



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS ESTROGENOS SOBRE LAS
ALTERACIONES DEL SISTEMA DOPAMINERGICO
MESOESTRIATAL CAUSADAS POR EXPOSICION A OZONO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIANA ANGOA PEREZ

ASESORA: DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA

Octubre, 2007



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.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	5
PRINCIPALES TIPOS DE RADICALES LIBRES Y SUS DERIVADOS EN ORGANISMOS VIVOS	5
1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	5
2. Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	6
LA SEÑALIZACIÓN REDOX	7
Mantenimiento de la homeostasis redox	7
Pérdida del balance redox	7
EL PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN EL ESTRÉS OXIDATIVO	9
1. Fisiología mitocondrial	9
2. Generación de ROS	11
ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)	12
El ozono como modelo de estrés oxidativo	12
SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOESTRIATAL	14
1. La dopamina (DA) como fuente de ROS en el SNC	16
2. La autooxidación de la DA	17
ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD DE PARKINSON	18
Estrés oxidativo mediado por hierro en la <i>substantia nigra</i> con EP	19
ESTRÓGENOS Y NEUROPROTECCIÓN EN EL SNC	21
1. Acciones genómicas	22
2. Acciones no genómicas	26
2.1 Los estrógenos como antioxidantes	28
LOS EFECTOS RÁPIDOS DE LOS ESTRÓGENOS ESTÁN IMPLICADOS EN LA NEUROPROTECCIÓN	29
1. Activación de la vía de cAMP-PKA-CREB por estrógenos	29
2. Activación de la vía de MAPK por estrógenos	30
3. La regulación de la apoptosis	31
4. Los estrógenos y la familia de proteínas BCL-2	31

5. Los receptores de estrógenos y neuroprotección	33
EFECTOS PROTECTORES DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE EL SISTEMA NIGROESTRIATAL (SNE)	34
1. Atrapadores de ROS	35
2. Actividad de la monoamino oxidasa (MAO)	35
3. Receptores y liberación de DA	36
4. Neurotrofinas	37
5. Morfología y fluidez de la membrana	37
6. Otras interacciones hormonales	38
7. Flujo sanguíneo	38
8. Los estrógenos como inhibidores del transportador de DA (DAT): una hipótesis	38
RELACIÓN DE LOS ESTRÓGENOS CON LA EP	39
HIPOTESIS	41
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS	41
MATERIALES Y METODOS	43
RESULTADOS	
I. Marcadores de estrés oxidativo	53
I-1. <i>Substantia nigra</i>	53
I-1.1. Peroxidación de lípidos	53
I-1.2. Oxidación de proteínas	54
I-1.3. Sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS)	56
I-2.- Estriado	54
I-2.1. Peroxidación de lípidos	58
I-2.2. Nitración de proteínas	58
I-2.3. Cuantificación de iNOS	61
II. Cuantificación de neuronas dopaminérgicas y expresión de TH	62
III. Receptores a estrógenos alfa (ER α) y beta (ER β)	67
III-1. <i>Substantia nigra</i>	67
III-2. Estriado	68
IV. Proteína acídica fibrilar de la glia (GFAP)	71

IV-1. <i>Substantia nigra</i>	71
IV-2. Estriado	73
V. Marcadores de muerte celular	75
V-1. <i>Substantia nigra</i>	75
V-1.1. Citocromo c	75
V-1.2. BCL-2 y BAX	76
V-2. Estriado	73
V-2.1. Citocromo c	77
V-2.2. BCL-2 y BAX	78
VI. Ciclooxygenasa-2 (COX-2)	80
VI-1. <i>Substantia nigra</i>	80
VI-2. Estriado	80
VII. Niveles de estradiol en plasma	82
VIII. Conducta	83
VII-1. Actividad motora	83
VII-2. Memoria de corto plazo	83
VII-3. Memoria de largo plazo	84
DISCUSION	
I. Estrés oxidativo en <i>Substantia nigra</i> y estriado	86
II. Efecto del 17 β -estradiol sobre el daño oxidativo en el sistema nigroestriatal	87
III. Cuantificación de células totales, neuronas dopaminérgicas y expresión de TH	89
IV. Efecto de los estrógenos sobre la expresión de TH	90
V. Estrés oxidativo y expresión de receptores ER α y ER β	92
VI. Efecto del 17 β -estradiol sobre la expresión de ER α y ER β	92
VII. Acciones de los estrógenos sobre los astrocitos en el sistema nigroestriatal	93
VIII. Efecto de los estrógenos sobre la muerte celular	94
IX. Estrés oxidativo, y el efecto de los estrógenos sobre la expresión de COX-2	97

X. Niveles de 17β -estradiol	98
XI. Efecto del 17β -estradiol sobre la actividad motora y la memoria	99
XII. CONCLUSIONES	101
REFERENCIAS	102

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-I Factor de transcripción compuesto por jun/fos

cAMP Monofosfato de adenosina cíclico

COMT Catecol-o-metiltransferasa

CoQ10 Coenzima Q10

COX-2 Ciclooxygenasa-2

CRE Elementos de respuesta a cAMP

CREB Elemento de respuesta de unión a CRE

DA Dopamina

DAG Diacilglicerol

DAT Transportador de dopamina

DE Desviación estándar

EP Enfermedad de Parkinson

ERE Elementos de respuesta a estrógenos

ERK cinasa de regulación extracelular

ER α Receptor a estrógenos alfa

ER β Receptor a estrógenos beta

ERs Receptores a estrógenos

GFAP Proteína acídica fibrilar de la glia

GSH Glutación

IP₃ Inositol trifosfato

iNOS Sintasa inducible del óxido nítrico

LTP Potenciación a largo plazo

MAO Monoamino-oxidasa

MAPK Proteínas cinasas activadas por mitógeno

mPTP Poro de transición de permeabilidad mitocondrial

MPTP 1-metil-4-fenilpiridina

NF κ B Factor nuclear kB

NMDA N-metil D-aspartato

NO Óxido nítrico

PKA Proteína cinasa A

ROS Especies reactivas de oxígeno

RNS Especies reactivas de nitrógeno

RL Radicales libres

SNC Sistema nervioso central

SOD Superóxido dismutasa

MnSOD Superóxido dismutasa de manganeso

Cu/ZnSOD Superóxido dismutasa de cobre y zinc

SNE Sistema nigroestriatal

TH Tirosina hidroxilasa

RESUMEN

La pérdida del control oxidativo en el organismo, ya sea por un exceso de prooxidantes, o por un déficit en las defensas de antioxidantes, se caracteriza por altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), las cuales producen oxidación de biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Se han utilizado diversos modelos para abordar el estudio del estrés oxidativo y su significado biológico en el organismo, entre los cuales se encuentra la exposición a ozono, que dependiendo de la dosis o del tiempo de exposición, produce un estado de estrés oxidativo.

El sistema dopaminérgico nigroestriatal que se origina de células de la sustancia nigra, que es de vital importancia para el control motor, y la degeneración de este sistema es la clave de la enfermedad de Parkinson. Está demostrado que el estrés oxidativo produce un incremento en la liberación y oxidación de dopamina. Los metabolitos reactivos de ésta, producto de la oxidación, tales como las quinonas y ROS, alteran directamente la funcionalidad de las proteínas e inducen modificaciones en la permeabilidad mitocondrial y disminución de ATP. Está ampliamente demostrado que los estrógenos están estrechamente relacionados con los sistemas dopaminérgicos, debido a que existe una correlación en la distribución de receptores a estrógenos en neuronas de las vías mesoestriatales. Además de sus acciones sobre receptores nucleares (efectos genómicos), se sugiere que los estrógenos pueden actuar como antioxidantes en un proceso independiente de receptor (efectos no genómicos), y se ha postulado una nueva acción de los estrógenos sobre receptores localizados en la membrana plasmática.

Objetivo: El objetivo principal de este trabajo fue determinar las alteraciones causadas por estrés oxidativo en las células dopaminérgicas nigroestriatales de ratas expuestas a ozono y evaluar si los estrógenos eran capaces de contrarrestar este daño.

Diseño experimental: Se utilizaron 90 ratas hembra Wistar ovariectomizadas divididas en 9 grupos: 1) Control, 2) Ozono 7 días, 3) Ozono+17 β -estradiol 7 días, 4) Ozono 15 días, 5) Ozono+17 β -estradiol 15 días, 6) Ozono 30 días, 7) Ozono+17 β -estradiol 30 días, 8) Ozono 60 días y 9) Ozono+17 β -estradiol 60 días. La dosis de ozono utilizada fue de 0.25ppm y la de hormona fue de 25ug/Kg

Resultados: Se encontró un aumento gradual de los lípidos peroxidados conforme se incrementaba el tiempo de exposición a ozono tanto en la *substantia nigra* como en el estriado. Estos resultados, aunados a un incremento en la expresión de 3-nitrotirosina en ambas estructuras, sugieren que la exposición a ozono promueve la generación de un estado de estrés oxidativo progresivo.

El estrés oxidativo crónico producido por exposición a ozono causó un proceso de neurodegeneración progresiva en *substantia nigra* y en el estriado, el cual se caracterizó por alteraciones en la morfología celular y muerte neuronal. En *substantia nigra* de los grupos expuestos a ozono, se encontró una disminución progresiva del número de neuronas inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa, y en los niveles de BCL-2, así como un aumento en la expresión de BAX. Además, se presentó un incremento en la expresión de iNOS conforme aumentaba el tiempo de exposición al contaminante. En el estriado, los niveles de BCL-2 disminuyeron en los grupos de ozono, mientras que la expresión de citocromo c y BAX presentó un aumento. En ambas estructuras cerebrales, el estado de estrés oxidativo ocasionó cambios en la expresión de receptores a estrógenos ER α y ER β , mientras que la administración de 17 β -estradiol produjo un incremento en la expresión de los mismos. Aunado a lo anterior, la exposición a ozono produjo déficits en la memoria de corto y de largo plazo, así como en la actividad motora. Sin embargo, el efecto protector de la administración de 17 β -estradiol sobre el daño oxidativo causado por exposición a ozono fue diferente en *substantia nigra* y estriado. En la primera, el efecto protector de la hormona se presentó a los 60 días, mientras que en estriado, el efecto se hizo evidente desde los 30 días.

Conclusión: la exposición repetida a bajas dosis de ozono produce un estado de estrés oxidativo en el sistema nigroestriatal similar al proceso neurodegenerativo que ocurre en la enfermedad de Parkinson. El daño oxidativo ocurre progresivamente a varios niveles, que involucran la activación de cascadas de señalización que culminan con muerte celular, y que llevan a un déficit de la actividad motora y la memoria, a nivel conductual. La administración de 17 β -estradiol fue capaz de contrarrestar el daño producido por la exposición a ozono en el sistema nigroestriatal de manera diferente en *substantia nigra* y estriado, ya que en la primera, este efecto se presentó más tardíamente y fue dependiente de dosis más altas de hormona, mientras que en estriado, el efecto se presentó desde los 30 días y requirió de una concentración plasmática de hormona más baja.

ABSTRACT

The loss of redox balance in the organism is characterized by high levels of oxygen and nitrogen reactive species. These reactive species can produce lipid, protein as well as nucleic acids oxidation. Different models have been used to produce oxidative stress. Among them, ozone exposure in animals represents a non-invasive model, which depending on the dose and exposure time, is able to cause a generalized oxidative stress.

Evidence suggests the contribution of oxidative stress to dopaminergic cell death in Parkinson's disease (PD). It is known that PD incidence is higher in men than in women and 17 β -estradiol has pointed to be a neuroprotective factor against oxidative damage.

Objective: the purpose of this study was to determine whether 17 β -estradiol administration was capable of counteracting the oxidative damage induced by ozone exposure in *substantia nigra* and striatum in an ozone-exposure model.

Experimental design: Ninety Wistar ovariectomized rats were divided into five groups (n=10): Control (air stream free of ozone), Ozone exposure (4h daily, 0.25 ppm) for 30 and 60 days; and their respective analogues treated with 17 β -estradiol (25 μ g/kg) after each ozone exposure. Brain from each animal was tested for: 1. Lipoperoxidation; 2. Immunohistochemistry for 3-NT, BCL-2, Bax, cytochrome c, GFAP, iNOS and estrogen receptors; 3. Western blot for BCL-2, Bax, cytochrome c, GFAP, iNOS and estrogen receptors; 4. RIA to quantify estrogen levels in plasma, and 5. Memory and motor activity.

Results: our experiments showed that ozone exposure produced a progressive oxidative stress state indicated by an increase in lipid peroxidation, protein nitration and iNOS expression in both *substantia nigra* and striatum. The effect of 17 β -estradiol administration was able of counteracting oxidative stress only at 60 days of treatment in *substantia nigra* and at 30 days in striatum. This oxidative stress was correlated to cell morphology alterations and a sustained reduction of both TH levels and around 90% of TH positive cells in the *substantia nigra*. This damage was counteracted by 17 β -estradiol treatment for 60 days. Oxidative damage also includes an increase in cell death markers such as cytochrome c and BAX in all ozone groups in both brain structures studied. Antiapoptotic protein BCL-2 was increased only in groups treated chronically with 17 β -estradiol. These alterations were accompanied by memory and motor activity

deficits. RIA analysis indicated this protector effect of 17β -estradiol was related to an increased plasma concentration of this hormone.

Conclusion: Ozone exposure causes a progressive oxidative stress in *substantia nigra* and striatum that was counteracted with 17β -estradiol administration at 60 days in *substantia nigra* and early in striatum at 30 days. This study suggests the potential use of ozone exposure as a PD model and the neuroprotection afforded by 17β -estradiol is dependent on its persistent administration.

ANTECEDENTES

PRINCIPALES TIPOS DE RADICALES LIBRES Y SUS DERIVADOS EN ORGANISMOS VIVOS

Los radicales libres (RL) son moléculas que poseen un electrón impar, esta característica las vuelve inestables y reactivas porque tratan de completar sus electrones tomándolos de moléculas estables (McCord, 2000).

Los RL son normalmente generados por el metabolismo celular para la obtención de energía. Los mecanismos de óxido-reducción y los RL desempeñan un papel importante en la fisiología de la célula (Kovacik y Pozos, 2006), y abarcan desde renovación de membranas, fenómenos plásticos celulares, sobrevivencia de células en sistema nervioso durante etapas embrionarias, mitosis (Chiarugi y Fiaschi, 2007), migración celular, síntesis y liberación de algunas hormonas, aumento en la transcripción de citocinas durante procesos inflamatorios, hasta la participación en señalización celular (Stone y Yang, 2006; Biniert et al., 2006) y mecanismos de segundos mensajeros (Smythies, 1998; Chiarugi y Fiaschi, 2007).

La presencia de radicales libres en sistemas biológicos fue descubierta hace un poco más de 50 años, cuando Denham Harman planteó la hipótesis de que los radicales de oxígeno pueden formarse como producto de reacciones enzimáticas en vivo. En 1956, Harman describió los radicales libres como una caja de Pandora que podía contribuir al daño celular, a la mutagénesis, al cáncer (Valko et al., 2006) y al proceso degenerativo del envejecimiento biológico (Droge, 2001; Flora 2007).

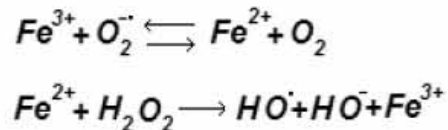
La ciencia de los radicales en los organismos entró en una segunda etapa cuando McCord y Fridovich descubrieron la enzima superóxido dismutasa (SOD). A inicios del siglo XX, se demuestra que los organismos no solo se habían adaptado a una coexistencia con los radicales libres sino que habían desarrollado estrategias para sacar ventaja de ellos, regulando los procesos fisiológicos mediante procesos de óxido-reducción.

A. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El anión superóxido se forma por la reducción univalente del estado molecular triple del oxígeno ($^3\text{O}_2$). Este proceso está mediado enzimáticamente por NAD(P)H/Xantina oxidasas, y no enzimáticamente por compuestos reactivos a oxígeno, como la semi-ubiquinona de la cadena transportadora de electrones. La enzima SOD convierte el superóxido en peróxido de hidrógeno (Deby, 1990; Ibrahim et al., 2000).

En tejidos biológicos, el superóxido puede convertirse de manera no enzimática en especies no radicales de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Steinbeck et al., 1993).

En presencia de iones metálicos reducidos como el hierro y el cobre, el peróxido de hidrógeno puede dar origen al radical hidroxilo (OH[•]) altamente reactivo (Chance et al., 1979; Liu et al., 2007). La reacción de Fenton, ilustra la reacción anterior:



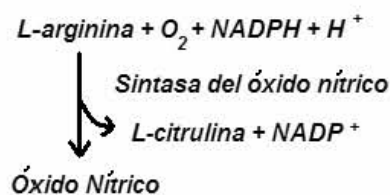
De manera alterna, el peróxido de hidrógeno puede ser convertido en agua por la catalasa y la enzima glutatión peroxidasa. En la reacción de la glutatión peroxidasa, el glutatión es oxidado a un disulfuro de glutatión, que puede regresar a glutatión por la glutatión reductasa en un proceso que consume NADPH (Aon et al., 2007).

El superóxido y el óxido nítrico (NO) son rápidamente convertidos a especies reactivas no radicales como el oxígeno singulete, H₂O₂ o peroxinitrito (Stamler et al., 1992; Pacher et al., 2007).

Frecuentemente, diferentes ROS coexisten en un mismo ambiente y dificultan la identificación inequívoca de un agente como responsable de un efecto biológico dado.

B. Especies reactivas de nitrógeno (RNS)

El radical de ON se produce en organismos superiores por la oxidación de uno de los átomos de nitrógeno terminal de la L-arginina (Chirino et al, 2006). Este proceso es catalizado por la sintasa del óxido nítrico (NOS):



Dependiendo del microambiente, el NO puede convertirse en varias RNS como el catión nitrosonio (NO⁺), el anión nitroxilo (NO⁻) o peroxinitrito (ONOO⁻).

Los radicales más importantes para la regulación biológica son el NO y el superóxido, cuya formación está catalizada por dos tipos de enzimas: la NAD(P)H oxidasa o isoformas de la NOS (Kawano et al., 2007).

Muchos efectos reguladores están mediados por H₂O₂ y otras ROS que son derivados químicos del superóxido.

LA SEÑALIZACIÓN REDOX

Mantenimiento de la homeostasis redox

El término “señalización redox” se usa para describir un proceso de regulación en el cual intervienen procesos de óxido-reducción. Este tipo de señalización se usa por un amplio rango de microorganismos, incluyendo bacterias (Doolen et al., 2007), para inducir respuestas protectoras en contra de daño oxidativo o para reestablecer el estado de homeostasis después de una exposición temporal a ROS.

Los antioxidantes son sustancias biológicas que son capaces de competir por sustratos oxidables e inhibir su oxidación (Halliwell y Gutteridge, 1984). Los sistemas antioxidantes se pueden dividir en enzimáticos y no enzimáticos (Somogyi et al., 2007).

Dentro de los primeros están los antioxidantes clásicos, SOD, glutatión peroxidasa, catalasa y tioredoxina. Los atrapadores de tipo no enzimáticos incluyen a las vitaminas y también a las proteínas y aminoácidos, que son menos reactivos pero están en mayor concentración, a diferencia de los atrapadores enzimáticos, que presentan una alta reactividad con las ROS, pero se encuentran en concentraciones más bajas.

Pérdida del balance redox

La pérdida del control oxidativo en el organismo, ya sea por un exceso de pro-oxidantes, o por un déficit en las defensas de antioxidantes (Soffler, 2007), se caracteriza por altos niveles de ROS (Halliwell y Gutteridge, 1984) y nitrógeno, las cuales incluyen a los RL, así como también compuestos que no lo son, pero que son productos secundarios del metabolismo de estos, como el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito, y que también producen daño celular.

Las especies reactivas producen oxidación de lípidos, proteínas y DNA en la célula. La oxidación de las moléculas que conforman la membrana celular, altera su permeabilidad selectiva, lo que conduce a una pérdida del equilibrio osmótico. Todo lo anterior lleva a una entrada no controlada de sodio y agua, alterando las concentraciones de electrólitos. Cuando los propios mecanismos celulares no pueden contrarrestar estos cambios, se inicia una cadena de reacciones que involucran alteraciones de los canales iónicos, aumento en la liberación de calcio (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hool y Corry, 2007) y en la producción de NO. Mantener el control de los niveles de calcio es crucial para la célula, por lo tanto, ésta lo atrapa en el retículo endoplásmico y en la mitocondria, pero cuando esta respuesta no es suficiente para contrarrestar este aumento de calcio, se forma un poro de transición en la mitocondria que la destruye, produciendo

un déficit de ATP que incrementa el estado de estrés oxidativo y lleva a la muerte celular.

Como los radicales libres interactúan con otros componentes celulares como las proteínas, el DNA y los lípidos, se forman múltiples productos catabólicos. Un ejemplo de estos, es la peroxidación de lípidos que produce hidroperóxidos de lípidos y aldehídos que interactúan con grupos sulfhidrilo de las proteínas, provocando la pérdida de su funcionalidad y perpetuando de esta forma el daño celular (ver figura 1).

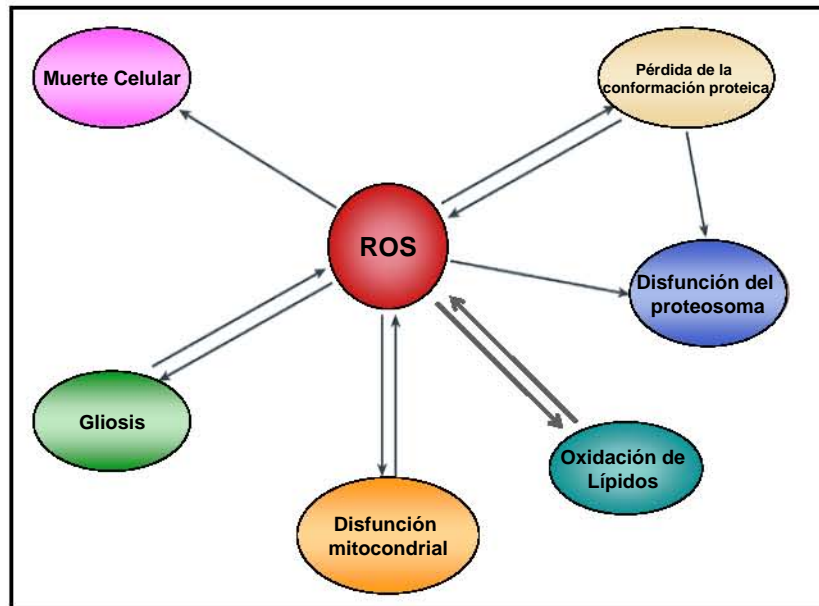


Figura 1. Efectos de un exceso de las ROS en el cerebro.

El aumento en los niveles de calcio y NO estimula la producción de interleucinas inflamatorias causando gliosis e incrementando el estado de estrés oxidativo. Esto causa daño y muerte celular (Sugaya et al., 1998; Ryter et al., 2007), estableciéndose así un ciclo a través de una cadena de reacciones oxidativas que involucran tanto a las neuronas como a la glia, en el mantenimiento del daño que se extiende hacia las células de los tejidos adyacentes.

EL PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

1. Fisiología mitocondrial

La mitocondria juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular. Este organelo no es solamente una importante fuente celular de energía (ATP), sino que también mantiene los niveles intracelulares de calcio dentro de los rangos adecuados para mediar la señalización, controlar la excitabilidad neuronal, y la función sináptica.

En el cerebro intacto, existe un acoplamiento metabólico entre los substratos vasculares, que proveen oxígeno y glucosa; y las necesidades metabólicas del tejido cerebral, constituido tanto por neuronas como por glia (Foster et al., 2006).

La secuencia de eventos que ocurre después de la estimulación neuronal incluye un decremento inicial de oxígeno en áreas de alta demanda de este gas (i.e., aquellas primeramente estimuladas), y un gran incremento posterior de oxígeno asociado a un amplio campo de vasodilatación arterial. Estos eventos están estrechamente relacionados con la actividad mitocondrial a través de la producción de moléculas de señalización como el peróxido de hidrógeno (Foster et al., 2006).

Al igual que otras células, las neuronas utilizan ATP como una fuente de energía para realizar procesos bioquímicos involucrados en varias funciones celulares, y producen ROS como resultado de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, la excitabilidad eléctrica y estructural, aunada a la complejidad sináptica de las neuronas, presenta demandas inusuales en los sistemas celulares que producen o responden a ATP y ROS. Las mitocondrias en los axones y terminales presinápticas proveen fuentes de ATP para llevar a cabo el bombeo de iones que se encuentran concentrados en estas estructuras, para restaurar rápidamente los gradientes iónicos subsiguientes a la despolarización y la liberación de neurotransmisores. La mitocondria también juega un papel preponderante en la regulación de las funciones sinápticas por su habilidad para regular los niveles de calcio y la producción de ROS (Mattson y Liu 2002).

Las neuronas en el cerebro son altamente vulnerables a desbalances metabólicos, por lo que una alteración mitocondrial, que cause una disminución en la producción de ATP, representa una clara amenaza a la viabilidad tanto de las mismas neuronas como de las células gliales, así como, a la funcionalidad de redes neuronales y en consecuencia, a las funciones normales del cerebro. La alteración en la regulación de los niveles de calcio, por fallas del amortiguamiento mitocondrial y/o por liberación del calcio secuestrado en la mitocondria contribuye a un daño severo del tejido cerebral en respuesta a excitotoxicidad por glutamato, estrés oxidativo, o a daños metabólicos tales como traumatismos. De igual manera, un incremento anormal en la generación de ROS por la mitocondria, también pone en riesgo la viabilidad celular, pues muchos mecanismos amortiguadores pueden verse sobrepasados (Kann y Kovács, 2007).

El resultado de esto es un daño oxidativo en las membranas celulares; las proteínas estructurales y reguladoras que modulan el estrado redox pueden, como consecuencia, llevar a una actividad anormal de varios canales iónicos (Chan, 2001).

Otro evento que pone en riesgo la viabilidad celular es la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), el cual ocurre en respuesta a una sobrecarga mitocondrial de calcio en presencia de elevados niveles de ROS. La transición de permeabilidad mitocondrial se caracteriza por un incremento no específico en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, por pérdida del potencial de membrana, por una posible ruptura de la membrana externa y por un severo edema mitocondrial. Cuando la apertura del mPTP es transitoria, la liberación de citocromo c del espacio intermembranal puede activar cascadas que involucran caspasas que llevan a apoptosis. Si la apertura del mPTP es prolongada, el contenido mitocondrial se reduce induciendo necrosis rápidamente (Kann y Kovács, 2007).

En vista de las numerosas funciones mitocondriales y su integración en varias vías de señalización, no es sorprendente que las alteraciones en la fisiología mitocondrial estén actualmente consideradas como eventos de vital importancia en varias enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, una disfunción crónica del complejo I está siendo considerada como una causa potencial de la enfermedad de Parkinson (Schulz y Beal, 1994; Abou-Sleiman y Mugit, 2006).

Muchas herramientas farmacológicas han sido usadas para estudiar la fisiología y fisiopatología de la mitocondria. Estas herramientas se han aplicado a preparaciones aisladas de mitocondrias y han contribuido a la elucidación de varios parámetros de la mitocondria (i.e., la función de la cadena transportadora de electrones, el potencial de membrana y la formación de radicales libres) (Foster et al., 2006).

2. Generación de ROS

La mitocondria constituye la mayor fuente de superóxido (O_2^-) y otras ROS en las células, generando aproximadamente el 85% del total de O_2^- , vía reacciones aberrantes de oxígeno. Durante los procesos de transporte de electrones en los complejos mitocondriales I-IV, aproximadamente del 2-5% de los electrones se escapan de interaccionar directamente con el oxígeno difusible, lo cual resulta en la producción de O_2^- en los complejos I-III. Cuando existe una actividad mitocondrial incrementada o una inhibición de la cadena respiratoria, la generación aguda o crónica de O_2^- puede aumentarse marcadamente, causando daño oxidativo, como el que se presenta en las enfermedades neurodegenerativas (Sas et al., 2007). Además de la producción mitocondrial de O_2^- , varias oxidasas citosólicas como la xantina oxidasa y la dinucleótido nicotinamida adenina oxidasa (NADPH), generan el 15% restante del O_2^- celular (Maia et al., 2007).

Una vez generado, el $\cdot\text{O}_2^-$ es convertido por varias formas de la enzima SOD, en H_2O_2 . A su vez, el H_2O_2 puede reaccionar para formar el altamente reactivo radical $\text{OH}\cdot$ en presencia de hierro. Alternativamente, el $\cdot\text{O}_2^-$ puede interaccionar con el NO para formar peroxinitrito (ONOO^-).

En la mayoría de circunstancias, los niveles de H_2O_2 en el cerebro son intrínsecamente más bajos que los niveles críticos para inducir daño oxidativo neuronal. El H_2O_2 puede actuar como una molécula de señalización fisiológica altamente permeable que participa en un amplio rango de funciones tanto en células como en el espacio extracelular y los vasos sanguíneos adyacentes. Estas funciones también incluyen interacciones glia-neurona y potenciación a largo plazo (Kamsler y Segal, 2003).

El papel fisiológico de las ROS (junto con el oxígeno y el NO) se extiende al control del tono vascular en el cerebro (van Deel et al., 2007), que está estrechamente modulado por la actividad metabólica neuronal.

Bajo condiciones fisiológicas normales, el H_2O_2 celular y otras ROS son atrapadas por los sistemas antioxidantes celulares, particularmente por el sistema glutatión (GSH). Sin embargo, estos sistemas no son capaces de mantenerse en condiciones patológicas de una alta generación de ROS, lo cual resulta en un estado agudo o crónico de disfunción mitocondrial (Sas et al., 2007).

El estrés oxidativo generado por un desbalance repentino de agentes oxidantes y reductores, puede causar daño directo o indirecto a blancos secundarios celulares. La severidad del daño depende de las ROS o RNS involucradas. Mientras el $\cdot\text{O}_2^-$ y el H_2O_2 son poco reactivos, el $\text{OH}\cdot$ y el ONOO^- son considerados altamente reactivos (Foster et al., 2006).

El daño celular se origina por la oxidación de macromoléculas como proteínas, lípidos y DNA. Pero no solo la citoarquitectura celular se altera, sino también las funciones y la señalización de modifican (Soffler 2007).

Debido a los efectos deletéreos del incremento de ROS y RNS, se han hecho intentos por reducir y prevenir el daño oxidativo celular mediante la administración de atrapadores de radicales libres, bloqueadores de la NOS, y la sobreexpresión de sistemas de auto-defensa celulares (Foster, et al., 2006).

ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

A. El ozono como modelo de estrés oxidativo

Se han utilizado diversos métodos para abordar el estudio del estrés oxidativo y su significado biológico en el organismo que van desde el nivel molecular y modelos en animales, hasta estudios clínicos.

En modelos animales se han utilizado lesiones por toxinas que al actuar sobre el metabolismo mitocondrial bloquean la producción de ATP de la cadena respiratoria, como es el caso del ácido 3-nitropropiónico (Binienda y Kim, 1997) o la exposición a contaminantes ambientales como el ozono (Cross et al., 1992), el cual, dependiendo de la dosis o del tiempo de exposición, produce estrés oxidativo (Lechuga-Guerrero, 1999).

El ozono, forma alotrópica (presentación de algunos elementos químicos en formas o estados diferentes) del oxígeno, es uno de los principales contaminantes atmosféricos en la ciudad de México.

El ozono es un contaminante que no se emite en los escapes o chimeneas, sino que se forma en la atmósfera a partir de reacciones muy complejas. Existen dos ciclos generales de reacciones fotoquímicas en la formación del ozono troposférico, en los que participan el oxígeno molecular y dos de los denominados precursores del ozono, los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos. Se ha observado que este gas disminuye la respuesta a estímulos auditivos y visuales e induce fatiga, letargia y dolor de cabeza (Calderón Guzmán et al., 2001). Además, puede llegar a producir alteraciones inmediatas en los mecanismos cerebrales del sueño (Paz et al., 1992). Aunque la mayoría de los estudios sobre los efectos del monóxido de carbono, de los dióxidos de azufre y de nitrógeno, así como del ozono, se han efectuado en animales, advierten, sin embargo, del daño en humanos causado por la creciente contaminación atmosférica.

El ozono al ser inhalado por el organismo, entra en contacto con el sistema respiratorio y produce por sí mismo oxidación y aumento en las ROS (Paz et al., 1992); las defensas antioxidantes pulmonares son capaces de neutralizar estas moléculas, pero cuando son sobrepasadas, se inicia una cadena de reacciones químicas que conduce a la formación de ROS secundarias a la exposición a ozono que pasan a la sangre, y a través del flujo sanguíneo llegan a todos los órganos produciendo un estado de estrés oxidativo generalizado (Rivas-Arancibia et al., 2000, 2003).

Se ha propuesto que el ozono al entrar en contacto con el ion cloro (Cl^-) presente en el organismo, produce iones de hipoclorito (ClO^-), que al reaccionar con otros componentes del medio, forman al final el ion hidroxilo ($-\text{OH}$), principal responsable de las reacciones de peroxidación en el organismo. Los radicales $-\text{OH}$ también se forman en el ambiente, debido a que el ozono ambiental al reaccionar con la luz ultravioleta

(fotólisis), genera un átomo de oxígeno excitado, que a su vez reacciona con las moléculas de agua presentes en el medio, para dar lugar al radical libre -OH (Calderón Guzmán et al., 2001).

El tejido cerebral es uno de los más vulnerables al daño oxidativo por el alto consumo de oxígeno, alta tasa metabólica, bajos niveles de enzimas antioxidantes como superóxido-dismutasa, glutatión peroxidasa y casi ausencia de catalasa. El gran aumento en los niveles de lípidos peroxidados por aumento en las ROS, se debe a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son altamente susceptibles a la oxidación. Es importante señalar que las diferentes estructuras cerebrales, presentan diferencias en su respuesta al daño oxidativo.

