

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y
NEUROCIENCIA



LA RESPUESTA GLIAL A ESTÍMULOS INFLAMATORIOS:
DIFERENCIAS SEXUALES Y REGULACIÓN POR
MODULADORES DE LA ESTEROIDOGÉNESIS
Y COMPUESTOS ESTROGÉNICOS

Memoria para optar al grado de Doctor en Neurociencia que presenta

MARÍA SANTOS GALINDO

Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección del
Dr. Luis Miguel García Segura

MADRID, 2012

Luis Miguel García Segura. Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CERTIFICA:

Que Dña. María Santos Galindo, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título:

“La respuesta glial a estímulos inflamatorios: diferencias sexuales y regulación por moduladores de la esteroidogénesis y compuestos estrogénicos.”

Considero que este trabajo es satisfactorio y apto para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid, a 8 de Febrero de 2012.

Fdo. Luis Miguel García Segura

Profesor de Investigación CSIC

Este trabajo ha sido realizado con cargo a proyectos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF205-00272), del ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-02950-C03-01) y de la Unión Europea (proyecto EWA LSHM-CT-2005-518245).

María Santos Galindo ha recibido financiación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, dentro del Programa “Junta para la Ampliación de Estudios” (JAE_Pre).

Índice

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	13
<u>1.- LAS CÉLULAS GLIALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</u>	15
1.1.- La astrogliá y la microglía en reposo	16
1.2.- La gliosis: respuesta de la astrogliá y la microglía al daño en el sistema nervioso central	17
<u>2.- LA MITOCONDRIA: MORFOLOGÍA, FUNCIÓN, IMPLICACIÓN EN LA ESTEROIDOGÉNESIS Y ESTRÉS OXIDATIVO</u>	20
2.1.- La función mitocondrial: fosforilación oxidativa	20
2.2.- Las proteínas translocadoras de colesterol: StAR Y TSPO	20
2.3.- La regulación de la morfología mitocondrial	22
2.4.- El estrés oxidativo en el SNC	23
<u>3.- ESTEROIDOGÉNESIS, HORMONAS SEXUALES Y EFECTOS NEUROPROTECTORES</u>	24
3.1.- La esteroidogénesis	24
3.2.- La testosterona y el estradiol: estructura molecular y síntesis	25
3.2.1.- La aromatasa: transformación de la testosterona en estradiol	26
3.2.2.- Mecanismos de acción de las hormonas sexuales	27
3.2.2.1.- Los receptores nucleares de estrógeno	28
3.3.- Efectos neuroprotectores del estradiol	29
3.4.- Los SERMs	31
3.4.1.- El tamoxifeno	32
3.4.2.- El raloxifeno	34
3.4.3.- El ospemifeno	34
3.4.4.- El bazedoxifeno	34
3.4.5.- El fispemifeno	34
<u>4.- DIFERENCIAS SEXUALES: IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DEL SNC Y EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS</u>	35
4.1.- Desarrollo sexual	35
4.2.- Diferenciación sexual del cerebro. Efectos organizadores y efectos activadores de las hormonas gonadales	36
4.3.- La testosterona perinatal	38
4.4.- Diferencias sexuales en las enfermedades neurodegenerativas	39

Índice

<u>5.- EL PROCESO NEUROINFLAMATORIO. MODELOS EMPLEADOS</u>	41
5.1.- Tipos de neuroinflamación.	41
5.2.- Células del SNC implicadas en la inflamación	42
5.3.- Las citoquinas y las quemoquinas	43
5.4.- Modelos de neuroinflamación empleados	44
5.4.1.- Modelos de administración de LPS	44
5.4.1.1.-Administración de LPS a astrocitos en cultivo	45
5.4.1.2.- Administración sistémica de LPS	46
5.4.2.- El modelo de lesión penetrante	46
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	55
<u>1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO</u>	57
<u>2. DISEÑOS EXPERIMENTALES</u>	57
2.1.- Efectos del LPS sobre astrocitos corticales primarios provenientes de machos o hembras	57
2.2.- Efectos del LPS sobre astrocitos corticales primarios provenientes de hembras inyectadas con propionato de testosterona o vehículo	58
2.3.- Efecto del ligando de la TSPO Ro5-4864 sobre la respuesta de los astrocitos corticales al LPS	59
2.4.- Efecto de distintos compuestos estrogénicos sobre la respuesta de los astrocitos corticales al LPS	60
2.5.- Efectos de la administración de LPS <i>in vivo</i> en machos, hembras y hembras tratadas perinatalmente con propionato de testosterona	60
2.6.- Efecto de los SERMs sobre la reactividad microglial en un modelo <i>in vivo</i> de inflamación periférica	62
2.7.- Efecto del tiempo de ovariectomía, el estradiol y los SERMs sobre la reactividad glial tras lesión penetrante en rata	63
<u>3. MÉTODOS</u>	66
3.1.- Cultivo de astrocitos corticales de ratón CD1	66
3.2.- Cultivo de astrocitos corticales de ratón Balb/c	67
3.3.- Androgenización perinatal	67
3.4.- Ovariectomía de rata Wistar	67
3.5.- Lesión penetrante de la corteza parietal y el hipocampo anterior dorsal en rata Wistar	68

