento/ Lesión**

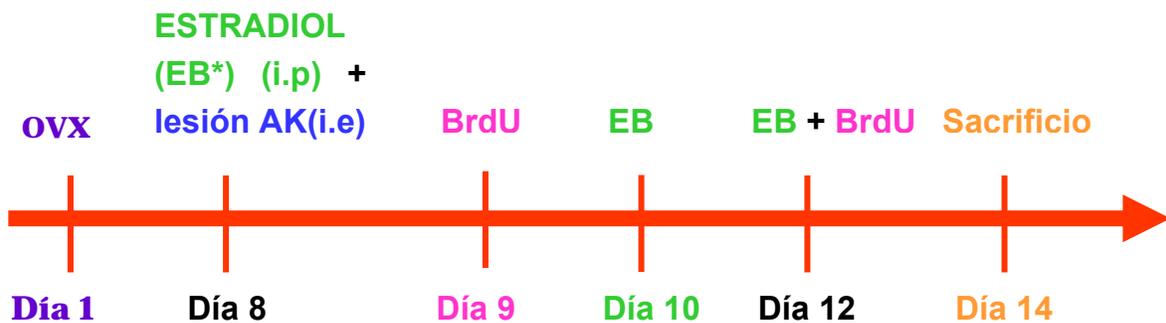
En el día ocho post cirugía se administró estradiol por vía subcutánea ( $\beta$ -Estradiol 3-Benzoato, Sigma) (0 $\mu$ g/rata, 25 $\mu$ g/rata y 100 $\mu$ g/rata) y simultáneamente se efectuó la lesión intraestriatal unilateral con ácido kaínico (5nm/0.5 $\mu$ l) (Ocean Produce International, Nova Scotia, Canadá) disuelto en amortiguador de fosfatos (pH 7.4). En el lado contralateral se efectuó una lesión intraestriatal mecánica de acuerdo con las coordenadas AP +1.2, ML +2.6 y DV -4.5 respecto a bregma y la línea media. Después de la lesión a los animales se les administró 0.5 ml de ampicilina y 0.1 ml de Diazepam (5mg/ ml). Durante los días tres y cinco post lesión, nuevamente se administró estradiol vía subcutánea.

### **Inyección de BrdU**

En el día cuatro y cinco post lesión, las ratas recibieron una inyección diaria del marcador mitogénico 5'bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (200mg/kg) (Sigma, St. Louis, USA) en 0.9% NaCl, por vía intraperitoneal, al séptimo día las ratas fueron sacrificadas utilizando una sobredosis de pentobarbital (0.3ml/ kg) (Cheminova, México, DF), perfundidas vía intracardiaca con PBS (0.1 M) y paraformaldehído (4% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4).

## Histología

Una vez obtenidos los cerebros, estos fueron criopreservados en sacarosa al 30% y cortados a 40 $\mu$  sagitalmente para posteriormente realizar la inmunohistoquímica contra BrdU, así como la tinción de Nissl y la técnica de citocromo oxidasa para observar el efecto de la lesión (como se describió en la metodología anterior). fig 14-20. Además, con el fin de determinar si el las células en división marcadas con BrdU, eran neuronas o posiblemente eran glia por que se estuviese llevando un proceso gliogénico por efecto de la lesión, se llevo a cabo una inmunohistoquímica contra glia (fig. 21 y 22).



(\*)0 $\mu$ gEB/rata  
5 $\mu$ gEB/rata  
100 $\mu$ gEB/rata

Fig (13). Se describen cada uno de los pasos seguidos del método utilizado en el experimento B.

## A. RESULTADOS EXPERIMENTO B

### VÍA MIGRATORIA ROSTRAL

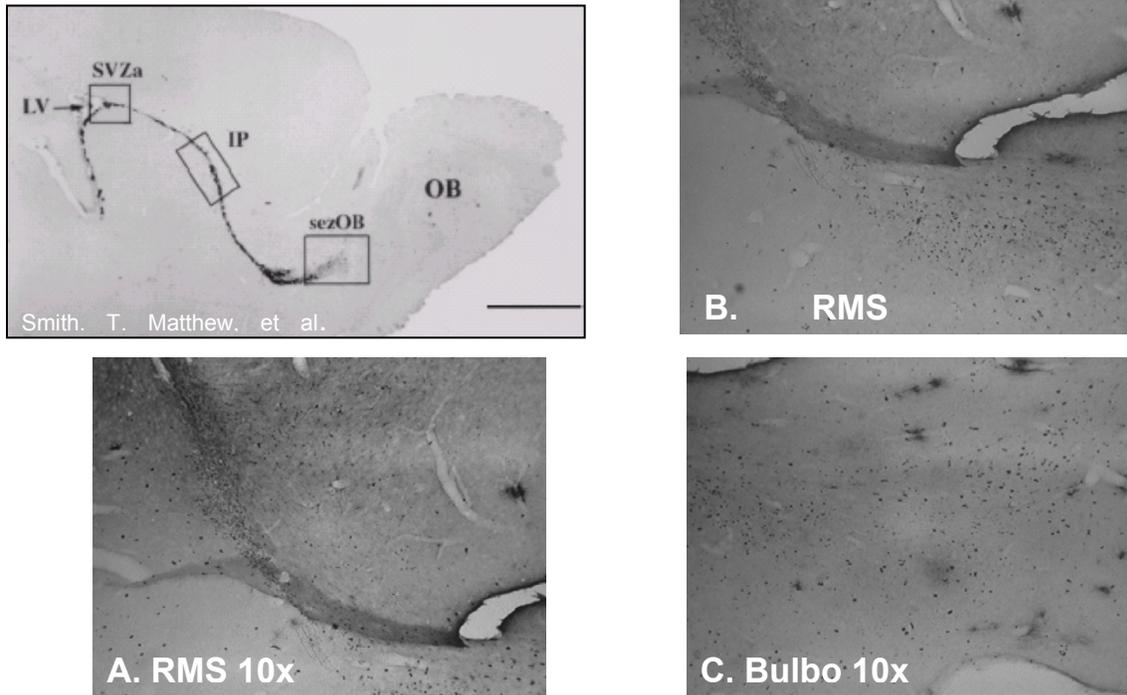


Fig (14). Inmunohistoquímica contra BrdU en cortes sagitales de ratas (0mgEB/rata) OVX. En inserto tomado de Mathew, et al (2000) del perrito de la pradera, se muestra la distribución de las células BrdU(+) a lo largo de la RMS. **A.** y **B.** se muestran células BrdU(+) en la SVZ aproximadamente en la zona indicada en el 1er recuadro del inserto. **C.** Se muestran células BrdU(+) en el bulbo olfatorio).

## EFFECTO DE LESIÓN (RATAS OVX 0mgEB/rata)

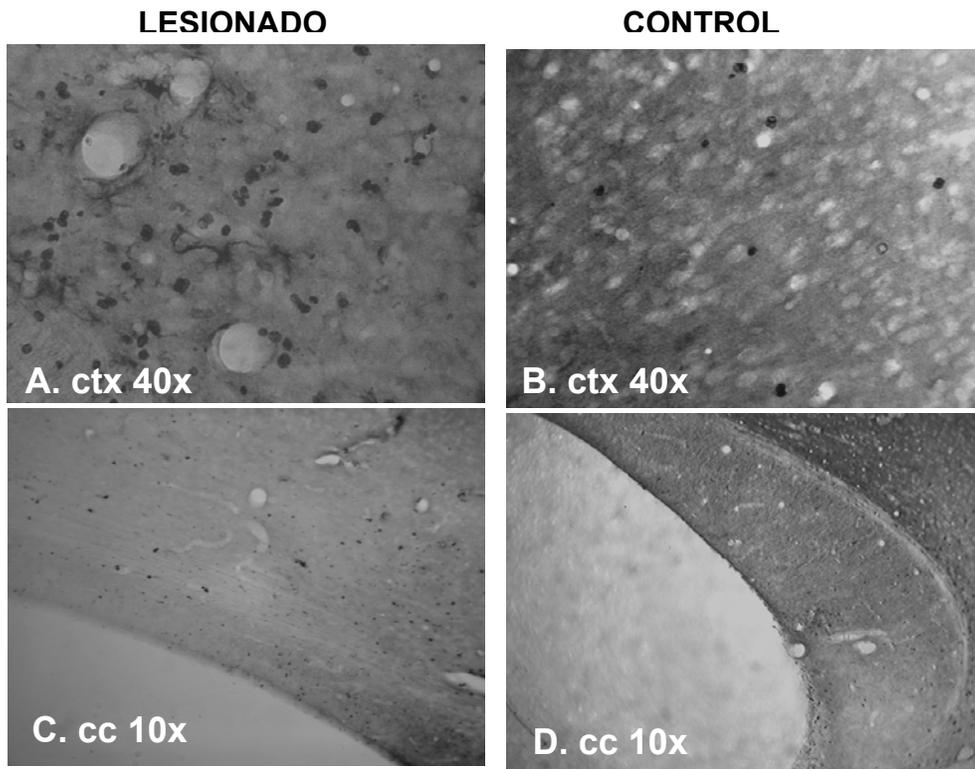
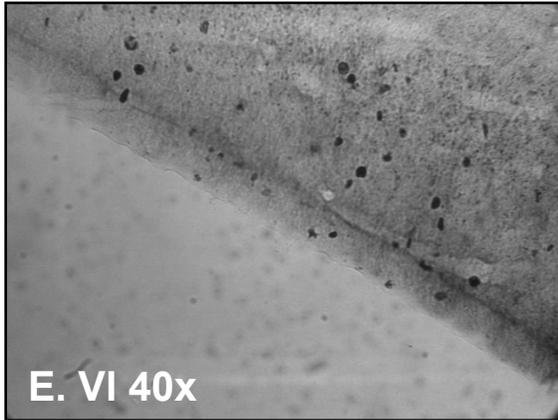


Fig (15). Inmunohistoquímica contra BrdU en cortes sagitales de ratas adultas ovariectomizadas sin estradiol (0 $\mu$ gEB/rata). **A.** células BrdU(+) en corteza (hemisferio lesionado), **B.** células BrdU(+) en corteza (hemisferio control), **C.** células BrdU(+) en cuerpo calloso (hemisferio lesionado). **D.** células BrdU(+) en cuerpo calloso (hemisferio control).

## EFFECTO DE LESIÓN (RATAS OVX 0mgEB/rata)..(CONT)

LESIONADO



CONTROL

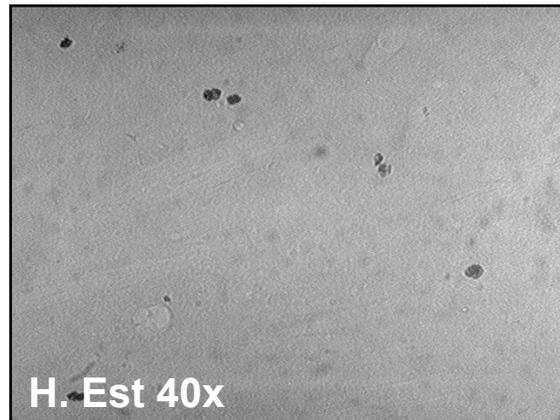
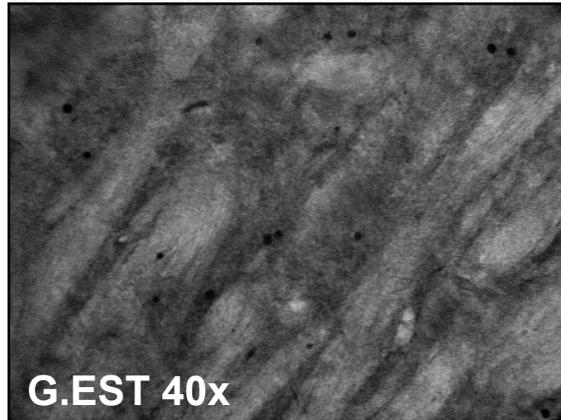
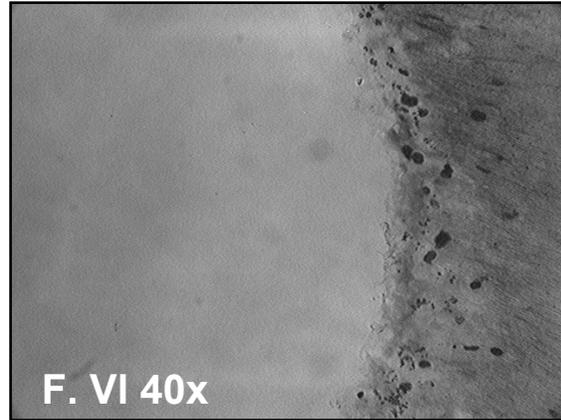
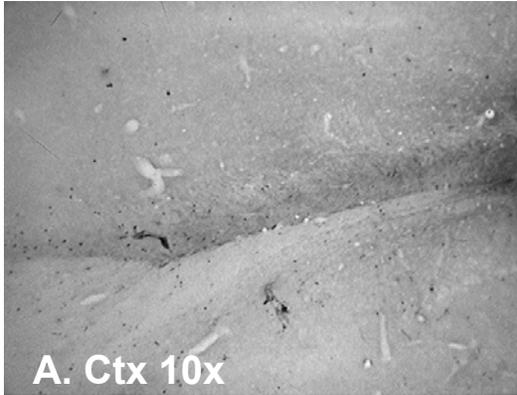


Fig (16). Inmunohistoquímica contra BrdU en cortes sagitales de ratas adultas ovariectomizadas con 0 $\mu$ gEB/rata. **E.** células BrdU(+) en ventrículo lateral (hemisferio lesionado), **F.** células BrdU(+) en ventrículo lateral (hemisferio control), **G.** células BrdU(+) en estriado (hemisferio lesionado), **H.** células BrdU(+) en estriado (hemisferio control).

## EFFECTO DE TRATAMIENTO (RATAS OVX 25 $\mu$ gEB/rata)

LESIONADO



CONTROL

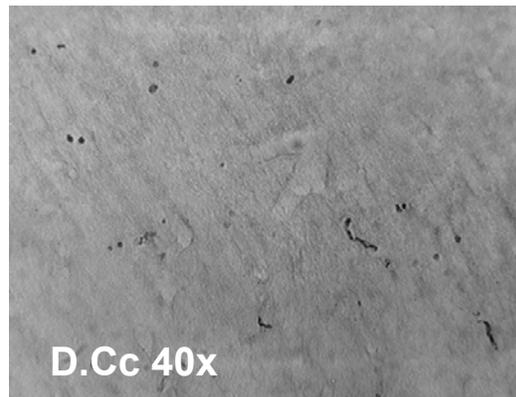
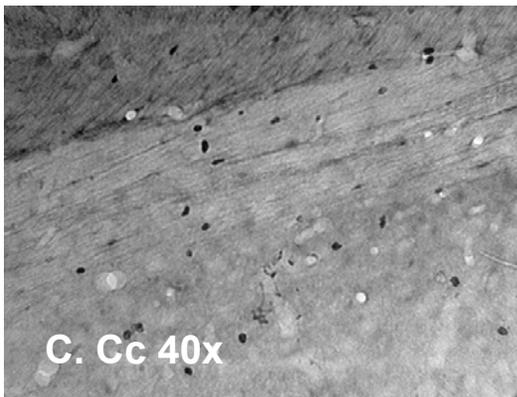
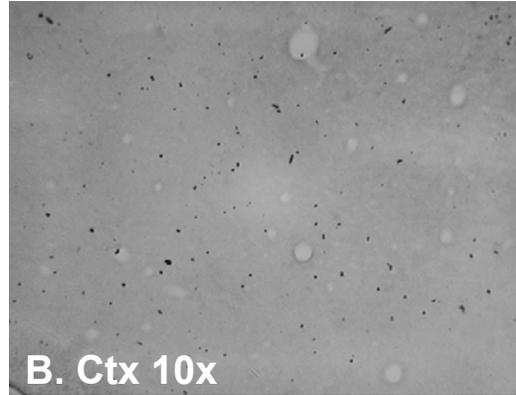


Fig (17). Inmunohistoquímica contra BrdU en cortes sagitales de ratas adultas ovariectomizadas tratadas con 25 $\mu$ gEB/rata. **A.** células BrdU(+) en corteza (hemisferio lesionado), **B.** células BrdU(+) en corteza (hemisferio control), **C.** células BrdU(+) en cuerpo calloso (hemisferio lesionado), **D.** células BrdU(+) en cuerpo calloso (hemisferio control).