El estrés oxidativo causado por exposición aguda o prolongada a ozono, ocasiona alteraciones plásticas cerebrales que se manifiestan a nivel conductual por déficit en los procesos de aprendizaje, memoria, conducta y actividad motora (Rivas-Arancibia et al., 2000).

Además, la exposición a ozono ambiental se ha asociado con varios efectos adversos a la salud (Rivas-Arancibia et al., 2003). En un estudio de contaminación del aire se encontró que existen asociaciones importantes entre los cambios a corto plazo en las concentraciones de ozono y la mortalidad y morbilidad, en 95 de las comunidades urbanas más grandes de USA, las cuales equivalen a un 40% de la población total. Un incremento de 10 ppb estuvo asociado con un 0.52% de aumento en la mortalidad diaria (Bell, 2004).

Se han detectado asociaciones entre la exposición a ozono y el aumento de mortalidad diaria, además del incremento en admisiones a hospitales que resultan estadísticamente significativas incluso en modelos de contaminantes múltiples (Schwela, 2000).

En otros estudios también se han encontrado asociaciones entre el ozono y la mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Esto apoya los hallazgos de que la contaminación urbana en los niveles actuales lleva a un aumento en la mortalidad y sugiere que la exposición a ozono puede desempeñar un papel causal en este exceso (Borja-Aburto et al, 1998).

Dada la numerosa población que está expuesta a contaminación ambiental tanto en México como en otras metrópolis en el mundo, estas pequeñas pero significativas asociaciones entre la mortalidad y los índices de contaminación del aire son motivo de preocupación pública (Loomis et al, 1996).

SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOESTRIATAL

La dopamina (DA) es una catecolamina que juega un papel importante en el cerebro humano como neurotransmisor inhibitorio, particularmente involucrado en la regulación de la función motora. Dicho neurotransmisor se sintetiza en las terminales nerviosas de las neuronas dopaminérgicas a partir de la tirosina, su aminoácido precursor.

La síntesis comienza con la formación de L-DOPA, mediante la acción de la tirosina hidroxilasa, que es la enzima limitante en la síntesis de dopamina, motivo por el cual, la actividad de la misma está rigurosamente controlada. La L-DOPA es inmediatamente metabolizada para formar DA por una descarboxilasa de aminoácido aromático. En las terminales nerviosas, la DA es almacenada en vesículas sinápticas cuyo contenido ácido previene la autooxidación del neurotransmisor antes de que éste sea liberado.

La acción de la DA termina con la recaptura de la misma por un transportador de membrana, y la subsiguiente reutilización o catabolismo por las enzimas monoamino-oxidasa (MAO) o la catecol-o-metiltransferasa (COMT).

Los sistemas dopaminérgicos intervienen en procesos de motivación, memoria, aprendizaje, control motor, y se estima que la dopamina constituye más del 80% del contenido total de catecolaminas en el cerebro (Feldman et al., 1997).

El sistema dopaminérgico mesoestriatal, tiene un componente dorsal, que se origina de células de la sustancia nigra, que es de vital importancia para el control motor, y la degeneración de este sistema es la clave de la enfermedad de Parkinson. Aunado a lo anterior, el componente ventral de este sistema, juega un papel crítico en las propiedades de reforzamiento a psicoestimulantes y otras drogas de abuso (Feldman et al., 1997).

El mayor riesgo de la DA es que su grupo catecol se oxida fácilmente mediante un proceso que involucra la transferencia de un electrón al oxígeno. De esta manera, esta oxidación da como resultado la formación de un $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , radical hidroxilo y otras ROS, las cuales pueden ser contrarrestadas por los sistemas antioxidantes y también debido por la neuromelanina. No obstante, en presencia de un estado de estrés oxidativo la oxidación de la dopamina contribuye a iniciar un proceso de daño oxidativo, el cual al generalizarse en la *substantia nigra*, puede conducir a una neurodegeneración progresiva.

Además de lo mencionado anteriormente, el estrés oxidativo produce un incremento en la liberación y oxidación de dopamina (Chiueh et al., 2003). Los metabolitos reactivos de ésta, producto de la oxidación, como las quinonas y ROS, alteran directamente la funcionalidad de las proteínas, inducen modificaciones en la permeabilidad mitocondrial y causan disminución de ATP.

Existen diferencias sexuales en las funciones de las neuronas dopaminérgicas, así como en la progresión de enfermedades asociadas a este sistema, como Parkinson y demencia. Estudios epidemiológicos han revelado que la prevalencia y progresión de la enfermedad de Parkinson es más alta y rápida en hombres que en mujeres (Leranth, 2000). La razón de estas diferencias no se conoce, pero sugieren que las hormonas gonadales juegan un papel importante en la modulación de estos sistemas (Dluzen, 2000).

A. La dopamina como fuente de ROS en el SNC

Las ROS generadas por la oxidación de dopamina se han implicado en la destrucción de neuronas relacionada con la edad y otros procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson.

A la fecha, se han propuesto dos mecanismos por medio de los cuales la DA estimula la producción de ROS. Estos dependen de la presencia o ausencia de mediadores enzimáticos: La participación de la MAO y la autooxidación.

La DA de la *substantia nigra* y el estriado es desaminada por la enzima MAO, que se localiza en la membrana externa de la mitocondria. Esta reacción da como resultado la producción de radicales $\cdot\text{O}_2^-$, e hidroxilo, además de H_2O_2 (Graham, 1978).

El salsolinol es uno de los derivados de la DA más estudiados por dos razones: está presente en el cerebro humano y se puede transformar fácilmente en una neurotoxina capaz de causar la muerte celular. Se ha propuesto que este compuesto puede formarse mediante una vía enzimática que involucra una sintasa o por vía no enzimática, mediante la condensación de la DA con acetaldehído (Naoi et al., 1996)

Otro derivado de la DA es el tetrahidropapaverinol (THP), que se obtiene del catabolismo enzimático. Se ha reportado que el THP por sí mismo es capaz de inducir necrosis en células de neuroblastoma y está relacionado con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

Los derivados del metabolismo de la DA actúan como proneurotoxinas en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Por otro lado, ciertos componentes del humo de tabaco pueden reaccionar con estas proneurotoxinas impidiendo su activación. Este

hecho puede explicar el efecto benéfico del hábito de fumar en la incidencia de Parkinson (Méndez-Alvarez y Soto-Otero, 2004) (Ver tabla 2).

Factores que pueden estimular la producción de ROS
Metabolismo de la dopamina
Autooxidación (no enzimática)
Desaminación oxidativa (enzimática por la MAO)
Proceso de formación de Neuromelanina
Alto contenido de hierro oxidante
Factores que pueden aumentar el estrés oxidativo
Disminución de la actividad de enzimas antioxidantes
Bajos niveles de glutatión peroxidasa
Bajos niveles de catalasa
Disminución de otras moléculas antioxidantes
Poco glutatión reducido
Bajos niveles de ubiquinona

Tabla 1. Factores que contribuyen al estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson. Tomado de Méndez-Alvarez y Soto-Otero, 2004.

B. La autooxidación de la Dopamina

Como se mencionó anteriormente, otro mecanismo por medio del cual la DA puede contribuir a la formación de ROS es la autooxidación espontánea. La DA es una molécula con un grupo catecol, el cual puede oxidarse fácilmente de manera no enzimática para formar una serie de especies electroquímicas tipo quinoides.

El paso inicial en la oxidación de la DA involucra una reacción con el oxígeno molecular para formar DA-o-quinona y dos moléculas de $\cdot\text{O}_2^-$. La formación de los aniones superóxido durante la autooxidación de la DA lleva a la producción de H_2O_2 por la dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$.

La DA-o-quinona luego sufre una ciclización intramolecular para formar 5,6-dihidroxiquinolina, que es subsecuentemente oxidada por la DA-o-quinona para formar dopaminocromo. Este compuesto sufre un rearrreglo para formar 5,6-dihidroxiindol, que a su vez se oxida en una quinona de indol. El siguiente proceso de polimerización lleva finalmente a la generación de un pigmento oscuro denominado neuromelanina. La

aparición oscura de la *substantia nigra* se debe a la presencia de este pigmento, que contiene productos derivados de la oxidación de la L-dopa.

Cuando la autooxidación de la DA tiene lugar en presencia de L-cisteína, la DA-o-quinona sufre un ataque nucleofílico por el grupo tiol del aminoácido para formar L-cisteinil-DA. Este hecho difiere de la oxidación normal de la DA para formar neuromelanina (Méndez-Alvarez & Soto-Otero, 2004). En la oxidación normal de la DA la formación de neuromelanina es un mecanismo de protección que contrarresta las especies de DA oxidadas.

ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo, que se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* y la concomitante pérdida de terminales nerviosas dopaminérgicas en el caudo-putamen, que es la principal área de proyección de las neuronas de la *substantia nigra*.

Los pacientes con EP presentan temblor en reposo, movimientos lentos (bradiquinesia), rigidez, e inestabilidad postural.

Acompañando esta pérdida de neuronas se encuentra la acumulación de cuerpos de Lewy, inclusiones proteínicas intracitoplásmicas que contienen α -sinucleína, sinfilina-1, componentes de la vía proteosómica de ubiquitina y parkina. Existen anomalías bioquímicas en el cerebro de pacientes con EP, tales como deficiencias en el complejo I mitocondrial, disminución extracelular de tioles, incremento del hierro oxidante (FeII) en la *substantia nigra*, así como daño oxidativo, que incluye oxidación de DNA, nitración e incremento en grupos carbonilos de proteínas, especialmente en la *substantia nigra* (Jenner y Olanow, 1998). Los cuerpos de Lewy en la EP son inclusiones filamentosas intraneuronales que se encuentran predominantemente en la *substantia nigra*. Estas inclusiones contienen neurofilamentos fosforilados y una proteína llamada α -sinucleína.

Actualmente existen evidencias de las propiedades agregatorias de la α -sinucleína y su posible asociación con un estado de estrés oxidativo presente en la EP (Sayre et al., 2001). Una de estas evidencias es la noción de que los agregados tipo amiloide de la α -sinucleína, similares a aquellos observados *in vivo*, son inducidos por co-incubación con cobre (II), Fe/ H₂O₂, o citocromo c/ H₂O₂ (Sayre et al., 2001).

Muchas de las características motoras que definen la EP resultan primariamente de la pérdida de las neuronas de la *substantia nigra*. Hasta el momento, el fármaco más

potente para el tratamiento de la EP es la l-dopa. Sin embargo, las complicaciones motoras de la administración crónica de l-dopa han emergido como una limitación mayor en el tratamiento. Es por eso que las terapias neuroprotectoras que retrasen la progresión de la enfermedad pueden retardar también la necesidad de l-dopa. No hay suficiente evidencia de que la terapia con l-dopa impida la muerte progresiva de las neuronas nigroestriatales, sino que por el contrario, se especula que puede contribuir al curso progresivo de la enfermedad (Fahn, 2006).

En los años recientes, se han aportado nuevos conocimientos acerca de los mecanismos de neurodegeneración presentes en la EP. Las deficiencias en la función mitocondrial, el incremento del estrés oxidativo, apoptosis, citotoxicidad e inflamación son parte de los procesos que eventualmente resultan en neurodegeneración. Las ROS generadas por la oxidación de dopamina, también han sido implicadas en la destrucción de neuronas relacionada con la edad y otros procesos neurodegenerativos como la EP (Fahn, 2006).

Estrés oxidativo mediado por hierro en la *substantia nigra* con EP

Existen cantidades anormalmente altas de hierro y estrés oxidativo en la EP (Sayre et al., 2001). El incremento del hierro total no necesariamente implica un estado de estrés oxidativo siempre y cuando existan proteínas que almacenen el hierro en su forma inerte, tales como la ferritina. La entrada y liberación de hierro por la ferritina ocurre cuando el hierro cambia a estado más activo y entra a la reacción de Fenton para generar el radical hidroxilo. El hierro se acumula en los astrocitos de la *substantia nigra* de ratas viejas, al mismo tiempo que existe un incremento en la tasa de Fe(III)/Fe(II) y una disminución de glutatión. Una interpretación es que el secuestro por la mitocondria del Fe(II) en la astrogliá de la nigra durante el envejecimiento, puede ser un factor que predispone el cerebro senescente a la EP (Sayre et al., 2001).

Además, existen evidencias de que la pérdida intracelular del balance redox resulta en una oxidación aberrante de dopamina en 6-hidroxi-dopamina, la cual a su vez puede sufrir una autooxidación para formar quinonas y simultáneamente, generar $\cdot\text{O}_2^-$.

Esta reacción en cascada, ya sea por sí misma, o amplificada por la generación de ROS, puede explicar la pérdida neuronal como resultado final (Méndez-Alvarez & Soto-Otero, 2004).

El hierro y la actividad de la MAO están incrementados en la EP. Estos están asociados con autooxidación de la dopamina y su desaminación por la MAO, lo cual resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres que

promueven el inicio de estrés oxidativo para inducir neurodegeneración. Se ha demostrado que los quelantes de hierro así como los inhibidores de la MAO resultan protectores en algunos modelos de EP, como la 6-hidroxi dopamina y el MPTP (Gal et al, 2006).

ESTRÓGENOS Y NEUROPROTECCIÓN EN EL SNC

El papel de los estrógenos en sistema nervioso central de mamíferos va más allá del control de funciones reproductivas, pues controla otras funciones homeostáticas, como la respuesta al estrés, la alimentación, ciclos de sueño, la regulación de temperatura y comportamientos motivados, entre otras. Los estrógenos tienen efecto en las neuronas mediante la activación de genes relacionados con neurotrofinas, tales como NGF (Amantea et al., 2005) y pueden modular receptores de neurotransmisores, además de regular la diferenciación de grupos específicos de neuronas (Toran-Allerand, 2004), la formación de sinapsis durante el desarrollo y la regeneración del sistema nervioso (Behl y Moosmann, 1997).

En las décadas pasadas, se ha demostrado que los estrógenos sirven como factores neuroprotectores en distintas enfermedades neurodegenerativas (Susuki et al., 2006). A pesar de estos conocimientos, se sabe poco de los mecanismos y blancos celulares por medio de los cuales los estrógenos ejercen su acción neuroprotectora.

Entre los efectos de los estrógenos más estudiados en el SNC se encuentran la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas, así como el control de un amplio rango de comportamientos. Éstos incluyen los comportamientos motor y reproductivo, la actividad neuronal relacionada con la cognición, la modulación de los estados emocionales, así como el mejoramiento del aprendizaje y la memoria (McEwen y Alves, 1999; Xu y Zhang, 2006).

Los efectos promotores del crecimiento de los estrógenos han sido descritos en varias regiones del cerebro, que incluyen al hipotálamo, hipocampo, mesencéfalo (Beyer y Karolczac, 2000) y la corteza. Además de actuar como agentes estimulantes del crecimiento, los estrógenos también interfieren con el desarrollo neuronal en la etapa de neurogénesis, modulan la muerte celular apoptótica (Arai et al., 1996; Amantea et al., 2005) y afectan la migración de neuroblastos que posteriormente formarán núcleos cerebrales.

Más tarde en el desarrollo, cuando los circuitos neurales ya están establecidos, los estrógenos promueven la formación de sinapsis.

El sistema nigroestriatal es un blanco de los estrógenos bien conocido durante el desarrollo, pero también en el cerebro adulto. Más específicamente, los estrógenos intervienen en el desarrollo del sistema nigroestriatal incluyendo la neuritogénesis, la plasticidad, además de la síntesis, liberación y metabolismo de la dopamina. Se propone que la diferenciación sexual de los sistemas dopaminérgicos es región-específica y que

tanto la neurogénesis como desarrollo de varios parámetros de actividad dopaminérgica, pueden afectarse diferencialmente. La diferenciación sexual de las neuronas dopaminérgicas puede iniciarse independientemente de la acción de hormonas esteroides gonadales, pero puede modificarse por diferencias en el ambiente hormonal (Beyer et al., 1991).

En el adulto, los estrógenos parecen afectar principalmente la actividad dopaminérgica y la actividad motora relacionada con la dopamina a nivel de estriado (Küppers et al., 2000).

Todas estas acciones de los estrógenos en el SNC son consideradas generalmente como una influencia positiva sobre las funciones neuronales. Se ha reportado que los estrógenos pueden jugar un papel protector en enfermedades como Parkinson (Saunders-Pullman et al., 1999; Amantea et al., 2005), Alzheimer (Yao et al., 2007), Huntington (Tuney et al., 2006), y reducen la severidad de procesos isquémicos en el cerebro (Rusa et al., 1999; Liu et al., 2007).

Es necesario hacer notar que los efectos neuroprotectores de los estrógenos están mediados por acciones genómicas y no genómicas, y además, debido a las características que presenta su estructura química, tienen la capacidad para actuar como antioxidantes (Bonfont et al., 1998; Moosmann et al., 1999; Prokai y Simpkins, 2007).

A. Acciones genómicas

Los factores que contribuyen a las respuestas heterogéneas al estradiol en el sistema nervioso central son debidos a la multiplicidad de receptores de estrógenos (ER), a la naturaleza de sus células blanco, y a la heterogeneidad de señales que pueden activarse por ER intracelulares.

Los estrógenos afectan a sus células blanco mediante la activación de receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción ligando-dependientes. Estos receptores interaccionan con elementos de respuesta a estrógenos en el DNA adyacente a genes dependientes de esta hormona, y así, regulan su expresión. Estos efectos genómicos involucran la síntesis de novo de proteínas y se caracterizan por una latencia a escala de varias horas.



Figura 2. Acciones de los estrógenos dependientes de su unión a receptores nucleares.

Existen dos tipos de receptores nucleares a estrógenos: $ER\alpha$ y $ER\beta$ que pueden formar homodímeros, que actúan potenciando la transcripción a través de sitios de respuesta a estrógenos (ERE). Sin embargo, en años recientes se han descrito otros efectos de los estrógenos mediados por interacciones entre sus receptores nucleares con otros factores de transcripción como los complejos fos/jun. Estos efectos están mediados por elementos similares a AP-1.

Los receptores intracelulares de estrógenos son miembros de una superfamilia de factores de transcripción regulados por hormonas. Los receptores $ER\alpha$ y $ER\beta$ residen en el núcleo de las células blanco en un complejo junto con proteínas inhibitorias (proteínas de choque térmico como Hsp90 y otras). La hormona conjugada al receptor determina la liberación de las proteínas inhibitorias, y el complejo estrógenos-ER puede reconocer secuencias de DNA específicas (denominadas elementos de respuesta a estrógenos) en los promotores de genes blanco, produciendo el reclutamiento de proteínas del aparato de transcripción para disparar la síntesis de mRNAs específicos (Figura 2).

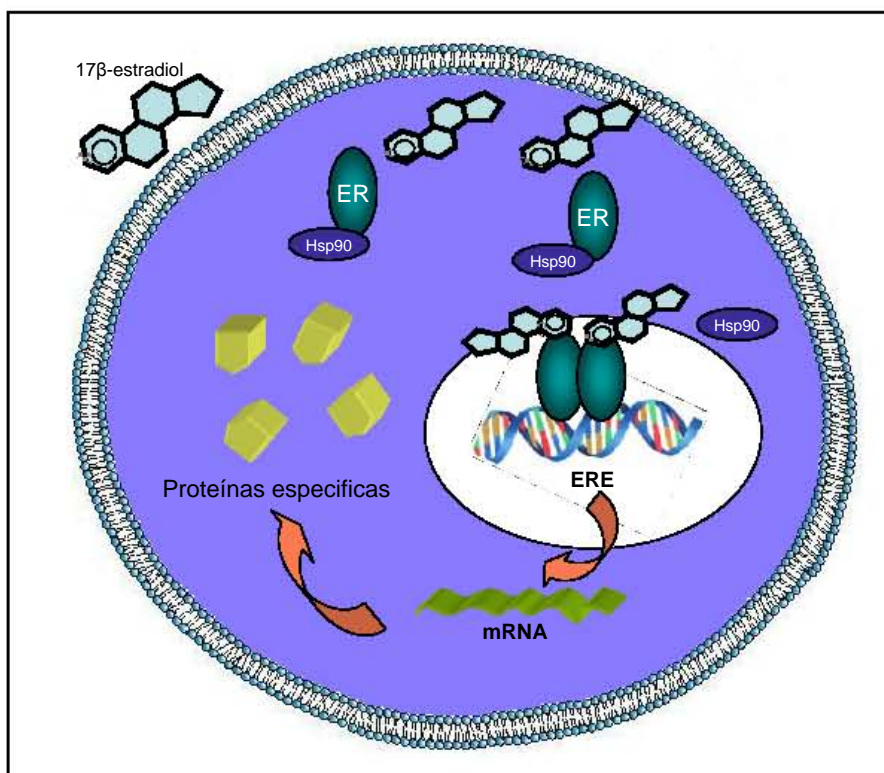


Figura 3. Efecto de los estrógenos sobre la transcripción de enzimas antioxidantes como tioredoxina y SOD, dependiente de la activación de receptores nucleares.

De manera alterna, los receptores activados por ligando que no se unen a DNA, pueden interactuar directamente con elementos de la maquinaria de transcripción y modular la transcripción de otros factores de transcripción (NFκB, AP-I). Se ha sugerido que los dos receptores tienen efecto directo distinto en la misma célula blanco.

Hay estudios que demuestran que los ERα involucran vías de señalización con la proteína G Rac1b, la cual juega un papel importante en el ensamblaje de microtúbulos. Los ER β no presentan este efecto.

El 17β-estradiol es un potente ligando endógeno de estrógenos, el cual protege de la neurodegeneración en modelos *in vitro* y en animales (Brann et al., 2007). Los estrógenos incrementan la expresión de NOS1 y de proteínas antiapoptóticas como tioredoxina, además de regular la expresión de MnSOD (Chiueh et al., 2003).

Existen estudios que indican que el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ y macrófagos activados, afectan de diferente manera la expresión de ERα y ERβ, demostrando una respuesta celular específica que puede bloquearse con antioxidantes. Estos datos sugieren que el estrés oxidativo y la producción de ROS/RNS funcionan como reguladores fisiológicos de la expresión de ERα y ERβ. Lo anterior puede proveer

información acerca de la acción protectora estrogénica y fitoestrogénica dependiente de ER β en la inflamación y enfermedades relacionadas (Snait et al., 2002).

Después de un trauma neuronal en varias enfermedades neurodegenerativas, la microglia activada secreta moléculas pro-inflamatorias que pueden contribuir al daño neuronal progresivo. La demostración del papel protector de los estrógenos en enfermedades neurodegenerativas tanto en humanos como en animales, llevó a averiguar si esta hormona regula la respuesta inflamatoria en SNC. Se ha mostrado que los estrógenos ejercen una actividad anti-inflamatoria sobre cultivos primarios de microglia en ratas, lo que sugiere un bloqueo en la producción de mediadores inflamatorios como son la iNOS, prostaglandina E₂ (PGE₂) y metaloproteinasa 9 (MMP-9). Los efectos son dosis-dependientes y se pueden bloquear con el antagonista del receptor de estrógenos ICI 182 780. La demostración de la expresión de ER α y ER β en microglia y macrófagos, aunada a la observación de que los estrógenos bloquean la acumulación del mRNA de MMP-9 apoya la hipótesis de una actividad genómica de los estrógenos vía receptores intracelulares (Vegeto et al., 2001).

Los ER intracelulares pueden encontrarse en neuronas y células gliales como astrocitos, oligodendrocitos e incluso en microglia.

Los ER α pueden ser activados transcripcionalmente por neurotransmisores, factores de crecimiento, e incluso en ausencia de ligando conjugado. En particular, la dopamina, insulina, IGF-1 y el factor de crecimiento epidermal pueden controlar la actividad transcripcional de ER α . mediante la fosforilación del mismo receptor o por interacción con coactivadores/represores. Por ejemplo, se sabe que EGF activa el receptor ER α de estrógenos por señalización a través de la vía de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), sugiriendo que una MAPK fosforila directamente la serina 118 del ER α . Esta interacción entre señalizaciones intracelulares y membranales ha sido referida como comunicación cruzada (Falkenstein et al., 2003).

Se ha propuesto que este mecanismo de comunicación puede ser relevante durante la diferenciación de SNC permitiendo a IGF-I activar receptores de estrógenos.

Esto podría explicar porqué por lo menos en ratas, los ERs son sintetizados en diversas áreas del cerebro durante etapas muy tempranas de la diferenciación de SNC, mientras que los altos niveles de alfa feto proteínas limitan el acceso de los estrógenos a sus células blanco (Maggi, et al., 2000).

La señalización genómica de los estrógenos es un mecanismo importante para la regulación a largo plazo de los cambios en el sistema nigroestriatal. En varios reportes se ha demostrado que el tratamiento crónico con estrógenos produce un incremento en la densidad de receptores D2 dopaminérgicos (Di Paolo, 1994). La administración de estrógenos también restaura la densidad de receptores D1 a sus niveles normales después de la ovariectomía (Küppers et al., 2000).

B. Acciones no genómicas

No todos los efectos de los estrógenos pueden explicarse mediante las acciones genómicas, pues varios estudios muestran que las hormonas esteroides pueden producir respuestas celulares de muchas formas. Estos efectos son conocidos como efectos no genómicos de los esteroides (Beyer, 1999; Prokai y Simpkins, 2007).

Se ha mostrado que la activación de los ER es dependiente de otras moléculas de señalización, como cAMP, calcio, cinasa de IP3, DAG, CREB, ERK-1, ERK-2, lo cual sugiere la posibilidad de que los estrógenos se unan a los sitios aceptores localizados en la membrana citoplasmática. Esto apoya otros estudios electrofisiológicos que han propuesto la existencia de receptores membranales de estrógenos que se relacionan funcionalmente con canales de calcio.

Se han descrito efectos extremadamente rápidos de los estrógenos sobre la excitabilidad de la membrana, la apertura de canales iónicos y señalización de neurotransmisores con receptores acoplados a proteínas G.

Actualmente existen evidencias de que los estrógenos y otros esteroides son capaces de unirse a receptores específicos localizados en la membrana plasmática (Toran-Allerand et al., 2004).

Cuando los estrógenos interaccionan con estos receptores de membrana, pueden estimular rápidamente distintos mecanismos de señalización intracelulares, tales como cascadas dependientes de calcio ((Mermelstein et al., 1996; Beyer y Karolczak, 2000), formación de cAMP e IP3 (Gu y Moss, 1993), fosforilación de CREB (Zhou et al., 1996) y transcripción (Yao et al., 2007), entre otros.

Sin embargo, es necesario hacer énfasis en que las acciones no genómicas sólo se refieren a la etapa inicial de los efectos de los estrógenos.

En el sistema nigroestriatal, no hay duda de que los estrógenos interfieren con las funciones dopaminérgicas y gabaérgicas a nivel estriatal. Con respecto a los elementos presinápticos dopaminérgicos en el estriado, se sabe que el estradiol puede

potenciar la liberación de dopamina (Liu y Xie, 2004), estimular la síntesis de dopamina (Pasqualini et al., 1995) y modificar la sensibilidad de los autorreceptores de dopamina (Thompson y Certain, 2005).

Además, los esteroides sexuales pueden modular la transmisión dopaminérgica interfiriendo con elementos postsinápticos. Algunos estudios bioquímicos y farmacológicos indican que la densidad de receptores D1 dopaminérgicos, cambia a lo largo del ciclo estral en la rata después de la administración de estrógenos (Díaz-Véliz et al., 1999). Por otro lado, la expresión y distribución de receptores D2, así como los niveles de transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT2) en el estriado se alteran con estrógenos (Le Saux et al., 2006).

Aunque las consecuencias de esta comunicación cruzada, entre los estrógenos y la transmisión dopaminérgica no se comprenden, es probable que los estrógenos afecten la conducta rotacional y otras ejecuciones motoras dependiendo de las interacciones estrógenos-dopamina (Xiao y Becker, 1997).

También se ha reportado que los estrógenos afectan la neurotransmisión serotoninérgica y gabaérgica en el estriado (Birzniece et al., 2006). En particular, se ha demostrado que el estradiol puede regular los niveles de GABA y producir cambios ultraestructurales a nivel de membranas dendríticas en neuronas gabaérgicas del núcleo caudado (Morrissette et al., 1992)

Las acciones no genómicas de los esteroides se caracterizan principalmente por su insensibilidad a los inhibidores de la transcripción y a la síntesis de proteínas, además de que actúan en un rango de segundos a minutos. (Falkenstein et al., 2003)

B.1 Los estrógenos como antioxidantes

Otra actividad independiente de la unión al receptor de los estrógenos es su papel como antioxidantes. La actividad antioxidante de los estrógenos parece deberse a su estructura química (Prokay y Simpkins, 2007). Se han probado varios derivados de los estrógenos para determinar su actividad antioxidante en algunos paradigmas de muerte neuronal por daño oxidativo y se encontró que además del 17β -estradiol, el estriol, la estrona, el etinilestradiol y el 2-hidroxiestradiol también presentan poderosos efectos antioxidantes.

Los prerrequisitos básicos para que las moléculas estrogénicas actúen como antioxidantes y neuroprotectores contra la oxidación es la presencia de un grupo hidroxilo intacto en el anillo A de la molécula esteroide (Figura 5). Cuando este grupo hidroxilo se modifica, como la alteración del grupo éter del mestranol, se pierde su

actividad protectora para inhibir la peroxidación de lípidos (Behl et al., 1997). Lo mismo ocurre con el α -tocoferol (vitamina E), que cuando cambia a acetato de tocoferol y otros derivados, pierde casi completamente su actividad antioxidante.

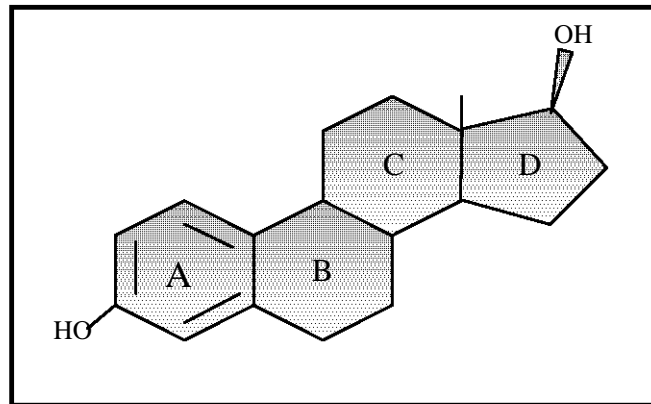


Figura 4. Estructura química del 17 β -estradiol. El grupo hidroxilo del anillo fenólico A, le confiere la actividad antioxidante directa.

Los estrógenos también pueden ser degradados estructuralmente en compuestos que presentan características antioxidantes similares a las de los estrógenos o la vitamina E, como son los polifenoles aromáticos (Moosman et al., 1997).

LOS EFECTOS RÁPIDOS DE LOS ESTRÓGENOS ESTÁN IMPLICADOS EN LA NEUROPROTECCIÓN

La acción protectora de los estrógenos se ha observado en enfermedades neurodegenerativas y en la pérdida de memoria asociada con el envejecimiento. Se ha demostrado que los estrógenos reducen la toxicidad en cultivos de neuronas causada por sobreestimulación con glutamato (Singer et al., 1996; Sribnick et al., 2006), peróxido de hidrógeno (Singer et al., 1998), privación de nutrientes (Gollapudi y Oblinger, 1999) y beta amiloides (Green et al., 1996; Yao et al., 2007). Muchos de los efectos protectores se deben a la activación de receptores clásicos de estrógenos.

Sin embargo, existen efectos rápidos de los estrógenos que activan otras cascadas de señalización, como las que se describen a continuación:

A. Activación de la vía de cAMP-PKA-CREB por estrógenos

Uno de los efectos de los estrógenos que fue denominado como “comunicación cruzada” con las vías de cinasas es su habilidad para estimular la adenilato ciclasa

incrementando los niveles de cAMP en las células, minutos después de administrar la hormona. Este aumento también se observa con moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs), incluyendo el tamoxifen y la familia de compuestos ICI. Las membranas impermeables a estrógenos también son capaces de presentar un incremento rápido de cAMP que puede llevar a una activación adicional de sistemas de segundos mensajeros (Han et al., 2000). Este incremento de cAMP por los estrógenos puede activar la PKA, que a su vez fosforila el factor de transcripción CREB (Zhou et al., 1996; Szego et al., 2006) para modular otros sistemas de señalización. A través de estos mecanismos, los estrógenos pueden aumentar la transcripción de genes que no contienen sitios ERE o AP-1, pero que contienen elementos de respuesta a cAMP (CRE) en sus regiones promotoras. La transcripción mediada por CRE juega un papel importante en la potenciación a largo plazo (LTP) (Impey et al., 1996), pues se incrementa en ciertos paradigmas de aprendizaje dependientes del hipocampo. Los estrógenos actúan como agentes neuroprotectores que mantienen la plasticidad en el adulto mediante la modulación de vías transcripcionales dependientes de CRE.

B. Activación de la vía de MAPK por estrógenos

Los efectos rápidos de los estrógenos se han descrito recientemente como iniciados en la membrana. Uno de estos efectos es la activación de la vía de transducción de señales de MAPK (Migliaccio et al., 1996; Szego et al., 2006). Esta activación puede ser importante en muchos efectos fisiológicos de los estrógenos, que no pueden explicarse mediante la hipótesis transcripcional (Figura 5).

La activación de MAPK por receptores de estrógenos también se ha implicado en la neuroprotección mediada por estrógenos (Singer et al., 1999; Szego et al., 2006) y la regulación del ciclo celular (Castoria et al., 1999).