3.6.- Sacrificio	69
3.6.1.- Perfusión de rata Wistar	69
3.6.2.- Decapitación de ratón CD1	69
3.7.-Extracción de ARN	69
3.8.-Retrotranscripción	69
3.9.- Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR)	70
3.9.1.-RT-PCR en termociclador ABI Prism 7500 Thermal Cycler	70
3.9.1.1.- Diseño de oligonucleótidos cebadores específicos (primers)	70
3.9.1.2.- Validación de los oligonucleótidos cebadores: realización de curvas estándar (o curvas patrón) y elección del control endógeno	71
3.9.1.3.- RT-PCR	71
3.9.2.-RT-PCR con el sistema de detección iQ5	72
3.10.-Inmunohistoquímica	74
3.10.1.- Inmunohistoquímica simple	74
3.10.2.- Inmunohistoquímica doble de fluorescencia con marcaje para BrdU	75
3.10.3.- Inmunohistoquímica doble con marcaje para BrdU y MHC-II mediante revelado con DAB-Ni	75
3.10.4.- Controles de especificidad	76
3.11.- Análisis morfométrico	78
3.11.1.- Técnica del disector óptico	78
3.11.2.- Fracción de volumen de células inmunorreactivas para MHC-II.	79
3.11.3.- Colocalización con BrdU	79
3.12.- Análisis estadístico	80
RESULTADOS	85
<u>1.- DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS</u>	87
1.1.- NIVELES BASALES DE LOS MARCADORES ESTUDIADOS	87
1.1.1.- Marcadores relacionados con inflamación	87
1.1.2.- Marcadores relacionados con la transducción de la señal inflamatoria	87
1.1.3.- Marcadores relacionados con la esteroidogénesis	89
1.1.4.- Marcadores relacionados con la señal estrogénica	89
1.1.5.- Marcadores relacionados con la función mitocondrial	89
1.1.6.- Marcadores relacionados con la morfología mitocondrial	89
1.1.7.- Marcadores de proliferación y apoptosis	91
1.1.8.- Ratio Drp1/Fis1, Pcna/Bax y Bcl2/Bax	91
1.1.9.- Resumen de los resultados	92

Índice

1.2.- EFECTO DEL LPS EN CULTIVOS DE ASTROCITOS PROCEDENTES DE MACHOS Y HEMBRAS	93
1.2.1.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con inflamación	93
1.2.2.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la transducción de la señal inflamatoria	94
1.2.3.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la esteroidogénesis	94
1.2.4.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la señal estrogénica	95
1.2.5.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la función mitocondrial	95
1.2.6.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la morfología mitocondrial	95
1.2.7.- Efecto del LPS sobre marcadores de proliferación y apoptosis	97
1.2.8.- Efecto del LPS sobre la ratio Drp1/Fis1, PcnA/Bax y Bcl2/Bax	97
1.2.9.- Resumen de los resultados	97
<u>2.- EFECTO DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA SOBRE LA RESPUESTA AL LPS DE CULTIVOS ASTROCITARIOS CORTICALES PROCEDENTES DE HEMBRAS</u>	98
2.1.- EFECTO DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA ADMINISTRADO <i>IN VIVO</i> SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS CORTICALES FEMENINOS	98
2.1.1.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con inflamación	98
2.1.2.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la transducción de la señal inflamatoria	98
2.1.3.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la esteroidogénesis	100
2.1.4.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la señal estrogénica	100
2.1.5.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la función mitocondrial	101
2.1.6.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la morfología mitocondrial	101
2.1.7.- Efecto del PT sobre marcadores de proliferación y apoptosis	101
2.1.8.- Efecto del PT sobre la ratio Drp1/Fis1, PcnA/Bax y Bcl2/Bax	103
2.1.9.- Resumen de los resultados	103
2.2.- EFECTO DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA ADMINISTRADO <i>IN VIVO</i> SOBRE LA RESPUESTA AL LPS DE CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS CORTICALES FEMENINOS	103
2.2.1.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con inflamación en respuesta al LPS	104
2.2.2.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la transducción de la señal inflamatoria en respuesta al LPS	104