## EFFECTO DE TRATAMIENTO (RATAS OVX 25 $\mu$ gEB/rata) Cont...

### LESIONADO

### CONTROL

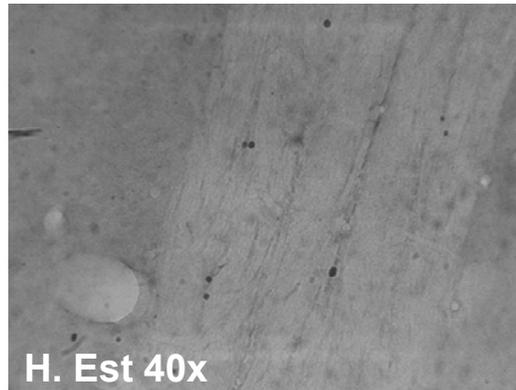
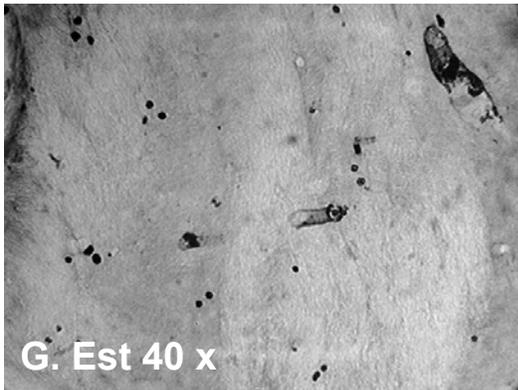
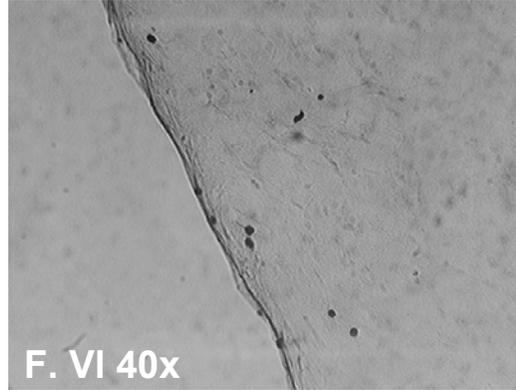
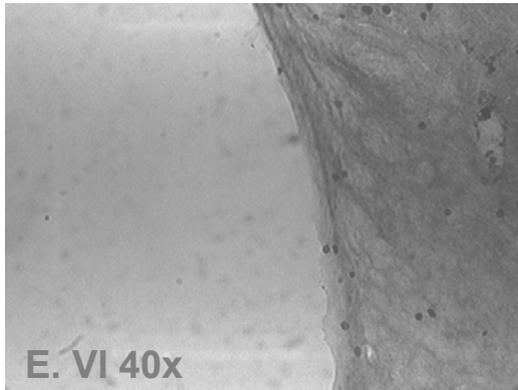


Fig (18). Inmunohistoquímica contra BrdU en cortes sagitales de ratas adultas ovariectomizadas tratadas con 25 $\mu$ gEB/rata. **E.** células BrdU(+) en ventrículo lateral (hemisferio lesionado), **F.** células BrdU(+) en ventrículo lateral (hemisferio control), **G.** células BrdU(+) en estriado (hemisferio lesionado), **H.** células BrdU(+) en estriado (hemisferio control).

## EFFECTO DE TRATAMIENTO (RATAS OVX 100µgEB/rata)

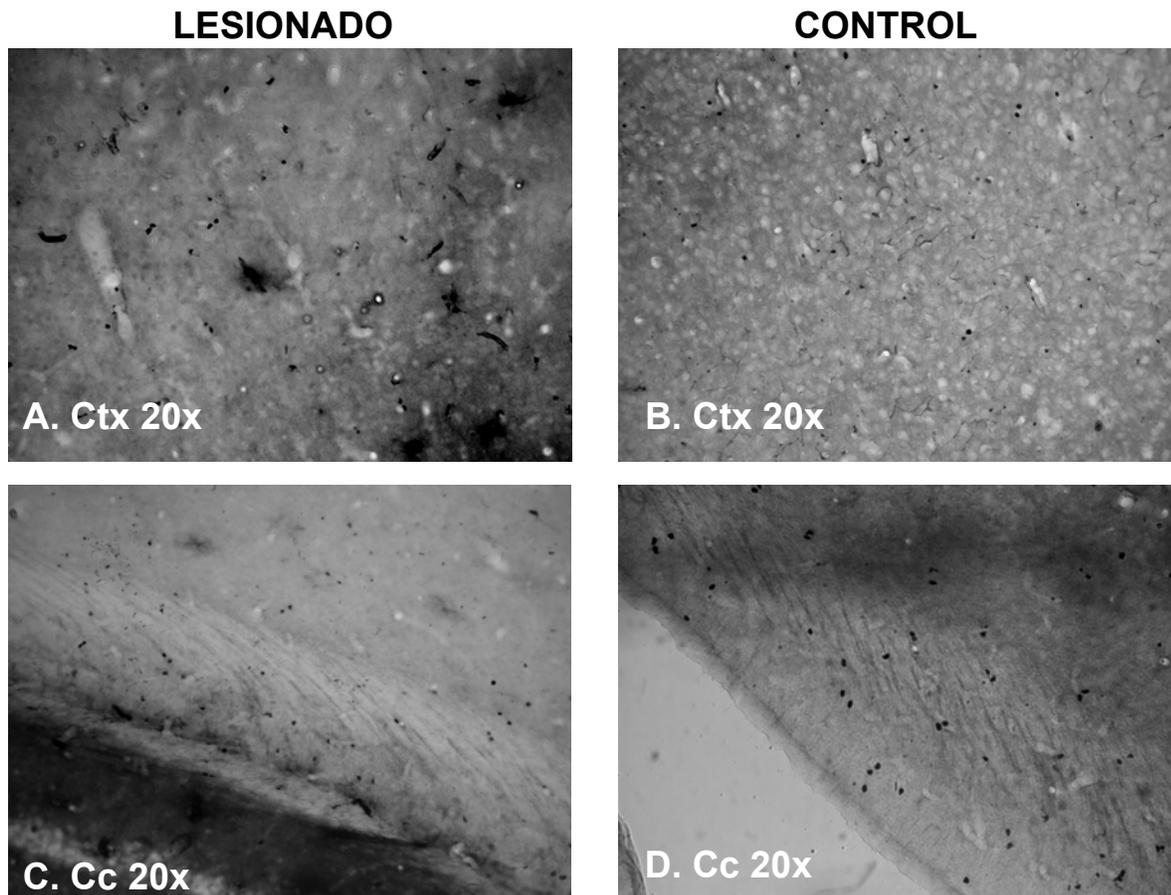


Fig (19). Inmunohistoquímica contra BrdU en cortes sagitales de ratas adultas ovariectomizadas tratadas con 100µgEB/rata. **A.** células BrdU(+) en corteza (hemisferio lesionado), **B.** células BrdU(+) en corteza (hemisferio control), **C.** células BrdU(+) en cuerpo calloso (hemisferio lesionado), **D.** células BrdU(+) en cuerpo calloso (hemisferio control).

## EFFECTO DE TRATAMIENTO (RATAS OVX 100µgEB/rata)

### LESIONADO

### CONTROL

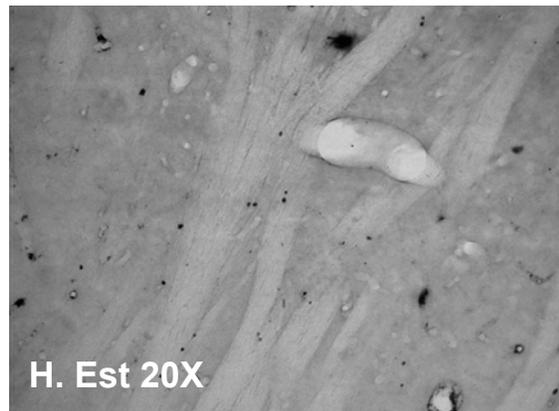
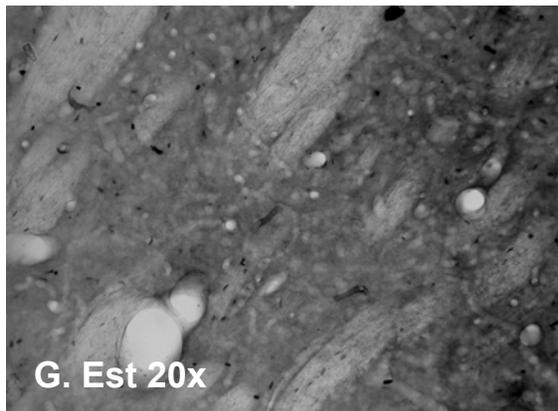
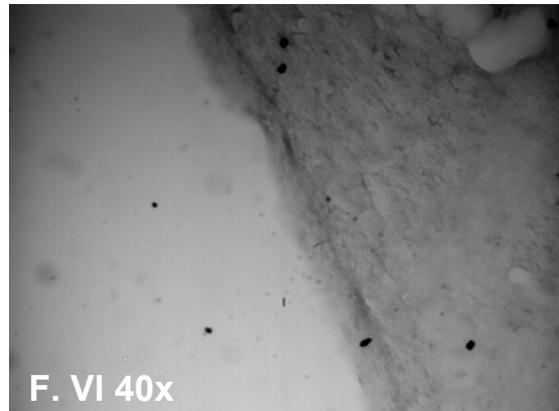
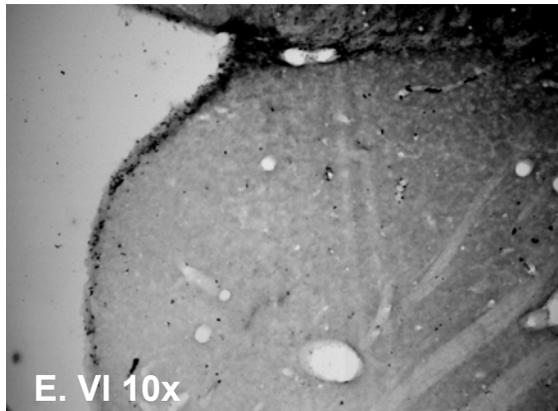


Fig (20). Inmunohistoquímica contra BrdU en cortes sagitales de ratas adultas ovariectomizadas tratadas con 100µgEB/rata. **E.** células BrdU(+) en ventrículo lateral (hemisferio lesionado), **F.** células BrdU(+) en ventrículo lateral (hemisferio control), **G.** células BrdU(+) en estriado (hemisferio lesionado), **H.** células BrdU(+) en estriado (hemisferio control)

## EXPRESIÓN DE GFAP (Proteína ácida fibrilar glial) 0µg/rata

LESIÓN

CONTROL

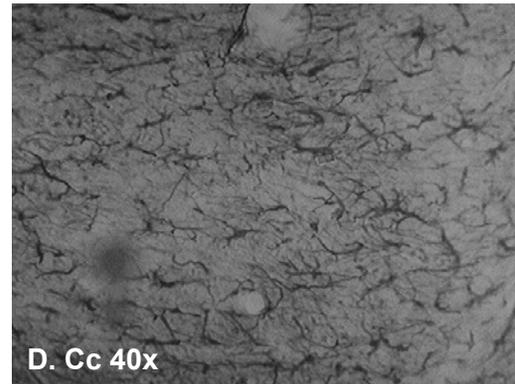
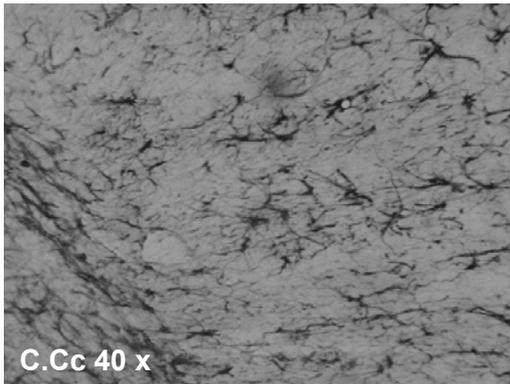
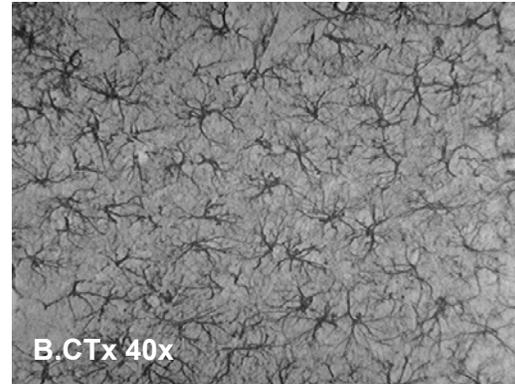
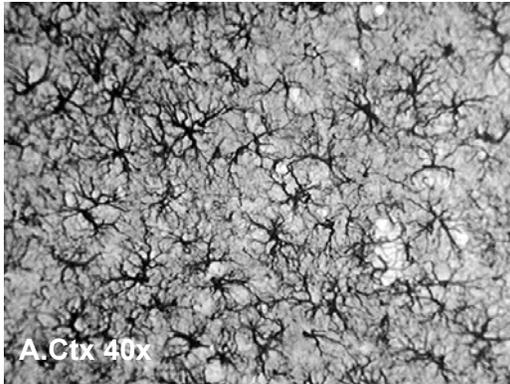


Fig (21). Inmunohistoquímica contra GFAP. Cortes sagitales de rata hembra adulta ovariectomizada con 0µgEB/rata. **A.** expresión de GFAP en corteza (hemisferio lesionado), **B.** expresión de GFAP en corteza (hemisferio control), **C.** expresión de GFAP en cuerpo calloso (hemisferio lesionado), **D.** expresión de GFAP en cuerpo calloso (hemisferio control).

## EXPRESIÓN DE GFAP (Proteína ácida fibrilar glial) 0 $\mu$ g/rata. Cont...

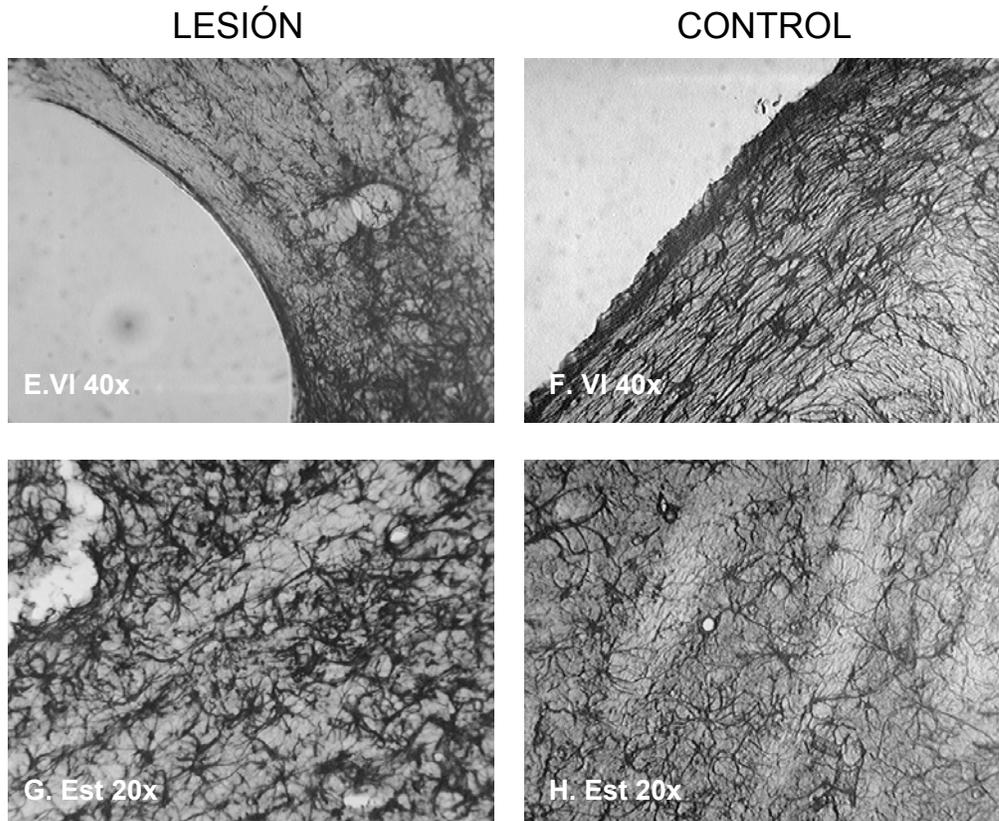


Fig (22). Inmunohistoquímica contra GFAP. Cortes sagitales de rata hembra adulta ovariectomizada con 0 $\mu$ gEB/rata. **E.** expresión de GFAP en ventrículo lateral (hemisferio lesionado), **F.** expresión de GFAP en ventrículo lateral (hemisferio control), **G.** expresión de GFAP en estriado (hemisferio lesionado), **H.** expresión de GFAP en estriado (hemisferio control).

### B. CONCLUSIONES EXPERIMENTO B

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis cualitativo, se puede observar la existencia de proliferación celular en todas las regiones analizadas (estriado, ventrículo lateral, cuerpo calloso y corteza), ya que en dichas regiones se encontraron células que incorporaron el marcador mitogénico BrdU.

## EXPRESIÓN DE GFAP (Proteína ácida fibrilar glial) 0 $\mu$ g/rata. Cont...

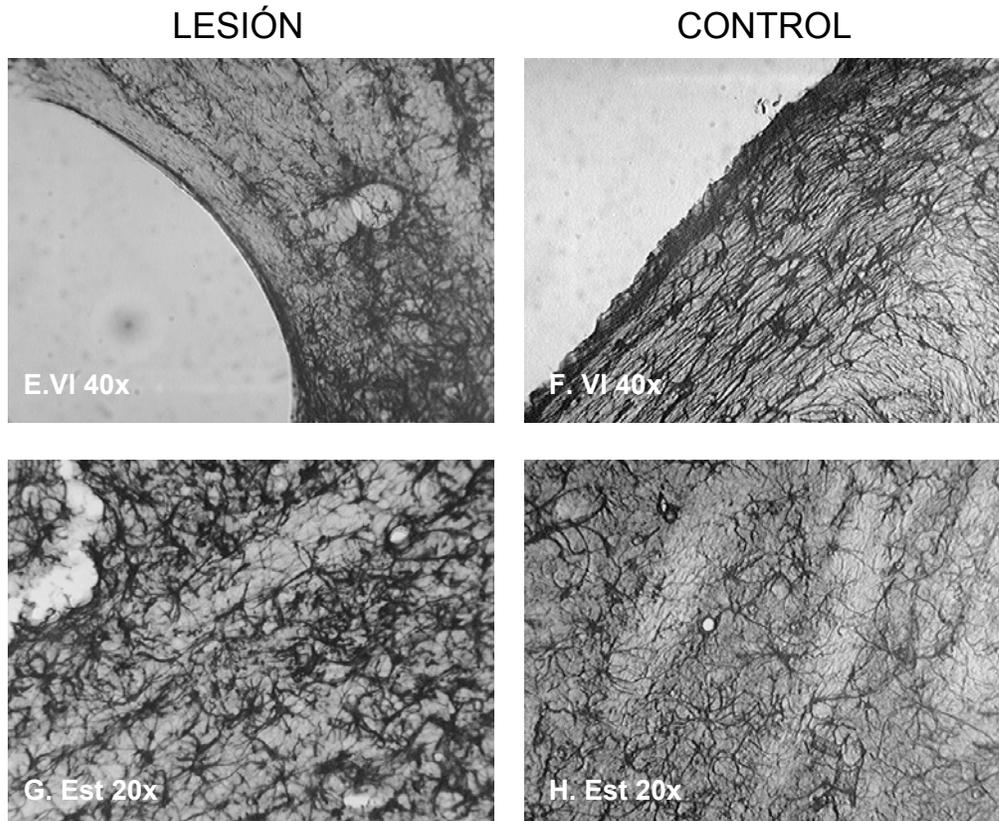


Fig (22). Inmunohistoquímica contra GFAP. Cortes sagitales de rata hembra adulta ovariectomizada con 0 $\mu$ gEB/rata. **E.** expresión de GFAP en ventrículo lateral (hemisferio lesionado), **F.** expresión de GFAP en ventrículo lateral (hemisferio control), **G.** expresión de GFAP en estriado (hemisferio lesionado), **H.** expresión de GFAP en estriado (hemisferio control).