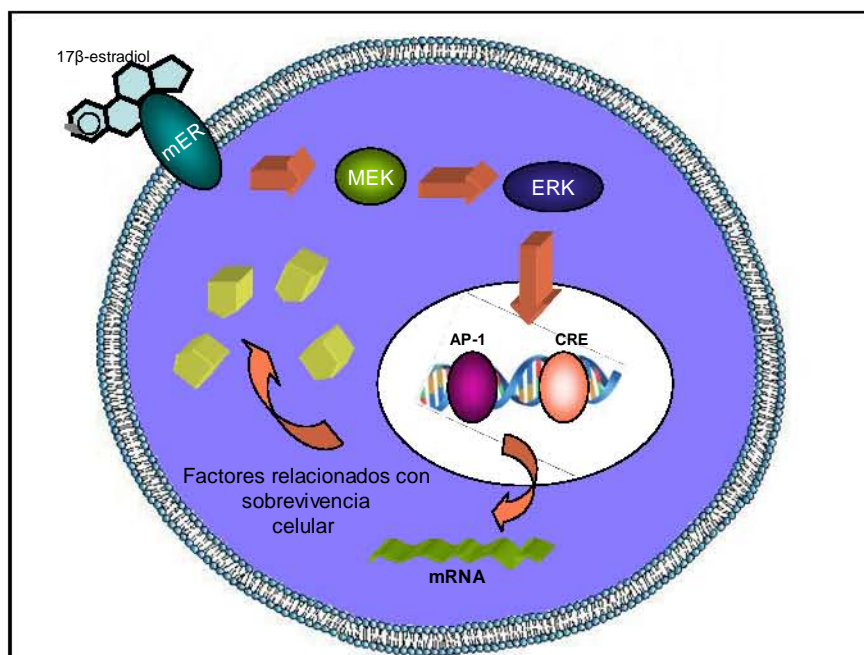


Figura 5. Efecto de los estrógenos sobre la supervivencia neuronal mediante la activación de la vía MAPK, dependiente de la activación de receptores membranales.

Otras evidencias han propuesto la existencia de receptores membranales de estrógenos que pueden activar estos efectos rápidos (Ramírez y Zheng, 1996). Sin embargo, muchos de los efectos rápidos también pueden producirse mediante los ERs conocidos. La activación de MAPK por medio de la interacción de los receptores con src (Migliaccio et al., 1996), Raf-B o hsp90 (Singh et al., 1999), sugiriendo la existencia de un complejo con ERs que involucra múltiples proteínas.

También se ha observado que las MAPK pueden fosforilar directamente los receptores de estrógenos (Kato et al., 1995) para modular su actividad transcripcional (Mashuhiro et al., 2005).

La fosforilación del receptor mediante src también está involucrada en la regulación de la dimerización del receptor y la transcripción en sitios ERE. Las MAPK participan en la transcripción de genes en respuesta a estrógenos que no contienen sitios usuales ERE o AP-1, posiblemente para modular la dimerización del receptor.

Por otro lado, aunque es evidente que el estradiol puede activar rápidamente vías de cinasas que tienen múltiples efectos en neuronas de SNC, los receptores y vías de transducción involucradas aun no se han identificado. Se ha reportado que el estradiol altera la neurotransmisión de GABA y μ -opioides a través de eventos no transcripcionales en neuronas con GABA, proopiomelanocortina (POMC) y dopamina. (Qiu et al., 2003)

C. La regulación de la apoptosis

La regulación de la apoptosis por los estrógenos es más obvia en la regulación de la sobrevivencia neuronal durante el desarrollo, donde los procesos apoptóticos tienen un papel importante para la conformación del cerebro adulto.

Debido a que la vía de MAPK ha sido implicada en procesos antiapoptóticos (Xia et al., 1995; Jover-Mengual et al, 2007), es probable que los efectos rápidos de los estrógenos estén relacionados con la apoptosis en general, y no se limiten únicamente a los procesos de excitotoxicidad. Adicionalmente, la activación de CREB y la transcripción mediada por CREB son importantes para la regulación de la apoptosis, y pueden ser otros blancos para la prevención de la muerte celular.

D. Los estrógenos y la familia de proteínas BCL-2

BCL-2 es la familia de proteínas reguladoras de la apoptosis más estudiada y un blanco interesante para las acciones neuroprotectoras de los estrógenos (Amantea, et al., 2005).

La familia BCL-2 ha sido fuertemente vinculada con la inhibición de la muerte celular tanto apoptótica como necrótica en respuesta a estímulos tóxicos. La sobreexpresión de BCL-2 puede proteger neuronas de privación de suero (Zhong et al., 1993), toxicidad por péptidos beta amiloides (Yao et al., 2007) y daño inducido por radicales libres. Estos datos sugieren que la mera abundancia de la proteína BCL-2 es suficiente para disminuir la muerte celular.

BCL-2 es una proteína asociada a membrana que se encuentra en la mitocondria, el núcleo y el retículo endoplásmico como hetero u homodímeros formando pares con otras proteínas homólogas que pueden funcionar de manera antiapoptótica (BCL-XL, BCL-W) o proapoptótica (BAX, BAD, BAK, BCL-Xs). La expresión de BCL-2 reduce la afinidad de JNK y la sintasa del óxido nítrico, además de prevenir la pérdida de citocromo c de la mitocondria (Shimizu et al., 1999) Está ampliamente demostrado que BCL-2 tiene un papel clave en la prevención de las etapas finales irreversibles de la apoptosis.

Aunque se ha probado que los estrógenos pueden regular la expresión de BCL-2, existen diversos mecanismos de acción. Se sugiere que los estrógenos incrementan la expresión de BCL-2 induciendo la fosforilación de CREB, el cual induce la transcripción a través de CRE en el promotor de BCL-2. Inicialmente se pensaba que debido a la pérdida de sitios ERE en el promotor de BCL-2, los estrógenos debían actuar a través de mecanismos no clásicos para inducir su transcripción. Sin embargo, ahora se sabe que la transcripción de BCL-2 también puede ocurrir mediante la unión

del receptor de estrógenos a sitios ERE en la región codificante del gen Bcl-2 (Perillo et al., 2000). Otros reportes han mostrado que la expresión de BCL-2 puede ser potenciada por la vía de activación de MAPK y NF-KB (Tamatani et al., 1999), ambos activados por estrógenos. Uno de los genes cuya expresión es modulada negativamente por estradiol es nip2, que codifica para una proteína de unión a Bcl-2 (Boyd et al., 1994).

En una serie de transfecciones en células de neuroblastoma se demostró que la sobreexpresión de nip2 produjo una muerte celular rápida con efecto dosis-dependiente. (Meda et al., 2000).

Estos datos sugieren que existen múltiples vías mediante las cuales los estrógenos pueden incrementar la expresión de BCL-2 y que la regulación del producto de este gen prueba la existencia de una convergencia entre los efectos de señalización rápida y los clásicos.

E. Los receptores de estrógenos y neuroprotección

Existen controversias acerca de si las acciones neuroprotectoras de los estrógenos están mediadas por los receptores clásicos conocidos, por la unión a sitios específicos distintos de los de los receptores conocidos, o por mecanismos antioxidantes no específicos. Una de las teorías explica que a dosis suprafisiológicas los estrógenos actúan a través de un mecanismo antioxidante que previene la muerte celular. A dosis mayores de 10 M, el 17 β -estradiol puede reducir la oxidación de fosfolípidos (Lacort et al., 1995). Más recientemente, se ha demostrado que a dosis micromolares de estrógenos, estos son capaces de proteger de la citotoxicidad a ciertas líneas neuronales carentes de ERs (Behl et al., 1997). Los estrógenos aplicados en altas concentraciones, reducen las corrientes de calcio mediadas por los receptores NMDA (Xia et al., 2002) y disminuyen la actividad de la sintasa de óxido nítrico, demostrando que a dosis suprafisiológicas, los estrógenos pueden unirse a sitios de baja afinidad por los receptores u otras proteínas. Es muy probable que los efectos neuroprotectores de los estrógenos a altas dosis resulten en una combinación de mecanismos antioxidantes directos y uniones de baja afinidad de los receptores a sitios alternativos.

También existe una gran cantidad de publicaciones que muestran que a dosis bajas, cercanas a las fisiológicas, los estrógenos solo pueden proteger a células que tienen ERs. Sin embargo, existen reportes adicionales que indican que las bajas dosis de estrógenos pueden inducir neuroprotección en líneas celulares carentes de ERs, pero en presencia de antioxidantes como glutatión (Gridley et al., 1998).

Mientras estas discrepancias se aclaran, es probable que en las células que expresan ERs existan múltiples vías que permitan que la viabilidad celular sea potenciada. Por el contrario, en células que no expresan ERs, hay varias explicaciones para los efectos neuroprotectores de los estrógenos. Estos incluyen la participación de nuevos receptores con alta afinidad por estrógenos (Revankar et al., 2005), globulinas de unión a esteroides que actúan independientemente de los ERs o la potenciación sinérgica de receptores de baja afinidad en las células. Todos estos datos claramente sugieren que las acciones de los estrógenos son multifacéticas y pueden involucrar varias vías intracelulares diferentes para producir un efecto *in vivo* fisiológicamente relevante.

EFFECTOS PROTECTORES DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE EL SISTEMA NIGROESTRIATAL (SNE)

Un importante sitio extra-hipotalámico donde los estrógenos regulan funciones que no son reproductivas es el sistema nigroestriatal (SNE). Esto tiene importantes consecuencias, como la existencia de diferencias dependientes de género en el SNE (Becker, 1999)

Estas diferencias de género determinan la respuesta a diferentes neurotoxinas: los ratones macho muestran una mayor reducción en las concentraciones de DA que las hembras cuando se tratan con neurotoxinas como MPTP (Freyaldenhoven et al., 1996)

Esto tiene correlaciones clínicas directas con la incidencia de enfermedades como el Parkinson, que es mucho mayor en hombres que en mujeres (Dluzen et al., 1998).

Se ha encontrado que las neuronas dopaminérgicas son blanco directo para la acción de los estrógenos y que éstos estimulan la extensión de neuritos y la expresión de tirosina hidroxilasa, que es la enzima limitante en la síntesis de dopamina. Se ha reportado que los estrógenos se requieren para la plasticidad y actividad del sistema dopaminérgico nigroestriatal tanto en desarrollo como adulto. Esto se confirma por la presencia en las neuronas nigroestriatales de la enzima aromatasa que es la responsable de la síntesis de estrógenos (Küppers et al., 2000). Los estrógenos juegan un papel importante durante la diferenciación sexual de neuronas dopaminérgicas de cerebro medio. Esto está indicado por la presencia de ER y la expresión transitoria de la aromatasa formadora de estrógenos en grupos de neuronas dopaminérgicas.

De igual manera, los estrógenos están estrechamente relacionados con sistemas de dopamina debido a que existe una correlación en la distribución de receptores a estrógenos en neuronas que coinciden con las vías mesoestriatales dopaminérgicas (Sawada y Shimohama, 2000).

De manera sorprendente, los efectos de los estrógenos sobre las funciones del sistema nigroestriatal no son transmitidas únicamente por receptores nucleares clásicos, sino que también dependen de acciones no clásicas que involucran receptores membranales acoplados a diversas cascadas de señalización molecular.

En un intento por entender las diferencias de género producidas por los estrógenos a continuación se describen los efectos más prominentes descritos en modelos animales:

La administración de estrógenos atenúa significativamente el grado de disminución de dopamina causado en animales tratados con las toxinas 6-OHDA, MPTP y metanfetaminas, las cuales son selectivas para el sistema nigroestriatal. La neuroprotección es máxima con el isómero 17β -estradiol, aunque también se presenta con 17α -estradiol. El tratamiento con anti-estrógenos como el tamoxifen, eliminó los efectos neuroprotectores sobre la toxicidad causada por las toxinas. Los estrógenos también preservaron las concentraciones de dopamina estriatales en ratones gonadectomizados tratados con MPTP, pero ni la testosterona, ni la dihidrotestosterona ofrecieron ninguna protección (Dluzen, 2000).

Por otra parte, en las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas, el exceso en la liberación de glutamato causa muerte neuronal mediada por receptores NMDA y el subsiguiente influjo de calcio (Sawada et al., 1996). Sin embargo, se ha reportado que el estradiol actúa como un antagonista del receptor NMDA bloqueando la entrada de calcio a través del canal (Di Paolo, 1994). También se ha demostrado que los estrógenos pueden contrarrestar el efecto de agentes neurotóxicos sólo si se administra antes de los componentes tóxicos (Maggi et al., 2000).

Además, existen datos obtenidos de experimentos realizados en cultivos celulares que apoyan el papel neuroprotector de los estrógenos en una amplia gama de condiciones para producir neurotoxicidad (Weaver et al., 1997).

A. Atrapadores de ROS

Una de las propiedades características de los agentes neurotóxicos involucra la generación de reacciones de estrés oxidativo y una patología resultante del daño por radicales libres. Un agente funciona como antioxidante cuando tiene el potencial de

abolir la neurodegeneración causada por el estrés oxidativo. Existen varias evidencias que demuestran que los estrógenos pueden funcionar como antioxidantes bajo una gama de condiciones tanto de laboratorio (Goodman et al., 1996) como clínicas (Tranquilli et al., 1995). Estos datos sugieren una capacidad de los estrógenos para ejercer acciones neuroprotectoras en el sistema nigroestriatal.

B. Actividad de la monoamino oxidasa (MAO)

Los estrógenos afectan la actividad de la MAO (Chakravorty y Halbreich, 1997). Debido a que las conclusiones generales respecto a las acciones específicas de los estrógenos sobre la MAO pueden modificarse por las diferencias entre especies, ubicación de la MAO A y B en glía y neuronas, podemos decir que el único efecto consistente es la reducción de la MAO-A por los estrógenos. Los datos sobre la MAO-B son limitados, pero sugieren que los estrógenos producen un incremento en su actividad.

Como la MAO es capaz de generar neurotoxinas (Magyar et al., 1998), los agentes como los estrógenos, que tienen la habilidad de modular la actividad de esta enzima pueden regular la producción de toxinas.

C. Receptores y liberación de DA

Está bien establecido que los estrógenos pueden modular los receptores de DA en el SNE. Aunque sus efectos son complejos, existen cambios tanto temporales como regionales en la expresión de los receptores de tipo D₂, D₁ en humanos (Lee y Mouradian, 1999). También se ha sugerido que los cambios en los receptores D₂ dependientes de estrógenos pueden representar un efecto secundario como resultado del incremento en la neurotransmisión de DA y no por los efectos directos sobre estos receptores (Lammers et al., 1999).

En ratas, el efecto del tratamiento crónico con estradiol sobre los receptores dopaminérgicos de los subtipos D₁ y D₂ se ha investigado extensivamente tanto en homogenizados como en rebanadas de estriado. Las ratas ovariectomizadas tratadas con 10 µg de 17β-estradiol durante dos semanas, mostraron un incremento en la densidad de receptores D₂ estriatales, pero sin modificar su afinidad (K_D). Este efecto fue observado desde 1979 y subsecuentemente descrito en ratas macho intactas y hembras ovariectomizadas. En este paradigma, el tratamiento empieza el segundo día después de la ovariectomía. Además, el 17β-estradiol, valeriato o benzoato de estradiol en dosis únicas (125 µg al día) o múltiples (1-100 µg al día) produjeron un incremento en la densidad de los receptores D₂ estriatales. Este efecto dosis-respuesta se observa solamente a dosis de estrógenos superiores a 1 µg al día. Esto sugiere que el incremento

de los receptores D₂ después del tratamiento con estradiol es independiente del aumento de prolactina. Sin embargo, la prolactina está involucrada en la modulación de estos receptores en la adenohipófisis, y la respuesta es de tipo bifásico, primero estimuladora y luego inhibitoria. La concentración más alta de esteroides está asociada con los niveles más altos de prolactina, y con una disminución de la unión a los receptores D₂.

Más aún, el estradiol puede aumentar los niveles de receptores independientemente de la prolactina. El tratamiento crónico con estradiol también incrementó la densidad de receptores D₁.

Sin embargo, ya sea a través de acciones directas sobre la liberación de DA o sus receptores, los estrógenos intervienen en la regulación de la síntesis de DA y sus funciones dentro del SNE.

Los cambios en la actividad de la DA, tales como el incremento en los niveles estriatales de la misma, pueden representar un componente neurotóxico, ya que pueden generar metabolitos tóxicos debido a que el flujo excesivo de DA se ha asociado con neurotoxicidad. Por el contrario, se ha propuesto que la reducción en la actividad de la DA estriatal puede vincularse con un nivel óptimo de funcionamiento del SNE (Dluzen et al., 1995).

D. Neurotrofinas

Los agentes neurotróficos son críticos para el desarrollo, mantenimiento y restauración de la función del SNC. Se ha propuesto que los estrógenos ejercen efectos sobre el SNC a través de la activación de neurotrofinas (Miranda y Sohrabji, 1996), potenciando la expresión de mRNAs de agentes neurotróficos como el BDNF, trkA y GAP-43 (Singer et al., 1996).

El incremento dependiente de estrógenos de BDNF, combinado con GDNF produce un gran aumento en el contenido de DA en cultivos mesencefálicos (Sautter et al., 1998). La habilidad de los estrógenos para activar estas neurotrofinas y sus efectos sobre el mantenimiento y restauración del SNC sugieren otros medios por los cuales los estrógenos podrían actuar como neuroprotectores.

E. Morfología y fluidez de la membrana

Los estrógenos pueden alterar la morfología de las membranas de neuronas estriatales (Morissette et al., 1992). Los cambios en la fluidez de la membrana fueron observados en respuesta al 17 β -estradiol y tamoxifen, pero no con 17 α -estradiol. El significado exacto de los efectos sobre la fluidez es desconocido. En otros sistemas como las membranas endoteliales, también se ha observado una fluidez reducida en ratas viejas

(Hashimoto et al., 1999). Estos datos implican que la fluidez membranal puede representar un componente en los procesos neurodegenerativos relacionados con la edad, y que además pueden ser modulados por los estrógenos.

F. Otras interacciones hormonales

Otros sistemas hormonales pueden verse alterados por los estrógenos. Muchos de ellos pueden afectar secundariamente la función del SNE. Por ejemplo, la hipofisectomía elimina algunos efectos moduladores dependientes de estrógenos sobre el SNC, como son los disparos espontáneos y evocados en neuronas de DA y el incremento de receptores dopaminérgicos en el estriado.

Los estrógenos pueden afectar el SNE por la interacción con hormonas como al prolactina y la melatonina. Desde que se reportó que la melatonina protege a las neuronas nigroestriales de la toxicidad causada por MPTP (Jin et al., 1998), podría ser posible que los estrógenos pudieran actuar en sinergia con la melatonina para contrarrestar la neurodegeneración en el SNE.

En general, la neurotoxicidad del SNE está relacionada con la temperatura corporal, pues se ha observado que las concentraciones de DA varían en respuesta a la aplicación de neurotoxinas como el MPTP o la 6-OHDA dependiendo de la temperatura a la que se apliquen (Moy et al., 1998). El incremento en la temperatura, como ocurre durante la ovulación, tiene el potencial de modular las respuestas termorreguladoras relacionadas con las neurotoxinas.

G. Flujo sanguíneo

Los estrógenos tienen efectos marcados sobre el sistema cardiovascular. Los ganglios basales parecen ser un sitio particularmente receptivo al incremento del flujo sanguíneo dependiente de estrógenos.

El incremento del flujo sanguíneo por los estrógenos puede ayudar a limpiar más eficientemente las neurotoxinas en el cerebro. Existen datos que muestran una acumulación estriatal de MPP⁺ con subsiguiente neurotoxicidad en ratones tratados con MPTP cuando existía vasoconstricción y el flujo sanguíneo era reducido (Moy et al., 1998).

H. Los estrógenos como inhibidores de DAT: una hipótesis

Los transportadores de DA (DAT's) se encargan de regular los niveles del neurotransmisor en la hendidura sináptica, pero también pueden transportar toxinas al interior de la neurona dopaminérgica. Se ha reportado que la 6-OHDA y el MPP⁺ se unen como sustratos al DAT. El tratamiento con estrógenos es similar al que se observa

con nomifensina, un bloqueador selectivo de DAT que reduce los efectos de la aplicación de las toxinas.

Los estrógenos parecen inhibir al DAT modificando su constante de afinidad al ligando, más que el número de DAT's funcionando (Dluzen, 2000).

RELACIÓN DE LOS ESTRÓGENOS CON LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer, y afecta aproximadamente al 1% de la población mayor de 50 años. Actualmente se ha incrementado la incidencia de esta enfermedad en todo el mundo, debido al aumento de edad en la población (Ebadi et al., 2001).

La incidencia de EP es 1.5 veces mayor en hombres que en mujeres, lo cual involucra la acción de hormonas sexuales (Beyer et al., 1991). En modelos animales de EP, el grado de muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por metanfetaminas, contaminantes ambientales (Angoa-Pérez et al., 2006), y toxinas como MPTP o 6-OHDA, se atenúa significativamente con la administración de estrógenos (Dluzen et al., 2000).

Por otra parte, en las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas, el exceso en la liberación de glutamato causa muerte neuronal mediada por receptores NMDA y el subsecuente influjo de calcio. Sin embargo, se ha reportado que el estradiol actúa como un antagonista del receptor NMDA bloqueando la entrada de calcio a través del canal.

Los estrógenos disminuyen la actividad de la MAO, disminuyendo así la dopamina que se oxida y la capacidad de la MAO para generar toxinas como producto del catabolismo de la dopamina.

Existen evidencias de que los defectos en el funcionamiento mitocondrial juegan un papel muy importante como mecanismos de neurodegeneración en trastornos del movimiento, como la enfermedad de Parkinson (Schulz y Beal, 1994). Estudios bioquímicos postmortem de cerebros de enfermos de Parkinson mostraron defectos en enzimas que participan en los procesos de fosforilación oxidativa. Los ganglios basales y la *substantia nigra* son particularmente susceptibles a la acumulación de delecciones en el DNA mitocondrial dependientes de la edad, las cuales contribuyen al inicio de los trastornos del movimiento (Schulz y Beal, 1994).

También se ha reportado un defecto en la fosforilación oxidativa de en términos de una reducción en la actividad de la NADH CoQ reductasa (complejo I) en el estriado

de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Ebadi et al., 2001). Esta reducción de la actividad del complejo I se encuentra en la *substantia nigra* pero no en otras áreas del cerebro como el globo pálido o la corteza. Por lo tanto, la especificidad de la alteración mitocondrial puede jugar un papel importante en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Este hecho está apoyado porque la administración de MPTP destruye las neuronas de la *substantia nigra*. Aunque los niveles de CoQ10 son normales en pacientes con enfermedad de Parkinson, la CoQ10 es capaz de atenuar la pérdida de neuronas estriatales dopaminérgicas inducida por MPTP (Ebadi et al., 2001).

Otros estudios postmortem de la función de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial en pacientes con Parkinson, mostraron que existe una disminución en la actividad de la NADH CoQ reductasa así como en la NADH citocromo c reductasa.

Esto indica que existe un defecto específico en la actividad del complejo I en la *substantia nigra* de pacientes con Parkinson (Schapira et al., 1990; Abu-Sleiman et al., 2006).

HIPÓTESIS.

Los estrógenos son capaces de contrarrestar el daño oxidativo y la muerte de células dopaminérgicas nigroestriatales causadas por la exposición crónica a bajas dosis de ozono.

OBJETIVOS GENERALES

- Determinar el tipo de alteraciones producidas en el sistema dopaminérgico nigroestriatal causadas por la exposición prolongada a bajas dosis de ozono durante distintos intervalos de tiempo.
- Evaluar el efecto antioxidante del 17 β -estradiol sobre la neurodegeneración progresiva causada por la exposición crónica de los animales a bajas dosis de ozono durante distintos períodos de tiempo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar el grado de estrés oxidativo mediante la cuantificación de los niveles de lípidos peroxidados y de la oxidación de proteínas, en *substantia nigra* y estriado de ratas expuestas a bajas dosis de ozono, durante diferentes periodos de tiempo.
- b) Estudiar las alteraciones morfológicas causadas por estrés oxidativo en el sistema nigroestriatal, mediante el empleo de técnicas de inmunohistoquímica.
- c) Estudiar el efecto de la administración de 17 β -estradiol sobre las alteraciones en la expresión de la TH causada por estrés oxidativo, tanto en *substantia nigra* como en estriado de ratas expuestas a ozono.
- d) Dilucidar el efecto de la administración de 17 β -estradiol, sobre los cambios en la expresión de COX-2 e iNOS, y GFAP causados por estrés oxidativo en *substantia nigra* y estriado.
- e) Estudiar el efecto del estrés oxidativo y de la administración de 17 β -estradiol sobre los cambios en la expresión de receptores a estrógenos alfa y beta a

medida que se establece el proceso de neurodegeneración progresiva en *substantia nigra* y estriado de ratas expuestas a ozono.

- f) Estudiar la relación que existe entre la expresión de receptores a estrógenos (ERs) con el grado de estrés oxidativo y los niveles de 17 β -estradiol.
- g) Cuantificar el grado de muerte celular mediante la expresión de citocromo c, BCL2, BAX, en células de la *substantia nigra* y estriado, así como evaluar si el tratamiento con estrógenos protege a las neuronas de la apoptosis.
- h) Evaluar los efectos de la administración de 17 β -estradiol sobre la alteración de la actividad motora, y las memorias de corto y largo plazo en ratas expuestas a ozono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se ovariectomizaron 90 ratas hembra de la cepa Wistar (250-300 g) y se dejaron transcurrir 15 días hasta su completa recuperación. Se realizaron frotis vaginales para confirmar la ovariectomía. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico con acceso libre de alimento y agua, y fueron divididas aleatoriamente en nueve grupos experimentales:

Grupo	N	Tratamiento
1	10	Control, expuesto a aire circulante (0 ppm de ozono)
2	10	Expuestas a ozono durante 7 días
3	10	Expuestas a ozono + 17 β -estradiol durante 7 días
4	10	Expuestas a ozono durante 15 días
5	10	Expuestas a ozono + 17 β -estradiol durante 15 días
6	10	Expuestas a ozono durante 30 días
7	10	Expuestas a ozono + 17 β -estradiol durante 30 días
8	10	Expuestas a ozono durante 60 días
9	10	Expuestas a ozono + 17 β -estradiol durante 60 días

La administración del 17 β -estradiol fue realizada inmediatamente después de cada exposición a ozono durante los distintos períodos de tratamiento.

La exposición a ozono se realizó a una dosis de 0.25 ppm durante 4 horas diarias durante los periodos establecidos. La dosis de 17 β -estradiol (25 μ g/Kg i.m., utilizando propilenglicol como vehículo) fue elegida mediante una curva dosis-respuesta tomando en cuenta la dosis que presentó la menor peroxidación de lípidos después de exponer los animales a ozono.

Cada subgrupo (n=10) fue estudiado midiendo los siguientes parámetros:

1) A nivel conductual:

- Actividad motora
- Memoria de corto y de largo plazo

2) A nivel bioquímico:

- Cuantificación de lípidos peroxidados
- Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol

3) A nivel celular:

- Pruebas inmunohistoquímicas (3-NT, TH, ER α , ER β , COX-2, iNOS, GFAP, citocromo c, BCL-2 y BAX).

5) A nivel molecular:

- Western Blot para TH, BCL2, BAX

Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas de la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, 1996).

Exposición a ozono

Los animales se mantuvieron en una cámara cerrada con un difusor conectado a un generador de ozono de flujo variable. Se utilizó un monitor de ozono para medir la concentración de ozono dentro de la cámara durante todo el experimento.

Generador de ozono. El ozono se produjo haciendo pasar una corriente de aire proveniente de un compresor (medida y regulada por un manómetro y un flujómetro), por la parte externa de un tubo de alto voltaje al vacío que contenía dos electrodos en su interior. El tubo está conectado en sus extremos a una corriente eléctrica controlada por un transformador con salida de voltaje variable. De esta manera se puede regular la relación aire-ozono en la cámara de exposición. Algunas moléculas del aire, al pasar por el tubo de vidrio y dependiendo de la intensidad de la corriente, se transforman en ozono. Existe una relación directa, entre el voltaje y las partes por millón de ozono generadas. Durante el tiempo de monitoreo es posible mantener los valores de concentración de ozono dentro de los límites adecuados.

Monitor de ozono. El monitor marca PCI ozone and Control Systems, Inc. Modelo LC 400, funciona comparando una muestra del gas con un gas de referencia, que es igual al gas de la muestra pero sin ozono (referencia cero). Los dos gases pasan alternadamente a través de una cámara de muestreo, equipada en un extremo con una lámpara de vapor de mercurio con un cátodo frío, cuya línea máxima es de 254 nm. La lámpara pasa luz ultravioleta a través del gas en la cámara de muestreo a un diodo vacío de telurio de cesio. Cuando hay ozono en la muestra del gas, la cantidad de luz que pasa a través de la cámara de muestreo está atenuada exponencialmente según la ley de Beer-Lambert.

$$(xlc)I=Ioe$$

Donde:

I= intensidad de la luz en la muestra con ozono

I₀= intensidad de la luz a una concentración de cero de ozono

x= coeficiente de absorción específico

l= largo de la cámara de muestra

c= concentración de ozono en la muestra

En cada ciclo de muestra de ozono, la intensidad de la luz que pasa a través de la cámara de muestreo se mide y se determinan las intensidades. Esta información se procesa en la microcomputadora y muestra la concentración de ozono en lecturas digitales. El error es menor a 1%. Existen dos flujómetros independientes, uno para la muestra de gas y otro para la referencia.

Exposición a aire

La misma cámara de exposición a ozono se utilizó para el tratamiento del grupo control, usando un flujo de aire libre de ozono.

Actividad motora

Una vez finalizada la exposición a ozono, los animales se devolvieron a sus cajas de alojamiento. Dos horas después, se midió la actividad motora de cada animal en cada uno de los grupos. Cada caja se situó en una placa sensible a la locomoción, mientras el animal permanecía dentro de dicha caja. La actividad motora se midió utilizando un monitor electrónico de actividad (EAM; Stoelting Co., Word Dale, IL, USA), el cual contiene un mecanismo sensor electrónico. Diez minutos después de haber situado la caja sobre la placa (de esta manera, se permitía al animal adaptarse a la nueva ubicación de la caja), se midió la actividad motora durante 10 minutos. Esta cuantificación se llevó a cabo en los diez animales de cada grupo.

Memoria de corto y largo plazo

Dos horas después de la penúltima exposición a ozono, los animales se entrenaron en un paradigma de evitación pasiva para medir la memoria de corto y largo plazo.

El entrenamiento se realizó en una cámara de condicionamiento con un compartimiento de seguridad y otro de castigo (cada uno con unas dimensiones de 30 cm de largo, 30 cm de ancho y 30 cm de alto), separados por una puerta corrediza tipo guillotina. El piso del compartimiento de seguridad consistió en una reja de barras de aluminio de 0.5 cm de diámetro separadas por una distancia de 1.5 cm. Las paredes laterales y el piso del compartimiento de castigo fueron hechas de placas de acero inoxidable. El piso estaba conectado a la salida de un generador de pulso (Modelo S48, Grass) mediante una unidad de corriente constante (Modelo CCU1, Grass). El

generador de pulso estuvo programado para transmitir un tren de 5 segundos de pulsos rectangulares repetitivos de con una duración de 5 ms por pulso, a una frecuencia de 50 Hz y una intensidad de 3 mA. Las latencias se midieron manualmente con ayuda de un cronómetro.

Cada animal se colocó inicialmente en el compartimiento de seguridad. Diez segundos después, la compuerta corrediza se levantó y se midió el tiempo que el animal tomó para cruzar al compartimiento de castigo (latencia de adquisición). Si el animal no cruzaba al otro compartimiento en un periodo de 100 segundos, se dejaba fuera del experimento. Una vez que el animal colocaba sus 4 patas dentro del compartimiento de castigo, la puerta corrediza se cerraba y se aplicó un pulso de corriente. Posteriormente se abrió la puerta y se midió el tiempo que el animal tomó en cruzar nuevamente al compartimiento de seguridad (latencia de escape). El animal permanecía 30 segundos en ese compartimiento antes de ser devuelto a su caja de alojamiento. Para medir la memoria de corto plazo, 10 minutos después del entrenamiento, el animal se colocó nuevamente en el compartimiento de seguridad durante 10 segundos. La puerta corrediza se abrió y se midió el tiempo en que el animal cruzaba al compartimiento de castigo. La sesión terminaba una vez que el animal cruzaba al compartimiento de castigo o permanecía en el de seguridad durante un periodo de 600 segundos como máximo (criterio de retención).

La memoria de largo plazo se realizó de la misma manera descrita anteriormente pero se midió la retención 24 horas después. Después de haber finalizado el último registro conductual, se procedió a sacrificar a los animales para llevar a cabo los análisis correspondientes a las pruebas bioquímicas, moleculares e inmunohistoquímicas.

Peroxidación de lípidos

Se seleccionaron aleatoriamente 6 animales de cada grupo para sacrificarse por decapitación. Las áreas correspondientes a la *substantia nigra* y al estriado se extrajeron en una placa de hielo y se pesaron inmediatamente. Cada muestra de tejido se homogenizó en PBS 1:10 y se almacenó a -70°C hasta el día de la cuantificación de lípidos peroxidados. Los homogenados de cada muestra se centrifugaron para desechar el sobrenadante. La peroxidación de lípidos se midió usando un kit LPO K-Assay (Kamiya Biomedical Co.), que emplea oxidasa ascórbica, lipasa de lipoproteína, cromógeno, amortiguador y hemoglobina. En presencia de hemoglobina, los

hidroperóxidos de lípidos se reducen a derivados hidroxilo, y el cromógeno 10-N-metilcarbamoil-3,7-dimetilamino-10-H-fenotiazin (MCDP) se oxida y se fragmenta para formar azul de metileno en una reacción molar equivalente. Los niveles de lípidos peroxidados se cuantificaron por colorimetría, midiendo el azul de metileno a una longitud de onda de 675 nm. Se elaboró una curva de calibración de dos puntos usando un blanco salino (0 nmol/ml) y un estándar de hidropeptidasa de cumeno (50 nmol/ml) contenido en el kit.