2.2.3.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la esteroidogénesis en respuesta al LPS	104
2.2.4.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la señal estrogénica en respuesta al LPS	106
2.2.5.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la función mitocondrial en respuesta al LPS	107
2.2.6.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la morfología mitocondrial en respuesta al LPS	107
2.2.7.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores de proliferación y apoptosis en respuesta al LPS	107
2.2.8.- Efecto del PT sobre el ratio Drp1/Fis1, Pcna/Bax y Bcl2/Bax en respuesta al LPS	109
2.2.9.- Resumen de los resultados	109
<u>3.- EFECTO DEL LIGANDO DE LA TSPO RO5-4864 SOBRE LA RESPUESTA AL LPS DE LOS ASTROCITOS CORTICALES</u>	110
<u>4.- EFECTO DE DISTINTOS COMPUESTOS ESTROGÉNICOS SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS</u>	112
4.1.- EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS	112
4.1.1.- Efecto del estradiol en solitario	112
4.1.2.- Efecto del estradiol sobre la respuesta de los astrocitos al LPS	112
4.2.- EFECTO DEL LETROZOL SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS	112
4.2.1.- Efecto del letrozol en solitario	112
4.2.2.- Efecto del letrozol sobre la respuesta de los astrocitos al LPS	113
4.3.- EFECTO DEL TAMOXIFENO SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS	117
4.3.1.- Efecto del tamoxifeno en solitario	117
4.3.2.- Efecto del tamoxifeno sobre la respuesta de los astrocitos al LPS	117
4.4.- EFECTO DEL RALOXIFENO SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS	117
4.4.1.- Efecto del raloxifeno en solitario	117
4.4.2.- Efecto del raloxifeno sobre la respuesta de los astrocitos al LPS	117

Índice

<u>5.- EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS <i>IN VIVO</i> EN MACHOS, HEMBRAS Y HEMBRAS TRATADAS PERINATALMENTE CON PROPIONATO DE TESTOSTERONA</u>	119
5.1.- DIFERENCIAS SEXUALES EN EL PESO CORPORAL BASAL Y TRAS ADMINISTRACIÓN DE LPS EN RATÓN CD1 PREPUBERAL	119
5.2.- DIFERENCIAS SEXUALES Y EFECTO DEL PT EN LA RESPUESTA AL LPS DE RATONES CD1 PREPUBERALES	121
5.2.1.- Niveles basales	121
5.2.2.- Efecto del LPS	122
<u>6.- EFECTO DE LOS SERMS SOBRE LA REACTIVIDAD MICROGLIAL EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE INFLAMACIÓN PERIFÉRICA</u>	125
6.1.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EN SOLITARIO DE SERMs SOBRE LA REACTIVIDAD MICROGLIAL	125
6.2.- EFECTO DE LOS SERMs SOBRE LA REACTIVIDAD MICROGLIAL TRAS UN ESTÍMULO INFLAMATORIO	125
<u>7.- EFECTO DE LA EDAD, EL TIEMPO DE OVARIECTOMÍA, EL ESTRADIOL Y LOS SERMs SOBRE LA REACTIVIDAD GLIAL TRAS LESIÓN CEREBRAL PENETRANTE EN RATA</u>	131
7.1.- ESTUDIO EN ANIMALES JÓVENES	132
7.1.1.- Efecto de los SERMs sobre la reactividad glial tras lesión cerebral penetrante	132
7.1.2.- Efecto de los SERMs sobre la proliferación glial tras lesión cerebral penetrante	133
7.1.3.- Efecto de los agonistas selectivos de ER α (PPT) y ER β (DPN) sobre la reactividad glial tras lesión cerebral penetrante	135
7.1.4.- Efecto del PPT y el DPN sobre la proliferación glial tras lesión cerebral penetrante	135
7.2.- EFECTO DE LA EDAD, EL TIEMPO TRAS LA OVARIECTOMÍA, EL ESTRADIOL Y LOS SERMs SOBRE LA RESPUESTA DE LA GLÍA REACTIVA A UNA LESIÓN CEREBRAL PENETRANTE	136

7.2.1.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre el peso corporal	136
7.2.2.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre la reactividad astrogial	137
7.2.3.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre la reactividad microglial	139
DISCUSIÓN	143
<u>1.- DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS. REGULACIÓN POR MODULADORES DE LA ESTEROIDOGÉNESIS</u>	145
<u>2.- EFECTO DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA SOBRE LA RESPUESTA AL LPS DE CULTIVOS ASTROCITARIOS CORTICALES PROCEDENTES DE HEMBRAS</u>	152
<u>3.- EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS <i>IN VIVO</i> EN MACHOS, HEMBRAS Y HEMBRAS TRATADAS PERINATALMENTE CON PROPIONATO DE TESTOSTERONA</u>	158
<u>4.- EFECTO DE LOS SERMs SOBRE LA GLÍA REACTIVA</u>	161
4.1 EFECTO DEL ESTRADIOL Y LOS SERMs SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES EN CULTIVO AL LPS	162
4.2 EFECTO DE LOS SERMs SOBRE LA GLÍA REACTIVA <i>IN VIVO</i>	164
4.2.1.-Efecto de los SERMs sobre la microglía reactiva en un modelo de administración sistémica de LPS	165
4.2.2.- Efecto de los SERMs, la edad y el tiempo de ovariectomía sobre la glía reactiva en un modelo de lesión cerebral penetrante	167
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	181