### B. CONCLUSIONES EXPERIMENTO B

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis cualitativo, se puede observar la existencia de proliferación celular en todas las regiones analizadas (estriado, ventrículo lateral, cuerpo calloso y corteza), ya que en dichas regiones se encontraron células que incorporaron el marcador mitogénico BrdU.

Por otro lado se puede observar un efecto de lesión, ya que el grupo de ratas a las que se les administró unilateral e intraestriatalmente ácido kaínico, y sin estradiol (0µg/rata EB), presentaron ligeramente un mayor número de células BrdU (+) en comparación con su propio control (hemisferio contralateral) (Fig 15).

Al comparar cualitativamente los grupos con diferentes dosis de estradiol (25µg/rata y 100µg/rata) se puede observar que el marcaje de células recién generadas con BrdU en las regiones analizadas es variable entre animales y entre grupo. Por lo que se puede concluir hasta el momento que el número de células no es dosis dependiente. Lo cual se relaciona con lo mencionado por Galea y colaboradores (2006), quienes muestran que el estradiol induce el incremento de la proliferación celular de manera dosis dependiente, una dosis de 10µg incrementa la proliferación celular, mientras que una dosis suprafisiológica (50µg) no incrementa significativamente dicha proliferación.

En los grupos experimentales (25µg/rata y 100µg/rata), se observa un mayor número de células que incorporaron el BrdU en el hemisferio control en comparación con el hemisferio ipsilateral a la lesión, en contraste con lo descrito en la literatura y al grupo control (0µg/rata) en donde se muestra que la lesión cerebral aumenta la proliferación celular.

Por otro lado no se puede asegurar que las células marcadas con BrdU sean de fenotipo neuronal, ya que los resultados de la inmunohistoquímica contra GFAP, muestran la existencia de una gran cantidad de glia. Por lo que es necesario corroborar estos datos en un siguiente experimento utilizando marcadores neuronales como doblecortina (DCX), el cual es un marcador de neuronas inmaduras.

Con base en los resultados previos, en la siguiente etapa del proyecto se emplearán marcadores fluorescentes, ya que el utilizar diaminobenzidina para visualizar la señal del anticuerpo secundario, no ha permitido realizar un conteo confiable de las células marcadas con BrdU en las regiones cercanas a la lesión.

### **3. EXPERIMENTO C**

#### **Sujetos**

Se utilizaron 20 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley en edad reproductiva entre 200- 300 kg de peso, las cuales se trataron bajo las mismas condiciones de la metodología descrita en el experimento B.

#### **Histología e Inmunofluorescencia**

Una vez obtenidos los cerebros, se obtuvieron cortes seriales de 40 $\mu$  los cuales se procesaron de acuerdo con la técnica de inmunofluorescencia usando un anticuerpo dirigido contra BrdU, para detectar proliferación celular. Por otro lado, para determinar el fenotipo de las células en división marcadas con BrdU se llevó a cabo un doble marcaje con GFAP y DCX, los cuales son marcadores de células gliales y neuronas inmaduras respectivamente (Tattersfield et al., 2004; Brown et al., 2003), en los tejidos previamente procesados con la inmunofluorescencia contra BrdU. Los protocolos experimentales se describen a continuación.

Para la inmunofluorescencia contra BrdU, los cortes en flotación fueron lavados con TBS (0.05M, pH 7.6) (20 min x 2) posteriormente se incubaron en borohidrato de sodio 0.5% por 15 min, seguidos de tres lavados con TBS. Para permitir el inmunomarcaje con BrdU los cortes se incubaron en HCl 2N por 60 min, y posteriormente se lavaron con TBS por 15 min. Se mantuvieron por 15 min a 4°C en la solución de bloqueo (20% Suero de caballo, 0.3% Triton X en TBS). Los tejidos se incubaron en el anticuerpo primario anti- BrdU (1:250, BD Bioscience) en 3% suero de caballo, 0.32% Triton X en TBS por 16 hrs a 4°C. Se bloqueó con 3 lavados de 15 min con 0.02% Triton X, 1% suero de caballo en TBS, seguido de la incubación por 2h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Cy3 cabra anti IgG- ratón (1:1000, Jackson Immunoresearch Laboratories). Los cortes fueron montados y cubiertos con glicerol bajo luz roja, e inmediatamente fueron observados bajo el microscopio confocal.

La doble inmunofluorescencia contra BrdU- GFAP y BrdU-DCX se realizó con tejidos previamente procesados con la inmunofluorescencia contra BrdU, los cuales fueron lavados con TBS hasta que estos se desprendieran del portaobjetos. De manera particular para llevar a cabo la doble inmunofluorescencia de BrdU-GFAP, los cortes se lavaron con TBS (0.05M, pH 7.6) durante 10 min (x4), posteriormente se incubaron con borohidrato de sodio 0.5% en TBS. El tejido se lavó con TBS (5x 10 min), posteriormente se incubó con DMSO (dimetil sulfóxido) por 10 min, y nuevamente se lavó con TBS (10min x3); en seguida se incubó con suero de caballo al 20% en Triton al 0.3% en TBS (15min) lavándose con TBS (10m x2). Los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario anti-GFAP (1:1000, DAKO, CO.) por 16 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con 0.02% de Triton X, 1% suero de caballo en TBS 15min (x4). Enseguida se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti IgG-conejo conjugado con FITC ZyMax (1:500, Zymed Laboratories) durante 2 hrs a temperatura ambiente en la oscuridad. Los cortes fueron montados bajo luz roja y cubiertos con medio de montaje para fluorescencia (VECTASHIELD, Vector Laboratories, Burlingame, CA.) y observados inmediatamente bajo el microscopio confocal.

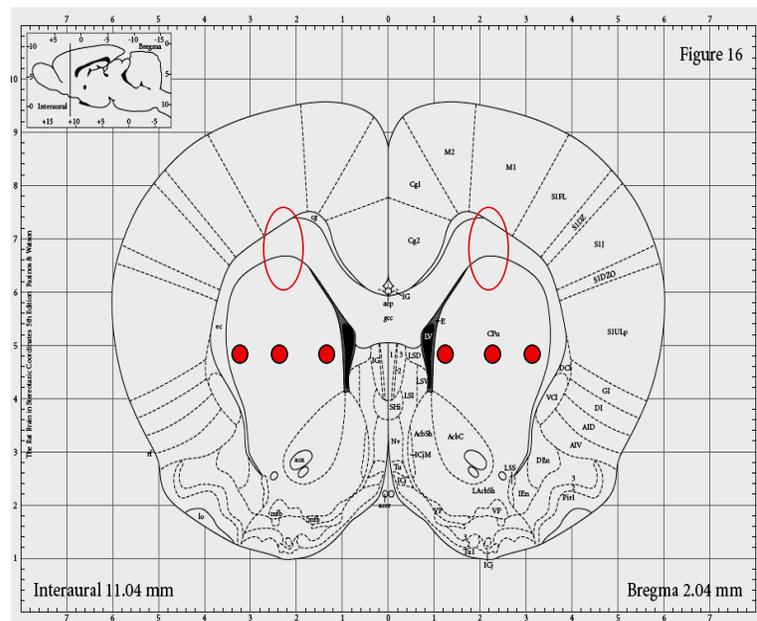
Para la doble inmunofluorescencia contra BrdU-DCX se siguió el protocolo anterior utilizándose el anticuerpo primario anti- doblecortina (DCX) (monoclonal) (1:500, CHEMICON) y el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Cy2 cabra anti-cobayo IgG (1:100). Posteriormente los cortes fueron montados bajo luz roja y cubiertos con medio de montaje para fluorescencia (VECTASHIELD, Vector Laboratories, Burlingame, CA), y fueron observados inmediatamente bajo el microscopio confocal.

Con el propósito de comprobar el marcaje selectivo de neuronas inmaduras con DCX, y descartar que no estuviese ocurrido un marcaje cruzado con células gliales, células en cultivo de una línea glial (C6) se incubaron con anticuerpos dirigidos contra DCX y GFAP. No obteniéndose expresión de DCX (Fig. 47).

El procedimiento que se utilizó para cuantificar la proliferación celular en el estriado, ventrículo lateral y cuerpo calloso para cada uno de los grupos (n=6) con los diferentes tratamientos con estradiol (0µgr/rata, 25µgr/rata y 100µgr/rata), se describe en la siguiente tabla.

<b>ESTRIADO</b>	<b>VENTRICULO LATERAL</b>	<b>CUERPO CALLOSO</b>
3 Niveles	3 Niveles	3 Niveles
3 campos dirección medio-lateral	Ventrículo lateral completo	1 campo
Hemisferio Izquierdo y Derecho	Hemisferio Izquierdo y Derecho	Hemisferios izquierdo y Derecho
Objetivo 40x	Objetivo 4x	Objetivo 40x

En seguida se muestran los tres niveles de cortes cerebrales en los que se cuantificó el número de células BrdU (+). Los círculos y óvalos rojos en el estriado y en el cuerpo calloso respectivamente, indican los campos en donde se llevó a cabo el análisis de proliferación celular en dichas estructuras. Mientras que en todo el ventrículo lateral, se cuantificó el número de células BrdU(+) (Tomada de Paxinos & Watson, 2005).



Nivel 1 (Bregma 2.04mm). Corte cerebral en el se analizo la proliferación celular. Los círculos y óvalos en el estriado y en el cuerpo callosos indican los campos en donde se cuantificó el número de células BrdU (+) en dichas estructuras. Se cuantificó en todo el ventrículo lateral. (Tomada de Paxinos & Watson, 2005).



## **Análisis de los datos y cuantificación**

Los tejidos procesados con la técnica de inmunofluorescencia contra BrdU, fueron observados para su análisis a través del microscopio confocal marca Nikon Eclipse E-600, en objetivos de 4x y 40x con ayuda del software de captura Simple PCI elaborado por C-Imaging Systems (Compix Inc, Cranberry Township, PA). Dichas muestras incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Cy3, fueron capturadas con el láser He-Ne, con el cual se observan longitudes de onda de 543nm, canal rojo, en un rango de ganancia de 1700 a 2800. Además, se utilizó un filtro al momento de capturar las imágenes con el fin de eliminar el exceso de fondo en cada una de ellas. Después de capturar la serie de imágenes (stack), de cada uno de los campos en las diferentes regiones cerebrales de interés, se procesaron con el programa simple PCI elaborando un montaje (unión) de cada una de las imágenes que comprendían dicha serie, para su posterior análisis cuantitativo y cualitativo (ventrículo lateral).

Para observar las muestras de tejido tratadas con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Cy2 y FITC, DCX y GFAP respectivamente, se utilizó el láser de Argón con una longitud de onda de 488nm (canal verde), con un rango de ganancia entre 1500 y 2100 de acuerdo al nivel del corte. Al igual que las muestras en el canal rojo después de capturar la serie de imágenes (stack) éstas se procesaron con el programa Simple PCI (Compix Inc, Cranberry Township, PA.) y de cada una de ellas se realizó un montaje para su posterior co-localización con las imágenes correspondientes en campo y en nivel al corte cerebral en el canal rojo.

La cuantificación de las células BrdU(+) se llevó a cabo manualmente en las imágenes capturadas con el objetivo de 40X, asegurándose que las estructuras observadas en la fotografía correspondieran a núcleos únicos marcados con BrdU y no se obtuvieran datos erróneos. Dicho análisis se llevó a cabo en cada uno de los niveles y campos para cada una de las estructuras cerebrales de interés (Figuras 23-28). Para el caso de las células GFAP (+) y DCX (+) no se llevó a cabo cuantificación, si no únicamente su detección para poder determinar el fenotipo de las células en proliferación marcadas con BrdU (Figuras 29-41).

Por otro lado la proliferación celular en los ventrículos laterales se evaluó cualitativamente de acuerdo al porcentaje del contorno de la zona subventricular en el que la señal de células BrdU (+) fue observada. Asignándose un valor arbitrario en relación con éste, 0-25%, 25-50%, 50-75% y 75-100%. Para cada grupo se calculó el número de animales que presentaron un porcentaje dado para cada nivel evaluado, como se muestra en las figuras (44-46).

## A. RESULTADOS EXPERIMENTO C

De acuerdo a los resultados obtenidos del número de células BrdU(+) en el estriado analizados mediante un ANOVA de tres vías (grupo por hemisferio por nivel), no existen diferencias significativas entre niveles (N1, N2 y N3) ni entre grupos (0µg/rata, 25µg/rata y 100µg/rata). Sin embargo, existe una diferencia significativa en el número de células BrdU(+) entre hemisferios, mostrándose un efecto de lesión ( $F(1,13)=34.36$ ,  $p<0.05$ ), ya que el hemisferio lesionado presenta un mayor número de células BrdU(+) en comparación con el hemisferio control (Fig.42). Por otro lado, al evaluar las diferencias entre grupos por hemisferio, sin considerar el nivel, mediante una prueba *post hoc* (Newman-Keuls) a partir de la ANOVA de tres vías, no se encontraron diferencias significativas entre grupos para ninguno de los dos hemisferios. En cambio, sí se encontraron diferencias significativas entre el hemisferio control y el hemisferio lesionado para cada uno de los grupos ( $p<0.05$ ). Vale la pena notar que se observa un ligero incremento de células BrdU (+) en cada uno de los tres niveles en el grupo de 100µg/rata, en comparación con los grupos de 0µg/rata y 25g/rata en el hemisferio izquierdo (control) sin llegar a ser significativo (Fig. 42).

En el caso del cuerpo calloso, al analizar los resultados mediante una ANOVA de tres vías (grupo por hemisferio por nivel), no se observan diferencias significativas en el número de células BrdU (+) comparando entre niveles ni entre grupos (Fig. 43). Sin embargo, al igual que en el estriado, se observa un efecto de lesión ya que sí existe una diferencia significativa en el número de células BrdU(+) entre el hemisferio derecho y el hemisferio izquierdo ( $F1,14= 31.27$ )  $p<0.05$ ). Al efectuar una prueba Post Hoc (Newman-Keuls) comparando los grupos por hemisferio, el grupo control (0µg/rata) muestra una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) en el incremento de células BrdU(+) dependiente de la lesión, lo cual no se observa en los grupos de

25 y 100µg/rata (Fig 27-28). Al llevar a cabo el ANOVA para evaluar el efecto de grupo por nivel en el número de células BrdU(+) tanto para el hemisferio lesionado como para el hemisferio control, no se observaron diferencias significativas en el grupo, ni en el nivel ni en la interacción ( $p < 0.05$ ) (Fig.43).

A continuación se muestran los resultados más relevantes de la inmunofluorescencia contra BrdU en el estriado, cuerpo calloso y ventrículos laterales. Algunos datos fueron omitidos, ya que se comportaron de manera similar a los resultados presentados.

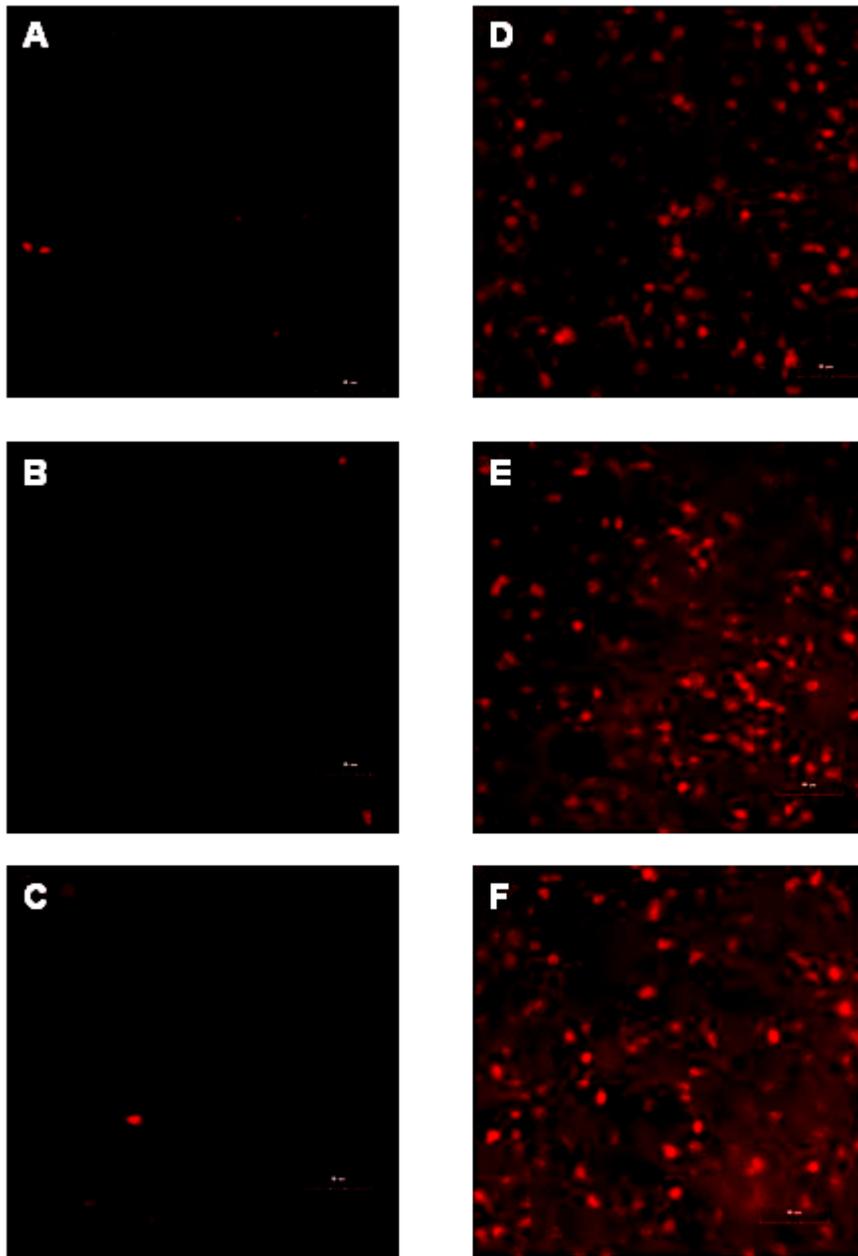


Fig (23). Inmunofluorescencia contra BrdU grupo 0 $\mu$ gEB/rata. Estriado Nivel 1. A (campo 1), B (campo 2) y C (campo 3) hemisferio control; D (campo 1) E (campo 2) y F (campo 3) hemisferio lesionado. Escala de barra 50  $\mu$ m.