Los resultados del ensayo de lipoperoxidación se calcularon utilizando la siguiente ecuación, cuyo rango lineal para este ensayo está entre 2.0 y 300 nmol/ml:

$$\text{LPO} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \right] = \left[\frac{(E_s - E_b) \times 50.0}{E_{\text{std}} - E_b} \right]$$

Donde E_s es la absorbancia de la muestra; E_b es la absorbancia del blanco; y E_{std} es la absorbancia de 50 nmol/ml del estándar.

Pruebas histológicas e inmunohistoquímicas.

Cuatro animales de cada grupo se perfundieron por vía aórtica para luego extraer sus cerebros y fijarlos (formalina 4%) durante 24 horas. Después de este procedimiento, los cerebros se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones sagitales de 5 micras de grosor y se montaron en un portaobjeto previamente tratado con poli-L-lisina. Posteriormente se procesaron con las técnicas histológica de Luxol fast blue, e inmunohistoquímica.

Luxol Fast Blue

La técnica de Luxol Fast Blue se usa para secciones de cerebro embebidas en parafina, y las lipoproteínas ahí contenidas son las responsables de la tinción. El mecanismo es el de una reacción ácido-base con formación de sales, porque la base de la lipoproteína reemplaza la base del tinte. El resultado final es que las fibras de mielina se tiñen de un tono de azul a azul verdoso, mientras que los cuerpos celulares se tiñen de rosa a violeta.

Esta técnica se utilizó para distinguir neuronas, pues las células gliales no se tiñen de azul con este marcaje.

Inmunohistoquímica.

Después de desparafinar los cortes sagitales de cada cerebro, se procedió a deshidratar los tejidos en alcoholes graduales empezando por el de 70% durante 5 minutos cada uno. Posteriormente, se lavaron con agua bidestilada y se aplicó el recuperador de antígenos (Reveal Biocare Med, 10x) en una olla de presión (decloacking chamber, Biocare Medical) durante 20 minutos. Se dejaron enfriar los cortes y después se lavaron con agua destilada. Una vez finalizado este procedimiento se aplicó el bloqueador de peroxidasas (Scytek) durante 10 minutos. Se aplicaron los anticuerpos primarios (enlistados al final de este apartado), y se dejaron incubando a una temperatura de 4°C durante toda la noche. A continuación se lavaron tres veces los cortes en intervalos de 5 minutos para posteriormente aplicar el anticuerpo biotinilado (biotinylated anticuerpo, Scytek) dejando incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS (Buffer de fosfatos) similares al paso anterior, se aplicó el anticuerpo HRP (Scytek) durante 30 minutos también a temperatura ambiente y se volvieron a enjuagar los cortes. Finalmente, se aplicó el cromógeno DAB (Biocare Medical) durante 5 minutos, se enjuagó y se contratiñeron los cortes con hematoxilina.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- TH (anticuerpo policlonal de conejo, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- iNOS (anticuerpo policlonal de conejo, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- 3-NT (anticuerpo policlonal de conejo, 1:100, Upstate, USA)
- ER α (anticuerpo policlonal de conejo, 1:300, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- ER β (anticuerpo policlonal de conejo, 1:200, Biocare).
- Citocromo c (anticuerpo policlonal de conejo, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- COX-2 (anticuerpo policlonal de conejo, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- BCL-2 (anticuerpo policlonal de conejo, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- BAX (anticuerpo policlonal de conejo , 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) .

Inmunoensayo para 17 β -estradiol

Este inmunoensayo fue realizado por duplicado utilizando un kit E2 EASIA (KAQ0621, Biosource Internacional Inc, CA, USA). Una vez finalizados los tratamientos, 6 animales de cada grupo se sacrificaron por decapitación y se tomó 1 ml de sangre de cada uno. Inmediatamente después las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 3000 g para separar el plasma y almacenarlo a -70°C hasta realizar el ensayo.

Se colocaron 50 µl de estándar o muestra en una microplaca de ensayo. Se adicionaron 50 µl del conjugado estradiol-HRP y posteriormente otros 50 µl de anti-estradiol. El principio de este inmunoensayo consiste en que una cantidad fija de estradiol marcado con peroxidasa de rábano (HRP) compite por un número limitado de sitios de unión a un anticuerpo específico, con el estradiol no marcado de los estándares o de las muestras. El complejo estradiol-HRP- anticuerpo se fija simultáneamente a las paredes de la placa de ensayo revestida con un exceso de gammaglobulinas anti-conejo.

Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente sobre un agitador horizontal (700 ± 100 rpm), la placa se lavó por aspiración del contenido de cada pozo, para detener la reacción de competencia.

Se agregaron 200 µl de la solución sustrato (tetrametilbenzidina (TMB)- H₂O₂) para luego incubarse en agitación por 30 minutos protegiendo de la luz directa. La reacción se detuvo agregando 50 µl de H₂SO₄ y se midió la absorbencia a una longitud de onda de 450 nm. La cantidad de sustrato unido es inversamente proporcional a la concentración de estradiol en la muestra. Se graficó una curva estándar y la concentración de estradiol (dada en pg/ml) en las muestras fue determinada por interpolación con la curva estándar, utilizando la siguiente ecuación:

$$B/B_0 \times 100 = \frac{DO \text{ (estándar o muestra)}}{DO \text{ (estándar cero)}} \times 100$$

Donde DO es la densidad óptica, B/B₀ x 100 es un valor estándar proporcionado previamente por el kit de acuerdo con las concentraciones de estradiol en pg/ml.

Western blot.

Se homogenizó toda la sustancia nigra en buffer de extracción [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet p-40, e inhibidores de proteasas (CALBIOCHEM, cat No 539131)]. Posteriormente los homogenizados se sonicaron brevemente y se centrifugaron a 7000 g durante 10 minutos a 4°C. La concentración de proteínas de cada muestra fue determinada usando electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de PVDF

Immobilon-P, Millipore cat No IPVH15150) durante 2 horas a 4°C. Las membranas fueron incubadas con amortiguador (1L DPBS, 1 ml Tween 20, 2 g leche en polvo) en amortiguador bloqueador durante toda la noche. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo correspondiente (véase la lista más abajo), toda la noche. Posteriormente se lavaron las membranas con tres cambios de buffer (1L DPBS, 1 ml Tween 20) e incubadas con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas de las proteínas específicas se detectaron con un kit (Pierce biotechnology, Inc, IL, USA).

Los anticuerpos utilizados para la cuantificación por western blot fueron los siguientes:

- TH (anticuerpo policlonal de conejo, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- ERs (anticuerpo policlonal de conejo, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- COX-2 (anticuerpo policlonal de conejo, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- BCL-2 (anticuerpo policlonal de conejo, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- BAX (anticuerpo policlonal de conejo, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- Citocromo c (anticuerpo policlonal de conejo, 1:5000, Cell Signaling, Boston, MA, USA).

Cuantificación de células inmunoreactivas

Una vez realizada la inmunohistoquímica correspondiente, se tomaron microfotografías de *substantia nigra* parte compacta con una cámara (Evolution VF Color, Media Cybernetics), conectada a un microscopio (Olympus BX41, Inc.) utilizando el objetivo de 40X. Cada campo equivale a 30,000 μm^2 . Se analizaron 12 campos de 4 animales por cada tratamiento contando tanto el número de células totales como el de células positivas a cada anticuerpo. Los índices de inmunoreactividad fueron calculados con el cociente del número de células inmunoreactivas a cada anticuerpo sobre el de células totales, pues era necesario descartar que los cambios en inmunoreactividad se debieran a una pérdida de células más que a una falta de marcaje.

El grado de inmunoreactividad a 3-NT se cuantificó en número de píxeles de tonos café (correspondientes al cromógeno utilizado), mediante el programa *Adobe Photoshop versión CS2*. Esta medida se utilizó debido al tipo de tinción extracelular generado de la inmunohistoquímica, el cual dificultaba el conteo de células por tratamiento.

Análisis Estadísticos

Una vez obtenidos los resultados de cada experimento se sometieron a las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para determinar el tipo de análisis estadístico más conveniente.

Cuando los datos presentaron una distribución normal y una variación homogénea, se procedió a aplicar un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar todos los grupos. La prueba de Scheffe fue realizada para localizar las diferencias entre grupos. El nivel de significancia considerado fue de $p < 0.05$ en ambas pruebas.

Cuando los datos no presentaron una distribución normal, ni una homogeneidad de varianza, se procedió a aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (un equivalente no paramétrico del ANOVA), para encontrar diferencias entre tratamientos y posteriormente una prueba U de Mann Whitney para determinar entre qué grupos existieron las diferencias. La prueba de Kruskal Wallis fue utilizada dado que nuestros experimentos utilizamos un diseño no balanceado.

En los casos donde se aplicaron pruebas de tipo paramétricas, las gráficas muestran las medias, mientras que los datos analizados con pruebas no paramétricas se graficaron con medianas.

RESULTADOS

I. Marcadores de estrés oxidativo

I-1. *Substantia nigra*

I-1.1. Peroxidación de lípidos

La exposición a ozono indujo un aumento gradual de lípidos peroxidados en la *substantia nigra*, el cual fue máximo a los 60 días de exposición. El análisis de varianza (ANOVA, $F=0.03$) reveló diferencias significativas. Cuando los grupos fueron comparados usando la prueba de comparaciones múltiples de Scheffe, se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos (7 días, $p=0.04$; 15 días, $p=0.03$; 30 días, $p=0.003$; 60 días, $p=0.001$), comparados con el control. Sin embargo, la administración de 17β -estradiol fue capaz de contrarrestar este incremento en la peroxidación de lípidos producida por el ozono en el grupo tratado durante 60 días, donde el nivel máximo de peroxidación de lípidos encontrado en los grupos expuestos a ozono disminuyó significativamente por la administración de estrógenos ($p=0.001$) (figura 1).

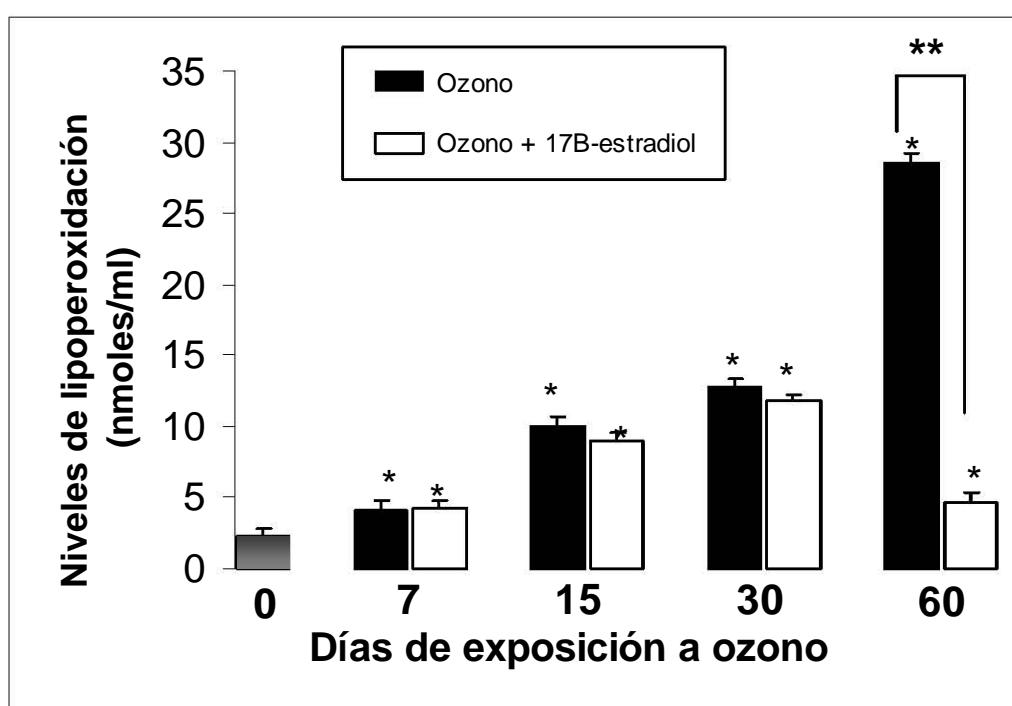


Figura 1. Efecto de la administración de 17β -estradiol sobre los niveles de peroxidación de lípidos en *substantia nigra* después de la exposición a ozono. (* $p<0.05$ vs. control; ** $p<0.05$ ozono vs. 17β -estradiol) Medias \pm DE.

I-1.2.- Nitración de proteínas

Los resultados muestran que existe un incremento significativo en la cantidad de las proteínas nitradas en relación al tiempo de exposición a ozono (ANOVA, $F=0.02$). El análisis por medio de una prueba de comparaciones múltiples de Scheffe, indicó que este incremento es significativo en los grupos expuestos a ozono comparado con los controles ($p<0.05$). Este aumento se hizo evidente desde los 7 días ($p=0.04$), y avanzó progresivamente (15 días, $p<0.003$, 30 días, $p=0.05$) hasta alcanzar un máximo a los 60 días de exposición a ozono ($p=0.01$). De igual manera, los grupos tratados con 17β -estradiol presentaron este aumento gradual en la inmunoreactividad a 3-NT a los 7 ($p=0.03$), 15 ($p=0.03$) y 30 ($p=0.004$) días con respecto al control. Sin embargo, la administración de la hormona causó una disminución significativa en la oxidación de proteínas a los 60 días ($p=0.002$), comparada con el grupo expuesto a ozono durante el mismo tiempo (ver figura 2). Días de exposición a ozono

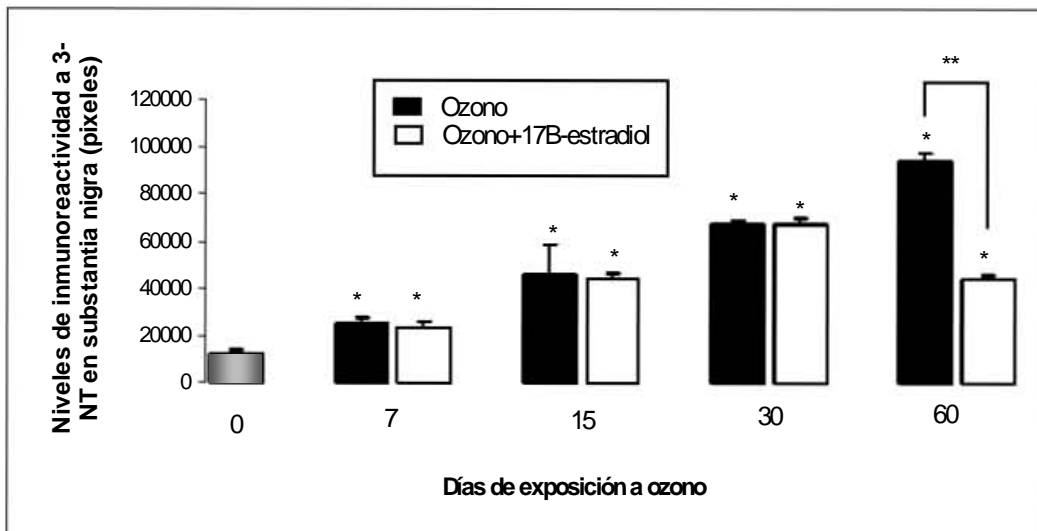


Figura 2. Efectos de la administración de 17β -estradiol sobre los niveles de expresión de 3-NT en *substantia nigra* de ratas expuestas a ozono. (* $p<0.05$ vs. control; ** $p<0.05$ ozono vs. 17β -estradiol) Medias \pm DE.

El análisis de la inmunohistoquímica de 3-NT en *substantia nigra* medida en píxeles, en todos los tratamientos se muestra en la figura 3. Como puede observarse, los niveles de inmunoreactividad se incrementaron progresivamente conforme avanzaba la exposición a ozono. A los 7 días de ozono, el incremento en la inmunoreactividad fue notorio y se presentó principalmente en el citoplasma de las células y también en el neuropilo. Estos cambios se presentaron a los 15 y 30 días de ozono, y estuvieron acompañados de una concentración de la inmunoreactividad a nivel extracelular hasta los 60 días, donde el marcaje fue casi exclusivo de este tipo.

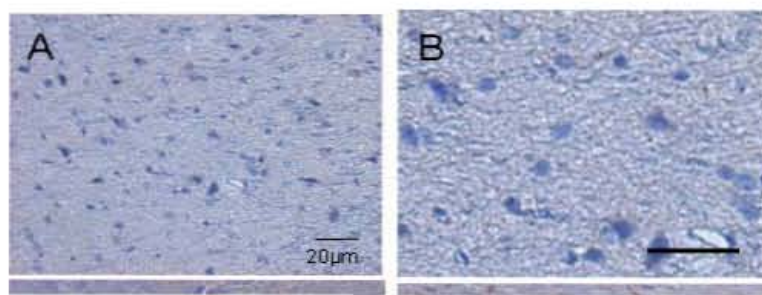


Figura 3. Efecto de la administración de 17β -estradiol sobre la expresión de 3-NT (en pixeles) en los grupos expuestos a ozono en *substantia nigra*. A. Control, 40x. B. Control (100x). Aumentos de 40x (C-J). C. Ozono 7 días. D. Ozono+ 17β -estradiol 7 días. E. Ozono 15 días. F. Ozono+ 17β -estradiol 15 días. G. Ozono 30 días. H. Ozono+ 17β -estradiol 30días. I. Ozono 60 días. J. Ozono+ 17β -estradiol 60 días.

En el tratamiento con 17β -estradiol a los 60 días disminuyó la inmunoreactividad a 3-NT comparada con el grupo expuesto a ozono (figura 3, pánels I y J).

I-1.3. Expresión de iNOS

Los resultados mostraron cambios significativos del número de células positivas a iNOS en los diferentes grupos (ANOVA, $F=0.02$). El análisis con la prueba de Scheffe reveló un aumento en las células positivas a iNOS en los grupos tratados con ozono desde los 7

($p=0.04$), 15 ($p=0.03$), 30 ($p=0.004$) hasta los 60 días ($p=0.02$), comparados con el control. El grupo tratado con 17β -Estradiol durante 60 días presentó una disminución del número de células positivas a iNOS, comparado con su análogo, expuesto a ozono durante el mismo tiempo (ver figura 4).

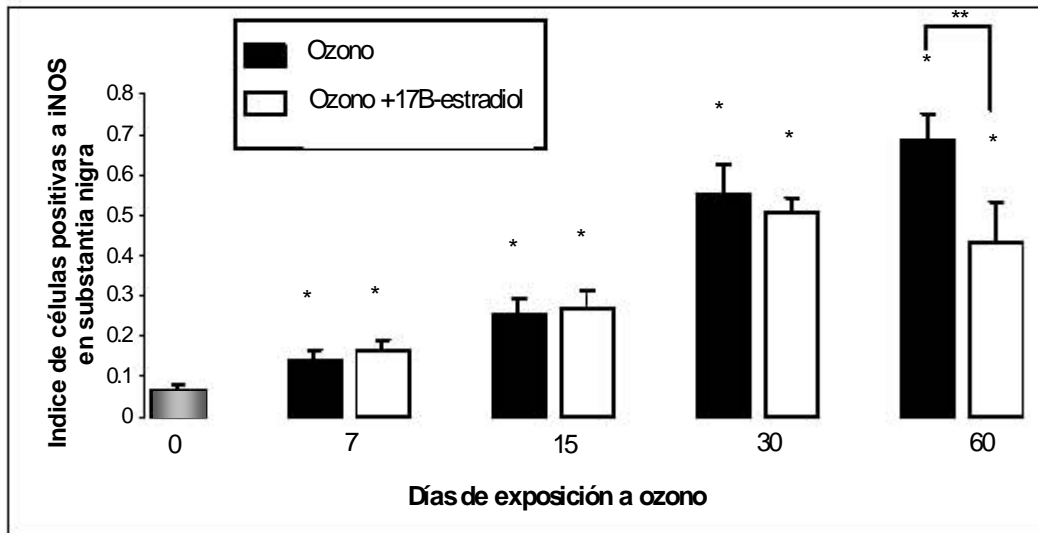


Figura 4. Efecto de la administración de 17β -estradiol sobre el número de células positivas a iNOS en *substantia nigra* de ratas expuestas a ozono. (* $p<0.05$ vs. control; ** $p<0.05$ ozono vs. 17β -estradiol) Medias \pm DE.

Además, las neuronas positivas a iNOS del grupo expuesto a ozono durante 60 días presentaron alteraciones de la morfología celular (edema), mientras que el tratamiento con hormona durante el mismo tiempo mostró que el tamaño de las células fue mucho más parecido a las del grupo control (figura 5).

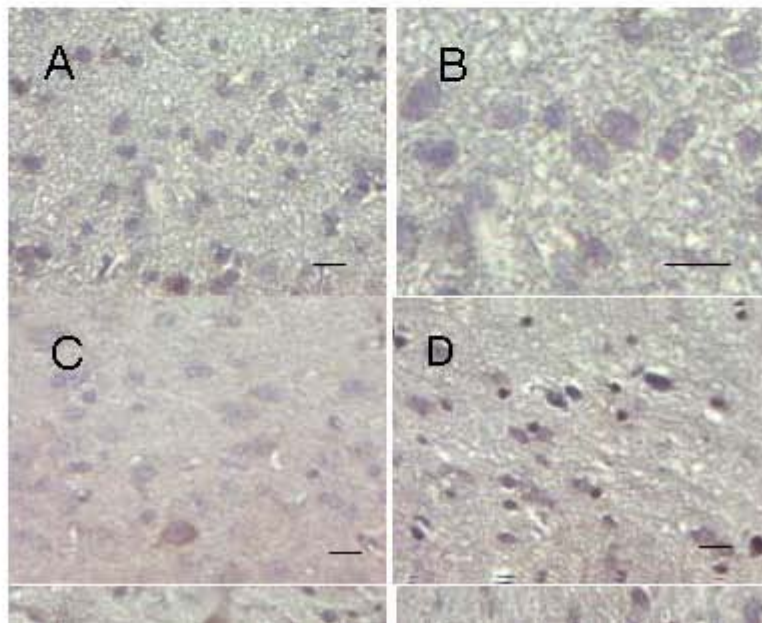


Figura 5. Micrografías de células inmunoreactivas a iNOS en *substantia nigra*. A. Control, B. Control 100x. Los cuadros (C-J) muestran un aumento de 40x. C. Ozono 7 días. D. Ozono+17 β -estradiol 7 días. E. Ozono 15 días. F. Ozono+17 β -estradiol 15 días. G. Ozono 30 días. H. Ozono+17 β -estradiol 30 días. I. Ozono 60 días. J. Ozono+17 β -estradiol 60 días. Las barras representan 20 μ m.

I-2.- Estriado

I-2.1. Peroxidación de lípidos

Los resultados obtenidos muestran que en estriado, los niveles de lípidos peroxidados presentaron diferencias entre los distintos grupos (ANOVA, $F=0.005$). La prueba de Scheffe reveló un aumento significativo en los niveles de lípidos peroxidados desde los 30 ($p<0.05$) hasta los 60 días ($p<0.004$) de exposición a ozono. Los grupos expuestos al gas durante los primeros 7 y 15 días no presentaron un aumento estadísticamente significativo con respecto al control (Figura 6).

El efecto del 17β-Estradiol contrarrestó el aumento en los niveles de los lípidos peroxidados por ozono, este efecto fue significativo desde los 30 (p<0.05) y se mantuvo a los 60 días (p<0.05) en comparación con el control.

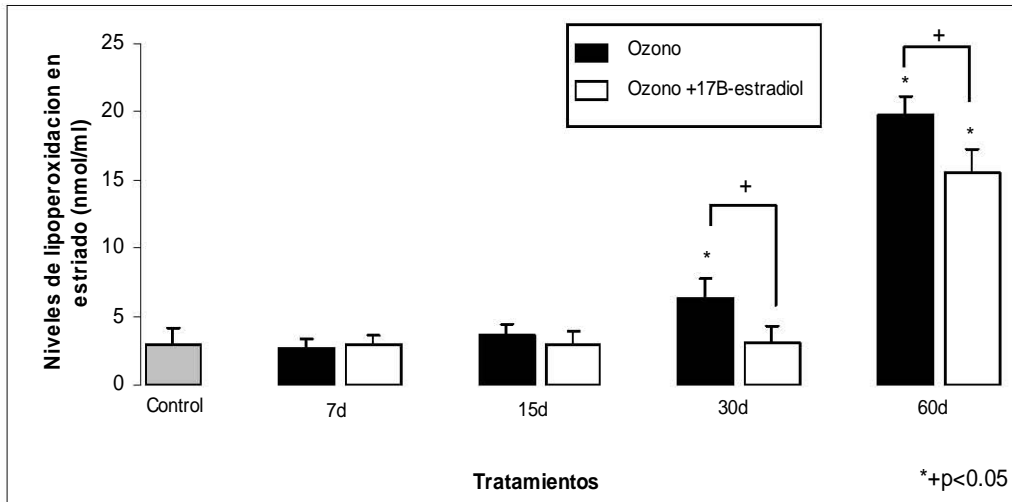


Figura 6. Efectos de la administración de 17β-estradiol en estradiol después de la exposición a ozono sobre los niveles de peroxidación de lípidos. (*p<0.5 vs. control; **p<0.05 ozono vs. 17β-estradiol) Medias ± DE.

I-2.2. Nitración de proteínas

El grado de inmunoreactividad a 3-NT en estradiol presentó un aumento en los grupos con ozono comparados con el control. Estas diferencias fueron significativas con la prueba de ANOVA (F=0.01) (figura 7). Este incremento fue gradual, con la prueba de Scheffe se encuentran diferencias estadísticas desde los 15 (p=0.004), 30 días (p=0.003), con un máximo a los 60 días, cuando se compararon con el control. La administración de 17β-Estradiol causó un efecto similar en el aumento de la inmunoreactividad a 3-NT a los 15 días (p<0.005). Sin embargo, a los 30 (p=0.04) y 60 días (p=0.02), el número de células disminuyó significativamente en los grupos tratados con 17β-Estradiol con respecto a sus análogos expuestos únicamente a ozono (figura 7).

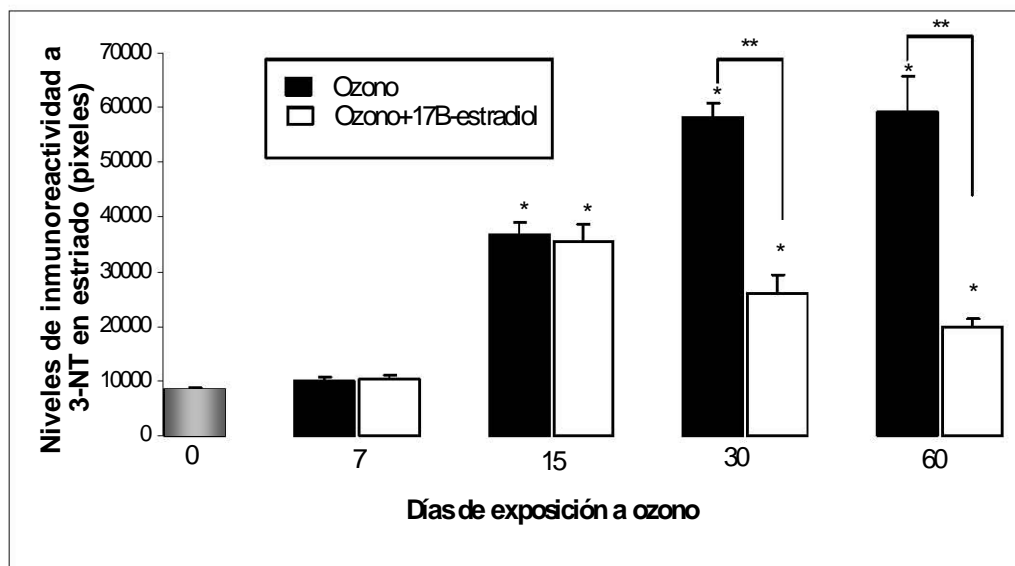


Figura 7. Efectos de la administración de 17β -estradiol en estriado después de la exposición a ozono sobre los niveles de inmunoreactividad a 3-NT en estriado. (* $p < 0.5$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol) Medias \pm DE.

Los resultados de la inmunohistoquímica de 3-NT en estriado medidos en pixeles, muestran que los tratamientos de 7 días, tanto de ozono solo (figura 8, C) como con hormona (D), no presentaron diferencias con respecto a los controles (A, B). Los niveles de inmunoreactividad se incrementaron en los grupos de ozono a partir de los 15 (E), 30 (G) hasta los 60 días (I), donde la inmunoreactividad no se concentra alrededor de las células, sino que se marca en forma de pequeños gránulos en sitios extracelulares.

Como se observa en la figura 8, el grupo tratado con 17β -estradiol durante 15 días, presentó un nivel de inmunoreactividad a 3-NT muy similar al de su análogo tratado únicamente con ozono. Sin embargo, los grupos a los que se les administró 17β -estradiol durante 30 (H) y 60 días (J), presentaron un grado menor de marcas positivas a 3-NT, comparados con sus respectivos grupos expuestos a ozono.

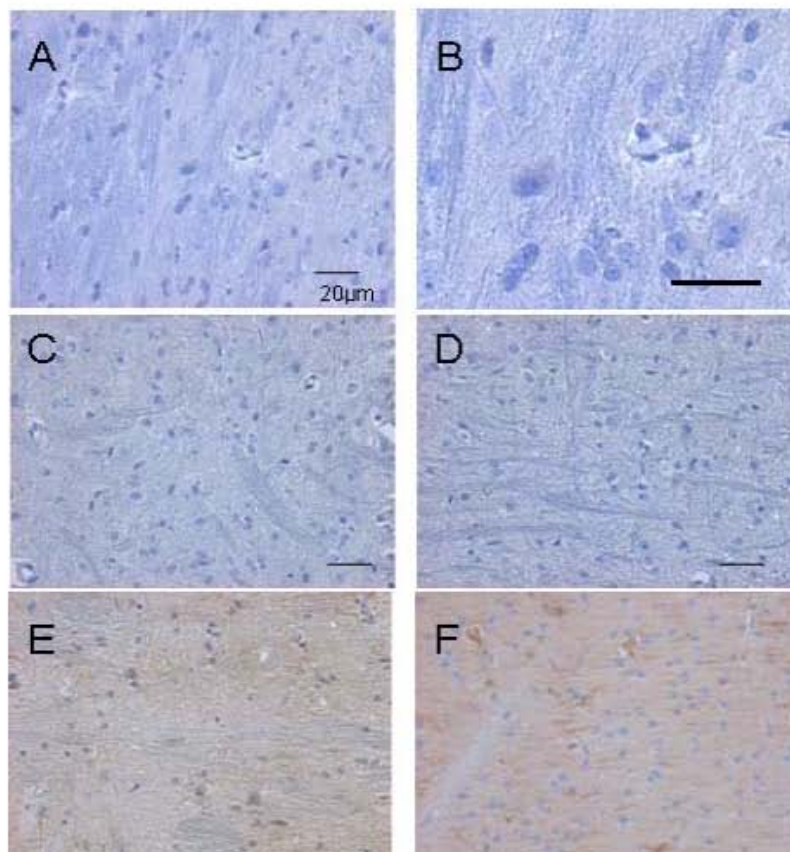


Figura 8. Efecto de la administración de 17β -estradiol en estriado sobre la expresión de 3-NT causada por exposición a ozono. A. Control, 40x, B. Control (100x). Magnificación de 40x (C-J). C. Ozono 7 días. D. Ozono+ 17β -estradiol 7días. E. Ozono 15 días. F. Ozono+ 17β -estradiol 15días. G. Ozono 30 días. H. Ozono+ 17β -estradiol 30días. I. Ozono 60 días. J. Ozono+ 17β -estradiol 60 días.

I-2.3. Expresión de iNOS

La expresión de iNOS en el estriado, presentó un aumento significativo (ANOVA, $F=0.03$). La cuantificación del número de células positivas a esta enzima fue significativa con la prueba de Scheffe en los tratamientos con ozono a los 30 ($p=0.002$) y 60 ($p=0.001$) días con respecto al control. El grupo tratado con 17β -estradiol durante 60 días fue el único que presentó una disminución de iNOS ($p=0.001$) cuando se compara con su análogo tratado solo con ozono (figura 9).

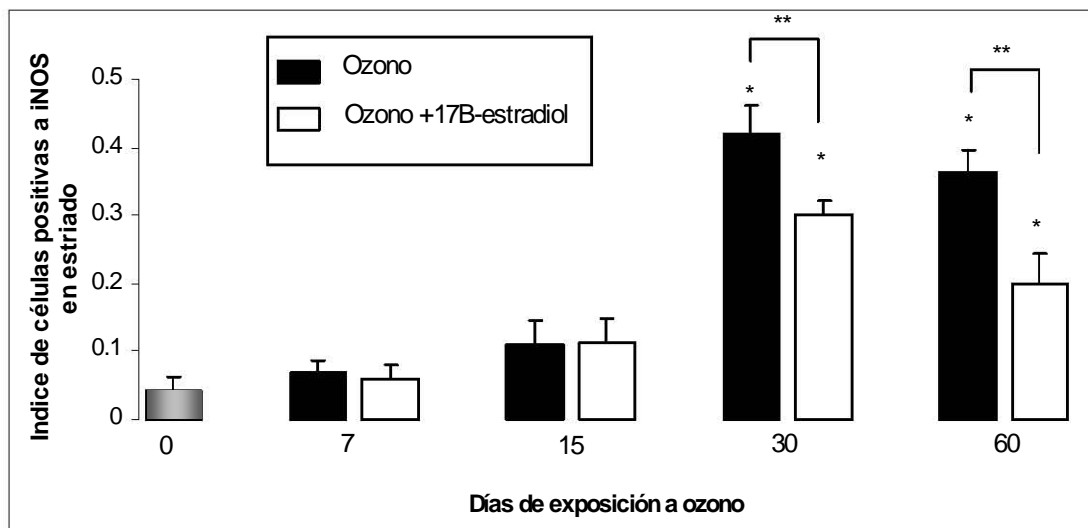


Figura 9. Efecto de la administración de 17β -estradiol sobre el número de células positivas a iNOS en estriado de ratas expuestas a ozono. (* $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol) Medias \pm DE.