RESUMEN

La neuroinflamación es un proceso que acompaña a las enfermedades neurodegenerativas y en el que están implicadas las células gliales, que se activan en respuesta al daño del sistema nervioso central cambiando su morfología y modificando su expresión génica. Por otra parte, las enfermedades neurodegenerativas presentan diferencias sexuales en su manifestación, en las que también podría participar la glía. El origen de las diferencias sexuales en la patología cerebral puede recaer tanto en la carga genética de cada individuo como en las acciones organizadoras y activadoras de las hormonas gonadales, que ejercen sus efectos desde estadios tempranos del desarrollo, teniendo una gran importancia la acción organizadora de la testosterona en los machos. Además de sus acciones durante el desarrollo, las hormonas sexuales ejercen efectos neuroprotectores en el cerebro, tanto sobre las neuronas como la glía. El papel neuroprotector del estradiol ha sido ampliamente demostrado, pero ejerce efectos deletéreos sobre otros tejidos, lo que ha impulsado el desarrollo de moléculas capaces de ejercer efectos agonistas o antagonistas a los del estradiol de forma específica de tejido. Dichos compuestos han sido denominados moduladores selectivos de los receptores de estrógeno o SERMs. Las células gliales contienen toda la maquinaria necesaria para la síntesis de hormonas sexuales, participando activamente en la esteroidogénesis local en el sistema nervioso central. La esteroidogénesis comienza en la mitocondria, el orgánulo encargado del abastecimiento energético de la célula, y allí tiene lugar su primera etapa limitante, la translocación del colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna.

En el presente trabajo, se han estudiado las diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de los astrocitos en cultivo, midiendo la expresión de ARNm de marcadores relacionados con la inflamación, la esteroidogénesis, la transducción de la señal estrogénica y la función y morfología mitocondrial. También se ha analizado el papel que en dichas diferencias ejerce la testosterona perinatal. También se ha analizado el efecto que sobre la respuesta inflamatoria astrogliar pudieran ejercer un ligando de la proteína translocadora del colesterol en la mitocondria, un inhibidor de la síntesis de estradiol y varios compuestos estrogénicos. Se han detectado diferencias sexuales en la respuesta astrogliar a la inflamación *in vitro*, algunas de las cuales resultaron análogas a las observadas tras el tratamiento perinatal con testosterona en animales hembra. Sin embargo, los tratamientos administrados no modificaron en líneas generales la respuesta inflamatoria, de tal forma que no se observaron efectos neuroprotectores de estas moléculas *in vitro*.

Asimismo, se han estudiado las diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de la corteza de ratones prepuberales *in vivo*, demostrando que la respuesta del tejido completo no se debe exclusivamente a la observada en los astrocitos. Aunque no

Resumen

fueran idénticas a las previamente observadas en los astrocitos *in vitro*, se detectaron diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de la corteza cerebral *in vivo*, algunas de las cuales también tuvieron su origen en la testosterona perinatal.

Finalmente, se estudió el efecto del estradiol y varios SERMs sobre la reactividad glial en dos modelos *in vivo*. En un modelo de inflamación sistémica, los SERMs redujeron la microglía reactiva en condiciones basales, incrementaron la microglía reactiva en condiciones de inflamación o tuvieron ambos efectos. En un modelo de lesión cerebral penetrante, los SERMs redujeron la reactividad de la astrogliá y la microglía. La reducción de la reactividad glial observada en este modelo probablemente implica la acción de los receptores clásicos de estrógeno, puesto que el tratamiento con agonistas selectivos de los mismos dio lugar a un efecto equivalente al ejercido por los compuestos estrogénicos. La respuesta astrogliá al daño traumático estuvo influenciada por la edad y el tiempo previo de privación de hormonas gonadales, puesto que dicha respuesta se exacerbó en animales de avanzada edad y se acentuó todavía más en animales con ovariectomía de larga duración.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADP: adenosín difosfato
AF: función de activación
ANOVA: análisis de la varianza
ApoE: apolipoproteína E
APP: proteína precursora de β -amiloide
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: adenosín trifosfato
B7-1: moléculas co-estimuladoras
Bad: proteína promotora de muerte asociada a Bcl2
Bak: proteína antagonista homóloga a Bcl2
Bax: proteína X asociada a Bcl2
Bcl2: proteína de linfoma de célula B 2
Bcl-XL: proteína de linfoma de célula B 2 extra grande
bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico
BLAST: herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
BrdU: bromo desoxiuridina
BSA: albúmina de suero bovino
CA: áreas del hipocampo *Cornu Ammonis*
CAMK: Calcio-calmodulina quinasa
CoQ: coenzima Q
Cox: citocromo c oxidasa
CoxIV1: citocromo c oxidasa, subunidad IV, isoforma 1
CoxIV2: citocromo c oxidasa, subunidad IV, isoforma 2
Cyt c: citocromo c
DAB: diaminobencidina
DHEA: dihidroepiandrosterona
DHT: dihidrotestosterona
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTPs: Desoxirribonucleósido trifosfato
DPN: día post-natal
DPN: 2,3-bis(4-Hidroxifenil)-propionitrilo
Drp1: proteína relacionada con la dinamina 1