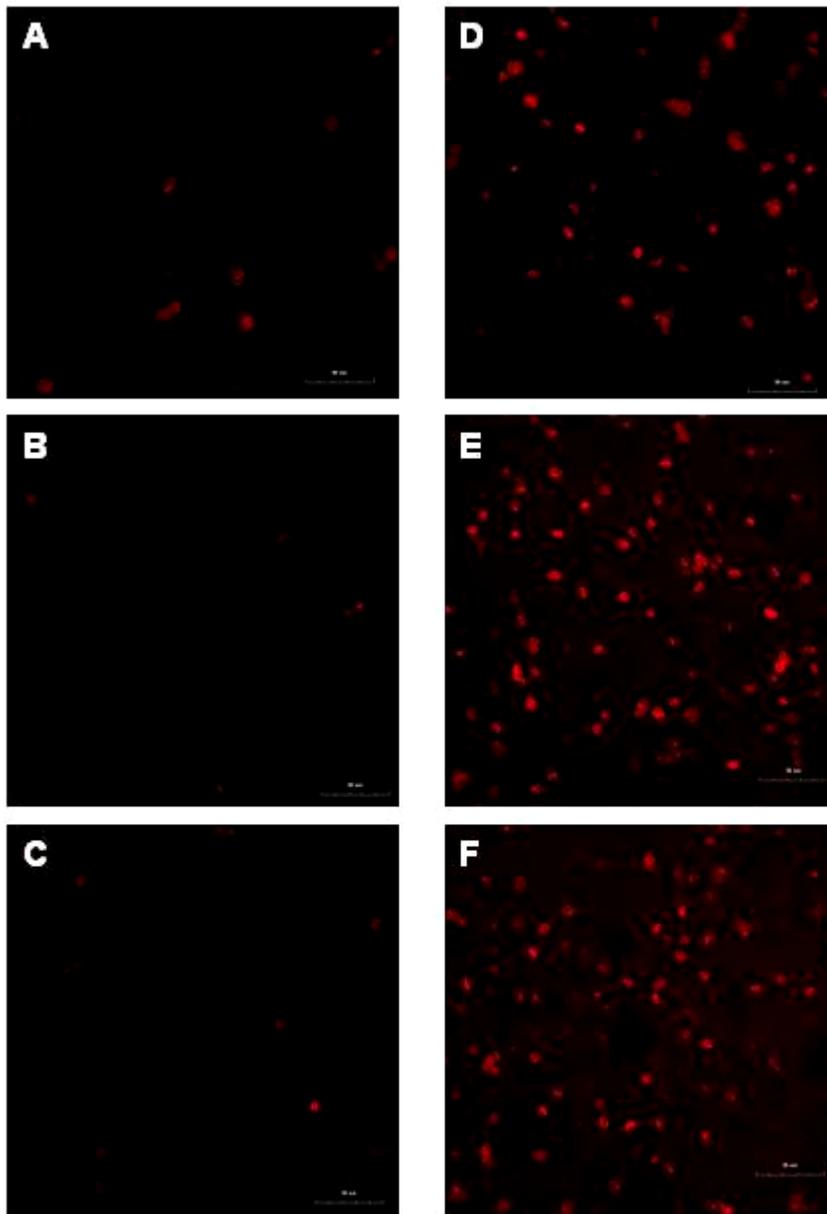


Fig (24). Inmunofluorescencia contra BrdU grupo 25 $\mu$ gEB/rata. Estriado Nivel 1. A (campo 1), B (campo 2) y C (campo 3) hemisferio control; D (campo 1) E (campo 2) y F (campo 3) hemisferio lesionado. Escala de barra 50  $\mu$ m.

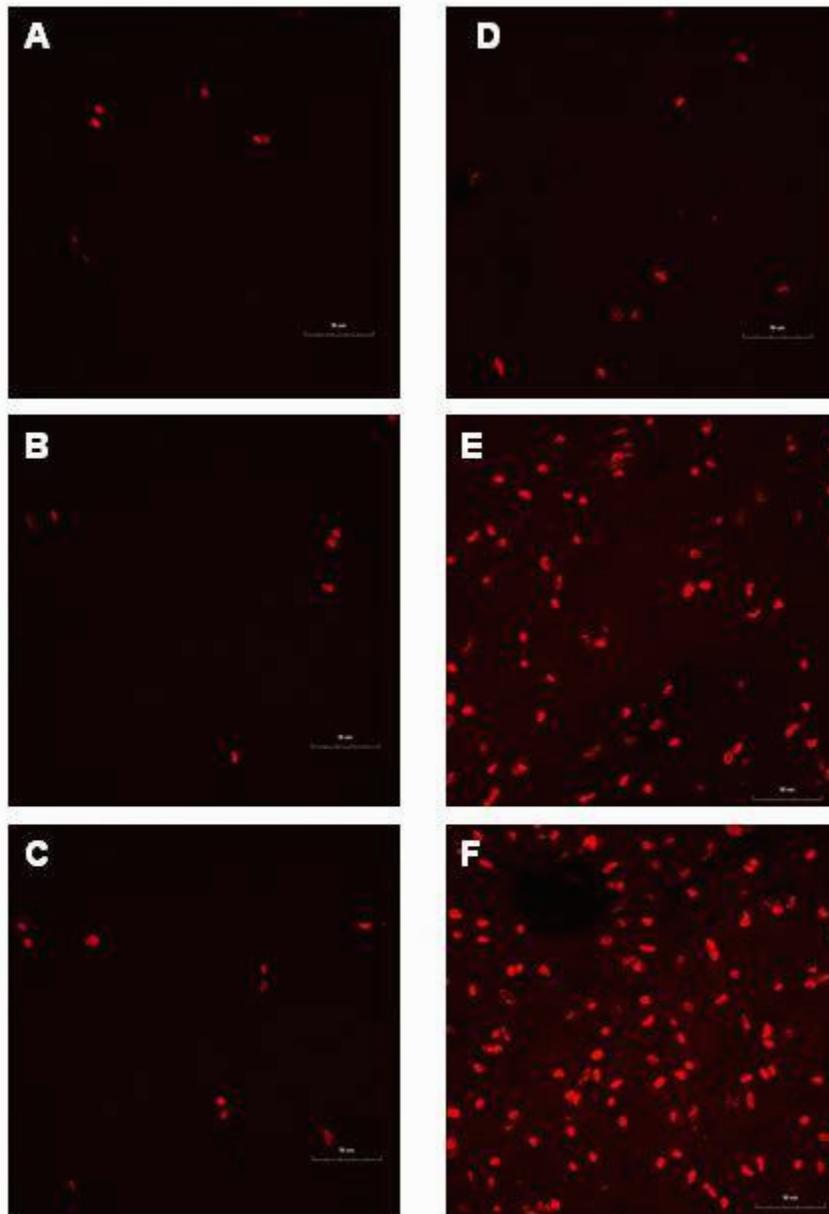


Fig (25). Inmunofluorescencia contra BrdU grupo 100µgEB/rata. Estriado Nivel 2. A (campo 1), B (campo 2) y C (campo 3) hemisferio control; D (campo 1) E (campo 2) y F (campo 3) hemisferio lesionado. Escala de barra 50 µm.

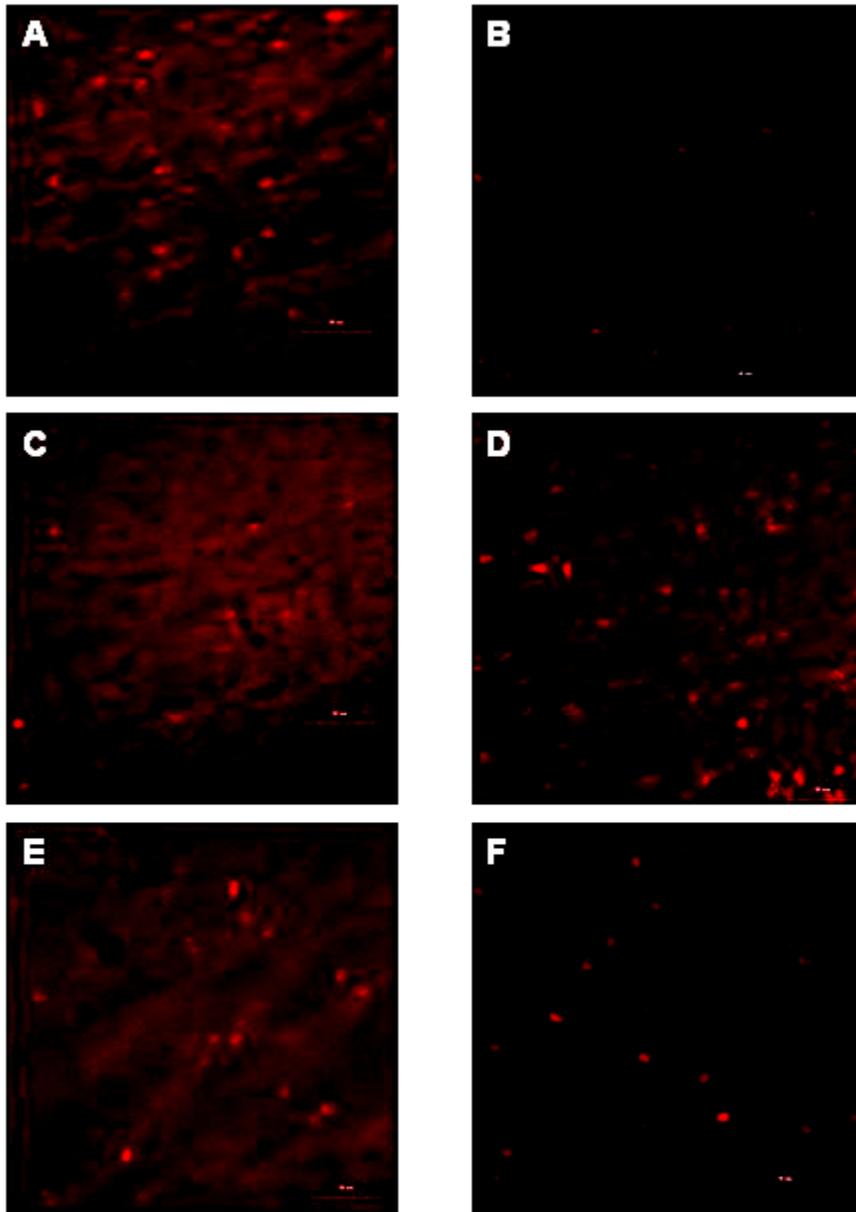


Fig (26). Inmunofluorescencia contra BrdU, cuerpo calloso Grupo 0 $\mu$ gEB/rata. A (control) y B (lesionado) Nivel 1; C (control) y D (lesionado) Nivel 2; E (control) y F (lesionado) Nivel 3. Escala de la barra 50 $\mu$ m.

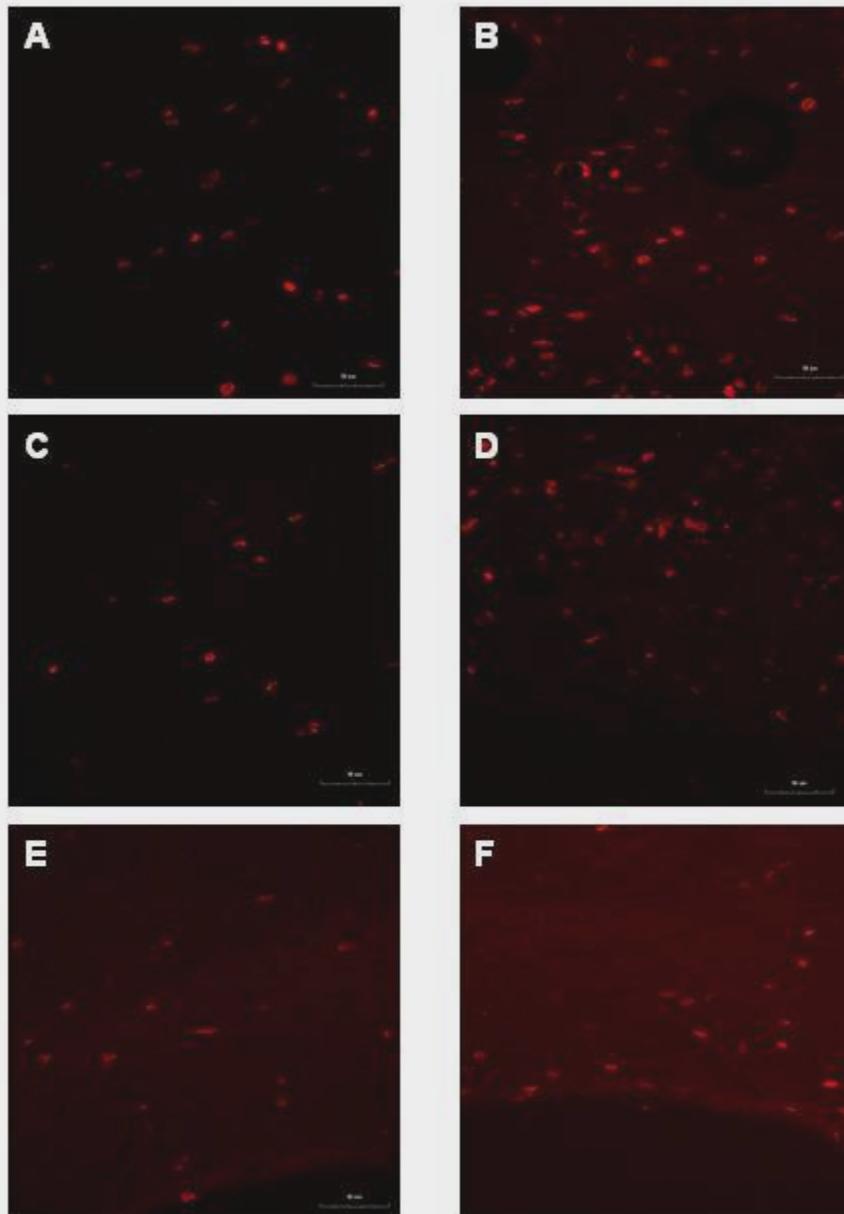


Fig (27). Inmunofluorescencia contra BrdU, cuerpo calloso Grupo 25 $\mu$ gEB/rata. A (control) y B (lesionado) Nivel 1; C (control) y D (lesionado) Nivel 2; E (control) y F (lesionado) Nivel 3. Escala de la barra 50 $\mu$ m.

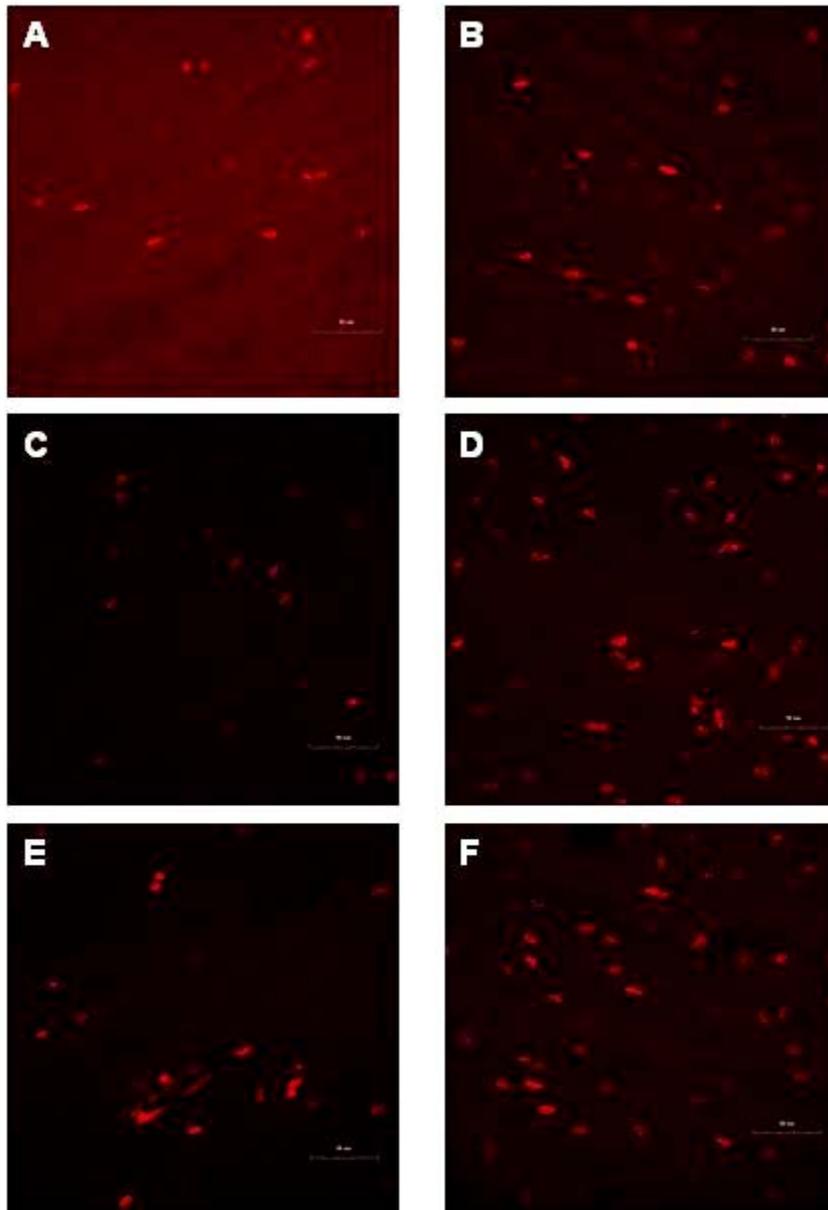


Fig (28). Inmunofluorescencia contra BrdU, cuerpo calloso. Grupo 100µgEB/rata. A (control) y B (lesión) Nivel 1; C (control) y D (lesionado) Nivel 2; E (control) y F (lesionado) Nivel 3. Escala de la barra 50µm.