La inmunohistoquímica contra iNOS muestra un incremento en la inmunoreactividad en las células de los tratamientos expuestos a ozono. Esta inmunoreactividad se encuentra distribuida uniformemente en el citoplasma de las células marcadas. En el tratamiento de 60 días de exposición a ozono las células se muestran más edematizadas. El tratamiento con 17β -estradiol durante 60 días disminuyó el grado de inmunoreactividad a iNOS.

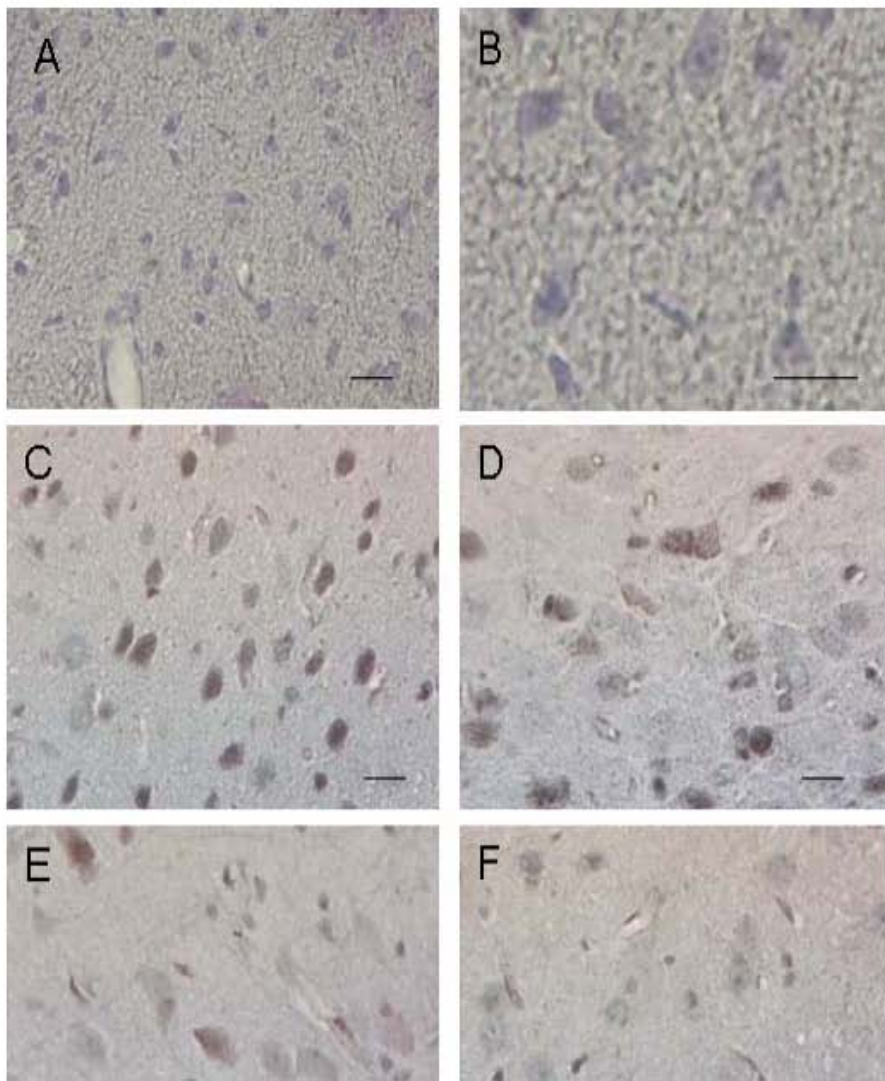


Figura 10. Efecto de la administración de 17β-estradiol en el incremento en la expresión de iNOS causada por exposición a ozono en estriado. A. Control (40x), B. Control (100x). Magnificación de 40x (C-F). C. Ozono 30 días. D. Ozono+17β-estradiol 30días. E. Ozono 60 días. F. Ozono+17β-estradiol 60días. Las barras representan 20um.

II. Cuantificación de neuronas dopaminérgicas y expresión de TH

La exposición a ozono produjo una pérdida progresiva de las células totales y de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (ANOVA, $F=0.005$). El aumento del estrés oxidativo producido por exposición a ozono (indicado por los altos niveles de lípidos peroxidados y proteínas oxidadas), presentó una relación con la pérdida de las células totales. Con la prueba de Scheffe se detectaron diferencias significativas con respecto al control desde los 15 días de exposición a ozono ($p=0.02$), y continua a los 30 ($p=0.003$) y 60 días ($p=0.003$).

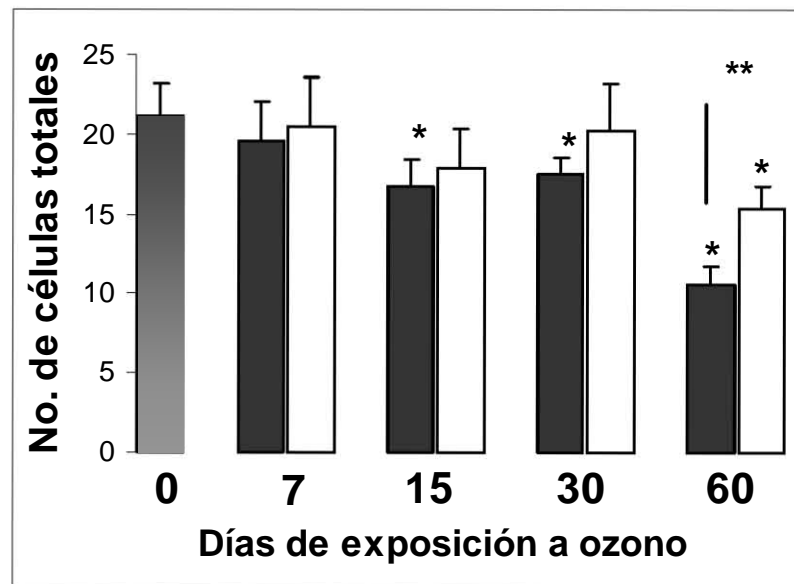


Figura 11. Efectos del ozono (Barras negras) y de la administración de 17β-estradiol después de la exposición a ozono (Barras blancas) sobre el número de células totales en *substantia nigra*. (* $p<0.05$ vs. control; ** $p<0.05$ ozono vs. 17β-estradiol). Medias \pm DE.



Figura 12. Efectos del ozono y de la administración de 17 β -estradiol después de la exposición a ozono sobre el número de células inmunoreactivas a TH en substantia nigra. (*p<0.05 vs. control; **p<0.05 ozono vs. 17 β -estradiol). Medias \pm DE.

El tratamiento con 17 β -estradiol logró contrarrestar esta disminución en las células totales a los 60 días de administración (p=0.003) (figura 11).

Las neuronas dopaminérgicas que expresaron tirosina hidroxilasa también presentaron una disminución progresiva en todos los grupos de ozono comparados con el control (7 días, p=0.005; 15 días, p=0.004; 30 días, p=0.005; 60 días, p=0.002) (figura 12).

Como puede observarse en la figura 9, la máxima disminución neuronal se presentó en el grupo expuesto a ozono durante 60 días, sin embargo, este efecto fue contrarrestado con el tratamiento crónico con 17 β -estradiol durante el mismo periodo de tiempo (p=0.001). Los demás grupos tratados con la hormona no presentaron diferencias significativas en el número de neuronas dopaminérgicas con respecto a sus grupos análogos expuestos únicamente a ozono.

Para determinar el efecto del 17 β -estradiol sobre los niveles de expresión de la TH, se realizó la técnica de Western blot (figura 13A), y los resultados se analizaron con un ANOVA (F=0.02). La prueba de Scheffe indicó una disminución significativa en la expresión de la enzima limitante en la síntesis de dopamina en los grupos expuestos a ozono, comparados con los niveles controles (7 días, p=0.01; 15 días, p=0.03; 30 días, p=0.002; 60 días, p=0.001) (figura 13B).

No se encontraron diferencias en los tratamientos con ozono con respecto a los tratados con 17 β -estradiol, con excepción de los 60 días (p=0.005) (figura 13B).

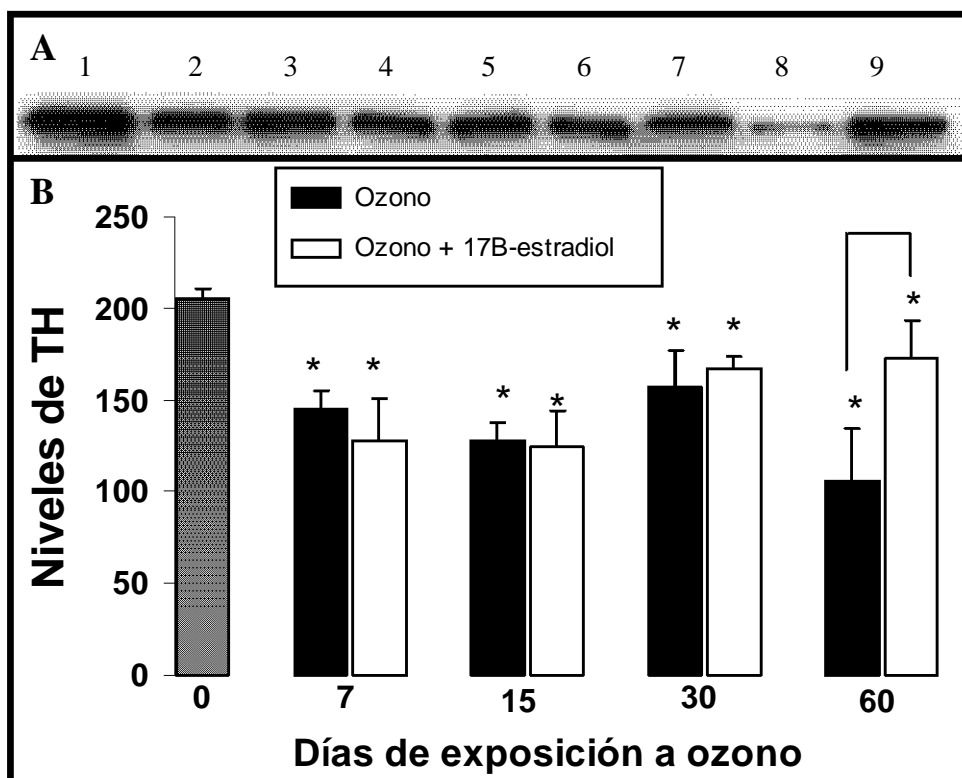


Figura 13. (A). Niveles de TH en *substantia nigra* de ratas expuestas a ozono. 1. Control, 2. Ozono 7 días, 3. Ozono+17β-estradiol 7 días, 4. Ozono 15 días, 5. Ozono+17β-estradiol 15 días, 6. Ozono 30 días, 7. Ozono+17β-estradiol 30 días, 8. Ozono 60 días, 9. O₃+17β-estradiol 60 días. (B). Efectos del 17β-estradiol sobre los niveles de TH. (*p<0.5 vs. control; **p<0.05 ozono vs. estradiol). Medias ± DE.

La exposición a ozono produjo una disminución en la expresión de TH, y también causó alteraciones morfológicas en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. En el grupo expuesto 30 días, el ozono ocasionó un edema celular acompañado de una pérdida de procesos neuronales. Aunque las células del grupo de 17β-estradiol tratado durante 30 días no presentaron esta edematización, también se encontró una disminución de los procesos (ver panel G y H, figura 14).

El tratamiento con 17β -Estradiol durante 60 días revirtió el daño causado por la exposición a ozono, como se observa en la figura 14 (J).

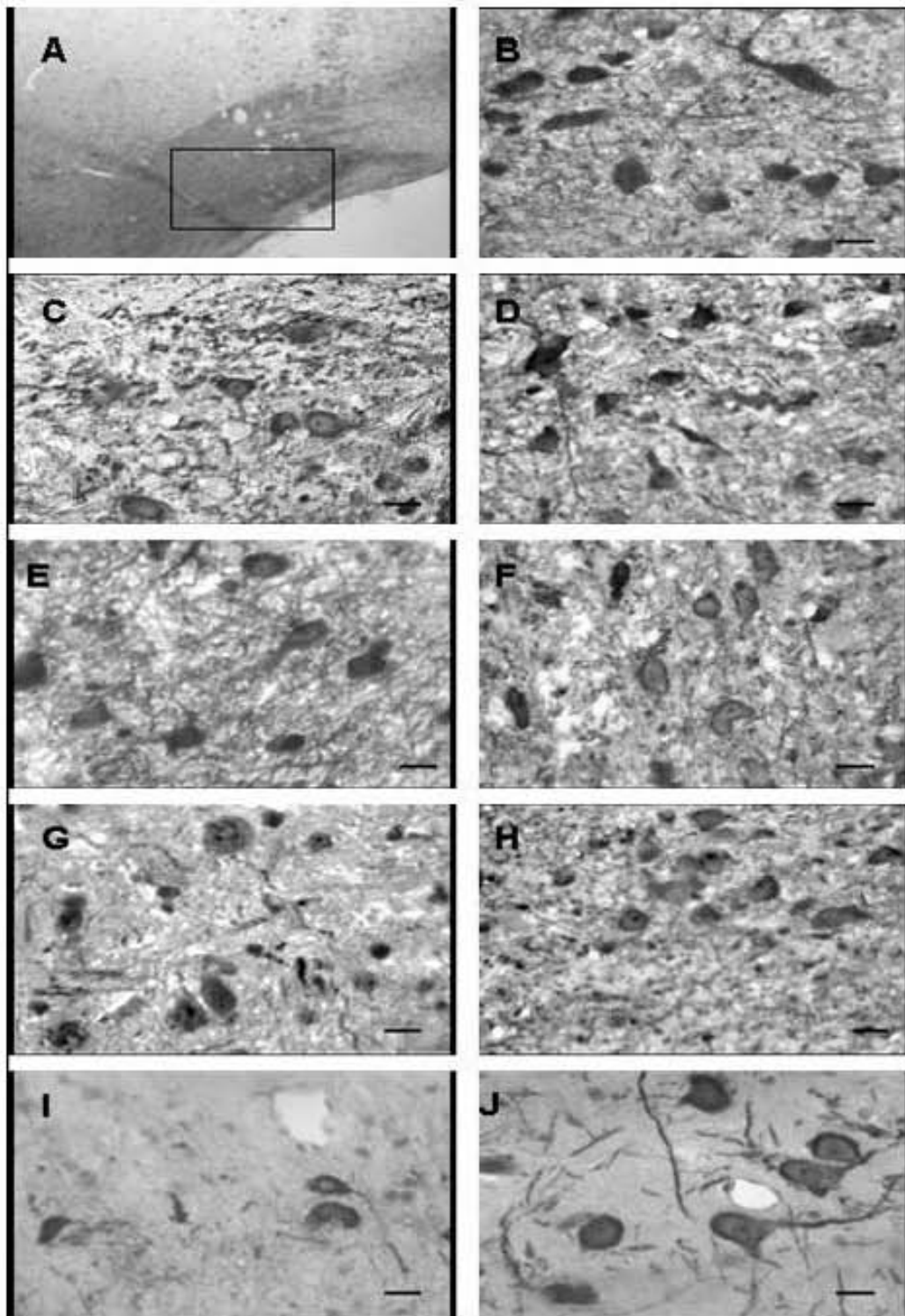


Figura 14. Micrografías de células inmunoreactivas a TH en substantia nigra. A. Control, 4x, El rectángulo indica el área mostrada a 40x B. Control 40x. Magnificación de 40x (B-J). C. Ozono 7 días. D. Ozono+ 17β -estradiol 7 días. E. Ozono 15 días. F. Ozono+ 17β -estradiol 15 días. G. Ozono 30 días. H. Ozono+ 17β -estradiol 30 días. I. Ozono 60 días. J. Ozono+ 17β -estradiol 60 días. Las barras representan 50 μ m.

III.- Receptores a estrógenos alfa (ER α) y beta (ER β)

III-1. Substantia nigra

El número de células positivas a ER α presentó cambios en los diferentes tratamientos comparados con el control (ANOVA, F=0.004) (figura 15). Con la prueba de Scheffe, podemos notar un incremento significativo en el número de células positivas a ER α desde los 30 (p=0.002) a los 60 días de ozono (p=0.003). El tratamiento con estradiol presentó un aumento significativo comparado con los grupos de ozono a los 30 (p=0.004) y a los 60 días (p=0.005) (figura 15).

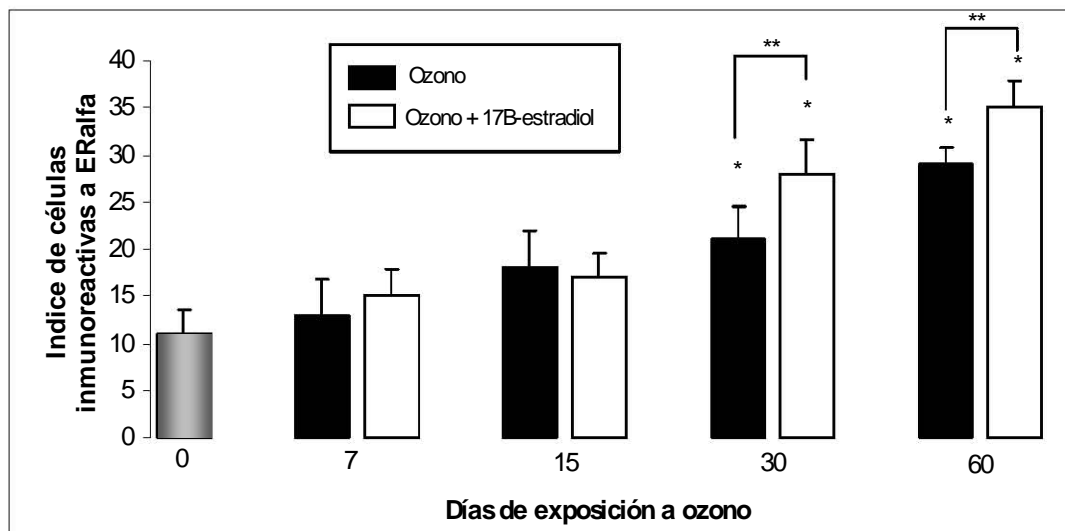


Figura 15. Efecto del 17 β -estradiol sobre la expresión de ER α en ratas expuestas a ozono (O $_3$) en *substantia nigra*. (*p<0.05 vs. control; **p<0.05 ozono vs. 17 β -estradiol). Medias \pm DE.

Las células positivas a ER β presentaron diferencias significativas entre grupos (ANOVA, F=0.03). Con la prueba de Scheffe, los grupos de 15 (p<0.005) y 30 (p=0.002) días de ozono fueron significativamente menores comparados con el control, pero los 60 días no difieren del control (figura 16).

El tratamiento con estradiol presentó diferencias significativas en el número de células marcadas con ER β en los tratamientos de 30 (p=0.004) y 60 días (p=0.005).

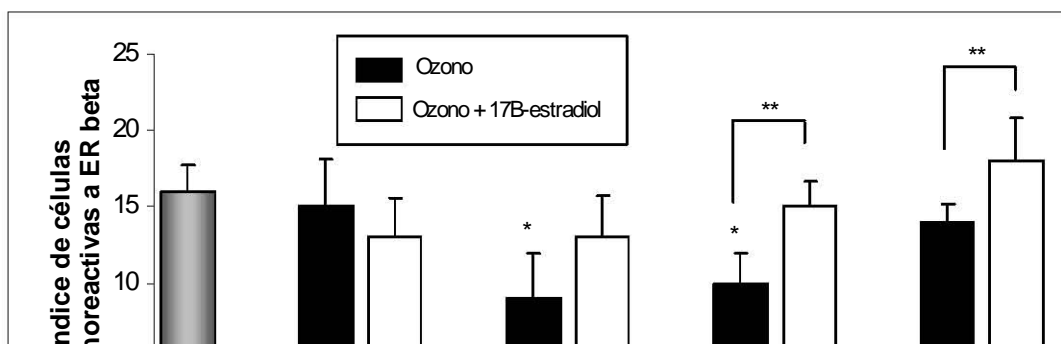


Figura 16. Efecto del 17β -estradiol sobre la expresión de $ER\beta$ en ratas expuestas a ozono (O_3) en *substantia nigra*. (* $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol). Medias \pm DE.

III-2. Estriado

En estriado, el índice de células positivas a los receptores a estrógenos $ER\alpha$ cuantificadas por inmunohistoquímica presentaron diferencias significativas entre grupos (ANOVA, $F=0.01$). Con la prueba de Scheffe se detectó un aumento significativo de $ER\alpha$ a los 30 días de ozono ($p < 0.005$) comparado con el control. Los grupos tratados con 17β -estradiol presentaron diferencias significativas a los 30 ($p < 0.005$) y 60 días ($p < 0.05$), comparados igualmente con el control (figura 17).

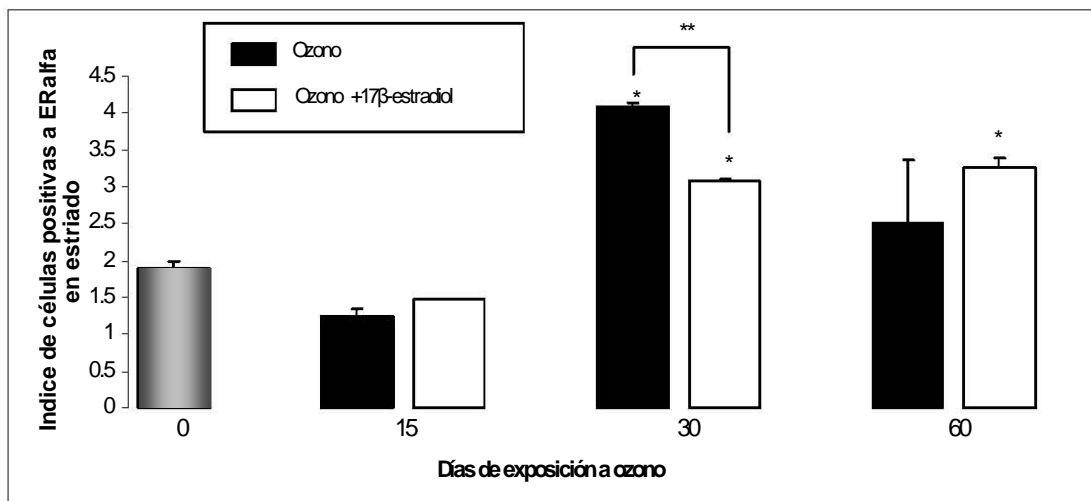


Figura 17. Niveles de $ER\alpha$ cuantificados por inmunohistoquímica en estriado de ratas con 17β -estradiol después de cada exposición a ozono. (* $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol).

El índice de células inmunoreactivas a $ER\beta$ mostraron diferencias significativas entre grupos (ANOVA, $F=0.002$). Con la prueba de Scheffe se detectó un aumento a los 30 ($p=0.002$) y 60 días de ozono ($p=0.003$) con respecto al control, y un máximo de expresión a los 60 días del tratamiento con 17β -estradiol (figura 18).

Cuando comparamos el grupo de ozono de 60 días con su análogo tratado con hormona, encontramos diferencias significativas ($p=0.001$).

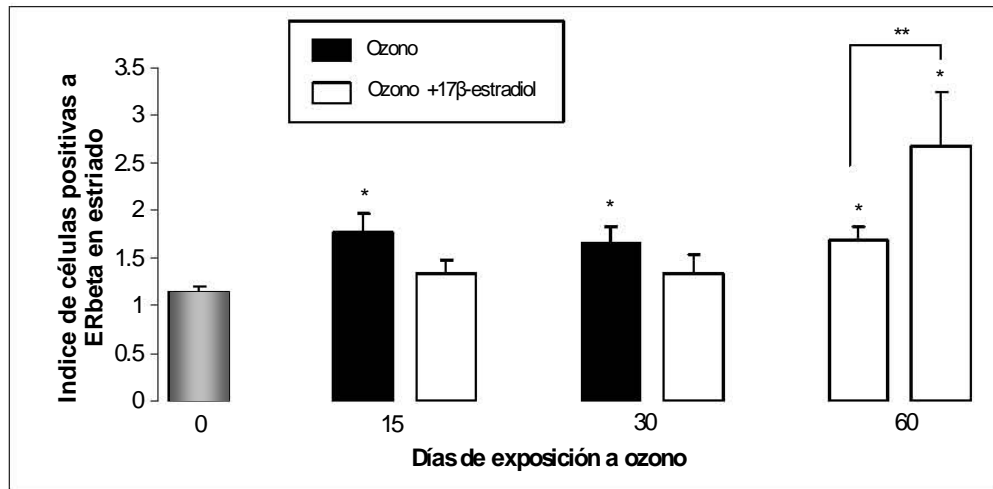


Figura 18. Índice de células positivas a ERβ cuantificados por inmunohistoquímica en estriado de ratas con 17β-estradiol después de cada exposición a ozono. Medias + DE. (* $p<0.05$ vs. control; ** $p<0.05$ ozono vs. 17β-estradiol).

La cuantificación por Western blot de los niveles de ERα en estriado mostró diferencias entre los diferentes tratamientos (ANOVA, $F=0.001$). El análisis con la prueba de comparaciones múltiples de Scheffe indicó un incremento a los 30 ($p=0.03$) y 60 ($p=0.004$) días de exposición a ozono, comparados con el control. Este aumento no se presentó en los tratamientos con 17β-estradiol. La disminución en la expresión de ERα resultó estadísticamente significativa en los grupos de ozono de 30 ($p<0.05$) y 60 días ($p=0.004$) con respecto a los tratados con hormona (figura 19).

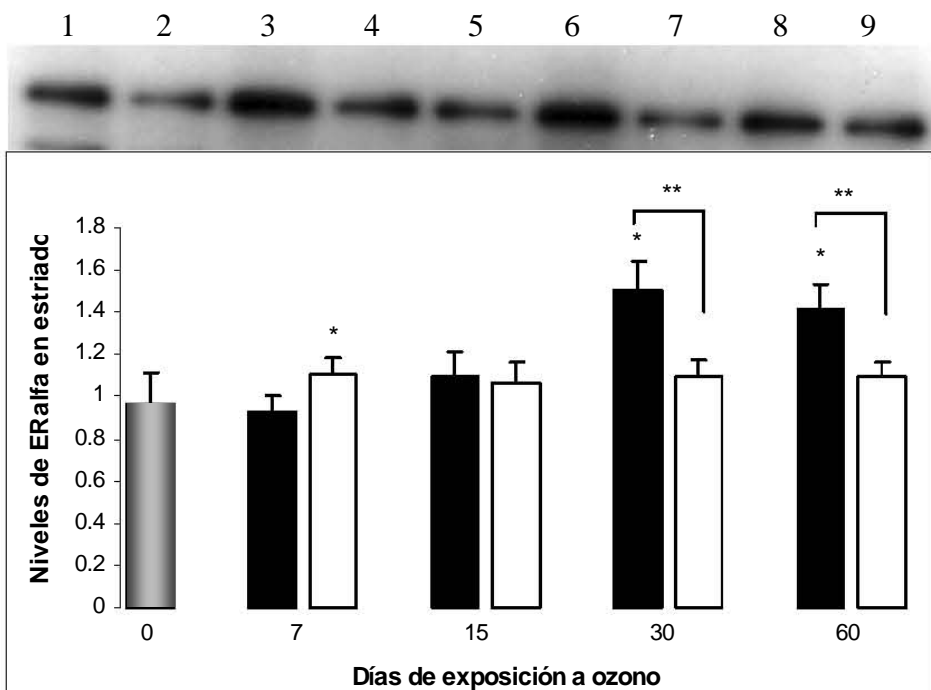


Figura 19. Niveles de ER α cuantificados por Western blot en estriado de ratas con 17 β -estradiol después de cada exposición a ozono. Medias = De. (*p<0.05 vs. control; **p<0.005 ozono vs. 17 β -estradiol). 1. Control, 2. O₃ 7d, 3. O₃+ E₂ 7d, 4. O₃ 15d, 5. O₃+ E₂ 15d, 6. O₃ 30d, 7. O₃+ E₂ 30d, 8. O₃ 60d, 9. O₃+ E₂ 60d.

IV Expresión de la proteína acídica fibrilar de la glia (GFAP)

IV-1. Substantia nigra

La cuantificación de astrocitos por inmunohistoquímica contra GFAP mostró diferencias entre los tratamientos (ANOVA, $F=0.03$). La prueba de Scheffé reveló un incremento del número de células que fue significativo a los 15 días ($p=0.02$) de exposición a ozono, y una disminución a los 60 días ($p=0.004$), con respecto al control. No se presentaron diferencias significativas en los grupos tratados con estrógenos (figura 20).

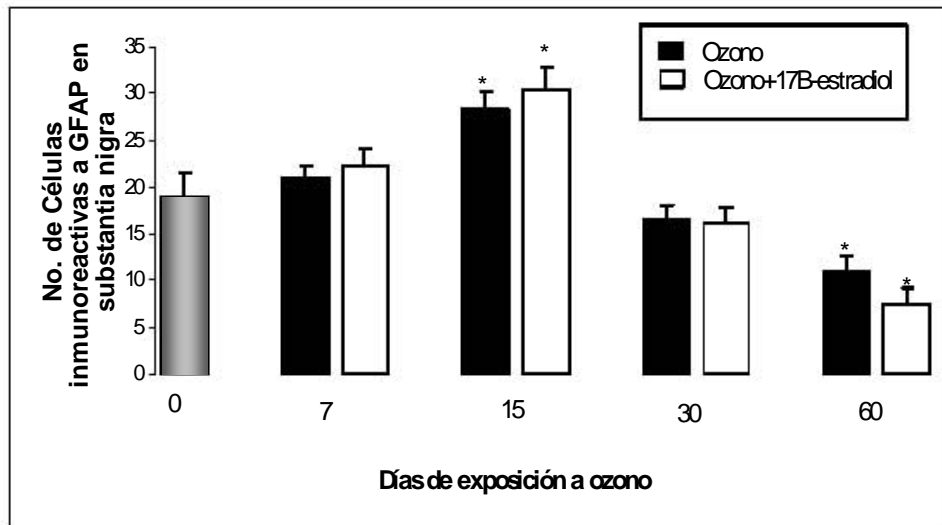


Figura 20. Efectos de la administración de 17 β -estradiol sobre el número de células positivas a GFAP en *substantia nigra*. (* $p < 0.05$ vs. control). Medias \pm DE.

El tratamiento con 17 β -estradiol en la *substantia nigra* mostró cambios en el número de astrocitos en los distintos tratamientos (ANOVA, $F=0.03$). El análisis con la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé detectó un aumento en la inmunoreactividad GFAP a los 15 días del tratamiento con ozono ($p=0.001$) y con la hormona, con respecto al control. El grupo de 60 días de ozono presentó una disminución en el marcaje de astrocitos ($p < 0.05$), al igual que los tratamientos con estradiol durante los mismos períodos. No se encontraron diferencias entre los grupos tratados con ozono y sus análogos tratados con 17 β -estradiol (figura 21).

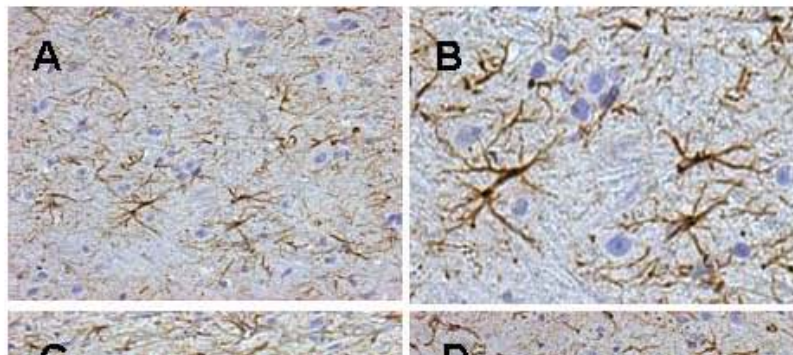


Figura 21. Micrografías de células inmunoreactivas a GFAP en *substantia nigra*. A. Control 40x, B. Control 100x. Los cuadros (C-J) muestran un aumento de 40x. C. Ozono 7 días. D. Ozono+17 β -estradiol 7días. E. Ozono 15 días. F. Ozono+17 β -estradiol 15días. G. Ozono 30 días. H. Ozono+17 β -estradiol 30días. I. Ozono 60 días. J. Ozono+17 β -estradiol 60 días. Las barras representan 20 μ m.

IV-2. Estriado

En estriado se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA, $F=0.01$). La prueba de Scheffe reveló un aumento significativo de astrocitos a los 15 días ($p<0.005$), comparado con el control. Una disminución se hizo evidente sin

diferencias entre los grupos tratados con la hormona a los 30 ($p < 0.004$) y 60 días ($p = 0.003$) (figura 22). No se encontraron diferencias entre los grupos de ozono y los que fueron tratados con 17β -estradiol.