Abreviaturas

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ER α : receptor de estrógenos α

ER β : receptor de estrógenos β

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido

FBS: suero fetal bovino

Fis1: homólogo de fisión (membrana mitocondrial externa)

GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

GDNF: factor neurotrófico derivado de células gliales

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

GPR30: receptor acoplado a proteínas G 30

GTPasas: guanosina trifosfatasa

IFN: interferón

IGF: factor de crecimiento similar a insulina

IgG: inmunoglobulina G

IHQ: inmunohistoquímica

I κ B α : Inhibidor de κ B α

IL: interleuquina

IL1/TLR: receptor de interleuquina1/ toll-like

Insl-3: péptido similar a la insulina 3

IP10 o Cxcl 10: proteína inducible por interferón 10

LBD: dominio de unión al ligando

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPS: lipopolisacárido

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

Mfn1: Mitofusina 1

Mfn2: Mitofusina 2

MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad I

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad II

MIS: hormona anti-Mülleriana.

M-MLV: transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NF- κ B: factor de transcripción nuclear κ B

NG2: Proteoglicano condroitina sulfato

NGF: factor de crecimiento nervioso

NLS: secuencia de localización nuclear

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintetasa
OGD: privación de oxígeno y glucosa
OPA1: proteína homóloga de atrofia óptica 1
OVX: ovariectomía
P450-scc: enzima de la escisión de la cadena lateral de colesterol
PBR: receptor periférico de benzodiazepinas
PBS: tampón fosfato salino
Pcna: antígeno nuclear de células en proliferación
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PGE2: prostaglandina-E2
PI3K: Fosfatidil inositol 3 kinasa
PKA: proteína quinasa A
PKC: proteína quinasa C
PPT: 4,4',4''-(4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triyl)trisfenol
PT: propionato de testosterona
RE: receptor de estrógeno
RNS: especie reactiva de nitrógeno
ROS: especie reactiva de oxígeno
RQ: "relative quantity", cantidad relativa
RT: retrotranscripción
RT-PCR: PCR "real-time", en tiempo real
SEM: error estándar de la media
SERMs: moduladores selectivos de los receptores de estrógeno
SHAM: operación simulada
SNC: sistema nervioso central.
SQ: "starting quantity", cantidad de inicio
Sry: región determinante del sexo en el cromosoma Y
StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
TGF: factor de crecimiento transformante
TLR4: receptor "toll-like" 4
TNF: factor de necrosis tumoral
TSPO: proteína translocadora de 18 kDa
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
Vim: vimentina
17 β HSD: 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
18S: ARN ribosomal 18S

Abreviaturas



INTRODUCCIÓN

1.- LAS CÉLULAS GLIALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La palabra glía procede del griego *γλία*, cuyo significado es pegamento. Su existencia fue descrita por primera vez en 1856, cuando Rudolf Virchow reconoció la presencia de un componente intersticial o tejido conjuntivo en el sistema nervioso envolviendo los componentes neuronales y que denominó *Nervenkitz* o neuroglía. A lo largo de la segunda mitad del siglo XIX se identificaron y clasificaron estas células no neuronales, de tal forma que a principios del siglo XX quedaron definidos los tres tipos principales de células gliales en el sistema nervioso central (SNC): astrocitos, microglía y oligodendrocitos (*Fig. 1*). La proporción relativa de cada uno de estos tipos celulares varía con la especie, la región cerebral e incluso con la edad (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998).

Durante mucho tiempo las células gliales han sido consideradas un simple soporte de la estructura del tejido nervioso. Sin embargo, hoy en día el concepto sobre sus funciones en el cerebro ha cambiado y se les atribuye una participación más activa en la modulación y transmisión de la señales nerviosas (Kirchhoff *et al*, 2001; Perea y Araque, 2005, 2006, 2007).

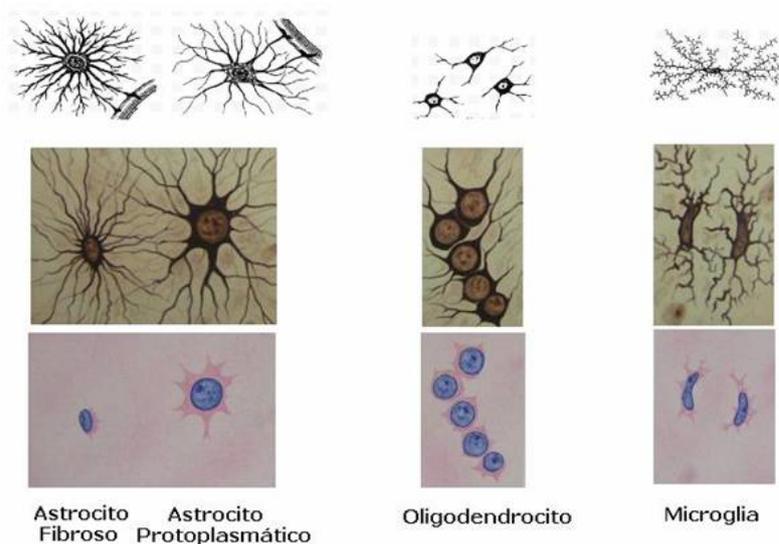


Figura 1. Principales tipos gliales del SNC humano (Imagen adaptada de Gilroy *et al*, 2011).