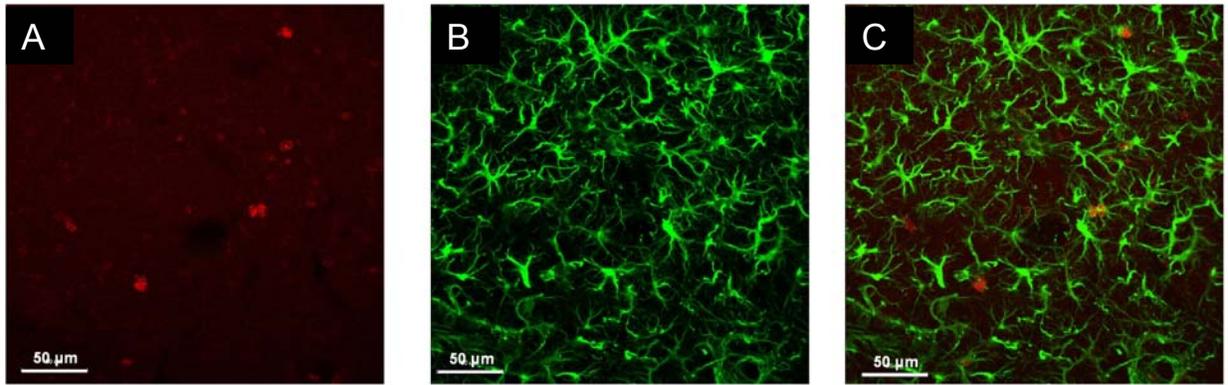


Fig (29). Doble marcaje con BrdU (rojo, células en división; A) y GFAP (verde, marcador glial; B); E (sobreposición de imágenes) en estriado derecho N1. Grupo control 0 $\mu$ gEB/rata. Escala de la barra 50 $\mu$ m.

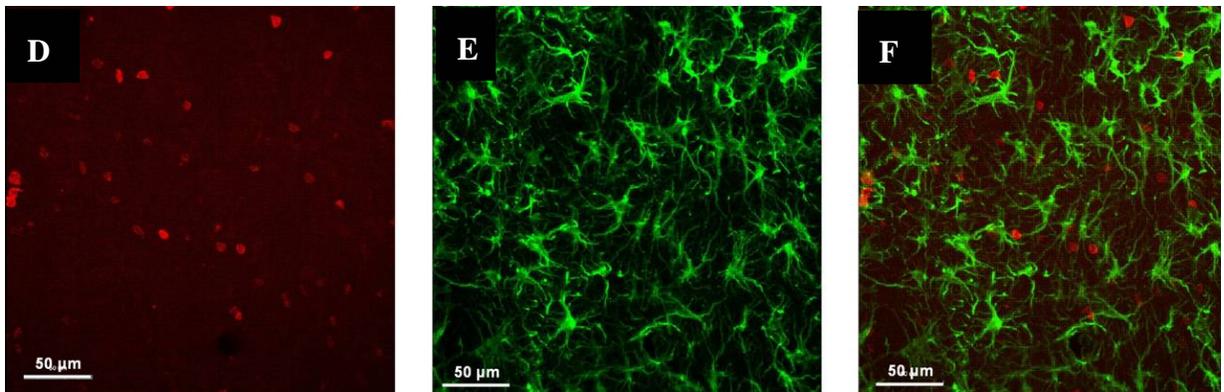


Fig (30). Doble marcaje con BrdU (rojo, células en división, D) y GFAP (verde, marcador glial, E); F (sobreposición de imágenes) en estriado derecho N2. Grupo 100 $\mu$ gEB/rata. Escala de la barra 50 $\mu$ m.

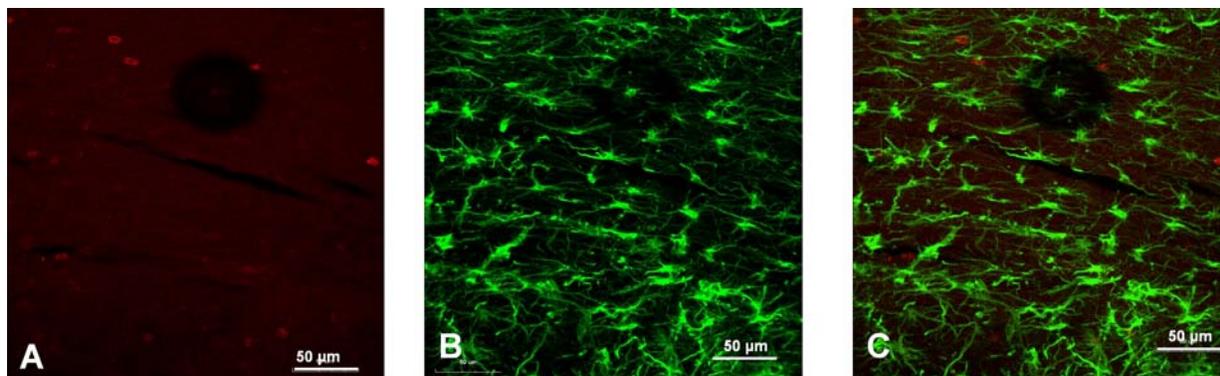


Fig.(31). Doble marcaje con BrdU (rojo, células en división; A) y GFAP (verde, marcador glial; B); C (sobreposición de imágenes). Cuerpo calloso derecho N1, grupo control 0µgEB/rata. Escala de la barra 50µm.

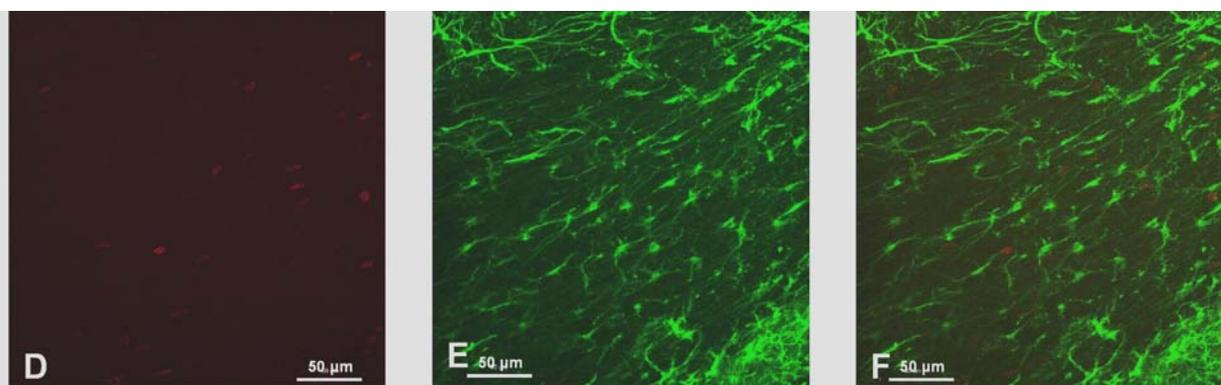


Fig. (32). Doble marcaje con BrdU (rojo; D células en división) y GFAP (verde; E; marcador glial); F (sobreposición de imágenes) en cuerpo calloso derecho N2, grupo 100µg/rata. Escala de la barra 50µm.

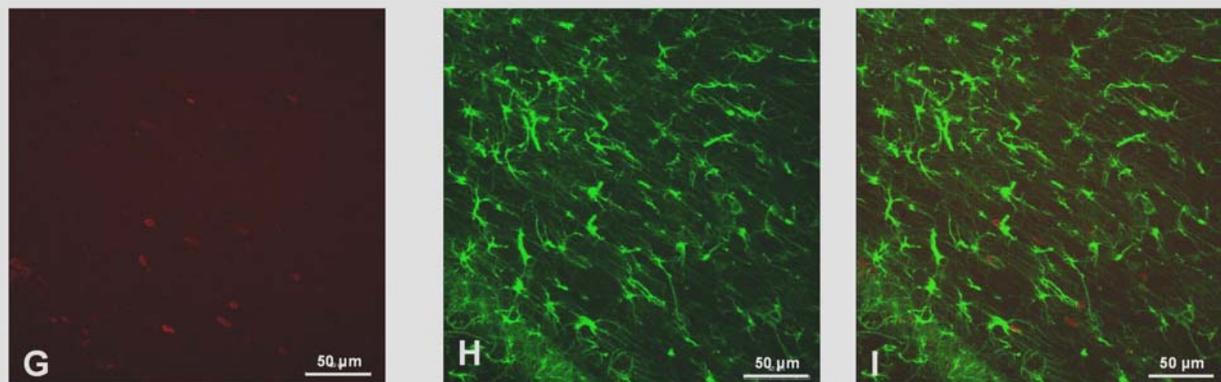


Fig. (33). Doble marcaje con BrdU (rojo; G células en división) y GFAP (verde; H; marcador glial); I (sobreposición de imágenes) en cuerpo calloso izquierdo N2, grupo 100µg/rata. Escala de la barra 50µm.

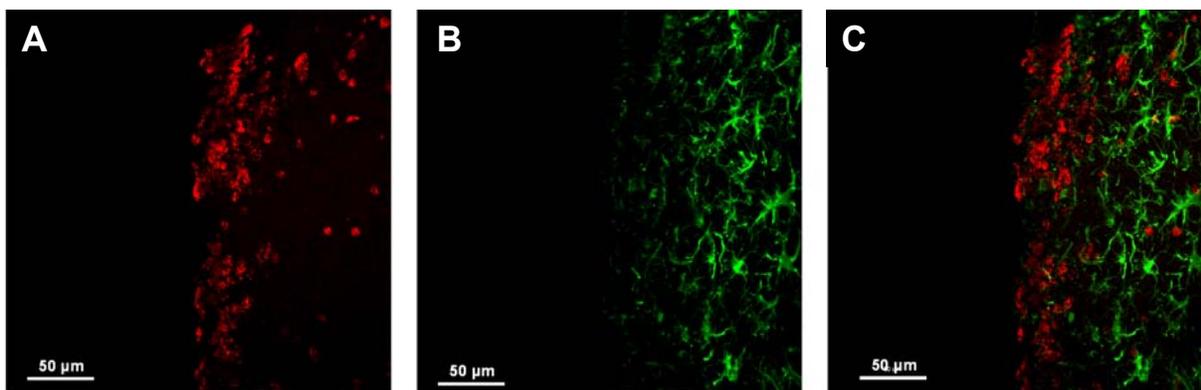


Fig.(34). Doble marcaje con BrdU (rojo, células en división; A) y GFAP (verde, marcador glial; B); C (sobreposición de imágenes). En ventrículo lateral derecho N2, grupo 100μgEB/rata. Escala de la barra 50μm.

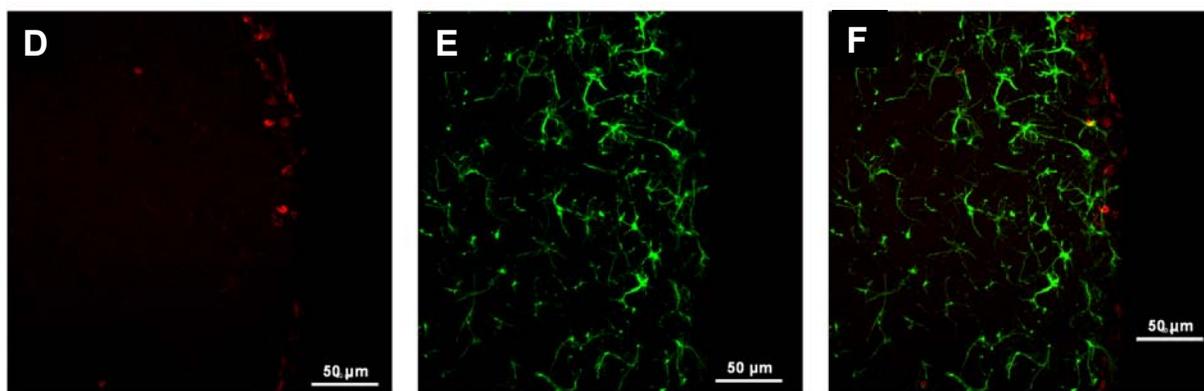


Fig.(35). Doble marcaje con BrdU (rojo, células en división; D) y GFAP (verde, marcador glial; E); F (sobreposición de imágenes). En ventrículo lateral derecho N2, grupo 100μgEB/rata. Escala de la barra 50μm.

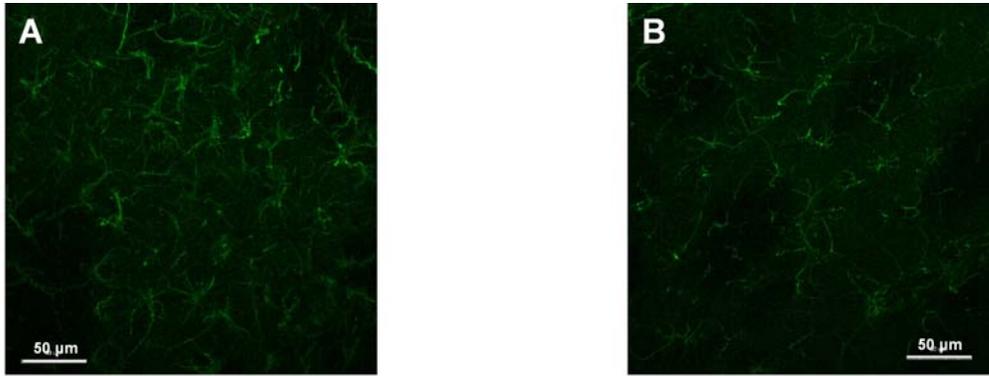


Fig. (36). Inmunofluorescencia contra DCX (marcador de neuronas inmaduras). A. estriado derecho N2, grupo 100µgEB/rata. B. estriado izquierdo N2, grupo 100µgEB/rata. Escala de la barra 50µm.

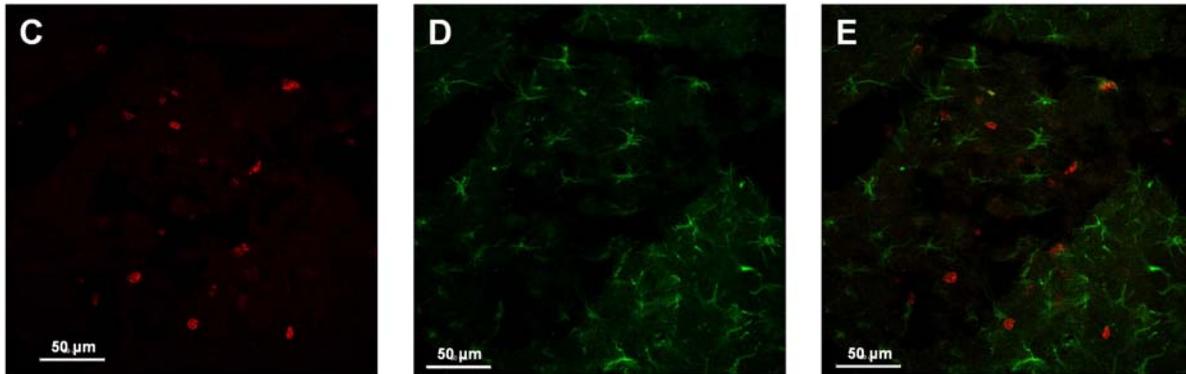


Fig. (37). Doble marcaje con BrdU (rojo, células en división; C) y DCX (verde, marcador de neuronas inmaduras; D); E (sobreposición de imágenes). Estriado derecho N2, grupo 0µgEB/rata. Escala de la barra 50µm.

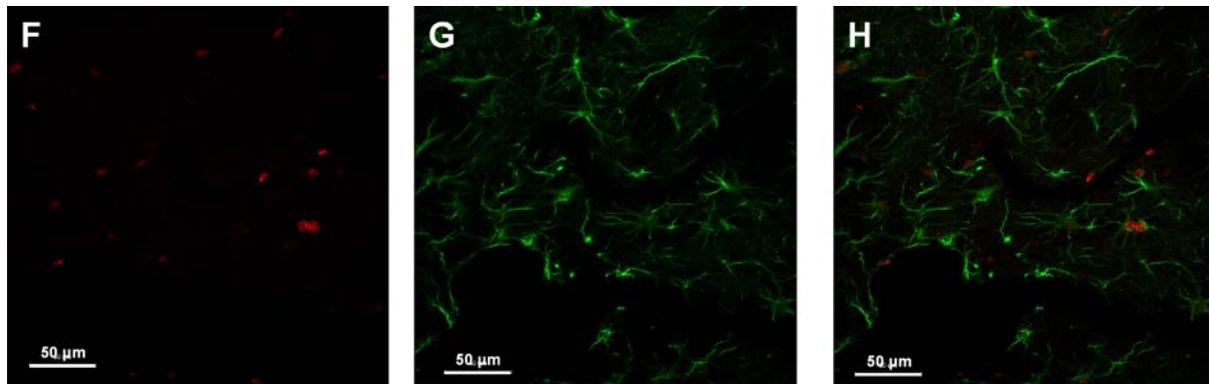


Fig.(38). Doble marcaje con BrdU (rojo; F células en división) y DCX (verde; G; marcador de neuronas inmaduras); (sobreposición de imágenes) en estriado derecho N2, grupo control 0µg/rata. Escala de la barra 50µm.