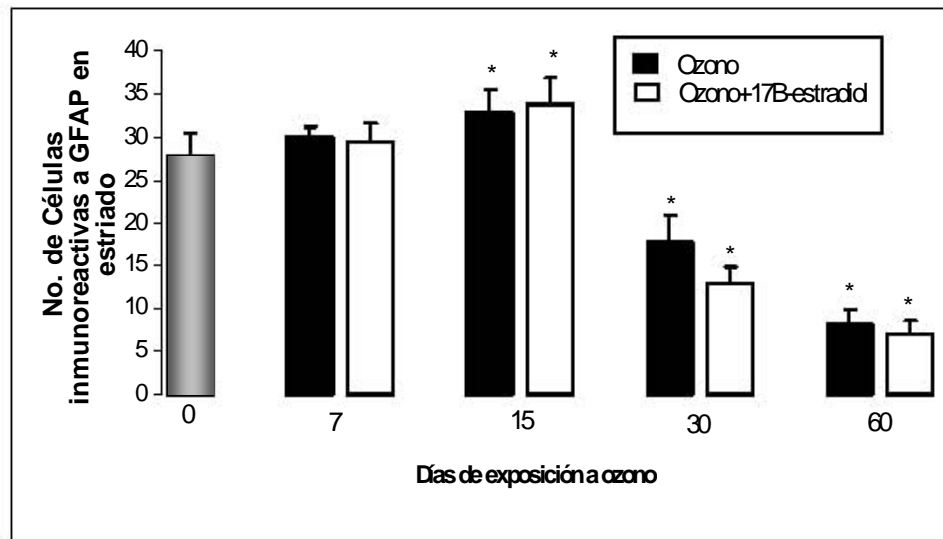


Figura 22. Efectos de la administración de 17β -estradiol sobre el número de células positivas a GFAP en estriado de ratas expuestas a ozono (* $p < 0.05$ vs. control). Medias \pm DE.

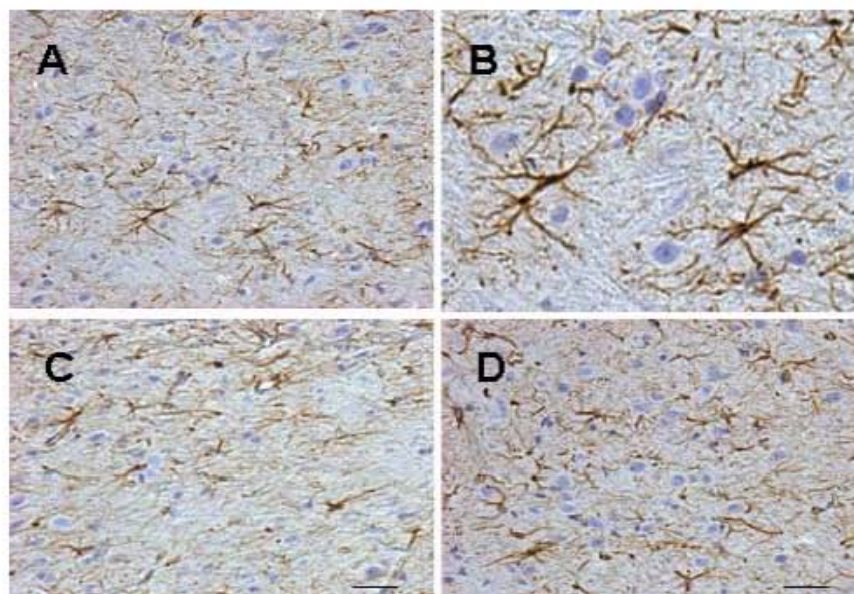


Figura 23. Micrografías de células inmunoreactivas a GFAP en estriado. A. Control, 100x. Los cuadros (B-J) muestran un aumento de 40x. B. Control. C. Ozono 7 días. D. Ozono+17 β -estradiol 7días. E. Ozono 15 días. F. Ozono+17 β -estradiol 15días. G. Ozono 30 días. H. Ozono+17 β -estradiol 30días. I. Ozono 60 días. J. Ozono+17 β -estradiol 60 días. Las barras de calibración representan 20um.

V. Marcadores de muerte celular

V-1. Substantia nigra

V-1.1 Citocromo c

Para evaluar el grado de muerte celular, se realizaron conteos celulares de las pruebas inmunohistoquímicas contra citocromo c y las proteínas BCL-2 y BAX.

Los resultados presentaron diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas a citocromo c en *substantia nigra* (ANOVA, $F=0.005$). La prueba de Scheffe mostró que las células positivas a citocromo c aumentan en los tratamientos con ozono, a medida que transcurre el tiempo. Sin embargo, este aumento fue significativo a

los 15 días ($p < 0.05$), 30 ($p < 0.005$) y continuó hasta ser máximo a los 60 días ($p = 0.001$) (figura 24).

El tratamiento con 17β -estradiol presentó diferencias estadísticas significativas a los 15 ($p = 0.002$) y a los 30 días ($p = 0.001$) con respecto al control.

Los grupos de 7, 15 y 30 días tratados con 17β -estradiol, no presentaron diferencias significativas con sus análogos tratados con ozono. No obstante, el tratamiento con 17β -estradiol durante 60 días, fue el único que logró disminuir el incremento en la expresión de citocromo c causado por la exposición crónica a ozono ($p = 0.001$).

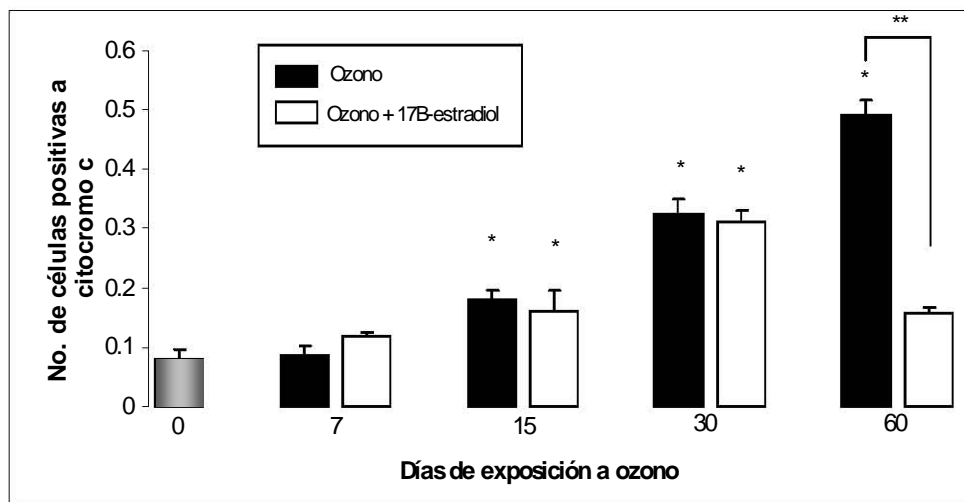


Figura 24. Efecto de la administración de estrógenos sobre el número de células positivas a citocromo c en *substantia nigra* de ratas expuestas a ozono. Medias \pm DE. (* $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol).

V-1.2. BCL-2 y BAX

Los resultados de la inmunoreactividad a BCL-2 en la *substantia nigra* presentaron diferencias significativas entre grupos (ANOVA, $F = 0.002$) El análisis con la prueba de Scheffe reveló que los tratamientos de 7, 15 y 30 días, no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. No obstante, el grupo de 60 días de ozono, manifestó una disminución significativa con respecto al control ($p < 0.005$); esta diferencia fue contrarrestada por la administración de estrógenos durante el mismo período de tiempo ($p < 0.005$) (figura 25).

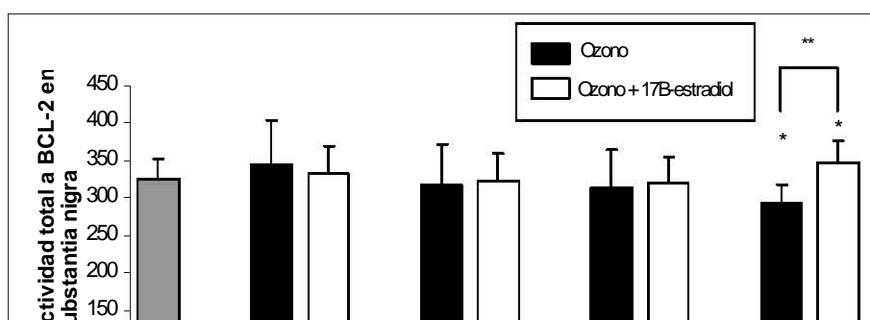


Figura 25. Efecto de la administración de estrógenos sobre la expresión de BCL-2 en sustantia nigra de ratas expuestas a ozono. Medias \pm DE. (* p <0.05 vs. control; ** p <0.05 ozono vs. 17 β -estradiol).

Los efectos de la exposición a ozono sobre la inmunoreactividad a BAX en la sustantia nigra, indicaron un aumento en los grupos de 30 (p =0.004) y 60 días (0.003). Los tratamientos con 17 β -estradiol de 7, 15, 30 y 60 días no presentaron diferencias significativas con respecto al control. Se encontraron diferencias entre el grupo con ozono de 60 días y su análogo tratado con 17 β -estradiol (p =0.003) (figura 26).

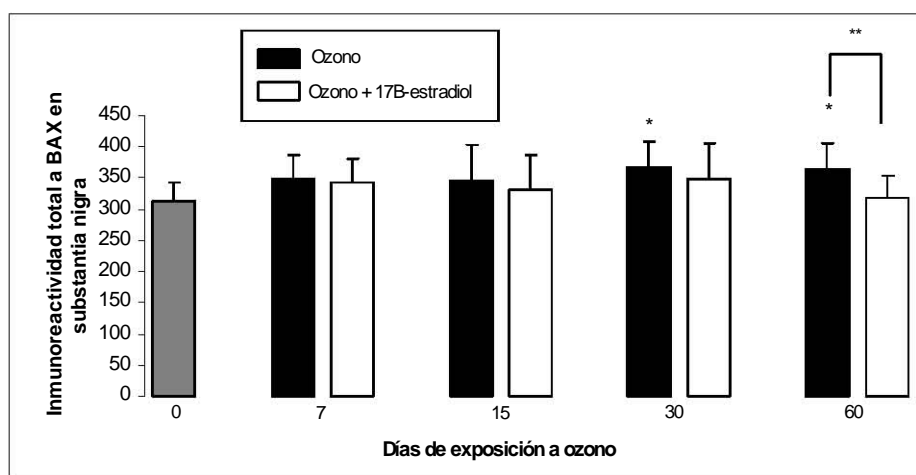


Figura 26. Efecto de la administración de estrógenos sobre la inmunoreactividad a BAX en ratas expuestas a ozono en sustantia nigra. (* p <0.05 vs. control; ** p <0.05 ozono vs. 17 β -estradiol). Medias \pm DE.

V-2. Estriado

V-2.1. Citocromo C

Los resultados del conteo de células positivas a citocromo c en estriado mostraron diferencias entre los diferentes tratamientos (ANOVA, $F=0.003$). La prueba de Scheffé detectó un aumento en los grupos de ozono de 15 ($p=0.001$), 30 ($p=0.003$) y 60 días ($p<0.05$), comparados con el control. Sin embargo, el tratamiento con 17β -estradiol fue efectivo en reducir la inmunoreactividad a citocromo c a los 30 ($p=0.03$) y 60 días ($p=0.002$) (figura 27).

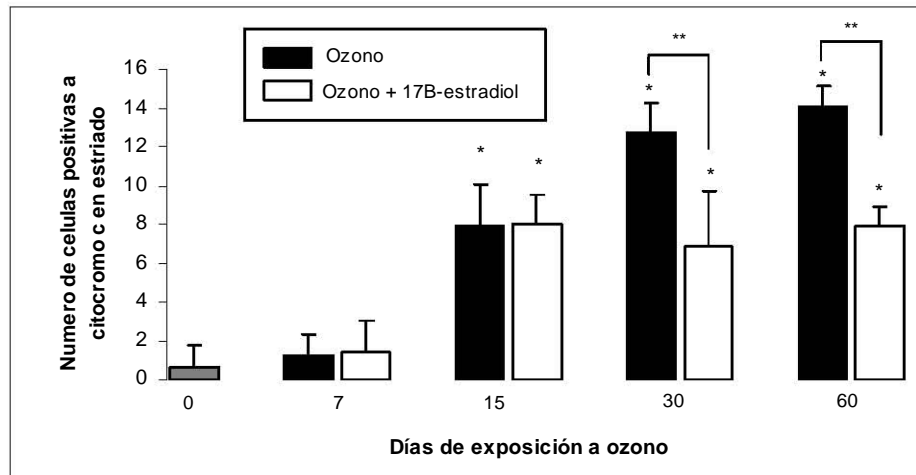


Figura 27. Efecto de la administración de estrógenos sobre las células positivas a citocromo c en estriado de ratas expuestas a ozono. (* $p<0.05$ vs. control; ** $p<0.05$ ozono vs. 17β -estradiol). Medias \pm DE.

V-2.2. BCL-2 y BAX

Los niveles de BCL-2 cuantificados por el número de células que presentaron inmunoreactividad a esta proteína se analizaron con una prueba de ANOVA ($F=0.04$). Cuando los resultados se analizaron con la prueba de Scheffé, se encontró una disminución en el grupo de 60 días de ozono ($p<0.05$) con respecto al control. La expresión de BCL-2 en los grupos de ozono de 7, 15 y 30 días no presentó ningún cambio con respecto a los controles. El tratamiento con 17β -estradiol logró contrarrestar la disminución causada por ozono a los 60 días (figura 28).

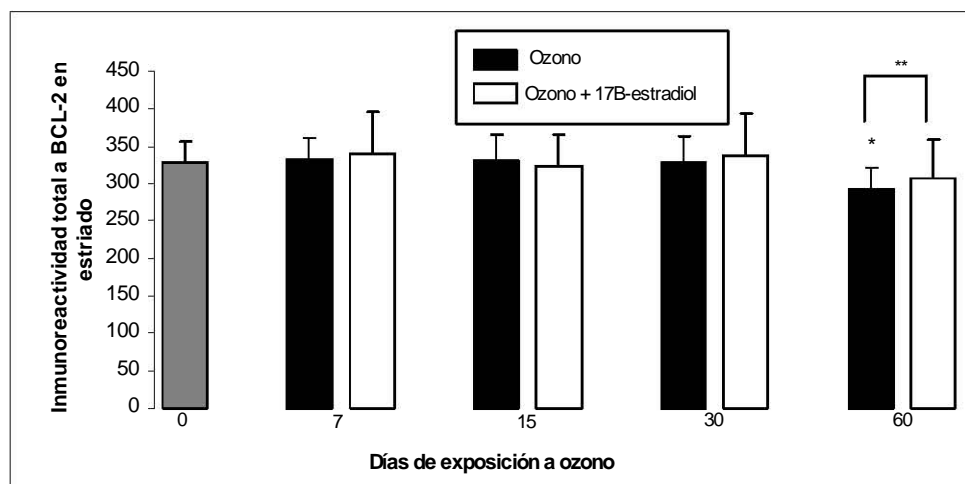


Figura 28. Niveles de inmunoreactividad a BCL-2 en estriado de ratas expuestas a ozono y tratadas con 17 β -estradiol. (*p<0.05 vs. control; **p<0.05 ozono vs. 17 β -estradiol).

La expresión de BCL-2 cuantificada por western blot, presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA, F=0.02). El análisis con la prueba de comparaciones múltiples de Scheffe reveló un incremento a los 7 y 60 días de ozono (p<0.05), comparados con el control. El tratamiento con 17 β -estradiol indujo un aumento con respecto a los grupos de 30 y 60 días de ozono (figura 29).

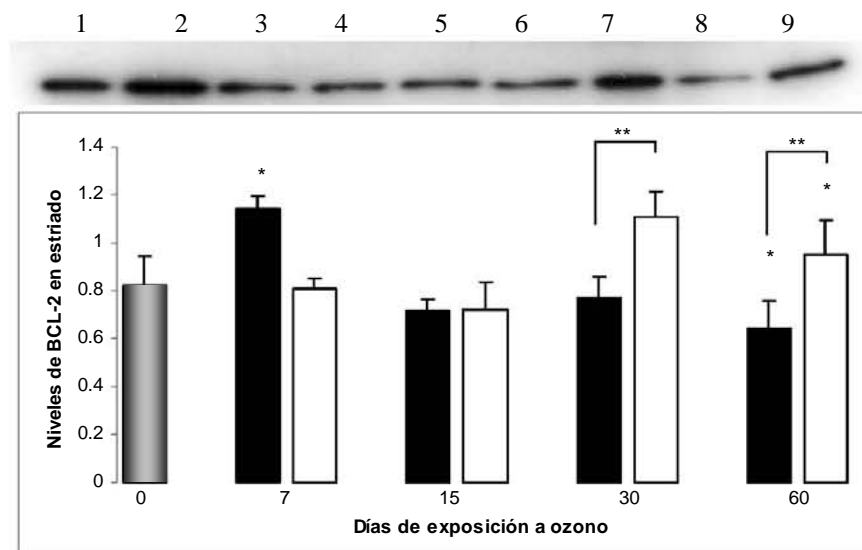


Figura 29. Efecto de la administración de estrógenos sobre la inmunoreactividad a BCL-2 en ratas expuestas a ozono en estriado. 1. Control; 2. Ozono 7 días; 3. Ozono + 17 β -estradiol 7 días; 4. Ozono 15 días; 5. Ozono + 17 β -estradiol 15 días; 6. Ozono 30 días; 7. Ozono + 17 β -estradiol 30d; 8. Ozono 60 días; 9. Ozono + 17 β -estradiol 60 días.

Por otro lado, la expresión de BAX presentó diferencias significativas entre grupos (ANOVA, F=0.02). El análisis con la prueba de Scheffe no presentó cambios en los grupos de ozono de 7 y 15 días con respecto al control. Sin embargo, en los grupos de 30 (p=0.002) y 60 días (p=0.005), el aumento causado por la exposición a ozono fue significativo y pudo ser contrarrestado por el 17 β -estradiol (p<0.05) (figura 30).

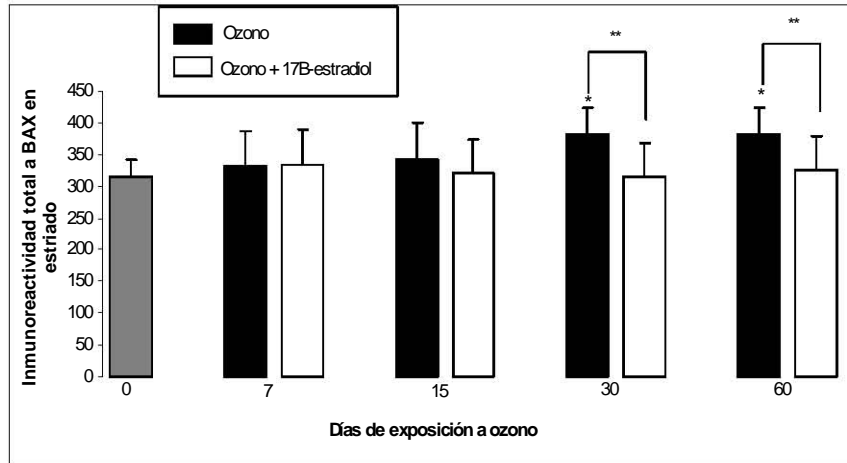


Figura 30. Efecto de la administración de estrógenos sobre la inmunoreactividad a BAX en ratas expuestas a ozono en estriado. Medias \pm DE. (* $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol).

VI. Ciclooxygenasa 2 (COX-2)

VI-1.1 Substantia nigra

El número de células inmunoreactivas a COX-2 en *substantia nigra* presentó diferencias entre tratamientos (ANOVA, $F=0.03$). El análisis con la prueba de Scheffe mostró un incremento significativo a partir de los 15 días ($p=0.03$) en los grupos expuestos a ozono, comparados con el control (figura 31). El tratamiento con hormona no mostró diferencias estadísticas con respecto a sus grupos análogos expuestos a ozono a los 7, 15 y 30 días, mientras que a los 60 días, disminuyó el incremento de COX-2 causado por la exposición a ozono ($p=0.001$).

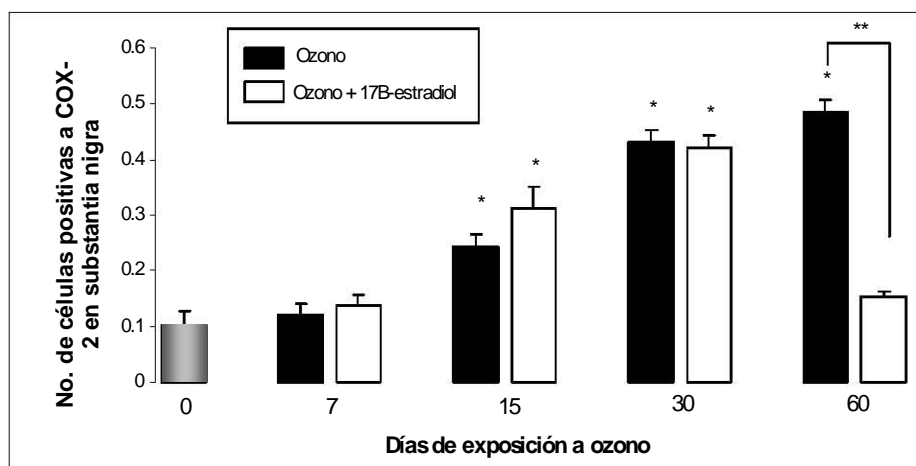


Figura 31. Efecto de la administración de estrógenos sobre el número de células inmunoreactivas a COX-2 en *substantia nigra* de ratas expuestas a ozono. Medias \pm DE. * $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol).

VI-1.2. Estriado

El índice de inmunoreactividad a COX-2 presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados (ANOVA, $F=0.01$). La prueba de Scheffe mostró un incremento significativo en los grupos expuestos a ozono a los 15 ($p=0.003$), 30 ($p=0.03$) y 60 días ($p=0.002$). Los tratamientos con 17β -estradiol mostraron un incremento en el número de células positivas a COX-2 a los 7 ($p=0.004$), 15 ($p=0.002$), 30 ($p=0.01$) y a los 60 días ($p=0.02$), con respecto al control. Se encontraron diferencias entre los grupos tratados con ozono y sus análogos con hormona a los 7 ($p=0.02$), 15 ($p=0.003$) y 60 días ($p=0.001$). (Figura 32).

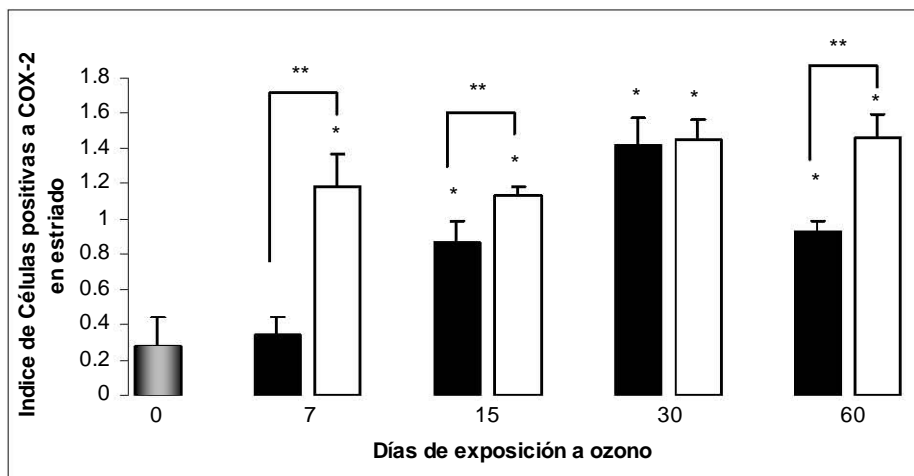


Figura 32. Efecto de la administración de estrógenos sobre el índice de inmunoreactividad a COX-2 en estriado de ratas expuestas a ozono. Medias + DE. (* $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol).

VI. Niveles de estradiol en plasma

Los niveles plasmáticos de 17β -estradiol cuantificados por ELISA a lo largo de los distintos tratamientos con la hormona se encuentran representados en la figura 33. Los resultados mostraron un incremento significativo entre tratamientos (ANOVA, $F=0.004$), La prueba de comparaciones múltiples de Scheffe reveló que los niveles de hormona en plasma fueron significativos con respecto al control desde los 15 días ($p=0.01$), 30 ($p=0.02$) y alcanzó un máximo al final del tratamiento crónico a los 60 días ($p=0.001$).

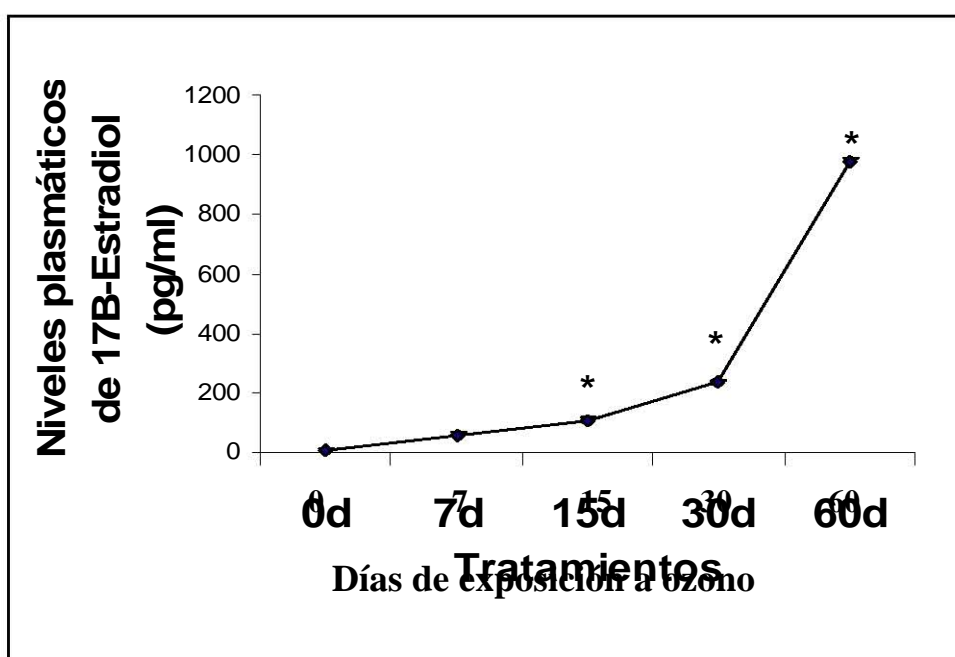


Figura 33. Efecto de la administración de 17β -estradiol sobre los niveles de esta hormona en plasma sanguíneo. Medias + DE. (* $p<0.05$ vs. control).

VII. Conducta

VII-1. Actividad motora

La actividad motora disminuyó significativamente (Kruskal Wallis, $p=0.002$). Al realizar la prueba de comparaciones pareada de U de Mann Whitney, se encontro que la exposición a ozono produjo un decremento de la actividad motora a los 7 ($p=0.004$), 15 ($p=0.002$), 30 días ($p=0.02$), con un mínimo a los 60 días ($p=0.003$). La administración de 17β -estradiol solamente logró reestablecer la actividad motora a los 30 ($p=0.005$) y 60 días ($p<0.005$) comparados con sus respectivos grupos expuestos a ozono (figura 34).

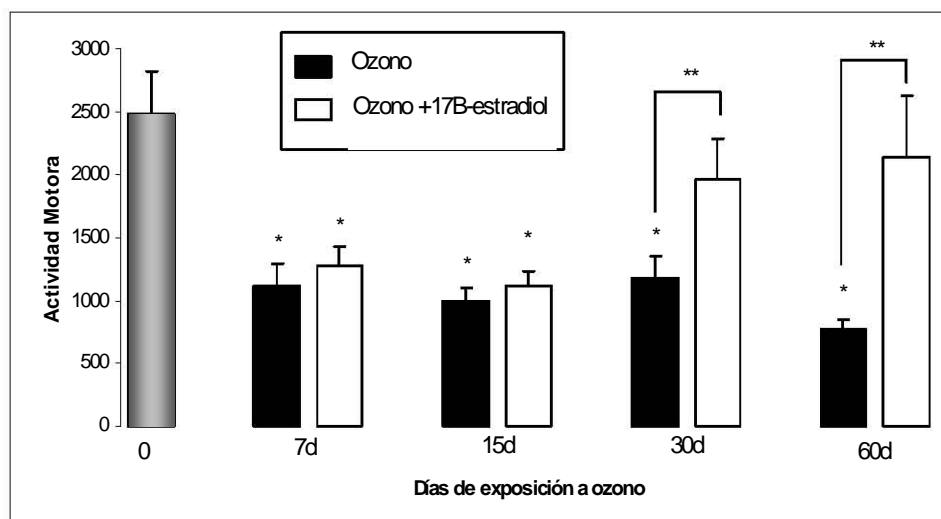


Figura 34. Efectos de la administración de 17β -estradiol sobre la actividad motora de ratas ovariectomizadas durante distintos intervalos de tiempo de exposición a ozono Medianas. (* $p<0.05$ vs. control; ** $p<0.05$ ozono vs. 17β -estradiol).

VII-2. Memoria

VII-2.1. Memoria de corto plazo

Los efectos de la administración de 17β -estradiol sobre la memoria de corto plazo se puede observar en la figura 35. Las latencias de retención a los 10 minutos (memoria de corto plazo) disminuyeron significativamente con respecto al control (Kruskal Wallis, $p=0.002$, seguida de U de Mann Whitney). La memoria de corto plazo disminuyó significativamente en todos los grupos con ozono (7 días, $p=0.005$ 15 días, $p=0.003$ 30 días, $p=0.003$ y 60 días, $p=0.001$), comparados con el control. La administración de la hormona produjo una disminución de la latencia de retención a los 15 días ($p=0.003$), pero un aumento a los 30 ($p=0.002$) y 60 días ($p<0.02$) comparados con los grupos análogos que solo recibieron ozono.

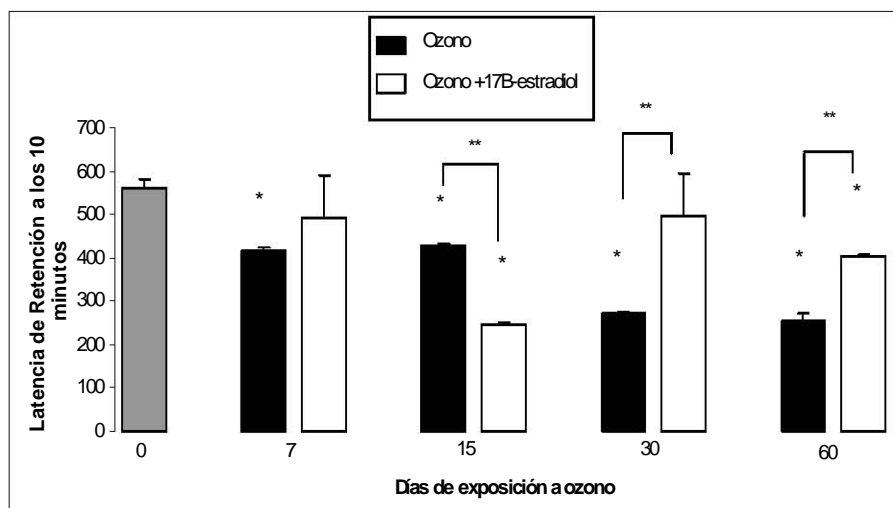


Figura 35. Efecto de la administración de 17β-estradiol sobre el déficit de la memoria de corto plazo producido por exposición a ozono. Medianas. (*p<0.05 vs. control; **p<0.05 ozono vs. 17β-estradiol).

VII-2.2. Memoria de largo plazo

El tratamiento con ozono disminuyó la memoria de largo plazo en todos los tiempos estudiados (Kruskal Wallis, $p=0.003$), mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Con la prueba de comparaciones de U de Mann Whitney, se encontró que la exposición a ozono causó una disminución de la latencia de retención a las 24 h (memoria de largo plazo) en todos los grupos con respecto al control (7 días, $p=0.02$, 15 días, $p=0.03$, 30 días, $p=0.002$, 60 días, $p=0.001$). La aplicación de 17β-estradiol durante 60 días ($p=0.001$) logró contrarrestar parcialmente el déficit de memoria que se presenta en el grupo que solo recibió ozono durante el mismo tiempo. Sin embargo, la latencia de retención en los grupos tratados con la hormona, también disminuyeron significativamente con respecto al control (7días, $p=0.005$, 15 días, $p=0.03$, 30 días, $p=0.01$) (figura 36).

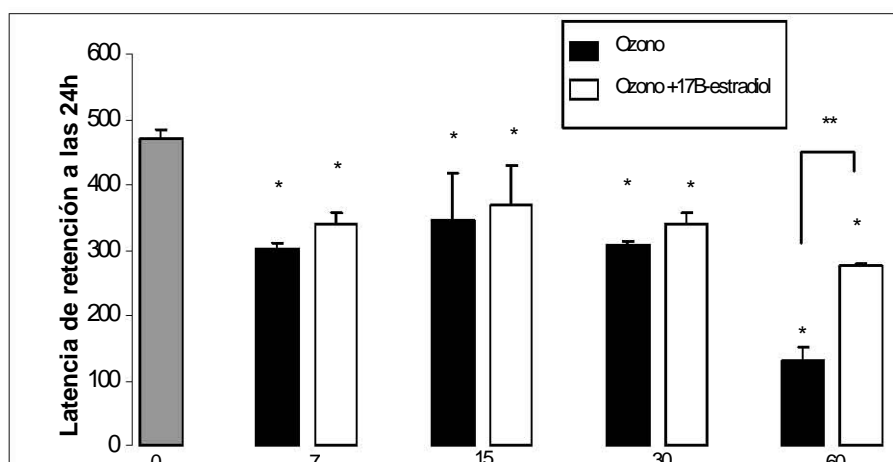


Figura 36. Efecto de la administración de 17β -estradiol sobre el déficit de la memoria de largo plazo producido por exposición a ozono. Medianas. (* $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.05$ ozono vs. 17β -estradiol).

DISCUSIÓN

I. Estrés oxidativo en substantia nigra y estriado

Numerosos estudios han utilizado el estrés oxidativo como un modelo de Parkinson (Gille et al., 2004), pues se considera un factor muy importante en la patología de esta enfermedad (Chiasson et al., 2006). Chiasson, y sus colaboradores en el 2006, postularon que la muerte de las neuronas de la *substantia nigra* de los pacientes con Parkinson se debe en gran parte a un estado de estrés oxidativo. Aunque el estrés oxidativo es un componente básico en los modelos clásicos de la enfermedad de Parkinson, la exposición a ozono parece más relevante en un contexto de niveles crecientes de contaminación ambiental en la atmósfera de las grandes ciudades. La inhalación de ozono del ambiente contaminado ha sido asociada con varios efectos adversos para la salud, que se reflejan en un incremento en las hospitalizaciones y en enfermedades respiratorias (Bell, 2004).