Durante el desarrollo embrionario, la glía radial es precursora de las neuronas y dirige su migración. En el organismo adulto, los oligodendrocitos sintetizan y mantienen las vainas de mielina que recubren los axones, facilitando la propagación del impulso nervioso. La microglía constituye el sistema inmune del cerebro por su capacidad de respuesta ante la invasión de microorganismos y su capacidad

Introducción

fagocítica. La astrogliá proporciona el soporte nutricional y trófico a las neuronas vecinas y modula su actividad sináptica, regulando los niveles extracelulares de iones y neurotransmisores y mediante la liberación de gliotransmisores (Perea y Araque 2006, 2007; Noctor *et al*, 2007; Theodosios *et al*, 2008; Nave y Trapp, 2008; Kielian, 2008). En condiciones fisiológicas, las células gliales desempeñan funciones tales como la producción de factores neurotróficos, la regulación de la homeostasis del entorno neuronal, el mantenimiento de la capacidad de señalización de las células nerviosas y la regulación de las sinapsis. Sin embargo, en situaciones de daño al sistema nervioso, ya sea por inflamación, lesión traumática, neurodegeneración o envejecimiento, la glía posee la capacidad de responder, experimentando cambios morfológicos y funcionales acompañados por la producción de citoquinas pro-inflamatorias y dando lugar a la denominada “gliosis reactiva o glía activada” (Raivich *et al*, 1999). La astrogliá y la microgliá son las dos mayores poblaciones de células gliales reactivas (Streit *et al*, 1999). No toda la glía responde de la misma manera cuando se produce un daño neuronal, de tal manera que los oligodendrocitos maduros no muestran cambios reactivos después de lesiones en el SNC.

1.1.- LA ASTROGLÍA Y LA MICROGLÍA EN REPOSO

Los astrocitos son células derivadas del ectodermo que aparecen durante las etapas más tempranas del desarrollo del SNC, atravesando una fase bipolar y otra monopolar, para finalmente transformarse en astrocitos maduros y multipolares (Mission *et al*, 1991; Steindler y Laywell, 2003; Morest y Silver, 2003). Históricamente han sido consideradas como células de sostén al servicio de las neuronas, puesto que realizan funciones como el mantenimiento del equilibrio iónico y el pH extracelular, la aportación de glucosa y sustratos metabólicos a las neuronas y la retirada de productos de desecho del metabolismo y la neurotransmisión. Asimismo, se han descrito más funciones astrocitarias que les dan peso específico para el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. Así, los astrocitos determinan la arquitectura del SNC (Bushong *et al*, 2002, 2004), responden a señales neuronales aumentando sus niveles de calcio intracelular (Ding *et al*, 2007) y liberan señales que regulan la fuerza y la función de las sinapsis (Araque *et al*, 1998, 2002; Newman, 2003), modulando la actividad sináptica (Perea y Araque, 2005, 2006, 2007). Los cambios en los niveles de calcio intracelular se transmiten a otros astrocitos mediante uniones comunicantes, lo que permite que las redes astrocitarias regulen la actividad de neuronas alejadas (Araque, 2008). También controlan la función vascular y la acoplan a la actividad neuronal (Abbott, 2002; Zonta *et al*, 2003; Anderson y

Nedergaard, 2003) e incluso pueden ser precursores y reguladores del recambio neuronal en el cerebro adulto (Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Ganat *et al*, 2006; Magnus *et al*, 2007; Hong *et al*, 2008). Además, el astrocito contiene la mayor reserva de energía del cerebro de los mamíferos en forma de gránulos de glucógeno (Dringen *et al*, 1993), que puede ser una fuente de energía rápida para las neuronas en condiciones de carencia de glucosa (Wender *et al*, 2000).

La microglía constituye el único tipo celular presente en el sistema nervioso central con origen mesodérmico. Fue descrita por primera vez a comienzos del siglo XX por Pío del Río-Hortega, que se dedicó durante más de una década a profundizar en su naturaleza, averiguando que la microglía aparecía en forma de cuerpos amorfos en el cerebro en desarrollo y luego se diferenciaba en formas muy ramificadas que colonizaban todas las regiones del cerebro. Durante el desarrollo, la microglía es la responsable de eliminar las células muertas (Ashwell, 1990; Ellison y de Vellis, 1995) y los axones sobrantes (Innocenti *et al*, 1983) y participa en la regulación de la glicogénesis (Giulian *et al*, 1988). En el cerebro adulto en condiciones fisiológicas se encarga de la vigilancia inmunitaria y la inspección y control del medio extracelular. Presenta un fenotipo ramificado, aunque con algunas variaciones regionales y diferencias entre distintas especies (del Río-Hortega, 1919, 1920, Lawson *et al*, 1990). Sierra *et al* (2010) describieron cómo durante la transición de progenitor neural en división a neuroblasto la mayoría de las células de nueva creación sufrían apoptosis, y cómo células microgliales inactivas localizadas en la zona subgranular del giro dentado eran las encargadas de su fagocitosis, sugiriendo una implicación de la microglía en la regulación de la neurogénesis adulta en condiciones fisiológicas.