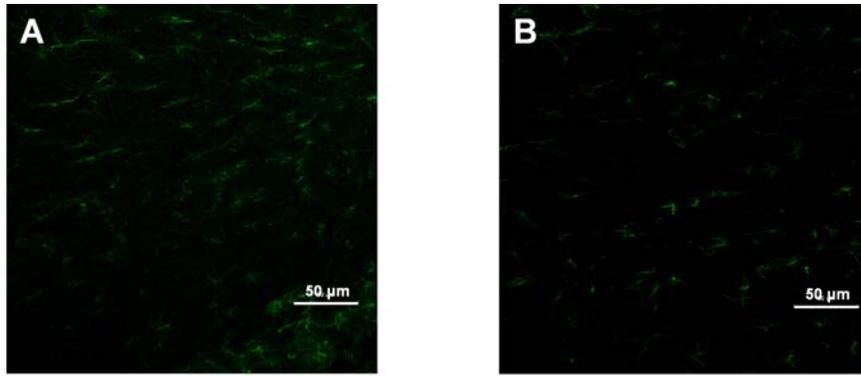


Fig.( 39). Inmunofluorescencia contra DCX (marcador de neuronas inmaduras). A. cuerpo calloso derecho N2, grupo 100µgEB/rata. B. cuerpo calloso izquierdo, grupo 100µgEB/rata. Escala de la barra 50µm.

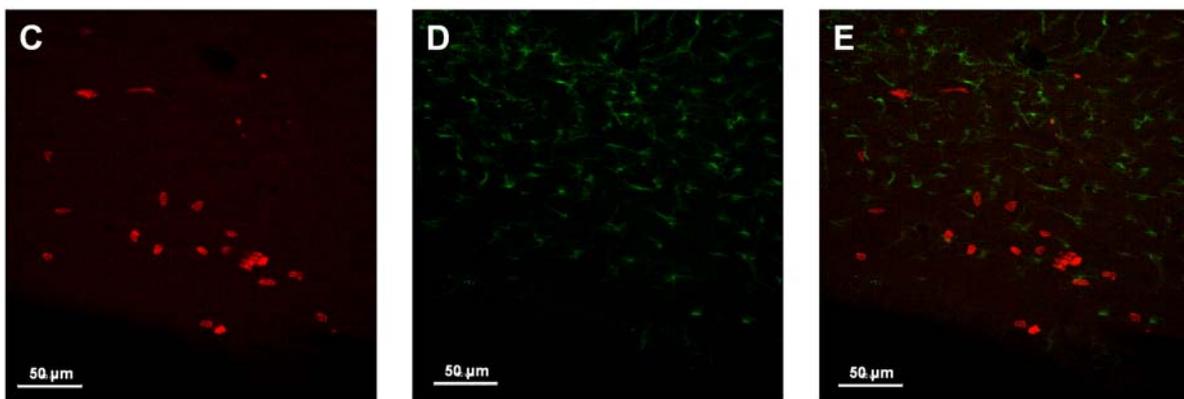


Fig.( 40).Doble marcaje BrdU (rojo, células en división; C) y DCX (verde, marcador de neuronas inmaduras); E (sobreposición de imágenes) en cuerpo calloso derecho N2, grupo control 0µgEB/rata. Escala de la barra 50µm.

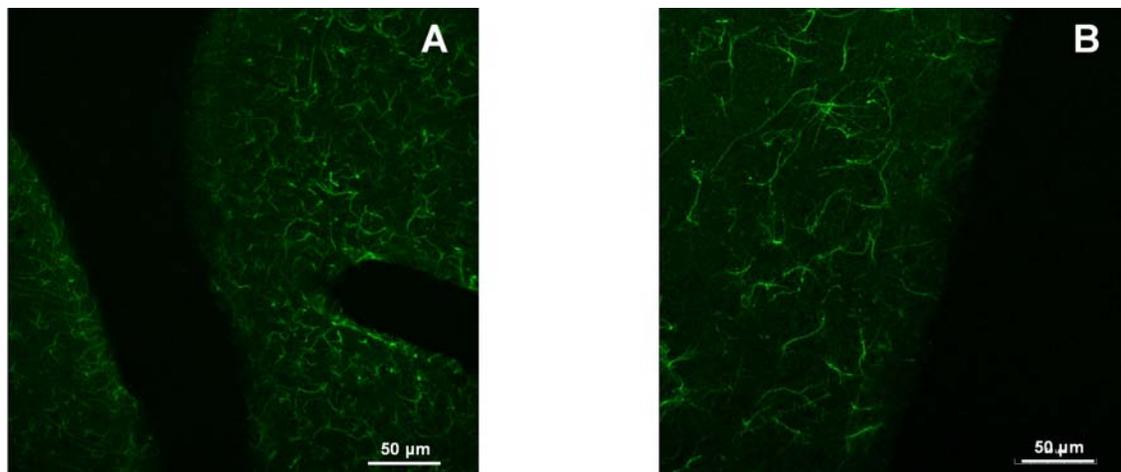
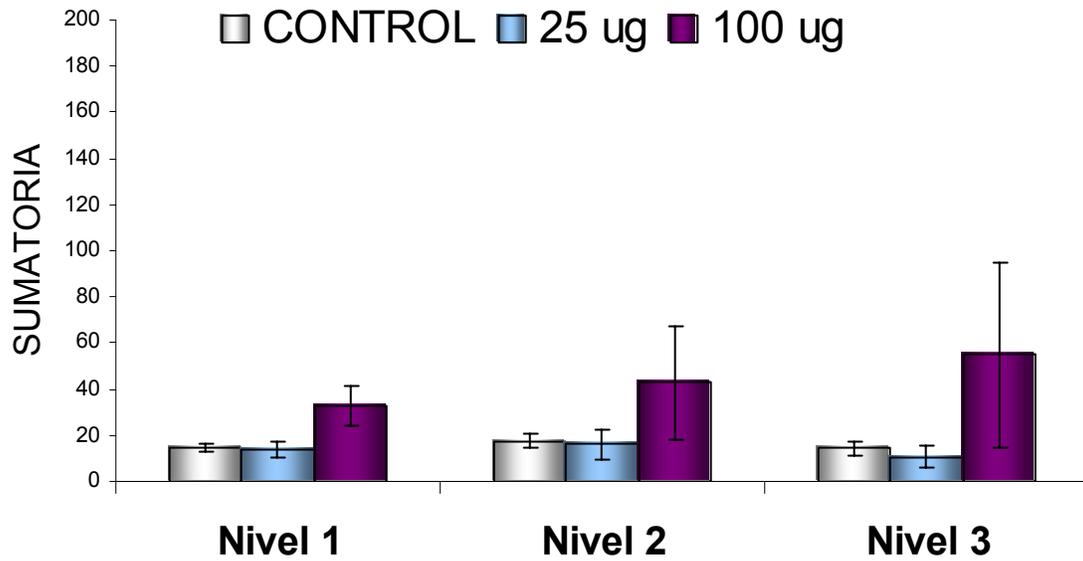


Fig. (41). Inmunofluorescencia contra DCX marcador de neuronas inmaduras. A ventrículo lateral derecho N2, grupo 100µgEB/rata. Escala de la barra 50µm.

## ESTRIADO

### HEMISFERIO IZQUIERDO



### HEMISFERIO DERECHO

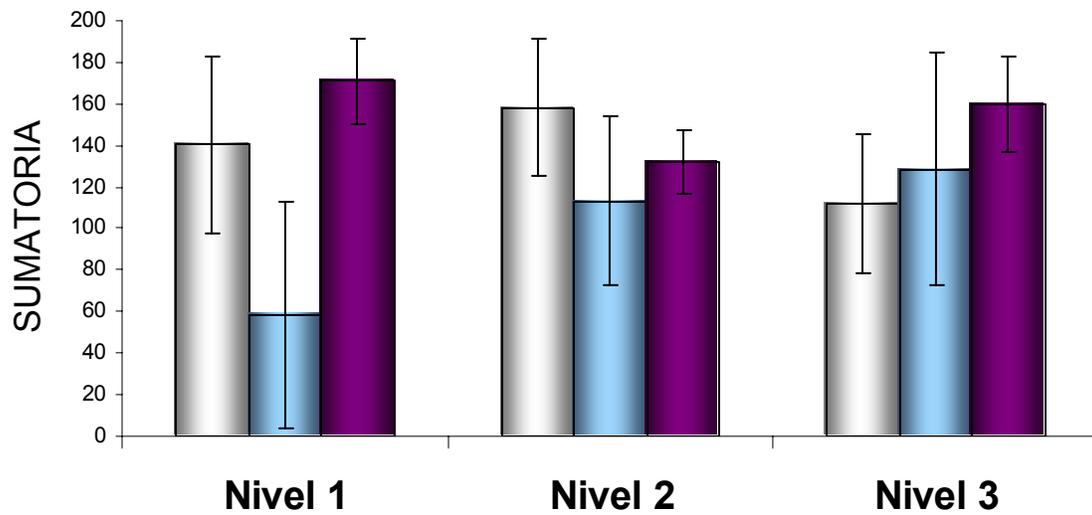


Fig (42). Sumatoria del número de células BrdU(+) (promedio EEM) en el estriado. Hemisferio izquierdo (gráfica superior) y derecho (gráfica inferior).

## CUERPO CALLOSO

□ CONTROL    ■ 25 ug    ■ 100 ug

### HEMISFERIO IZQUIERDO

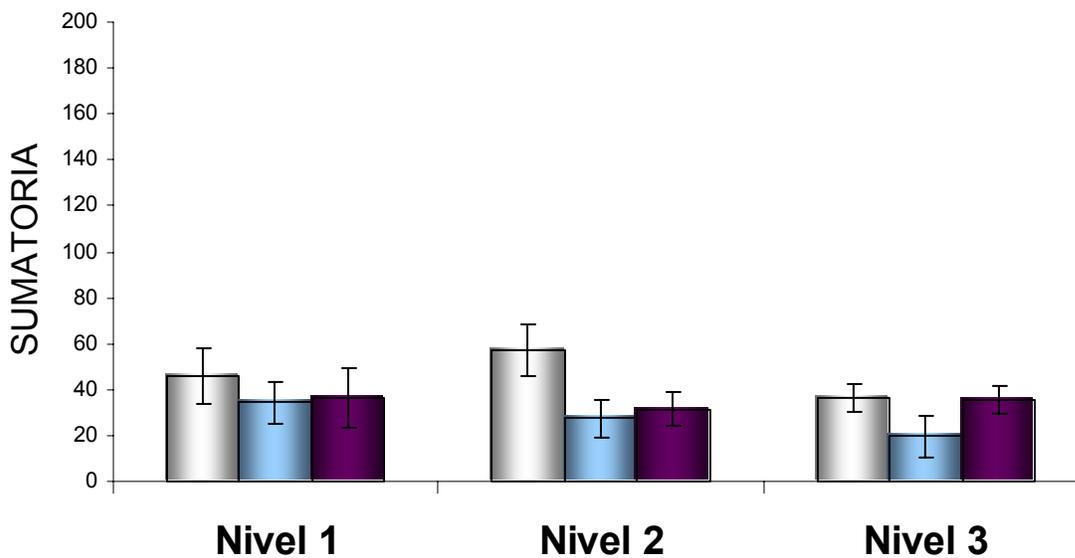
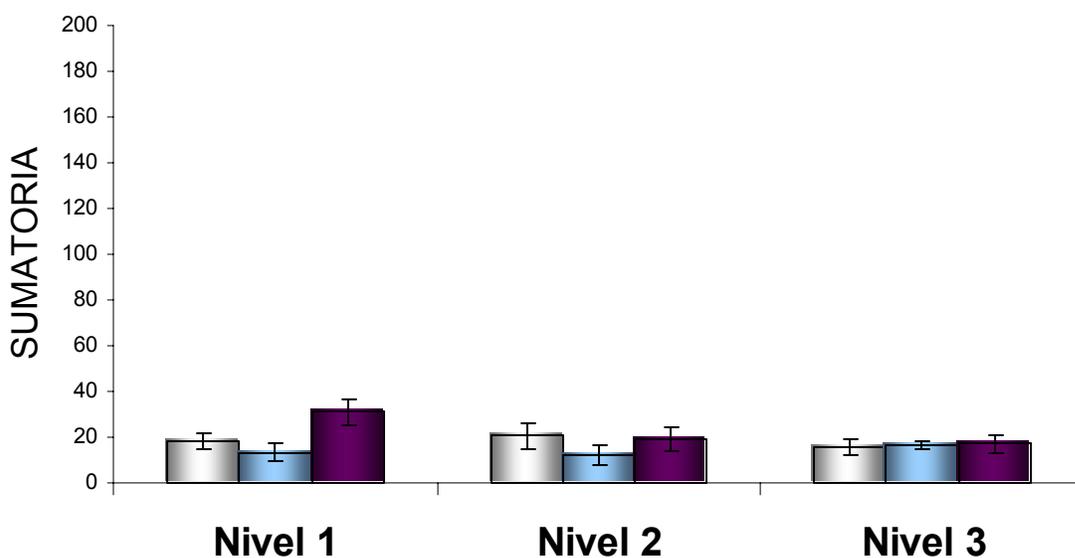


Fig (43). Sumatoria del número de células BrdU(+) (promedio  $\pm$  EEM) en el cuerpo calloso. Hemisferio izquierdo (gráfica superior) y derecho (gráfica inferior).

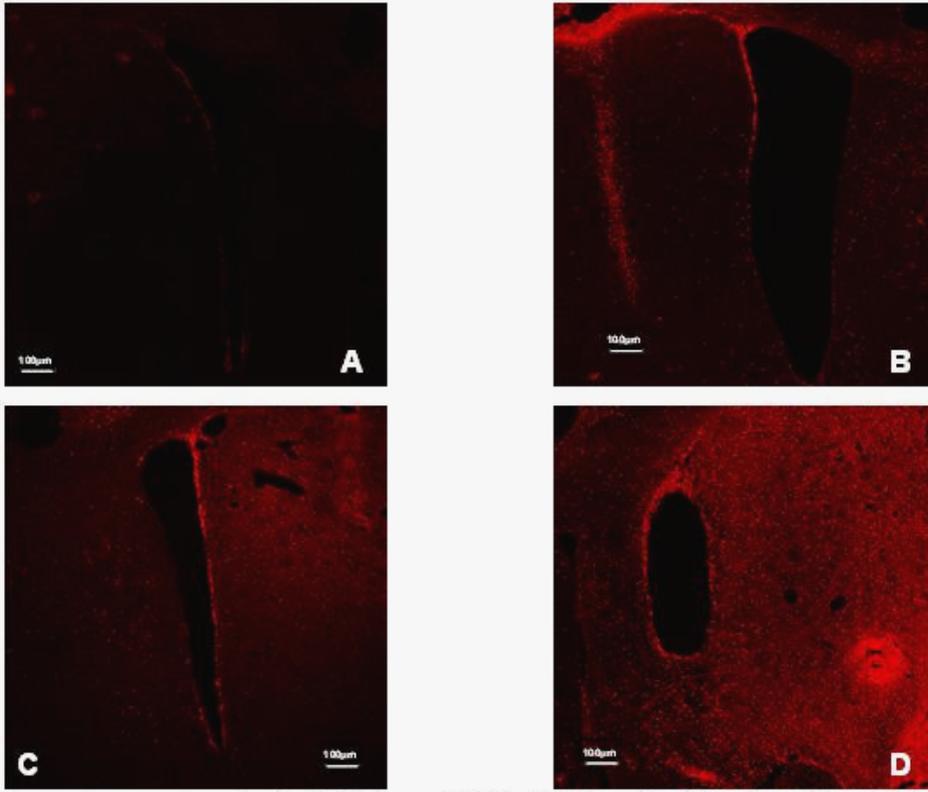


Fig. (44). Inmunofluorescencia contra BrdU (células en división) (4x). Porcentaje del contorno del ventrículo lateral (VL) donde se observa la señal de células BrdU (+). A. 0-25% (VL izquierdo N2, grupo 0µgEB/rata), B. 25-50% (VL izquierdo N2, grupo 25µgEB/rata), C. 50-75% (VL derecho N2 grupo 0µgEB/rata), D. 75-100% (VL derecho N1, grupo de 25µg/rata).