En el cerebro, una exposición breve a ozono produce cambios en la biosíntesis de catecolaminas en neuronas simpáticas y centrales (Soulage, 2004), así como también una disrupción del sueño (Gonzalez-Piña, 2003).

Resultados previos en nuestro laboratorio muestran que la exposición a ozono produce estrés oxidativo, tal como lo indica un incremento en los niveles de lípidos peroxidados en diferentes estructuras cerebrales (Rivas-Arancibia et al., 2000; Rivas-Arancibia et al., 2003), entre las cuales se encuentran la *substantia nigra* y el estriado (Pereyra-Muñoz et al., 2005). Las neuronas de *substantia nigra* y sus fibras son especialmente sensibles al estrés oxidativo debido al metabolismo oxidativo de la dopamina, el alto contenido de hierro y los bajos niveles de enzimas antioxidantes (Méndez-Alvarez y Soto-Otero, 2004).

La peroxidación de lípidos, así como la oxidación de proteínas, se consideran marcadores confiables de estrés oxidativo dado que producen daño directo a las membranas y proteínas asociadas, lo cual genera una amplia variedad de productos oxidantes que culminan en muerte celular. En este experimento, la presencia de estrés oxidativo causado por exposición a ozono puede observarse en la figuras 1 y 6, que muestran un incremento en la peroxidación de lípidos tanto en *substantia nigra* como en estriado. En las figuras 2 y 4 se puede observar el incremento que produce la exposición a ozono sobre la cantidad de proteínas oxidadas en la *substantia nigra* y el estriado, respectivamente. Esto concuerda con los resultados obtenidos de la cuantificación de lípidos peroxidados en ambas estructuras. Sin embargo, el efecto de la

exposición a ozono fue mucho más temprano en la *substantia nigra* (desde los 7 días) que en estriado (desde los 30 días).

Además del aumento de los lípidos y las proteínas oxidadas, la expresión de iNOS aumentó a medida que transcurría el tiempo de exposición a ozono. Esta enzima convierte a la L-arginina en L-citrulina y NO y es particularmente inducida por estrés oxidativo. La disminución en la síntesis de iNOS, da como resultado una menor cantidad de NO y por consiguiente, una formación menor de peroxinitrito (Marletta, 1999). El peroxinitrito tiene un importante poder oxidante y nitrante y puede ser producido por células de la microglia y neuronas durante estados de hiperactividad en la transmisión de glutamato, la disfunción mitocondrial y la disminución de L-arginina.

II. Efecto del 17 β -estradiol sobre el daño oxidativo en el sistema nigroestriatal

En este experimento, la pérdida del balance redox causada por exposición a ozono en el sistema nigroestriatal se hizo evidente por un incremento progresivo de los lípidos peroxidados en los grupos expuestos a ozono comparados con el control. Las comparaciones entre los tratamientos con ozono y sus análogos 17 β -estradiol mostraron que la hormona fue potencialmente capaz de disminuir los niveles de lípidos peroxidados solo a los 60 días en *substantia nigra* y en estriado después de los 30 días de administración subsiguiente a la exposición al contaminante. A este respecto, se ha propuesto un modelo mecanístico en el cual el 17 α -estradiol se puede intercalar en la membrana celular para finalizar reacciones en cadena de peroxidación de lípidos. De esta manera el estradiol preserva la integridad de la membrana y puede entrar a un ciclo redox donde su acoplamiento enzimático al glutatión o a la NADPH, lo convierten a su estado reducido (Dykens et al., 2005).

Como resultado del metabolismo aerobio de los organismos, las especies reactivas y radicales libres son generados constantemente durante el transcurso de su vida. Debido a esto, existe una producción permanente de especies oxidantes, ocurre un daño oxidativo que incluye la formación de proteínas modificadas por oxidación (Poppek y Grune, 2006). Los derivados de las proteínas oxidadas tienden a acumularse, y el exceso de dichos agregados puede llevar muerte celular. Para prevenir esto, las proteínas oxidadas son selectivamente reconocidas, reparadas o degradadas por el proteosoma. No obstante, en un estado de estrés oxidativo, las funciones reparadoras de este organelo se encuentran alteradas, y no puede desempeñarse correctamente (Poppek y Grune, 2006).

En este trabajo, el efecto de la administración de 17 β -estradiol en la disminución de la cantidad de proteínas oxidadas fue notorio a los 60 días en *substantia nigra*, mientras que en estriado fue evidente desde los 30 días (figuras 3 y 8, respectivamente).

Por otro lado, existen evidencias que indican que los estrógenos reducen el estrés oxidativo mediante una disminución en la producción de peróxido de hidrógeno por mitocondria (Stirone et al., 2005). Esta podría ser una de las vías por medio de las cuales, el estradiol presenta efectos antioxidantes.

En este modelo, los efectos protectores del 17 β -estradiol, son dependientes de los altos niveles plasmáticos de la hormona, que se alcanzaron a los 60 días de administración crónica.

Además, este trabajo reveló que en ambas estructuras del sistema nigroestriatal, la administración de estradiol produjo una disminución de la inmunoreactividad a iNOS a los 60 días. A este respecto, se sugiere que los estrógenos inhiben un incremento de la iNOS (Cheepsunthorn et al., 2006) por medio de la asociación de ER/p65 y por consiguiente, bloqueando la unión de p65 con el promotor de la iNOS (Shih et al., 2006).

Además, los estrógenos disminuyen la activación glial y la producción de iNOS por medio de la estimulación de la vía de MAPK por ER β (Baker et al., 2004).

La neuroprotección conferida por los estrógenos también está relacionada a una atenuación de la expresión de la iNOS por medio de una vía transcripcional o postranscripcional. Dicha atenuación resulta en potentes efectos anti-inflamatorios de los estrógenos (Park et al., 2006).

La deficiencia de estrógenos en la postmenopausia juega un papel muy importante en la patogénesis de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y algunos trastornos neurodegenerativos. Además, existen diferencias sexuales en la progresión de enfermedades asociadas con el sistema dopaminérgico nigroestriatal, como la de Parkinson. Los mecanismos responsables de la degeneración de las neuronas nigroestriatales aún no se conocen bien, pero se piensa que el estrés oxidativo y la inflamación tienen papeles clave en esta pérdida neuronal (Morale et al., 2006).

III. Cuantificación de células totales, neuronas dopaminérgicas y expresión de TH

La producción de especies reactivas secundarias a la exposición a ozono causa una pérdida del balance redox que puede dañar a las neuronas dopaminérgicas. En estas condiciones, el metabolismo oxidativo de la dopamina y de la tirosina hidroxilasa

pueden estar contribuyendo a la formación de radicales libres y otras especies reactivas en esta población neuronal.

La hipótesis principal sugiere que la muerte neuronal nigroestriatal que ocurre en la enfermedad de Parkinson, se debe a un excesivo estrés oxidativo (Gelinas et al., 2004) generado por la formación de metabolitos oxidativos tóxicos producidos por la oxidación enzimática o autooxidación de la dopamina (Xiao-Qing et al., 2005), la neuromelanina y la presencia de elevadas concentraciones de hierro (Barzilai et al., 2000).

El cofactor de la TH, la BH₄ (tetrahidrobiopterina) puede rearrreglarse químicamente en solución mediante una reacción de autooxidación que produce anión superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno. La combinación de la TH con su cofactor produce más radicales de oxígeno que la sola autooxidación del cofactor (Adams et al., 1997).

Los factores antes mencionados están relacionados con la alta vulnerabilidad de la *substantia nigra* al daño oxidativo. En este experimento, se observó que las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* presentaron una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo, dado que presentaron un menor grado de sobrevivencia. Como puede observarse en la figura 11, la exposición a ozono produjo una disminución del número de células totales en la *substantia nigra* desde los 15 días. Sin embargo, el efecto del estrés oxidativo sobre el número de neuronas dopaminérgicas fue mucho más temprano (desde los 7 días de ozono) y drástico.

Los resultados de este trabajo, revelaron que la pérdida de neuronas dopaminérgicas no correspondía directamente con una disminución en los niveles de TH.

A este respecto, se ha reportado que la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* en la enfermedad de Parkinson, lleva a ajustes compensatorios, tales como un incremento en la producción de dopamina en las células que sobreviven (Calne y Zigmond, 1991). No obstante, en dicha enfermedad, este incremento no es notorio debido a la enorme disminución de dopamina en la *substantia nigra* y el estriado debida a la pérdida masiva de las neuronas dopaminérgicas en estas estructuras cerebrales. Los estudios de Kastner y colaboradores en 1993, demostraron que en esta enfermedad, cada neurona dopaminérgica contiene menor cantidad de mRNA y menos moléculas de TH, sin embargo los estudios de Lovenberg (1979) y Riederer (1988),

sugieren que la síntesis compensatoria de dopamina se logra por una mayor activación cinética de las moléculas de TH existentes.

IV. Efecto de los estrógenos sobre la expresión de TH

Como sabemos, el 17 β -estradiol regula la expresión de TH a nivel transcripcional y traduccional. Esta regulación no solo ocurre en el cerebro medio en desarrollo (Ivanova et al., 2002), sino que también en el adulto sobre diferentes tipos neuronales (Arbogast et al., 2000).

En este sentido, se han identificado efectos de los estrógenos diferentes e incluso opuestos dependiendo del tipo neuronal (Kritzer, 1998). Así, mientras los niveles de mRNA disminuyen en algunas estructuras después del tratamiento con estrógenos (Arbogast et al., 1993), en otras áreas los niveles están aumentados (Pau et al., 2000).

Por otro lado, existen evidencias que señalan el papel protector de los estrógenos (Bisagno et al., 2003; Tomas-Camardiel et al., 2002) en contra de daño oxidativo en *substantia nigra* (Dluzen, 2000). El 17 β -estradiol a concentraciones fisiológicas induce la expresión de genes citoprotectores además de enzimas antioxidantes y antiapoptóticas como la tioredoxina y la SOD (Chihue et al., 2003). Las comparaciones entre los tratamientos con ozono y sus análogos 17 β -estradiol revelaron que la hormona fue potencialmente capaz de restaurar los niveles de TH solo a los 60 días de administración después de la exposición al contaminante, cuando los niveles plasmáticos de la hormona estuvieron más elevados. Los otros tratamientos con estradiol no fueron capaces de contrarrestar la disminución de TH causada por el ozono.

Estos resultados concuerdan con otros estudios que revelan que la administración crónica y no aguda de estrógenos es capaz de restituir las funciones dopaminérgicas estriatales en ratas ovariectomizadas (Ohtani et al., 2001).

Otras evidencias revelan que una dosis única de estradiol no produjo cambios en la severidad del daño causado por oxidantes. Sin embargo, el tratamiento crónico con estradiol se asoció con una reducción del 25-35% en el número de neuronas dañadas (Dribben et al., 2003).

Los resultados también muestran que los niveles de TH en células de *substantia nigra* disminuyeron en los grupos tratados con ozono y estradiol con respecto al grupo control (Fig 12). En este sentido, se ha sugerido un papel patogénico de la TH como una enzima que funciona como fuente de especies reactivas y además es blanco del daño oxidativo (Haavik, 1997). Estos resultados concuerdan con otros estudios que reportan

que el daño oxidativo produce una inactivación de la TH en *substantia nigra* (De La Cruz et al., 1995).

En la *substantia nigra*, el reemplazo de estrógenos parece tener una influencia relativamente modesta sobre los cambios en los niveles de TH inducidos por ovariectomía, como se muestra en los tratamientos con 17β -estradiol a los 7, 15 y 30 días, los cuales no contrarrestaron la disminución de TH producida por el ozono. Se ha reportado que los catecol estrógenos que se forman en el cerebro como metabolitos de los estrógenos pueden inhibir la actividad de la TH (Lloyd, 1978).

El efecto 17β -estradiol sobre el incremento de los niveles de TH solamente a los 60 días podría indicar que probablemente la respuesta producida depende del tiempo, la dosis (Serova, 2002; Liu et al., 2007) e incluso del tipo de administración (Pau, 2000; Tseng, 1997).

Mientras más larga es la exposición a ozono, más severo es el daño causado en las células de la *substantia nigra*. El estrés oxidativo causa una oxidación de la TH (Haavik y Toska, 1998) y de la dopamina, lo cual contribuye a perpetuar el daño ya existente y a crear un círculo vicioso. En estas condiciones, la célula desarrolla un estado de daño oxidativo progresivo caracterizado por edema, que lleva a una disfunción mitocondrial y por consiguiente a una disminución en la producción de ATP (Berg et al, 2004).

Por lo tanto, con una deficiencia en ATP, las bombas que dependen de él para regular el volumen celular fallan causando edema y otras alteraciones en la morfología (Berg et al, 2004). Los productos de oxidación ocasionan un poro de transición mitocondrial que culmina con la muerte neuronal (Arriagada et al, 2004). Como se muestra en la figura 3, el número de neuronas inmunoreactivas a TH disminuye en todos los tratamientos, independientemente de que el número total de células también disminuya. Sin embargo, solo la administración de 17β -durante 60 días pudo revertir esta tendencia.

El estrés oxidativo también altera la integridad de la membrana celular, como se muestra en la inmunohistoquímica contra TH (Fig. 14). Aunado a lo anterior, se sabe que estrés oxidativo afecta el citoesqueleto neuronal a través de la proteólisis y cambios estructurales anormales en los neurofilamentos. Los estrógenos contribuyen a la recuperación de neuronas con daño en citoesqueleto después de un estado de estrés oxidativo (Chiasson et al., 2006).

Este estudio muestra que el estrés oxidativo producido por exposición a bajas dosis de ozono de manera repetida es capaz de causar una disminución de TH similar a la que ocurre en algunos procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson.

Por lo anterior, podemos inferir que protección morfológica y neuroquímica mostrada por el tratamiento crónico con estrógenos en estos experimentos, puede llevar a una preservación de la función cerebral como se observa en la recuperación de la memoria de largo plazo.

VI. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de ER α y ER β

Varios estudios han sugerido que el papel protector de los estrógenos en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, ocurre mediante un mecanismo de interacción con sus receptores (Quesada et al., 2007).

La formación de ROS es un mediador importante de daño y muerte celular. Se sugiere que el ER α desempeña un papel importante en la modulación del daño oxidativo (Lin y Lin, 2006).

Sin embargo, en este experimento, los resultados en *substantia nigra* revelaron que la expresión de ER α parece aumentar conforme aumenta el periodo de exposición a ozono con un máximo ubicado a los dos meses comparando con los controles, sometidos a aire circulante. Se ha observado que la inducción de genes protectores contra altos niveles de estrés oxidativo mitocondrial es dependiente de los receptores ER α , por lo que estos se consideran reguladores importantes del metabolismo oxidativo (Rangwala et al., 2007).

En estriado, este incremento solamente se presentó a los 30 días de ozono. Aunque en estriado la expresión de ER α sólo aumentó a los 30 y no a los 60 días de ozono, en la *substantia nigra* la expresión de ER α presentó una correlación positiva con el aumento de exposición a ozono. Los tratamientos con estrógenos produjeron una leve disminución en la expresión de ER α con respecto a los grupos expuestos solamente a ozono. A los 60 días de administración de 17 β -estradiol, los niveles de expresión de ER α presentaron un incremento (Fig 15).

En el caso de los ER β , la disminución fue evidente únicamente a los 15 y 30 días de exposición a ozono con respecto al control en *substantia nigra* (Fig. 6). Dado que a los 60 días no hubo ninguna diferencia significativa, podría sugerirse que el efecto del

ozono en la expresión de ER β depende del grado de estrés oxidativo. En estriado, los resultados presentaron un incremento desde los 30 días de exposición a ozono; la aplicación de estrógenos produjo un aumento en la expresión de ER β únicamente a los 60 días.

Esta información concuerda exactamente con estudios realizados por Snait, y colaboradores (2002), en donde se observó que las ROS y el estrés oxidativo pueden regular la expresión de ambos receptores de estrógenos (ER α y ER β).

Las mediciones estereológicas han revelado que el 40% de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra* compacta, son inmunoreactivas al ER β . Más aún, una tercera parte de los astrocitos de la *substantia nigra* también presentan ER β (Quesada et al., 2007). Esto sugiere un papel modulador de los estrógenos sobre las neuronas dopaminérgicas y los astrocitos en la *substantia nigra*.

VII. Acciones de los estrógenos sobre los astrocitos en el sistema nigroestriatal

La expresión de GFAP es un marcador de astrocitos que puede ser regulado por los niveles de circulantes de esteroides gonadales como los estrógenos durante el desarrollo postnatal (Conejo et al., 2005).

Más aún, las hormonas gonadales ejercen influencia sobre la morfología y función de las células gliales, particularmente sobre los astrocitos (Martínez y de Lacalle, 2007). En estudios con animales ovariectomizados, la administración de 17 β -estradiol contribuyó a la recuperación estructural de neuronas colinérgicas hipocámpales dañadas por una toxina, mediante el bloqueo de la expresión de GFAP en el área (Martínez y de Lacalle, 2007).

En este trabajo, la cuantificación de astrocitos en la *substantia nigra* reveló un incremento máximo en los grupos de ozono y estrógenos a los 15 días con respecto al control, lo cual podría indicar que la gliosis es un proceso que ocurre tempranamente en esta estructura cerebral. Sin embargo, los tratamientos de 60 días presentaron una disminución con respecto al nivel máximo de expresión, que coincide con una disminución del número de células totales en estos grupos. Dado que la administración de 17 β -estradiol no produjo diferencias significativas en el número de astrocitos con respecto a los grupos expuestos a ozono, podemos decir que el efecto de esta hormona no estuvo relacionado con una proliferación glial. Estos resultados son consistentes con trabajos donde la administración de 17 β -estradiol en cultivos neuronales dañados con

neurotoxinas como ácido iboténico y beta-amiloides en cultivos neuronales, no desplegó ningún efecto en cuanto al número de astrocitos (Hruska y Dohanich, 2007).

En estriado el ozono produjo un incremento de astrocitos a los 15 días, y el tratamiento con estrógenos mostró un efecto similar al de la *substantia nigra*. No obstante, la disminución de astrocitos se hizo evidente desde los 30 días y permaneció hasta el final del tratamiento. Por lo tanto, el efecto del 17 β -estradiol sobre la expresión de GFAP tampoco presentó efectos significativos.

VIII. Efecto de los estrógenos sobre la muerte celular

El incremento en la liberación de citocromo c se considera un marcador de disfunción mitocondrial (Lee et al., 2007), que se encuentra asociado con un estado de estrés oxidativo. La disfunción del complejo I mitocondrial se encuentra asociada a la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* que ocurre en la enfermedad de Parkinson (Perier et al., 2005; Perier et al., 2007). Este déficit del complejo I estimula un estado de estrés oxidativo intramitocondrial, que a su vez, promueve un incremento en la liberación de citocromo c, lo cual finalmente puede culminar en la activación de vías que llevan a muerte celular (Perier, et al., 2005).

Una vez que el citocromo c es liberado al citosol, puede activar junto con otras proteínas, la cascada de caspasas que median las alteraciones morfológicas y bioquímicas que median los procesos de apoptosis. Además, la pérdida de citocromo c mitocondrial estimula la producción de radicales libres (Fiskum et al., 2003).

Aunque la técnica inmunohistoquímica empleada en este trabajo no nos permite diferenciar entre el citocromo c contenido en la mitocondria, del que se encuentra en el citosol, los resultados obtenidos son congruentes con los cambios reportados que causa en el estrés oxidativo, así como en el conjunto de experimentos realizados en este trabajo. Por lo tanto, podemos inferir que a pesar de la falta de especificidad de la técnica, los resultados obtenidos son relevantes en la determinación del efecto del ozono sobre los procesos de muerte celular. Los resultados antes mencionados revelaron que en *substantia nigra*, el número de células positivas a citocromo c aumentaron desde los 7 días en los grupos expuestos a ozono, mientras que en el estriado, este efecto se presentó desde los 15 días. Esto indica que el estrés oxidativo tuvo un efecto temprano en el desencadenamiento de procesos de muerte celular en la *substantia nigra* que en el estriado.

La administración de estrógenos solamente fue capaz de contrarrestar el efecto del ozono en el número de células positivas a citocromo c a los 60 días en la *substantia nigra*, mientras que en el estriado la protección fue evidente desde los 30 hasta los 60 días. Algunos estudios han demostrado que los estrógenos proveen neuroprotección mediante el bloqueo de la translocación de citocromo c de la mitocondria al citosol durante etapas tempranas de la muerte neuronal (Borgetta et al., 2004; Nilsen et al., 2006).

Por otro lado, las proteínas de la familia bcl-2 juegan un papel muy importante durante la apoptosis y también pueden regular los procesos de muerte neuronal en respuesta a estrés oxidativo, como los que ocurren en la enfermedad de Parkinson (Kramer y Mytilineou, 2004).

En este trabajo, se cuantificaron los niveles de expresión de proteínas anti y proapoptóticas como BCL-2 y BAX respectivamente, para determinar el papel de los estrógenos en la protección de la muerte celular causada por exposición a ozono en la *substantia nigra* (Figs. 25 y 26) y en estriado (Figs. 29 y 30).

El incremento en la permeabilidad mitocondrial dependiente de BAX es el responsable de la liberación de factores mitocondriales que señalizan para una degradación apoptótica. Las neuronas de la *substantia nigra* presentan un incremento de los niveles de BAX en la enfermedad de Parkinson (Tatton et al., 2003).

La translocación de BAX a la mitocondria es uno de los mecanismos mediante los cuales se puede inducir la liberación de citocromo c (Perier et al, 2007). La acumulación excesiva de calcio mitocondrial constituye otro mecanismo que puede incrementar la liberación de citocromo c y promover la producción de superóxido (Fiskum et al., 2003).

Los resultados obtenidos en *substantia nigra* indicaron una disminución a los 60 días de ozono en la expresión de BCL-2, el cual fue contrarrestado por la administración de estrógenos únicamente durante 60 días. La expresión de BAX aumentó desde los 30 días en los grupos expuestos a ozono comparados con el control, pero el tratamiento con estradiol logró contrarrestar el aumento de BAX solamente a los 60 días.

En estriado, la expresión de BCL-2 presentó una disminución significativa a los 60 días de ozono comparada con el control, pero la administración de estrógenos fue efectiva para incrementar los niveles de la proteína antiapoptótica desde los 30 días. En el caso de BAX, su expresión aumentó a los 30 y 60 días de ozono, pero el 17 β -estradiol logró disminuir este incremento en ambos grupos.

Esto puede indicar que el tratamiento crónico con estrógenos está protegiendo de la muerte celular, puesto que favorece la expresión de proteínas antiapoptóticas (BCL-2) y desfavorece la de elementos que causan apoptosis (BAX).

La dopamina, en combinación con hierro II, induce apoptosis por un mecanismo mediado por estrés oxidativo (vía peróxido de hidrógeno), el cual a su vez desata una cascada de señalización que requiere de una síntesis de RNA y proteínas. Se ha observado que el estradiol previene significativamente la apoptosis inducida por dopamina/FeII en cultivos celulares mediante la inhibición directa de la acumulación de peróxidos intracelulares generada por la reacción de la dopamina con el metal (Jiménez Del Rio y Velez-Pardo, 2000).

La apoptosis inducida por toxinas que causan un estado de estrés oxidativo (i.e. 6-hidroxi-dopamina), involucran mecanismos que incluyen la activación de la caspasa-3 y la oxidación de la dopamina para formar quinonas y metabolitos de peróxido de hidrógeno (Jiménez Del Rio y Velez-Pardo, 2000). Algunas evidencias probaron que los estrógenos administrados en altas concentraciones (150 µg/kg), retrasaron la muerte de neuronas estriatales. Dado que el tamoxifen, un antagonista de receptores de estrógenos no suprimió este efecto, se sugiere que los estrógenos podrían haber actuado bajo un mecanismo de antioxidantes (Kii et al., 2005).

Esto concuerda con la información de que el estrés oxidativo activa una serie de moléculas de señalización celular que participan en los mecanismos de muerte celular. En modelos de estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno en células mesencefálicas, se detectó una mayor sensibilidad en las células dopaminérgicas, donde los niveles de actividad de la caspasa-3 estuvieron mucho más incrementados que en las gabaérgicas (Anantharam et al., 2007).

IX. Estrés oxidativo, y el efecto de los estrógenos sobre la expresión de COX-2

Algunas evidencias sugieren que la inflamación crónica, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo juegan papeles significativos y probablemente sinérgicos en la enfermedad de Parkinson (Hunter et al., 2007). En este sentido, los anti-inflamatorios proveen protección en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* por medio de la restauración de la función mitocondrial y la disminución de la inflamación (Hunter et al., 2007).

La exposición a ozono produjo un incremento en la expresión de la COX-2, un mediador de inflamación. Marin, y colaboradores, en 2007, correlacionaron un aumento

en la expresión de la COX-2 con la degeneración de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, la administración de 17 β -estradiol resultó en un aumento en la expresión de la enzima, al igual que en los grupos expuestos a ozono. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios, donde se ha observado que la expresión de COX-2 en ratas es más alta durante el proestro y el estro, periodos que se encuentran bajo influencia estrogénica. La inducción de COX-2 por 17 β -estradiol en el oviducto (Perez-Martinez et al., 2006), y en el útero de humanos (Tamura et al., 2004) se correlacionó con un incremento de las prostaglandinas PGF y PGE₂, y fue bloqueada con antagonistas del receptor de estrógenos.

En general, los lípidos bioactivos, tales como el ácido araquidónico, precursor de la COX, participan en la regulación de la función y disfunción sináptica. La COX-2 modula los procesos de plasticidad sináptica (Sang et al., 2005) y memoria. El estrés oxidativo rompe la señalización de los lípidos, favorece su peroxidación y de esta manera inicia y propaga la neurodegeneración (Bazan, 2006).

Dado que los estrógenos promovieron un incremento en la expresión de la COX-2, pero una disminución en otros marcadores de daño oxidativo como los lípidos peroxidados y la 3-NT, podríamos sugerir que bajo un balance redox, este aumento podría estar más bien correlacionado con una participación de la enzima en los procesos de memoria y plasticidad.

X. Niveles de 17 β -estradiol

Los resultados de la determinación de la concentración de 17 β -estradiol en el plasma sanguíneo de las ratas, mostraron un incremento progresivo en la concentración de la hormona desde los 7 días de administración crónica, con un máximo a los 60 días. Esto sugiere que el efecto neuroprotector del 17 β -estradiol sobre las alteraciones inducidas por ozono en *substantia nigra* se hace evidente hasta los 60 días de tratamiento, cuando los niveles de la hormona alcanzan el máximo (Fig.33). En el estriado, la neuroprotección se puede observar de manera general, desde los 30 días, lo cual indica un efecto más temprano en esta estructura cerebral.

Se ha propuesto que las mujeres postmenopáusicas se encuentran en riesgo de experimentar demencia y síntomas de Parkinson, asociados con bajos niveles de estrógenos. Los estrógenos parecen ser efectivos en la prevención del estrés oxidativo (Bisagno et al., 2003) y de la pérdida de función del transportador de dopamina en modelos de neurotoxicidad (Wallace et al., 2006).

Nuestros datos sugieren que el 17β -estradiol logró revertir el daño oxidativo a los 60 días, lo cual concuerda con estudios que revelan que el reemplazo crónico (no agudo) de estrógenos es capaz de restaurar la función dopaminérgica en ratas ovariectomizadas (Ohtani et al., 2001). El efecto antioxidante del estradiol depende de su presencia en altas concentraciones y está relacionado con su propiedad intrínseca para atrapar ROS directamente. Esta potente actividad antirradical que poseen los estrógenos es independiente de su unión a receptor (Badeau et al., 2005), y despliega dos mecanismos de acción antioxidante. El primero de ellos es el resultado de la estructura hidrofénolica de la molécula de estradiol (un grupo hidroxilo en el anillo A). El estradiol puede donar átomos de hidrógeno de su grupo hidroxilo a peroxirradicales de lípidos, lo cual lleva a la terminación de la cadena de reacciones que produce daño oxidativo en los fosfolípidos de las membranas celulares. El segundo mecanismo está asociado con el efecto estimulador del 17β -estradiol sobre las enzimas antioxidantes celulares (Bednarek et al., 2002). Los estrógenos también son considerados como aceptores de electrones muy efectivos, capaces de bloquear la inducción de la fragmentación de DNA y de la peroxidación de lípidos *in vitro* (Thibodeau et al., 2002). Otras evidencias demostraron que el nivel de lípidos peroxidados disminuye proporcionalmente a la concentración de 17β -estradiol en homogenados de piel (Ukhina, 1993).

En este trabajo, el efecto protector de la hormona presentó una relación con las altas concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol alcanzadas a los 60 días.

XI. Efecto del 17β -estradiol sobre la actividad motora y la memoria

La actividad motora de las ratas controles presentó una disminución significativa con respecto a las ratas expuestas a los diferentes tiempos de exposición a ozono (Fig. 24). La administración de 17β -estradiol fue capaz de restaurar la actividad motora desde los 30 días de tratamiento. Estos datos apoyan otros trabajos que se han realizado con ratas macho sin gonadectomía en el mismo laboratorio, pero cabe recalcar que los efectos son más severos en el caso de las hembras ovariectomizadas.

En cuanto a la evaluación de la memoria de corto y de largo plazo los resultados indicaron una disminución de ambas en los grupos expuestos a ozono (Figs. 35 y 36, respectivamente). No obstante, la aplicación de estrógenos pudo mejorar considerablemente el déficit causado por el ozono en la memoria de corto plazo desde los 15 días, y en la de largo plazo únicamente a los 60 días. Es bien conocido que los

estrógenos modulan los procesos de aprendizaje en el hipocampo y el estriado a través de acciones independientes en estas estructuras (Zukurovsky, 2007).

Los estrógenos pueden interaccionar diferencialmente con los receptores dopaminérgicos D1 y D2 para modular la respuesta al aprendizaje. Esta acción directa de los estrógenos sobre la funcionalidad dopaminérgica puede regular el desempeño de las ratas en pruebas de aprendizaje (Daniel et al., 2006).

Los estrógenos son reguladores importantes de la plasticidad sináptica, debido a que estimulan la elongación de neuritas en las neuronas dopaminérgicas (Kupers et al., 2000).

En experimentos con ratas ovariectomizadas tratadas con neurotoxinas, el reemplazo de estradiol desplegó una mejora en la ejecución de pruebas de memoria de trabajo (Hruska y Dohanich, 2007).

En resumen, estos resultados demuestran que el efecto protector de los estrógenos sobre los procesos de memoria y aprendizaje estuvo relacionado con la acción de esta hormona a varios niveles, entre los cuales se encuentran el molecular, celular y bioquímico. Los diferentes niveles de acción del estradiol se manifestaron en una disminución del grado de estrés oxidativo, en una restauración de la morfología celular y en una protección de la muerte celular por varias vías. Finalmente, cabe destacar que todos estos efectos del 17β -estradiol, fueron dependientes de los altos niveles plasmáticos de la hormona, no obstante en el estriado ocurrieron de manera más temprana que en la *substantia nigra*.

XII. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas para este trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- La exposición crónica a bajas dosis de ozono causa un estado de estrés oxidativo el cual depende del tiempo de exposición a este gas, en el sistema nigroestriatal.
- El estrés oxidativo causado por exposición a ozono causa neurodegeneración progresiva en el sistema nigroestriatal.
- El efecto antioxidante del 17β -Estradiol en la *substantia nigra*, se presenta después de 60 días de administración, ya que depende del mantenimiento de niveles elevados de esta hormona en sangre y esta asociado con aumento en la expresión de receptores $ER\alpha$.
- El tratamiento con 17β -Estradiol tiene un efecto antiapoptótico mediado por un aumento en el BCL-2, una disminución en BAX, iNOS y citocromo c, en la *substantia nigra*.
- El efecto protector del 17β -Estradiol en el sistema nigroestriatal difiere entre *substantia nigra* y estriado, ya que en *substantia nigra* este efecto se presentó más tardíamente y requiere de dosis más altas de hormona, mientras que en estriado, el efecto se presentó desde los 30 días y requiere de una dosis de hormona más baja.
- El tratamiento con 17β -Estradiol en la *substantia nigra* presenta efectos protectores a los 60 días sobre las neuronas dopaminérgicas, pero no tienen ningún efecto sobre los astrocitos.
- El efecto del 17β -Estradiol sobre la expresión de COX-2 en *substantia nigra* causa una disminución, mientras que en el estriado causa un aumento.
- La exposición a ozono produjo un déficit de la actividad motora y la memoria, el cual pudo ser contrarrestado por la administración de 17β -Estradiol desde los 30 días.