1.2.- LA GLIOSIS: RESPUESTA DE LA ASTROGLÍA Y LA MICROGLÍA AL DAÑO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Tanto la astrogliosis como la microglía van a responder al daño en el sistema nervioso central, activándose en respuesta a la neurodegeneración, lesiones traumáticas o procesos infecciosos. La respuesta astrogliótica a las lesiones ocurre rápidamente, pudiéndose detectar una hora después de un trauma mecánico (Mucke *et al*, 1991). La primera célula en reaccionar después de cualquier lesión, sin embargo, es la microglía, que secreta diversos factores responsables de la activación astrogliótica (Davis *et al*, 1994; Kreutzberg, 1996; Streit *et al*, 1999; Liberto *et al*, 2004).

Introducción

La gliosis es un fenómeno complejo que incluye una mezcla de respuestas positivas y negativas frente a la supervivencia y regeneración neuronales. La astrogliosis mantiene la integridad de la barrera hematoencefálica y la supervivencia del tejido perilesional, pero puede impedir la regeneración axonal (Bush *et al*, 1999; Faulkner *et al*, 2004; Silver and Miller, 2004; Myer *et al*, 2006). La microglía reactiva realiza importantes funciones positivas remodelando el tejido dañado, pero secreta citoquinas proinflamatorias y puede exacerbar el daño neuronal (Lindsay, 1986; Thomas, 1992; Ridet *et al*, 1997; Streit *et al*, 1999; Kim and de Vellis, 2005; Pekny and Nilsson, 2005).

Los eventos más característicos de la activación astrogliosis son la hipertrofia, la proliferación astrocitaria y la sobreexpresión de filamentos intermedios (Norton *et al*, 1992; Amat *et al*, 1996; Silver y Miller, 2004). Esto va acompañado por un aumento en la expresión de una variedad de moléculas que incluyen factores de crecimiento y sus receptores, citoquinas, eicosanoides, moléculas de adhesión y enzimas implicadas en diferentes funciones (Eddleston y Mucke, 1993; Ridet *et al*, 1997). Los astrocitos reactivos ejercen efectos neuroprotectores pero también pueden exacerbar el daño, por lo que la inhibición de la gliosis puede llegar a ser neuroprotectora (Mourlevat *et al*, 2003). Por un lado los astrocitos median la reparación celular a través de la secreción de factores neurotróficos (Dougherty *et al*, 2000; Sasaki *et al*, 2004), la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (Chen *et al*, 2006). Los astrocitos pueden también minimizar el daño y muerte neuronal a través del mantenimiento de los niveles homeostáticos de neurotransmisores (Newman, 2003). Además, estas células protegen a las neuronas a través de la regulación de la síntesis y uso de factores metabólicos (Magistretti, 2006). Después de lesiones traumáticas, los astrocitos reactivos disminuyen el daño tisular controlando y restaurando la integridad de la barrera hematoencefálica, evitando la extensión de edemas vasogénicos y citotóxicos mediante transportadores de iones y acuaporinas (Chen y Swanson, 2003). Por otra parte, la cicatriz glial supone un grave impedimento para la regeneración axonal ya que forma una barrera física que impide el crecimiento de las neuritas (Bovolenta *et al*, 1992; Le Roux y Reh, 1996; Fawcett, 2006). Además, en la matriz extracelular de la cicatriz glial se acumulan numerosas moléculas que inhiben la regeneración axonal (Fawcett y Asher, 1999; Hampton *et al*, 2006; Silver y Miller, 2004) y se ha demostrado que la inhibición de la astrogliosis estimula la regeneración axonal y el crecimiento de neuritas, no solo por la ausencia de un impedimento físico sino también por la falta de secreción de dichas moléculas inhibitorias del crecimiento axonal (Fawcett y Asher, 1999; Gates y Dunnett, 2001; Silver y Miller, 2004; Sandvig *et al*, 2004).