## HEMISFERIO DERECHO

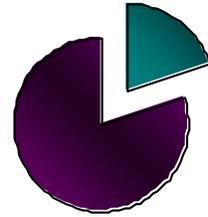
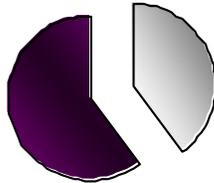
0 - 25% 25 - 50% 50 - 75% 75 - 100%

### NIVEL 1

CONTROL

25 ug

100 ug

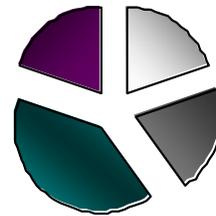
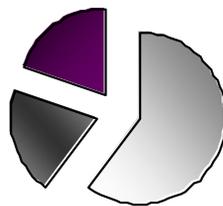


### NIVEL 2

CONTROL

25 ug

100 ug



### NIVEL 3

CONTROL

25 ug

100 ug

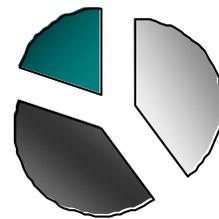
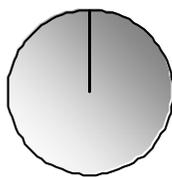
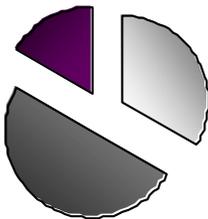
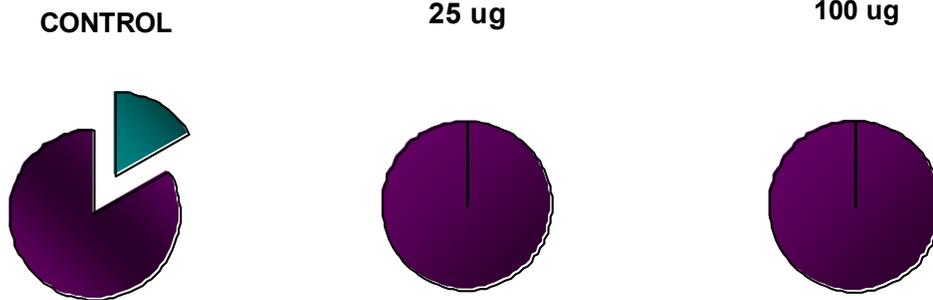


Fig (45) Porcentaje del contorno del ventrículo lateral que presentó una señal de células BrdU (+) en el ventrículo lateral derecho en el los niveles 1,2 y 3 en cada uno de los tratamientos con estradiol (0µg/rata, 25µg/rata y 100µg/rata).

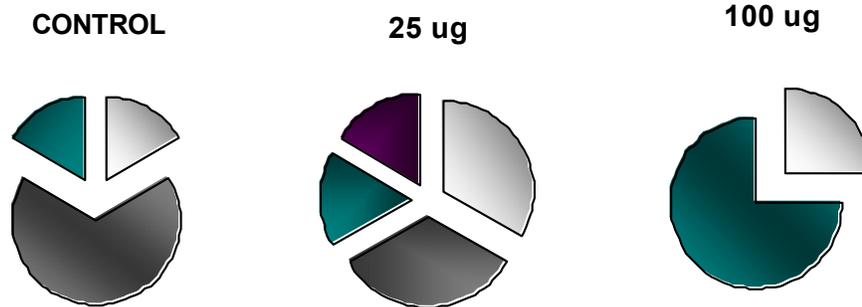
## HEMISFERIO IZQUIERDO

□ 0 - 25% ■ 25 - 50% ■ 50 - 75% ■ 75 - 100%

### NIVEL 1



### NIVEL 2



### NIVEL 3

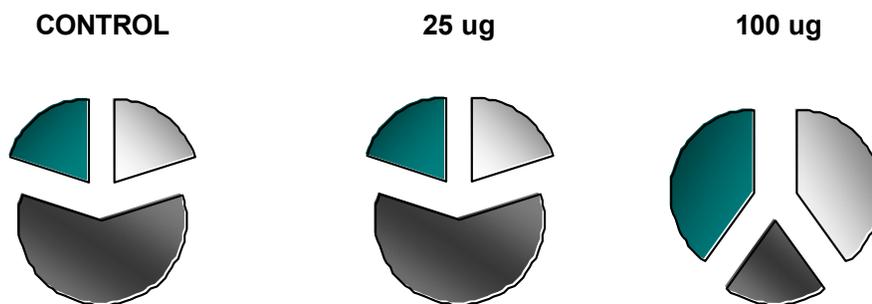


Fig (46) Porcentaje de la señal de células BrdU (+) en el ventrículo lateral izquierdo en el los niveles 1,2 y 3 en cada uno de los tratamientos con estradiol (0 $\mu$ g/rata, 25 $\mu$ g/rata y 100 $\mu$ g/rata).

## B. DISCUSIÓN EXPERIMENTO C

A pesar de que se ha estudiado ampliamente el papel neuroprotector y neurogénico del estrógeno en los que se ha observado que en roedores adultos hembra la neurogénesis se ve afectada por los niveles fluctuantes de estrógeno, esto sigue siendo objeto de discusión (Ciriza, Carrero, Azcoitia, Lundeen & Garcia-Segura, 2004; Taupin, 2005). Nuestros resultados, indican que el estradiol por sí mismo en este modelo de la enfermedad de Huntington, no induce generación de nuevas neuronas ni en el estriado ni en el cuerpo calloso; ya que el grupo control 0µg/rata a pesar de estar ovariectomizado, al igual que los demás grupos, y de no recibir estradiol exógeno se comportó de manera similar a los grupos que recibieron 25µg/rata o 100µg/rata de estradiol. Por otro lado, tal vez el uso de estas concentraciones de estradiol no muestran influencia sobre la proliferación celular ya que como se ha observado en estudios en los que se ha evaluado el papel neuroprotector del estradiol una alta concentración de estrógeno no protege a las neuronas en contra de la apoptosis (Liu et al., 2001). Por otro lado, Galea y colaboradores (2006) señalan que el estradiol induce aumento en la proliferación celular de manera dosis dependiente, ya que dosis de 10µg de estradiol incrementan la proliferación celular, mientras dosis suprafisiológicas (50µg), no incrementan significativamente la proliferación celular. Otra probable razón de no encontrarse diferencias significativas entre los grupos con tratamiento con estradiol y el grupo control, puede deberse a que el tratamiento con estradiol disminuye la proliferación de células progenitoras neuronales en el adulto inducido por el factor de crecimiento endodimial, o por el efecto de la inducción de la expresión de esteroides adrenales, ya que se ha observado que en el giro dentado el estradiol inicialmente aumenta, pero subsecuentemente disminuye la proliferación de células granulares (Hoyk, Varga & Parducz, 2006).

Sin embargo, la lesión intraestriatal con ácido kaínico, de acuerdo a nuestros resultados tiene un claro efecto en la inducción de la proliferación celular. En otros estudios reportan que en condiciones patológicas como enfermedades neurológicas, lesiones excitotóxicas y de tipo traumático e infarto cerebral, incrementa la neurogénesis en la zona subventricular (SVZ) y en el giro dentado (Taupin, 2005), el grupo de Collin (2005), y de Tattersfield (2004), reportan que tras una lesión unilateral en el estriado de rata adulta con ácido quinolínico, da lugar a un elevado incremento de proliferación celular principalmente en la zona subventricular y en el estriado

ipsilateral en comparación con el hemisferio contralateral. Este claro incremento de células BrdU(+) en el hemisferio lesionado se debe al reemplazo celular causado por la magnitud de la lesión, ya que ésta ocurre tras una lesión o enfermedad cerebral (Nottebohm, 2002). Las nuevas células se originan de la SVZ, de donde migran a través de la vía migratoria rostral hacia el sitio de lesión. El número de células neuronales recién generadas en el sitio de lesión se ha reportado que es de 0.2%, ó 1,600 nuevas neuronas, del total de las células nerviosas dañadas en el estriado después de una lesión isquémica focal, las cuales se observan a las cuatro semanas después de la lesión en el estriado ipsilateral mostrando marcadores de neuronas maduras (Taupin, 2005). De acuerdo a nuestros resultados existe proliferación celular a los siete días después de la lesión con ácido kaínico, ya que en este periodo se observa la presencia de células que expresan marcadores de neuronas inmaduras, así como glía.

De acuerdo al análisis cualitativo de las células BrdU (+) en el ventrículo lateral izquierdo y derecho en los tres niveles, se observa un gradiente antero-posterior (a la baja), tanto en el hemisferio derecho como en el hemisferio izquierdo en todos los grupos. Por otro lado, se observa una disminución gradual en los grupos control (0 $\mu$ g/rata) y 100 $\mu$ g/rata en el hemisferio derecho, y en el grupo de 100 $\mu$ g/rata en el hemisferio izquierdo. Mientras que en el grupo de 25 $\mu$ g/rata se muestra un marcado decremento del marcaje de células en división en el hemisferio derecho (Fig. 45 y 46).

Por otro lado, puede observarse que la región con mayor marcaje con BrdU es la zona subventricular (SVZ) anterior, principalmente en el N1, en donde se obtuvieron valores del 75-100% de señal de células BrdU(+) tanto en el hemisferio control como el hemisferio lesionado (Fig 44). Esto probablemente se deba que ante una lesión cerebral, como es el caso del modelo de la enfermedad de Huntington en animales adultos, induzca al cerebro a comportarse de manera similar a lo observado en etapas embrionarias y postnatales. Ya que de acuerdo con reportes publicados en el 2006, las células precursoras neuronales se originan en la parte anterior de la SVZ formando cadenas, continuando su división mientras migran a través de la vía migratoria rostral. En el cerebro neonatal, la vía migratoria rostral incluyendo la SVZ anterior, es principalmente neurogénica, mientras que la SVZ alrededor de la parte posterior del ventrículo lateral es principalmente gliogénica. Además se ha observado que la densidad de células en

división disminuye a lo largo de un gradiente rostro-caudal, con un máximo alrededor del ventrículo lateral y un mínimo en la capa subependimal del bulbo olfatorio (Martoncikova et al., 2006).

De acuerdo con el análisis del co-marcaje con BrdU+DCX y BrdU+GFAP, se observa una alta expresión de células positivas a GFAP y DCX; sin embargo, son muy pocas las células que coexpresan dichos marcadores gliales y neuronales con el marcador mitogénico BrdU. Es decir, son muy pocas las células recién generadas de fenotipo neuronal y glial como se muestra en las figuras (29-41). Por otro lado, se confirmó que el marcaje con DCX fue específico para neuronas inmaduras, no tratándose de un marcaje cruzado con células gliales como se muestra en la figura (47).

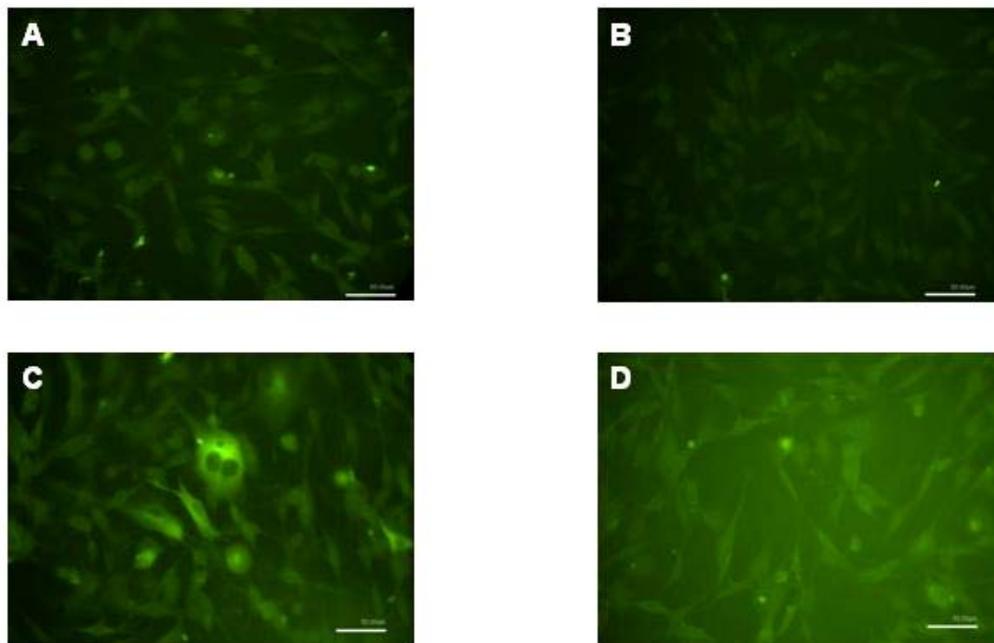


Fig.(47). Línea celular glial C6. A. Inmunofluorescencia contra DCX (marcador de neuronas inmaduras). B. Inmunofluorescencia contra DCX control negativo. C. Inmunofluorescencia contra GFAP. D. Inmunofluorescencia contra GFAP control negativo. Escala de la barra 50 $\mu$ m.

Por otro lado con objeto de evaluar la sobrevivencia de las neuronas recién generadas (DCX+), o si el alto número de glia pudiese estar actuando como precursor neuronal, es necesario evaluar a diferentes tiempos la presencia de células GFAP(+), DCX(+), así como NeuN(+) (marcador de neuronas maduras), ya que se ha reportado la presencia de neuronas NeuN(+) a las seis semanas de la lesión con ácido quinolínico (Collin et al., 2005).

### **C. CONCLUSIÓN EXPERIMENTO C**

El estradiol administrado exógenamente en dosis de 25µg/rata y 100µg/rata en ratas hembras adultas ovariectomizadas, lesionadas unilateral e intraestriatalmente con ácido kaínico, parece no tener un efecto inductor de neurogénesis en el estriado, cuerpo calloso, ni en los ventrículos laterales. Sin embargo, la lesión con ácido kaínico tiene un efecto significativo en el incremento de la proliferación celular, por lo que las células recién generadas pueden adjudicarse al efecto de la lesión.

Debido a que no se cuantificó el número de células positivas para DCX y GFAP, no se puede aseverar que las células recién generadas sean de tipo neuronal, por lo tanto no podemos descartar una gliosis por efecto de la lesión con ácido kaínico.

Por otro lado es necesario evaluar la presencia de células gliales, neuronas inmaduras y maduras a diferentes tiempos, con objeto de determinar si las células BrdU(+) pudiesen estar actuando como precursores neuronales y para evaluar la sobrevivencia de las neuronas recién generadas, detectando la presencia de células maduras mediante la expresión del marcador NeuN a periodos más largos.

### **CONCLUSION GENERAL**

Una de las ventajas de utilizar niveles fisiológicos de estrógeno en la rata para estudiar su efecto en el incremento del número de células recién generadas, es que permite evaluar su influencia sobre la neurogénesis de acuerdo a la fluctuación de dichos niveles a través del ciclo estral de la rata. Sin embargo, el monitorear la fase del ciclo estral en el que se encuentran las

Por otro lado con objeto de evaluar la sobrevivencia de las neuronas recién generadas (DCX+), o si el alto número de glia pudiese estar actuando como precursor neuronal, es necesario evaluar a diferentes tiempos la presencia de células GFAP(+), DCX(+), así como NeuN(+) (marcador de neuronas maduras), ya que se ha reportado la presencia de neuronas NeuN(+) a las seis semanas de la lesión con ácido quinolínico (Collin et al., 2005).

### **C. CONCLUSIÓN EXPERIMENTO C**

El estradiol administrado exógenamente en dosis de 25µg/rata y 100µg/rata en ratas hembras adultas ovariectomizadas, lesionadas unilateral e intraestriatalmente con ácido kaínico, parece no tener un efecto inductor de neurogénesis en el estriado, cuerpo calloso, ni en los ventrículos laterales. Sin embargo, la lesión con ácido kaínico tiene un efecto significativo en el incremento de la proliferación celular, por lo que las células recién generadas pueden adjudicarse al efecto de la lesión.

Debido a que no se cuantificó el número de células positivas para DCX y GFAP, no se puede aseverar que las células recién generadas sean de tipo neuronal, por lo tanto no podemos descartar una gliosis por efecto de la lesión con ácido kaínico.

Por otro lado es necesario evaluar la presencia de células gliales, neuronas inmaduras y maduras a diferentes tiempos, con objeto de determinar si las células BrdU(+) pudiesen estar actuando como precursores neuronales y para evaluar la sobrevivencia de las neuronas recién generadas, detectando la presencia de células maduras mediante la expresión del marcador NeuN a periodos más largos.

### **CONCLUSION GENERAL**

Una de las ventajas de utilizar niveles fisiológicos de estrógeno en la rata para estudiar su efecto en el incremento del número de células recién generadas, es que permite evaluar su influencia sobre la neurogénesis de acuerdo a la fluctuación de dichos niveles a través del ciclo estral de la rata. Sin embargo, el monitorear la fase del ciclo estral en el que se encuentran las

ratas de manera continua induce que éstas permanezcan por un largo periodo en la fase de diestro, es decir, se provoca un pseudo embarazo. Por lo cual se optó por ovariectomizar a las ratas y administrar exógenamente estradiol.

El evaluar el marcaje de células recién generadas con diaminobenzidina (DAB), no nos permitió replicar los resultados reportados en la literatura, los cuales muestran un consistente aumento de la proliferación celular tras la lesión. Esto debido a un problema técnico, ya que sumado el efecto de la lesión y el marcaje con DAB, no fue posible cuantificar el número de células BrdU(+). Sin embargo, el evaluar la proliferación celular mediante inmunofluorescencia y su análisis mediante el microscopio confocal, nos proporcionó las condiciones ideales para cuantificar dicha proliferación, obteniéndose resultados comparables con otros estudios; en donde la proliferación con ácido káinico incrementa significativamente el de células recién generadas.

Dentro de las perspectivas de este estudio está el cuantificar el número de células en el bulbo olfatorio antes y después de una lesión de tipo excitotóxica, con el fin de determinar si las células recién generadas observadas en el estriado lesionado que se originan de la zona subventricular y migran normalmente hacia el bulbo olfatorio a través de la ruta migratoria rostral permanecen en el estriado lesionado para remplazar la muerte neuronal. Ya que si esto fuese lo que estuviera sucediendo el número de células recién generadas detectadas en el bulbo olfatorio sería menor. Y de no ser así, descartar la posible existencia de precursores neuronales en el estriado, los cuales estuviesen replicándose por efecto de la lesión.

## REFERENCIAS

- Alvarez-Buylla, A., Seri, B. & Doetsch, F. 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull*, 57, 751-8.
- Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G. & Corasaniti, M. T. 2005. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res*, 52, 119-32.
- Arrington, L. R. 1978. *Anatomy and Physiology*. En: Arrington, L. R. (Eds.), *Introductory Laboratory Animal Science, The breeding, care and management of experimental animals*, (pp. 29- 59): Interstate printers and pub.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. & Lindvall, O. 2002. Neuronal replacement

Por otro lado con objeto de evaluar la sobrevivencia de las neuronas recién generadas (DCX+), o si el alto número de glia pudiese estar actuando como precursor neuronal, es necesario evaluar a diferentes tiempos la presencia de células GFAP(+), DCX(+), así como NeuN(+) (marcador de neuronas maduras), ya que se ha reportado la presencia de neuronas NeuN(+) a las seis semanas de la lesión con ácido quinolínico (Collin et al., 2005).