REFERENCIAS

1. Abou-Sleiman PM, Mugit MMK, Wood W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Revs Neurosci* 7:207-19.
2. Adams JD, Jr., Klaidman LK, Ribeiro P. (1997). Tyrosine hydroxylase: mechanisms of oxygen radical formation. *Redox Rep* 3:273-279.
3. Angoa-Pérez M, Jiang H, Lemini C, Rodríguez AI, Levine R, Rivas-Arancibia S. (2006). Estrogen counteracts nigral ozone-induced oxidative stress and cell death. *NeuroReport* 17:629-633.
4. Anantharam V, Lehrmann E, Kanthasamy A, Yang Y, Banerjee P, Becker KG, Freed WJ, Kanthasamy AG. (2007). Microarray analysis of oxidative stress regulated genes in mesencephalic dopaminergic neuronal cells: Relevance to oxidative damage in Parkinson's disease. *Neurochem Int* 50:834-847.
5. Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT. (2005). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res* 52:119-132.
6. Aon MA, Cortassa S, Maack C, O'rourke B. (2007). Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status. *J Biol Chem* 283:21889-21900.
7. Arai Y, Sekine Y, Murakami S. (1996). Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci Res* 25:403-407.
8. Arbogast LA, Voogt JL. (1993). Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 58:501-510.
9. Arriagada C, Paris I, Sanchez de las Matas MJ, Martinez-Alvarado P, Cardenas S, Castaneda P, Gaumann R, Perez-Pastene C, Olea-Azar C, Couve E, Herrero MT, Caviedes P, Segura-Aguilar J. (2004). On the neurotoxicity mechanism of leucoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis and hydroxyl radical formation. *Neurobio Dis* 16:468-477.
10. Badeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P, Tikkanen MJ. (2005). Estrogen A-ring structure and antioxidative effect on lipoproteins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96:271-278.
11. Bagetta G, Chiappetta O, Amantea D, Iannone M, Rotiroti D, Costa A, Nappi G, Corasaniti MT. (2004). Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neurosci Lett* 368:87-91.
12. Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. (2004). Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 145:5021-5032.
13. Bader N, Grune T. (2006). Protein oxidation and proteolysis. *Biol Chem* 387:1351-5.
14. Barzilai A, Zilkha-Falb R, Daily D, Stern N, Offen D, Ziv I, Melamed E, Shirvan A. (2000). The molecular mechanism of dopamine-induced apoptosis: identification and characterization of genes that mediate dopamine toxicity. *J Neural Transm Suppl* 60:59-76.

15. Bazan NG. (2006). The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling. *Cell Mol Neurobiol*; 26:901-913.
16. Becker JB. (1999). Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens. *Pharm Biochem Behav* 64:803-812.
17. Bednarek-Tupikowska G. (2002). Antioxidant properties of estrogens. *Ginekol Pol* 73:61-67.
18. Behl C, Skutella T, Lezohualc'h F, Post A, Widmann M, Newton C, Holsboer F. (1997). Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharm* 51:535-541.
19. Behl C, Moosmann B. (1997). Estrogens and other antioxidants in neuroprotection: Implications for Alzheimer's disease. *Free Rad Brain Patophysiol* 467-485.
20. Behl C, Skutella T, Lezohuaalch F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. (1997). Neuroprotection against oxidative stress by estrogens structure activity relationship. *Mol Pharmacol* 51:535-541.
21. Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F. (2004). Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *JAMA* 292:2372-2378.
22. Berg D, Youdim MB, Riederer P. (2004). Redox imbalance. *Cell Tissue Res* 318:201-213.
23. Beyer C. (1999). Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embriol* 199:379-390.
24. Beyer C, karolczak M. (2000). Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/PKA signaling. *J Neurosci Res* 59:107-116.
25. Beyer C, Pilgrim C, Reisert I. (1991). Dopamine content and metabolism in mesencephalic and diencephalic cell cultures: sex differences and effects of sex steroids. *J Neurosci* 11:1325-1333.
26. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758:994-1003.
27. Binienda Z, Kim CS. (1997). Increase in levels of total free acids in rat brain region following 3-nitropropionic acid administration. *Neurosci Lett* 230:199-201.
28. Birzniece V, Bäckström T, Johansson IM, Lindblad C, Lundgren P, Löfgren M, Olsson T, Ragagnin G, Taube M, Turkmen S, Wahlström G, Wang MD, Wihlbäck AC, Zhu D. (2006). Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. *Brain Res Rev* 51:212-239.
29. Bisagno V, Bowman R, Luine V. (2003). Functional aspects of estrogen neuroprotection. *Endocrine* 21:33-41.
30. Bonnefont AB, Muñoz FJ, Inestrosa NI. (1998). Estrogen protects neuronal cells from the cytotoxic induced by acetylcholinesterase-amyloid complexes. *FEBS Lett* 441:220-224.
31. Borja-Aburto VH, Castillejos M, Gold DR, Bierzwinski S, Loomis D. (1998). Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environ Health Perspect* 106:849-855.

32. Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Shaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C, Chinnadurai G. (1994). Adenovirus E1B 19kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 7:341-351.
33. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. (2007). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72:381-405.
34. Calderón Guzmán D, Toledo López AR, Hernández Islas JL, Barragán Mejía R, A, Rodríguez Pérez RA, Hernández García E. (2001). Determinación de triptófano en cerebro de ratas expuestas a ozono. *Arch Neurociencia* 6:2-5.
35. Calne DB, Zigmond MJ. (1991). Compensatory mechanisms in degenerative neurologic diseases. Insights from parkinsonism. *Arch Neurol* 48:361-363.
36. Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Auricchio F. (1999). Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J* 18:2500-2510.
37. Chakravorty SG, Halbreich U. (1997). The influence of estrogen on monoamine oxidase activity. *Psychopharmacol Bull* 33:229-233.
38. Chan PH. (2001). Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:2-14.
39. Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
40. Chen ZH, Na HK, Hurh YJ, Surh YJ. (2005). 4-Hydroxyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: possible protection by NF-kappaB and ERK/MAPK. *Toxicol Appl Pharmacol* 208:46-56.
41. Cheepsunthorn P, Mairae N, Nasee K. (2006). Estrogen enhances the inhibitory effect of iron on microglial nitric oxide production. *J Med Assoc Thai* 89:840-845.
42. Chiarugi P, Fiaschi T. (2007). Redox signaling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal* 19:672-682.
43. Chiasson K, Lahaie-Collins V, Bournival J, Delapierre B, Gelinat S, Martinoli MG. (2006). Oxidative stress and 17-alpha- and 17-beta-estradiol modulate neurofilaments differently. *J Mol Neurosci* 30:297-310.
44. Chirino I, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev Inv Clin* 58:350-358.
45. Chiueh CC, Lee SY, Andoh T, Murphy D. (2003). Induction of antioxidative and apoptotic thioredoxin supports neuroprotective hypothesis of estrogen. *Endocrine* 21:27-32.
46. Conejo NM, González-Pardo H, Cimadevilla JM, Argüelles JA, Díaz F, Vallejo-Seco G, Arias JL. (2005). Influence of gonadal steroids on the glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocyte population in young rat hippocampus. *J Neurosci Res* 79:488-494.
47. Cross CE, Rznick AZ, Packer L, Davis PA, Susuki YJ, Halliwell B. (1992). Oxidative damage to human plasma proteins by ozone free radicals. *Res Commun* 15:347-352.
48. Daniel JM, Sulzer JK, Hulst JL. (2006). Estrogen increases the sensitivity of ovariectomized rats to the disruptive effects produced by antagonism of D2 but

- not D1 dopamine receptors during performance of a response learning task. *Horm Behav* 49:38-44.
49. Deby C, Groutier R. (1990). New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 39:399-405.
 50. De La Cruz CP, Revilla E, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A. (1996). Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free Radic Biol Med* 20:53-61.
 51. Del Rio MJ, Velez-Pardo C. (2002). Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF-kappaB), p53, c-Jun transcription factors. *Biochem Pharmacol* 63:677-688.
 52. Díaz-Véliz G, Benavides MS, Butrón S, Dussaubat N, Mora S. (1999). Behavioral effects of dopamine agonists and antagonists: influence of estrous cycle, ovariectomy, and estrogen replacement in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 62:21-29.
 53. Di Paolo T. (1994). Modulation of brain dopamine transmission by sex steroids. *Revs Neurosci* 5:27-42.
 54. Dykens JA, Moos WH, Howell N. (2005). Development of 17alpha-estradiol as a neuroprotective therapeutic agent: rationale and results from a phase I clinical study. *Ann N Y Acad Sci* 1052:116-135.
 55. Dluzen DE, Disshon KA, Mc Dermott JL. (1998). Estrogen as a modulator of striatal dopaminergic neurotoxicity. In *Recent Advances in neurodegenerative disorders*. pp. 149-192. Scottsdale, AZ: prominent Press
 56. Dluzen DE, Liu B, Chen CY, Di Carlo SE. (1995). Daily spontaneous running alters behavioral and neurochemical indexes of nigrostriatal function. *J App Physiol* 78:1219-1224.
 57. Dluzen DE. (2000). Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurocytol* 29:387-399.
 58. Doolen JF, Geddes GC, Blackstone NW. (2007). Multicellular redox regulation in an early-evolving animal treated with glutathione. *Physiol Biochem Zool* 80:317-325.
 59. Dribben W, Nemmers B, Nardi A, Taylor G, Olney J, Farber N. (2003). Chronic but not acute estradiol treatment protects against the neurodegenerative effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Endocrine* 21:53-58.
 60. Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Revs* 82:47-95.
 61. Ebadi M, Govitrapong P, Sharma S, Muralikrishnan d, Shavali s, Pellett L, Schafer R, Albano C, Eken K. (2001). Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of parkinson's disease. *Biol Signals Recept* 10:224-253.
 62. Fahn S. (2006). A new look at levodopa based on the ELLDOPA study. *J Neural Transm Suppl* 70:419-426.
 63. Falkenstein E, Tillman HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. (2003). Multiple Actions of Steroid Hormones- A Focus On Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacol Revs* 52:513-556.

64. Feldman R, Meyer J, Quenzer L. (1997). Principles of Neuropsychopharmacology. Part II. Dopamine Systems: Anatomy, Physiology and Behavior. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. Pp. 303-323.
65. Feyaldenhoven TE, Cadet JL, Ali SF. (1996). The dopamine depleting of MPTP in CD-1 mice are gender dependent. *Brain Res* 735:232-238.
66. Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C. (2003). Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:111-119.
67. Flora SJ. (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol* 53:1-2.
68. Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M. (2006). Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 79:136-171.
69. Gal S, Fridkin M, Amit T, Zheng H, Youdim MB. (2006). M30, a novel multifunctional neuroprotective drug with potent iron chelating and brain selective monoamine oxidase-ab inhibitory activity for Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 70:447-456.
70. Gelinas S, Bureau G, Valastro B, Massicotte G, Cicchetti F, Chiasson K, Gagne B, Blanchet J, Martinoli MG. (2004). Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotox Res* 6:141-148.
71. Gille G, Hung ST, Reichmann H, Rausch WD. (2004). Oxidative stress to dopaminergic neurons as models of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1018:533-540.
72. Gollapudi L, Oblinger MM. (1999). Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ER α transfected PC12 cells from apoptosis. *J Neurosci Res* 56:471-481.
73. Gonzalez-Pina R, Alfaro-Rodriguez A, Morales-Martinez JJ. (2003). The role of the dorsal raphe in the sleep disruptions produced by ozone exposure. *Proc West Pharmacol Soc* 46:116-120.
74. Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. (1996). Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury and amyloid B-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 66:1836-1844.
75. Graham DG. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14:633-643.
76. Green PS, Gridley KE, Simpkins JW. (1996). Estradiol protects against beta amyloid-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 218:165-168.
77. Gridley KE, Green PS, Simpkins JW. (1998). A novel, synergistic interaction between 17 β -estradiol and glutathione in the protection of neurons against beta amyloid-induced toxicity in vitro. *Mol Pharmacol* 54:874-880.
78. Gu QG, Moss RL. (1996). 17 β -estradiol potentiates kainite-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J Neurosci* 10:3620-3629.

79. Haavik J, Almas B, Flatmark T. (1997). Generation of reactive oxygen species by tyrosine hydroxylase: a possible contribution to the degeneration of dopaminergic neurons? *J Neurochem* 68:328-332.
80. Haavik J, Toska K. (1998). Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 16:285-309.
81. Halliwell B, Gutteridge JM. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 23:1396-1398.
82. Han HJ, Lee YH, Park SH. (2000). Estradiol 17beta-BSA stimulates Ca(2+) uptake through nongenomic pathways in primary rabbit kidney proximal tubule cells: involvement of cAMP and PKC. *J Cell Physiol* 183:37-44.
83. Harman D. (1956). Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.
84. Hashimoto M, Hossain S, Masumura S. (1999). Effect of aging on plasma membrane fluidity of rat aortic endothelial cells. *Exp Gerontol* 34:687-698.
85. Hool LC, Corry B. (2007). Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 9:409-435.
86. Hruska Z, Dohanich GP. (2007). The effects of chronic estradiol treatment on working memory deficits induced by combined infusion of beta-amyloid (1-42) and ibotenic acid. *Horm Behav* 52:297-306.
87. Hunter RL, Dragicevic N, Seifert K, Choi DY, Liu M, Kim HC, Cass WA, Sullivan PG, Bing G. (2007). Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem* 100:1375-1786.
88. Ibrahim W, Lee US, Yen HC, St Clair DK, Chow CK. (2000). Antioxidant and oxidative status in tissues of manganese superoxide dismutase transgenic mice. *Free Radic Biol Med* 28:397-402.
89. Ignarro LJ. (2002). Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53:503-514.
90. Impey s, Mark M, Villacre EC, Poser S, chavkin C, Storm DR. (1996). Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16:973-982.
91. Ivanova T, Beyer C. (2003). Estrogen regulates tyrosine hydroxylase expression in the neonate mouse brain. *J Neurobiol* 54:638-647.
92. Jenner P, Olanow CW. (1998). Understanding cell death in Parkinson's disease *Ann Neurol* 44:72-84.
93. Jimenez Del Rio M, Velez-Pardo C. (2000). 17beta-estradiol protects lymphocytes against dopamine and iron-induced apoptosis by a genomic-independent mechanism. Implication in Parkinson's disease. *Gen Pharmacol* 35:1-9.
94. Jin BK, Shin DY, Jeong MI, Gwag MI, Baik HW, Yoon KS Cho YH, Joo WS, Kim YS, Baik HH. (1998). Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from (MPP⁺) neurotoxicity in rats. *Neurosci Let* 245:61-64.
95. Jover-Mengual T, Zukin RS, Etgen AM. (2007). MAPK signaling is critical to estradiol protection of CA1 neurons in global ischemia. *Endocrinology* 148:1131-1143.

96. Kamsler A, Segal M. (2003). Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:269-276.
97. Kann O, Kovács R. (2007). Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C641-657.
98. Kastner A, Hirsch EC, Herrero MT, Javoy-Agid F, Agid Y. (1993). Immunocytochemical quantification of tyrosine hydroxylase at a cellular level in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 61:1024-1034.
99. Kato S, endoh H, Mshuiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, et al.. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen activated protein kinase. *Science* 270:1491-1494.
100. Kawano T, Kunz A, Abe T, Girouard H, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. (2007). iNOS-derived NO and nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1453-1462.
101. Kii N, Adachi N, Liu K, Arai T. (2005). Acute effects of 17beta-estradiol on oxidative stress in ischemic rat striatum. *J Neurosurg Anesthesiol* 17:27-32.
102. Kovacic P, Pozos RS. (2006). Cell signaling (mechanism and reproductive toxicity): redox chains, radicals, electrons, relays, conduit, electrochemistry, and other medical implications. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78:333-344.
103. Kramer BC, Mytilineou C. (2004). Alterations in the cellular distribution of bcl-2, bcl-x and bax in the adult rat substantia nigra following striatal 6-hydroxydopamine lesions. *J Neurocytol* 33:213-223.
104. Kritzer MF, Kohama SG. (1998). Ovarian hormones influence the morphology, distribution, and density of tyrosine hydroxylase immunoreactive axons in the dorsolateral prefrontal cortex of adult rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 395:1-17.
105. Küppers E, Ivanova T, Karolczak M, Beyer C. (2000). Estrogen: A multifunctional messenger to nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurocytol* 29:375-385.
106. Lammers CH, D'Souza U, Quin ZH, Lee SH, Yahima S, Mouradian MM. (1999). Regulation of striatal dopamine receptors by estrogen. *Synapse* 64:222-227.
107. Lacort M, Leal AM, Liza M, Martin C, Martínez R, Ruiz-Larrea MB. (1995). Protective effect of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage in vitro. *Lipids* 30:141-146.
108. Lechuga-Guerrero A, Dorado-Martínez C, Rodríguez IA, Pedroza-Rios K, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. (1999). Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *NeuroReport* 10:1689-1692.
109. Lee SH, Mouradian MM. (1999). Up-regulation of DA1 receptor gene transcription by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 156:151-157.
110. Lee SY, Moon Y, Hee Choi D, Jin Choi H, Hwang O. (2007). Particular vulnerability of rat mesencephalic dopaminergic neurons to tetrahydrobiopterin: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 25:112-120.

111. Leranath C, Roth RH, Elsworth JD, Naftolin F, Horvath TL, Redmond ED Jr. (2000). Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: Implications for Parkinson's disease and memory. *J Neurosci* 20:8604-8609.
112. Le Saux M, Morissette M, Di Paolo T. (2006). ERbeta mediates the estradiol increase of D2 receptors in rat striatum and nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 50:451-457.
113. Lin CH, Lin PH. (2006). Induction of ROS formation, poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and cell death by PCB126 and PCB153 in human T47D and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 162:181-194.
114. Linford N, Wade C, Dorsa D. (2000). The rapid effects of estrogen are implicated in estrogen-mediated neuroprotection. *J Neurocytol* 29:367.
115. Liu B, Xie J. (2004). Increased dopamine release in vivo by estradiol benzoate from the central amygdaloid nucleus of Parkinson's disease model rats. *J Neurochem* 90:654-658.
116. Liu H, Wang C, Li X, Xuan X, Jiang C, Cui H. (2007). A novel electro-fenton process for water treatment: reaction-controlled pH adjustment and performance assessment. *Environ Sci Technol* 41:2937-2942.
117. Liu R, Shao H, Pérez E, Kun DY, Wu S, Eberts K, Prokai L, Prokai-Tatrai K, Cai ZY, Covey DF, Arthur L, Simpkins JW. (2002). Neuroprotective effects of a novel non-receptor binding estrogen analogue: in vitro and in vivo analysis. *Stroke* 33:2485-2491.
118. Liu R, Wang X, Liu Q, Yang SH, Simpkins JW. (2007). Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of 17beta-estradiol when administered after cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 415:237-241.
119. Lloyd T, Weisz J. (1978). Direct inhibition of tyrosine hydroxylase activity by catechol estrogens. *J Biol Chem* 253:4841-4843.
120. Loomis DP, Borja-Aburto VH, Bangdiwala SI, Shy CM. (1996). Ozone exposure and daily mortality in Mexico City: a time-series analysis. *Res Rep Health Eff Inst* 75:1-37.
121. Lovenberg W, Levine RA, Robinson DS, Ebert M, Williams AC, Calne DB. (1979). Hydroxylase cofactor activity in cerebrospinal fluid of normal subjects and patients with Parkinson's disease. *Science* 204:624-626.
122. Maia L, Duarte RO, Ponces-Freire A, Moura JJ, Mira L. (2007). NADH oxidase activity of rat and human liver xanthine oxidoreductase: potential role in superoxide production. *J Biol Inorg Chem* 12:777-787.
123. Maggi A, Vegeto E, Brusadelli A, Belcredito S, Pollio G, Ciana P. (2000). Identification of estrogen target genes in human neural cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:319-325.
124. Magyar K, Szende B, Lengyel, J, Tarczalli J, Szatmary I. (1998). The neuroprotective and neurorescue effects of deprenyl. *J Neural Trans fSuppl* 52:109-123.
125. Marin C, Saldana M, Roca-Ferrer J, Bonastre M, Aguilar E, Mullol J. (2007). Striatal and nigral COX-2 expression after chronic typical and atypical neuroleptic administration in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:678-682.

126. McCord JM. (2000). Evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108:652-659.
127. Mc Ewen BS, Alves SE. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Revs* 20:279-307.
128. Marchetti B, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Cioni S, Gennuso F, Rocchitta G, Desole MS, Mazzarino MC, Miele E, Morale MC. (2005). Hormones are key actors in gene x environment interactions programming the vulnerability to Parkinson's disease: glia as a common final pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1057:296-318.
129. Marletta, M.A. (1999). Nitric oxide synthase: Function and mechanism, *Adv. Exp. Med. Biol* 338:281-284.
130. Martinez L, de Lacalle S. (2007). Astrocytic reaction to a lesion, under hormonal deprivation. *Neurosci Lett* 415:190-193.
131. Masuhiro Y, Mezaki Y, Sakari M, Takeyama K, Yoshida T, Inoue K, Yanagisawa J, Hanazawa S, O'malley BW, Kato S. (2005). Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8126-8131.
132. Mattson MP, Liu D. (2002). Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2:215-231.
133. Meda C, Vegeto E, Pollio G, Brusadelli A, Patrone C, Pellicciari C, Maggi A. (2000). Oestrogen prevention of neural cell death correlates with decreased expression of the pro-apoptotic protein nip-2. *J Neuroendocrinol* 12:1051-1059.
134. Méndez-Alvarez E, Soto-Otero R. (2004). Dopamine: a double-edged sword for the human brain. *Recent Res Devel Life Sci* 2:217-246.
135. Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ. (1996). Estradiol reduces calcium currents in rats neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci* 16:595-604.
136. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, De Falco a, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAPKinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15:1292-1300.
137. Miranda RC, Sohrajbi F. (1996). Gonadal steroid receptors: Possible roles in the etiology and therapy of cognitive and neurological disorders. *Ann Reprod Med Chem* 31:11-20.
138. Moosman B, Behl C. (1999). The antioxidant neuroprotective effects of estrogen and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *PNAS USA* 94:1482-1487.
139. Moosman B, Uhr M, Behl C. (1997). Neuroprotective potential of aromatic alcohols against oxidative cell death. *FEBS Lett* 423:467-472.
140. Morale MC, Serra PA, L'episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B. (2006). Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138:869-878.
141. Morissette M, García-Segura LM, Belanger A, Dipaolo T. (1992). Changes of rat striatal neuronal membrane morphology and steroid content during the estrous cycle. *PNAS USA* 94:1482-1487.

142. Moy LY, Alber DS, Sonsalla PK. (1998). Lowering ambient or core body temperature elevates striatal MPP⁺ levels and enhances toxicity to dopamine neurons in MPTP-treated mice. *Brain Res* 790:264-269.
143. Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Khoda K, Kaiya T. (1996). A novel enzyme enantio-selectively synthesizes (R)salsolinol, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol. *Neurosci Lett* 212:183-186.
144. Nilsen, J, Shuhua C, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD. (2006). Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci* 7:1471-1485.
145. Ohtani H, Nomoto M, Douchi T. (2001). Chronic estrogen treatment replaces striatal dopaminergic function in ovariectomized rats. *Brain Res* 900:163-168.
146. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
147. Park EM, Cho S, Frys KA, Glickstein SB, Zhou P, Anrather J, Ross ME, Iadecola C. (2006). Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:392-401.
148. Pasqualini C, Olivier V, Guibert B, Frain O, Leviel V. (1995). Acute stimulatory effect of estradiol on striatal dopamine synthesis. *J Neurochem* 65:1651-1657.
149. Pau KY, Hess DL, Kohama S, Bao J, Pau CY, Spies HG. (2000). Oestrogen upregulates noradrenaline release in the mediobasal hypothalamus and tyrosine hydroxylase gene expression in the brainstem of ovariectomized rhesus macaques. *J Neuroendocrinol* 12:899-909.
150. Paz C, Bazan-Pencins B. (1992). Sleep-wake disorganization in rats exposed to ozone. *Neurosci Lett* 40:270-272.
151. Pereyra-Muñoz N, Rugerio-Vargas C, Angoa-Pérez M, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. (2006). Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *J Chem Neuroanat* 31:114-123.
152. Perez Martinez S, Hermoso M, Farina M, Ribeiro ML, Rapanelli M, Espinosa M, Villalon M, Franchi A. (2006). 17-beta-Estradiol upregulates COX-2 in the rat oviduct. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80:155-164.
153. Perier C, Tieu K, Guégan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, Martinuzzi A, Hirano M, Przedborski S, Vila M. (2005). Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19126-19131.
154. Perier C, Bové J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, Rathke-Hartlieb S, Bouillet P, Strasser A, Schulz JB, Przedborski S, Vila M. (2007). Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8161-8166.
155. Perillo B, Sasso A, Abbondaza C, Palumbo G. (2000). 17beta-estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen responsive elements present in the coding sequence. *Mol Cell Biol* 20:2890-2091.
156. Poppek D, Grune T. (2006). Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid Redox Signal*. 8:173-84.

157. Prokai L, Simpkins JW. (2007). Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. *Pharmacol Ther.*114:1-12.
158. Quesada A, Romeo HE, Micevych P. (2007). Distribution and localization patterns of estrogen receptor-beta and insulin-like growth factor-1 receptors in neurons and glial cells of the female rat substantia nigra: localization of ERbeta and IGF-1R in substantia nigra. *J Comp Neurol* 503:198-208.
159. Qiu J, Bosch M, Tobias SC, Grande DK, Scanlan T, Ronnekleiv O, Kelly MJ. (2003). Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neuron involves a novel G-Protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 23:9529-9540.
160. Radi R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4003–4008.
161. Ramirez VD, Zheng J. (1996). Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Front Neuroendocrinol* 17:402-439.
162. Rangwala SM, Li X, Lindsley L, Wang X, Shaughnessy S, Daniels TG, Szustakowski J, Nirmala NR, Wu Z, Stevenson SC. (2007). Estrogen-related receptor alpha is essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function. *Biochem Biophys Res Commun* 357:231-236.
163. Revankar CM, Cimino CF, Sklar LA, Arteburn JB, Prossnitz ER. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307:1625-1630.
164. Riederer P, Rausch WD, Schmidt B, Kruzik P, Konradi C, Sofić E, Danielczyk W, Fischer M, Ogris E. (1988). Biochemical fundamentals of Parkinson's disease. *Mt Sinai J Med* 55:21-28.
165. Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Borgonio-Pérez G, Hiriart-Urdanivia M, Verdugo-Díaz L, Durán-Vázquez A, Colín-Barenque L, Avila-Costa MR. (2000). Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature and old rats. *Environ Res* 82:7-17.
166. Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Colín-Barenque L, Kendrick KM, de la Riva, C, Guevara-Guzmán R. (2003). Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharm Biochem Beh* 74:891:900.
167. Rusa R, alkayed NJ, Crain BJ, Traystman RJ, Kimes AS, London ED, Klaus JA, Hurn PD. (1999). 17beta-estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals. *Stroke* 30:1665-1670.
168. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. (2007). Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 9:49-89.
169. Saille C, Marin P, Martinou JC, Nicole A, London J, Ceballos-Picot -I. (1999). Transgenic murine cortical neurons expressing human BCL-2 exhibit increased resistance to amyloid beta-peptide neurotoxicity. *Neuroscience* 92: 1455-1463.
170. Sang N, Zhang J, Marcheselli V, Bazan NG, Chen C. (2005). Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J Neurosci* 25:9858-9870.

171. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 257:221-239.
172. Saunderson-Pullman R, Gordon-Elliot J, Parides M, Fahn S, Saunders HR, Bressman S. (1999). The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology* 22:1417-1421.
173. Sawada H, Shimohama S. (2003). Estrogen and Parkinson's disease: A novel approach for neuroprotection. *Endocrine* 21:77-80.
174. Sawada H, Shimohama S. (2000). Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Behav Rev* 24:143-147.
175. Sawada H, Kawamura T, Shimohama S, et al. (1996). Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rats mesencephalic cultures. *J Neurosci Res* 43:503-510.
176. Sayre LM, Smith MA, Perry G. (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8:721-738.
177. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823-827.
178. Schulz JB, Beal MF. (1994). Mitochondrial dysfunction in movement disorders. *Curr Opin Neurol* 4:333-339.
179. Schwela D. (2000). Air pollution and health in urban areas. *Rev Environ Health* 15:13-42.
180. Serova L, Rivkin M, Nakashima A, Sabban EL. (2002). Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat locus coeruleus. *Neuroendocrinology* 75:193-200.
181. Shih HC, Lin CL, Lee TY, Lee WS, Hsu C. (2006). 17beta-Estradiol inhibits subarachnoid hemorrhage-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by interfering with the nuclear factor kappa B transactivation. *Stroke* 37:3025-3031.
182. Shimizu S, Narita M, Sujimoto Y. (1999). BCL-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483-487.
183. Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. (1998). Modulation of Bcl-2 expression: A potential component of estrogen protection in NT2 cells neurons. *NeuroReport* 9:2565-2568.
184. Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM. (1996). Estrogen increases GAP-43 (Neuromodulin) mRNA in preoptic area of aged rats. *Neurobiol Aging* 17:661-663.
185. Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM. (1996). Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* 212:13-16.
186. Singh M, Setalo G, Jr, Guan, X, Warren M, Toran-Allerand CD. (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: Convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* 19:1179-1188.

187. Smythies J. (1998). The neurochemicals basis of learning and neurocomputation: The redox theory. *Behav Brain Res* 99:17-25.
188. Snait T, Sarit I, Jacob V. (2002). The effect of oxidative stress on ER α and ER β expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81: 327-332.
189. Soffler C. (2007). Oxidative stress. *Vet Clin North Am Equine Pract* 23:135-157.
190. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 28:R41-55.
191. Soulage C, Perrin D, Cottet-Emard JM, Pequignot J, Dalmaz Y, Pequignot JM. (2004). Central and peripheral changes in catecholamine biosynthesis and turnover in rats after a short period of ozone exposure. *Neurochem Int* 45:979-986.
192. Sribnick EA, Ray SK, Banik NL. (2006). Estrogen prevents glutamate-induced apoptosis in C6 glioma cells by a receptor-mediated mechanism. *Neuroscience* 137:197-209.
193. Stamler JS, Single D, Loscalzo J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902.
194. Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ. (1993). Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J Biol Chem* 268:15649-15654.
195. Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. (2005). Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol* 68:959-965.
196. Stone JR, Yang S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8:243-270.
197. Sugaya K, Chou S, Xu S, McKinney M. (1998). Indicator of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of an endotoxina. *Mol Brain Res* 58:1-9.
198. Suzuki S, Brown CM, Wise PM. (2006). Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29:209-215.
199. Szabo C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 140–141:105–112.
200. Szabo C, Pacher P, Swanson RA. (2006). Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. *Trends Pharmacol Sci* 27:626-630.
201. Szego EM, Barabás K, Balog J, Szilágyi N, Korach KS, Juhász G, Abrahám IM. (2006). Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J Neurosci* 26:4104-4110.
202. Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, Tohyama M. (1999). Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF-KB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem* 274:8531-8538.

203. Tamura M, Deb S, Sebastian S, Okamura K, Bulun SE. (2004). Estrogen up-regulates cyclooxygenase-2 via estrogen receptor in human uterine microvascular endothelial cells. *Fertil Steril* 81:1351-1356.
204. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R431–R444.
205. Thibodeau PA, Kachadourian R, Lemay R, Bisson M, Day BJ, Paquette B. (2002). In vitro pro- and antioxidant properties of estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81:227-236.
206. Thompson TL, Certain ME. (2005). Estrogen mediated inhibition of dopamine transport in the striatum: regulation by G alpha i/o. *Eur J Pharmacol* 511:121-126.
207. Tomas-Camardiel M, Sanchez-Hidalgo MC, Sanchez del Pino MJ, Navarro A, Machado A, Cano J. (2002). Comparative study of the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone and 17beta-estradiol against 1-methyl-4-phenylpyridium toxicity on rat striatum. *Neuroscience* 109:569-584.
208. Tranquilli AL, Mazzanti L, Cougini AM, Cester N, Garzetti GG, Romanini C. (1995). Transdermal estradiol and medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy are both antioxidants. *Gynecol Endocrinol* 9:137-141.
209. Toran-Allerand CD. (2004). Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol. *Exp Gerontol* 39:1579-1586.
210. Tseng JY, Kolb PE, Raskind MA, Miller MA. (1997). Estrogen regulates galanin but not tyrosine hydroxylase gene expression in the rat locus ceruleus. *Brain Res Mol Brain Res* 50:100-106.
211. Tunez I, Collado JA, Medina FJ, Pena J, Del C Munoz M, Jimena I, Franco F, Rueda I, Feijoo M, Muntane J, Montilla P. (2006). 17beta-Estradiol may affect vulnerability of striatum in a 3-nitropropionic acid-induced experimental model of Huntington's disease in ovariectomized rats. *Neurochem Int* 48:367-373.
212. Ukhina TV, Kalmagambetova GZ. (1993). Effect of estradiol on lipid peroxidation in skin. *Biull Eksp Biol Med* 115:362-364.
213. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40.
214. van Deel ED, Merkus D, van Haperen RJ, de Waard MC, de Crom R, Duncker DJ. (2007). Vasomotor control in mice overexpressing human endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1144-H1153.
215. Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani A, Ciana P, Maggi A. (2001). Estrogens prevents the lipopolysaccharide-Induced Inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 21:1809-1818.
216. Vina J, Sastre J, Pallardo FV, Gambini J, Borras C. (2006). Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free Radic Res* 40:1359-1365.

217. Wallace DR, Dodson S, Nath A, Booze RM. (2006). Estrogen attenuates gp120- and tat1-72-induced oxidative stress and prevents loss of dopamine transporter function. *Synapse* 59:51-60.
218. Weaver CE Jr, Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH. (1997). 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res* 761:338-341.
219. Xia S, Cai ZY, Thio LL, Kim-Han JS, Dugan LL, Covey DF, Rothman SM. (2002). The estrogen receptor is not essential for all estrogen neuroprotection: new evidence from a new analog. *Neurobiol Dis* 9:282-293.
220. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1325-1331.
221. Xiao L, Becker JB. (1997). Hormonal activation of the striatum and the nucleus accumbens modulates paced mating behavior in the male rat. *Horm Behav* 32:114-124.
222. Xiao-Qing T, Jun-Li Z, Yu C, Jian-Qiang F, Pei-Xi C. (2005). Hydrogen peroxide preconditioning protects PC12 cells against apoptosis induced by dopamine. *Life Sci* 78:61-66.
223. Xu X, Zhang Z. (2006). Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sci* 79:1553-1560.
224. Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. (2007). Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. *J Neurosci* 27:1422-1433.
225. Zhong LT, Kane, DJ Bredesen DE. (1993). BCL-2 blocks glutamate toxicity in neural cell lines. *Brain Res Mol Brain Res* 19:353-355.
226. Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM. (1996). Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinol* 137:2163-2166.
227. Zurkovsky L, Brown SL, Boyd SE, Fell JA, Korol DL. (2007). Estrogen modulates learning in female rats by acting directly at distinct memory systems. *Neuroscience* 144:26-37.