### **C. CONCLUSIÓN EXPERIMENTO C**

El estradiol administrado exógenamente en dosis de 25µg/rata y 100µg/rata en ratas hembras adultas ovariectomizadas, lesionadas unilateral e intraestriatalmente con ácido kaínico, parece no tener un efecto inductor de neurogénesis en el estriado, cuerpo calloso, ni en los ventrículos laterales. Sin embargo, la lesión con ácido kaínico tiene un efecto significativo en el incremento de la proliferación celular, por lo que las células recién generadas pueden adjudicarse al efecto de la lesión.

Debido a que no se cuantificó el número de células positivas para DCX y GFAP, no se puede aseverar que las células recién generadas sean de tipo neuronal, por lo tanto no podemos descartar una gliosis por efecto de la lesión con ácido kaínico.

Por otro lado es necesario evaluar la presencia de células gliales, neuronas inmaduras y maduras a diferentes tiempos, con objeto de determinar si las células BrdU(+) pudiesen estar actuando como precursores neuronales y para evaluar la sobrevivencia de las neuronas recién generadas, detectando la presencia de células maduras mediante la expresión del marcador NeuN a periodos más largos.

### **CONCLUSION GENERAL**

Una de las ventajas de utilizar niveles fisiológicos de estrógeno en la rata para estudiar su efecto en el incremento del número de células recién generadas, es que permite evaluar su influencia sobre la neurogénesis de acuerdo a la fluctuación de dichos niveles a través del ciclo estral de la rata. Sin embargo, el monitorear la fase del ciclo estral en el que se encuentran las

Por otro lado con objeto de evaluar la sobrevivencia de las neuronas recién generadas (DCX+), o si el alto número de glia pudiese estar actuando como precursor neuronal, es necesario evaluar a diferentes tiempos la presencia de células GFAP(+), DCX(+), así como NeuN(+) (marcador de neuronas maduras), ya que se ha reportado la presencia de neuronas NeuN(+) a las seis semanas de la lesión con ácido quinolínico (Collin et al., 2005).

### **C. CONCLUSIÓN EXPERIMENTO C**

El estradiol administrado exógenamente en dosis de 25µg/rata y 100µg/rata en ratas hembras adultas ovariectomizadas, lesionadas unilateral e intraestriatalmente con ácido kaínico, parece no tener un efecto inductor de neurogénesis en el estriado, cuerpo calloso, ni en los ventrículos laterales. Sin embargo, la lesión con ácido kaínico tiene un efecto significativo en el incremento de la proliferación celular, por lo que las células recién generadas pueden adjudicarse al efecto de la lesión.

Debido a que no se cuantificó el número de células positivas para DCX y GFAP, no se puede aseverar que las células recién generadas sean de tipo neuronal, por lo tanto no podemos descartar una gliosis por efecto de la lesión con ácido kaínico.

Por otro lado es necesario evaluar la presencia de células gliales, neuronas inmaduras y maduras a diferentes tiempos, con objeto de determinar si las células BrdU(+) pudiesen estar actuando como precursores neuronales y para evaluar la sobrevivencia de las neuronas recién generadas, detectando la presencia de células maduras mediante la expresión del marcador NeuN a periodos más largos.

### **CONCLUSION GENERAL**

Una de las ventajas de utilizar niveles fisiológicos de estrógeno en la rata para estudiar su efecto en el incremento del número de células recién generadas, es que permite evaluar su influencia sobre la neurogénesis de acuerdo a la fluctuación de dichos niveles a través del ciclo estral de la rata. Sin embargo, el monitorear la fase del ciclo estral en el que se encuentran las

ratas de manera continua induce que éstas permanezcan por un largo periodo en la fase de diestro, es decir, se provoca un pseudo embarazo. Por lo cual se optó por ovariectomizar a las ratas y administrar exógenamente estradiol.

El evaluar el marcaje de células recién generadas con diaminobenzidina (DAB), no nos permitió replicar los resultados reportados en la literatura, los cuales muestran un consistente aumento de la proliferación celular tras la lesión. Esto debido a un problema técnico, ya que sumado el efecto de la lesión y el marcaje con DAB, no fue posible cuantificar el número de células BrdU(+). Sin embargo, el evaluar la proliferación celular mediante inmunofluorescencia y su análisis mediante el microscopio confocal, nos proporcionó las condiciones ideales para cuantificar dicha proliferación, obteniéndose resultados comparables con otros estudios; en donde la proliferación con ácido káinico incrementa significativamente el de células recién generadas.

Dentro de las perspectivas de este estudio está el cuantificar el número de células en el bulbo olfatorio antes y después de una lesión de tipo excitotóxica, con el fin de determinar si las células recién generadas observadas en el estriado lesionado que se originan de la zona subventricular y migran normalmente hacia el bulbo olfatorio a través de la ruta migratoria rostral permanecen en el estriado lesionado para remplazar la muerte neuronal. Ya que si esto fuese lo que estuviera sucediendo el número de células recién generadas detectadas en el bulbo olfatorio sería menor. Y de no ser así, descartar la posible existencia de precursores neuronales en el estriado, los cuales estuviesen replicándose por efecto de la lesión.

## REFERENCIAS

- Alvarez-Buylla, A., Seri, B. & Doetsch, F. 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull*, 57, 751-8.
- Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G. & Corasaniti, M. T. 2005. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res*, 52, 119-32.
- Arrington, L. R. 1978. *Anatomy and Physiology*. En: Arrington, L. R. (Eds.), *Introductory Laboratory Animal Science, The breeding, care and management of experimental animals*, (pp. 29- 59): Interstate printers and pub.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. & Lindvall, O. 2002. Neuronal replacement

ratas de manera continua induce que éstas permanezcan por un largo periodo en la fase de diestro, es decir, se provoca un pseudo embarazo. Por lo cual se optó por ovariectomizar a las ratas y administrar exógenamente estradiol.

El evaluar el marcaje de células recién generadas con diaminobenzidina (DAB), no nos permitió replicar los resultados reportados en la literatura, los cuales muestran un consistente aumento de la proliferación celular tras la lesión. Esto debido a un problema técnico, ya que sumado el efecto de la lesión y el marcaje con DAB, no fue posible cuantificar el número de células BrdU(+). Sin embargo, el evaluar la proliferación celular mediante inmunofluorescencia y su análisis mediante el microscopio confocal, nos proporcionó las condiciones ideales para cuantificar dicha proliferación, obteniéndose resultados comparables con otros estudios; en donde la proliferación con ácido káinico incrementa significativamente el de células recién generadas.

Dentro de las perspectivas de este estudio está el cuantificar el número de células en el bulbo olfatorio antes y después de una lesión de tipo excitotóxica, con el fin de determinar si las células recién generadas observadas en el estriado lesionado que se originan de la zona subventricular y migran normalmente hacia el bulbo olfatorio a través de la ruta migratoria rostral permanecen en el estriado lesionado para remplazar la muerte neuronal. Ya que si esto fuese lo que estuviera sucediendo el número de células recién generadas detectadas en el bulbo olfatorio sería menor. Y de no ser así, descartar la posible existencia de precursores neuronales en el estriado, los cuales estuviesen replicándose por efecto de la lesión.

## REFERENCIAS

- Alvarez-Buylla, A., Seri, B. & Doetsch, F. 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull*, 57, 751-8.
- Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G. & Corasaniti, M. T. 2005. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res*, 52, 119-32.
- Arrington, L. R. 1978. *Anatomy and Physiology*. En: Arrington, L. R. (Eds.), *Introductory Laboratory Animal Science, The breeding, care and management of experimental animals*, (pp. 29- 59): Interstate printers and pub.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. & Lindvall, O. 2002. Neuronal replacement

- from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*, 8, 963-70.
- Azcoitia, I., Fernandez-Galaz, C., Sierra, A. & Garcia-Segura, L. M. 1999. Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J Neurocytol*, 28, 699-710.
- Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S. & Garcia-Segura, L. M. 2005. Brain steroidogenesis: emerging therapeutic strategies to prevent neurodegeneration. *J Neural Transm*, 112, 171-6.
- Banasr, M., Hery, M., Brezun, J. M. & Daszuta, A. 2001. Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 14, 1417-24.
- Becker, J. B. 2002. Hormonal Influences on Sensorimotor Function. En: Becker, J. B., Breedlove, S. M., Crews, D. & McCarthy, M. M. (Eds.), *Behavioral Endocrinology*, (pp. 497-527). USA: Massachusetts Institute of Technology Press.
- Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S. & Saudou, F. 2006. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2642-60.
- Brannvall, K., Korhonen, L. & Lindholm, D. 2002. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci*, 21, 512-20.
- Brown, J. P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L. & Kuhn, H. G. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 467, 1-10.
- Brown, M., Keynes, R. & Lunnsden, A. 2001. Repair and plasticity in the adult brain nervous system. En: Brown, M., Keynes, R. & Lunnsden, A. (Eds.), *The developing brain*, (pp. 416-436). United Kingdom: Oxford Press University.
- Cameron, H. A. & McKay, R. D. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 435, 406-17.
- Carpenter, M. B. 1994. Cuerpo estriado y nucleos relacionados. En: Kaufman, A. T. (Eds.), *Fundamentos de Neuroanatomía*, (pp. 311-335). México: Ed. Medica Panamericana; Williams & Wilkins.
- Cattaneo, E. 2003. Dysfunction of wild-type huntingtin in Huntington disease. *News Physiol Sci*, 18, 34-7.
- Ciriza, I., Carrero, P., Azcoitia, I., Lundeen, S. G. & Garcia-Segura, L. M. 2004. Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *J Neurobiol*, 61, 209-21.
- Collin, T., Arvidsson, A., Kokaia, Z. & Lindvall, O. 2005. Quantitative analysis of the generation of different striatal neuronal subtypes in the adult brain following excitotoxic injury. *Exp Neurol*, 195, 71-80.
- Curtis, M. A., Penney, E. B., Pearson, A. G., van Roon-Mom, W. M., Butterworth, N. J., Dragunow, M., Connor, B. & Faull, R. L. 2003. Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9023-7.
- Dubal, D. B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S. W., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Kindy, M. S. & Wise, P. M. 2001. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1952-7.
- Fowler, C. D., Freeman, M. E. & Wang, Z. 2003. Newly proliferated cells in the adult male amygdala are affected by gonadal steroid hormones. *J Neurobiol*, 57, 257-69.
- Fox, R. R. & Laird, C. W. 1970. Sexual Cycles. En: Hafez, E. S. E. (Eds.), *Reproduction and*

- Breeding Techniques for animals*, (pp. 107- 122): UMI-BOD.
- Fusco, F. R., Chen, Q., Lamoreaux, W. J., Figueredo-Cardenas, G., Jiao, Y., Coffman, J. A., Surmeier, D. J., Honig, M. G., Carlock, L. R. & Reiner, A. 1999. Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J Neurosci*, 19, 1189-202.
- Fusco, F. R., Martorana, A., De March, Z., Viscomi, M. T., Sancesario, G. & Bernardi, G. 2003. Huntingtin distribution among striatal output neurons of normal rat brain. *Neurosci Lett*, 339, 53-6.
- Gage, F. H. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci*, 22, 612-3.
- Galea, L. A., Spritzer, M. D., Barker, J. M. & Pawluski, J. L. 2006. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus*, 16, 225-32.
- Garcia-Segura, L. M., Azcoitia, I. & DonCarlos, L. L. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*, 63, 29-60.
- Garcia-Verdugo, J. M., Ferron, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E. & Font, E. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull*, 57, 765-75.
- Gerfen, C. R. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci*, 15, 133-9.
- Giordano, M. & Mejia-Viggiano, M. C. 2001. Gender differences in spontaneous and MK-801-induced activity after striatal lesions. *Brain Res Bull*, 56, 553-61.
- Gutekunst, C. A., Norflus, F. & Hersch, S. M. 2002. The neuropathology of Huntington's disease. En: Bate, G., Harper, P. & Jones, L. (Eds.), *Huntington's Disease*, (pp. 251-269). United Kingdom: Oxford University Press.
- Heimer, L., Zahm, D. S. & Alheid, G. F. 1995. Basal Ganglia. En: Paxinos, G. (Eds.), *The Rat Nervous System*, (pp. 579-614). San Diego, United States of America: Academic Press.
- Hoyk, Z., Varga, C. & Parducz, A. 2006. Estrogen-induced region specific decrease in the density of 5-bromo-2-deoxyuridine-labeled cells in the olfactory bulb of adult female rats. *Neuroscience*, 141, 1919-24.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L. & Greenberg, D. A. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11946-50.
- Jones, A. L. 1996. The Huntington's disease gene and its protein product. En: Harper, P. (Eds.), *Huntington's disease*, (pp. 293-317). London: W.B. Saunders Co.
- Kawaguchi, Y. 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci*, 13, 4908-23.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. & Gage, F. H. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130, 391-9.
- Kilen, S. M. & Schwartz, N. B. 1998. Estrous Cycle. En: Knobil, E. & Neill, J. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*, (pp. 126- 138). San Diego, united States of America: Academic Press.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J. & Gage, F. H. 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci*, 17, 5820-9.
- Li, R. & Shen, Y. 2005. Estrogen and brain: synthesis, function and diseases. *Front Biosci*, 10, 257-67.

- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. L. & Gage, F. H. 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 399-421.
- Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28, 713-26.
- Liu, Z., Gastard, M., Verina, T., Bora, S., Mouton, P. R. & Koliatsos, V. E. 2001. Estrogens modulate experimentally induced apoptosis of granule cells in the adult hippocampus. *J Comp Neurol*, 441, 1-8.
- Louissaint, A., Jr., Rao, S., Leventhal, C. & Goldman, S. A. 2002. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*, 34, 945-60.
- MacMilan, J. & Quarrell, O. 1996. The neurobiology of Huntington's disease. En: Harper, P. (Eds.), *Huntington's Disease*, (pp. 317-359). London: W. B. Saunders Co.
- Markakis, E. A. & Gage, F. H. 1999. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*, 406, 449-60.
- Martoncikova, M., Racekova, E. & Orendacova, J. 2006. The Number of Proliferating Cells in the Rostral Migratory Stream of Rat During the First Postnatal Month. *Cell Mol Neurobiol*.
- McEwen, B. S. & Alves, S. E. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*, 20, 279-307.
- Meza-Navarro, M. 2001. Actividad electroencefalográfica del Área Tegmental Ventral durante la conductal maternal de la rata hembra. Unpublished Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco.
- Modo, M., Mellodew, K., Cash, D., Fraser, S. E., Meade, T. J., Price, J. & Williams, S. C. 2004. Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*, 21, 311-7.
- Murad, F. & Kurat, J. A. 1991. Estrogens and Progestines. En: A. Goodman Gillman, T. W. R., A. S. Nies, P. Taylor (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*, (pp. 1384-1412). New York: Mc Graw-Hill.
- Murashov, A. K., Pak, E. S., Hendricks, W. A. & Tatko, L. M. 2004. 17beta-Estradiol enhances neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett*, 569, 165-8.
- Nottebohm, F. 2002. Why are some neurons replaced in adult brain? *J Neurosci*, 22, 624-8.
- Ormerod, B. K., Lee, T. T. & Galea, L. A. 2003. Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neurobiol*, 55, 247-60.
- Palmer, T. D., Ray, J. & Gage, F. H. 1995. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*, 6, 474-86.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R. & Gage, F. H. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 425, 479-94.
- Papalexli, E., Antoniou, K. & Kitraki, E. 2005. Estrogens influence behavioral responses in a kainic acid model of neurotoxicity. *Horm Behav*, 48, 291-302.
- Parent, A. & Hazrati, L. N. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev*, 20, 91-127.
- Parent, J. M., Janumpalli, S., McNamara, J. O. & Lowenstein, D. H. 1998. Increased

- dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neurosci Lett*, 247, 9-12.
- Paxinos G., W. C. 2005. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. En: (Eds.), (pp. 204). Burlington: Elsevier Academic Press.
- Smith, C. L. 1998. Estrogens, Overview. En: Knobil, E. & Neill, J. (Eds.), *Encyclopedia of reproduction*, (pp. 119-127). San Diego, Ca., United States of America: Academic Press.
- Smith, M. T., Pencea, V., Wang, Z., Luskin, M. B. & Insel, T. R. 2001. Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Horm Behav*, 39, 11-21.
- Song, H. J., Stevens, C. F. & Gage, F. H. 2002. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci*, 5, 438-45.
- Sribnick, E. A., Ray, S. K. & Banik, N. L. 2004. Estrogen as a multi-active neuroprotective agent in traumatic injuries. *Neurochem Res*, 29, 2007-14.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J. & Gould, E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, 19, 5792-801.
- Tattersfield, A. S., Croon, R. J., Liu, Y. W., Kells, A. P., Faull, R. L. & Connor, B. 2004. Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience*, 127, 319-32.
- Taupin, P. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest. *Med Sci Monit*, 11, RA247-252.
- Wanker, E. E. & Dröge, A. 2002. Structural biology of Huntington's disease. En: Bates, G., Harper, P. & Jones, L. (Eds.), *Huntington's disease*, (pp. 327-348). United Kingdom: Oxford University Press.
- Wise, P. M., Dubal, D. B., Wilson, M. E. & Rau, S. W. 2000. Estradiol is a neuroprotective factor in in vivo and in vitro models of brain injury. *J Neurocytol*, 29, 401-10.
- Wise, P. M., Dubal, D. B., Wilson, M. E., Rau, S. W. & Bottner, M. 2001. Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinology*, 142, 969-73.
- Zhao, L. & Brinton, R. 2006. Estrogen receptor B as a therapeutic target for promoting neurogenesis preventing neurodegeneration. *Drug Development Research*, 66, 103-117.
- Zhu, Y., Jin, K., Mao, X. O. & Greenberg, D. A. 2003. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression. *Faseb J*, 17, 186-93.