Las situaciones de infección o daño tisular provocan la inducción de una respuesta inflamatoria en la microglía, que es capaz de presentar antígenos (Becher *et al*, 2000; Aloisi, 2001). La activación microglial puede iniciarse por la presencia de niveles alterados de potasio, purinas o pirimidinas, que son señalizadores del daño neuronal (Khanna *et al*, 2001; Inoue, 2002). También pueden servir como factores activadores de la microglía ciertas proteínas que normalmente no se encuentran en el compartimento extracelular del SNC, o que se expresan en niveles relativamente moderados, como la trombina, fragmentos del complemento, proteínas de choque térmico, citoquinas, proteína beta amilácea, gangliósidos o quemoquinas (Klein *et al*, 1997; Moller *et al*, 1997, 2000). Los diversos grados de activación microglial conllevan un aumento de la expresión de marcadores como antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I, MHC-II) y moléculas co-estimuladoras (B7-1), el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , varias moléculas de adhesión celular como la tromboespondina, el factor de crecimiento transformante (TGF)- β , e incluso la expresión *de novo* de la proteína precursora de β -amiloide (APP) (Kreutzberg, 1996). La microglía activada puede ejercer una acción neuroprotectora (Polazzi *et al*, 2001; Polazzi y Contestabile, 2002) mediante la secreción de productos que son beneficiosos para la función neuronal, como el factor de crecimiento similar a insulina (IGF)-1 (Mason *et al*, 2001; Zhao *et al*, 2006), la tromboespondina (Chamak *et al*, 1994), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el NGF (Heumann *et al*, 1987), la interleuquina (IL)-1 (Wang *et al*, 2008; Lai y Todd, 2008) o la IL-6 (Sawada *et al*, 1995; Bruce-Keller, 1999; Juliet *et al*, 2008), el TNF- α (Cheng *et al*, 1994) o diversos prostanoides (Minghetti y Levi, 1998). Además, la microglía activada parece necesaria para la remodelación del tejido nervioso dañado (Prewitt *et al*, 1997; Moller *et al*, 2000). Su capacidad fagocítica le permite retirar los restos celulares y la mielina, inhibidora del crecimiento axonal (Cadelli *et al*, 1992; Frisen *et al*, 1994). No obstante, aunque la respuesta de activación aguda de la microglía tiene un carácter protector, el efecto de estas células puede ser nocivo en los casos de activación crónica, debido a deficiencias en los mecanismos que las mantienen en niveles de activación controlados (Akiyama *et al*, 2000; McGeer y McGeer, 2001) o como consecuencia de un defecto genético, una infección vírica o priónica o por el desgaste producido por el envejecimiento (Streit, 2002; Streit *et al*, 2004). En estas condiciones, la microglía puede producir mediadores citotóxicos, como el glutamato, en gran concentración y especies reactivas del oxígeno o del nitrógeno (Giulian *et al*, 1990, 1995; Banati *et al*, 1993; Nakajima *et al*, 2007; Yawata *et al*, 2008).

2.- LA MITOCONDRIA: MORFOLOGÍA, FUNCIÓN, IMPLICACIÓN EN LA ESTEROIDOGENESIS Y ESTRÉS OXIDATIVO

2.1.- LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL: FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La mitocondria es el orgánulo donde comienza el proceso esteroideogénico y donde tiene lugar la primera etapa limitante de la ruta. Su función principal, sin embargo, es el abastecimiento energético de la célula mediante la síntesis de ATP a expensas de carburantes metabólicos como pueden ser la glucosa, lípidos y aminoácidos, en el proceso conocido como fosforilación oxidativa. Presenta en su membrana interna una cadena de transporte de electrones compuesta por cuatro complejos enzimáticos fijos y dos transportadores de electrones móviles, encargados de generar la energía suficiente para mantener la actividad del complejo V o ATP sintasa (*Fig. 2*). El mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa está asociado con desórdenes metabólicos muy fuertes con predominancia en tejidos con alta demanda energética, como el cerebro (Wallace, 1992). Dentro de los desórdenes humanos más severos se encuentran los asociados con el complejo IV o citocromo c oxidasa (Cox), último complejo de la cadena transportadora de electrones encargado de reducir el O₂ para convertirlo en agua. Dicho complejo está compuesto por 13 subunidades (Taanman, 1997), de las cuales las tres mayores están codificadas por el ADN mitocondrial y forman el núcleo catalítico de la enzima y las restantes diez, evolutivamente más jóvenes, se codifican en el ADN nuclear y pueden presentar isoformas específicas de tejido (Kadenbach *et al*, 1990, 1991). Entre ellas se encuentra la subunidad IV (CoxIV), cuyas isoformas 1 y 2 se expresan en neuronas y astrocitos (Horvat *et al*, 2006; Singh *et al*, 2009, Misiak *et al*, 2010). La pérdida de subunidades codificadas por el ADN nuclear da lugar a mayor transporte de electrones pero con un bombeo de protones dañado que se traduce en menor capacidad del complejo, menor afinidad por el oxígeno y un mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial menoscabado (Pecina *et al*, 2004).

2.2.- LAS PROTEÍNAS TRANSLOCADORAS DE COLESTEROL: StAR Y TSPO

La esteroideogénesis comienza en la mitocondria con la translocación de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna, proceso realizado por la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO) y la proteína reguladora de la

esteroidogénesis aguda (StAR). Esta primera etapa esteroidogénica constituye el primer paso limitante del proceso.

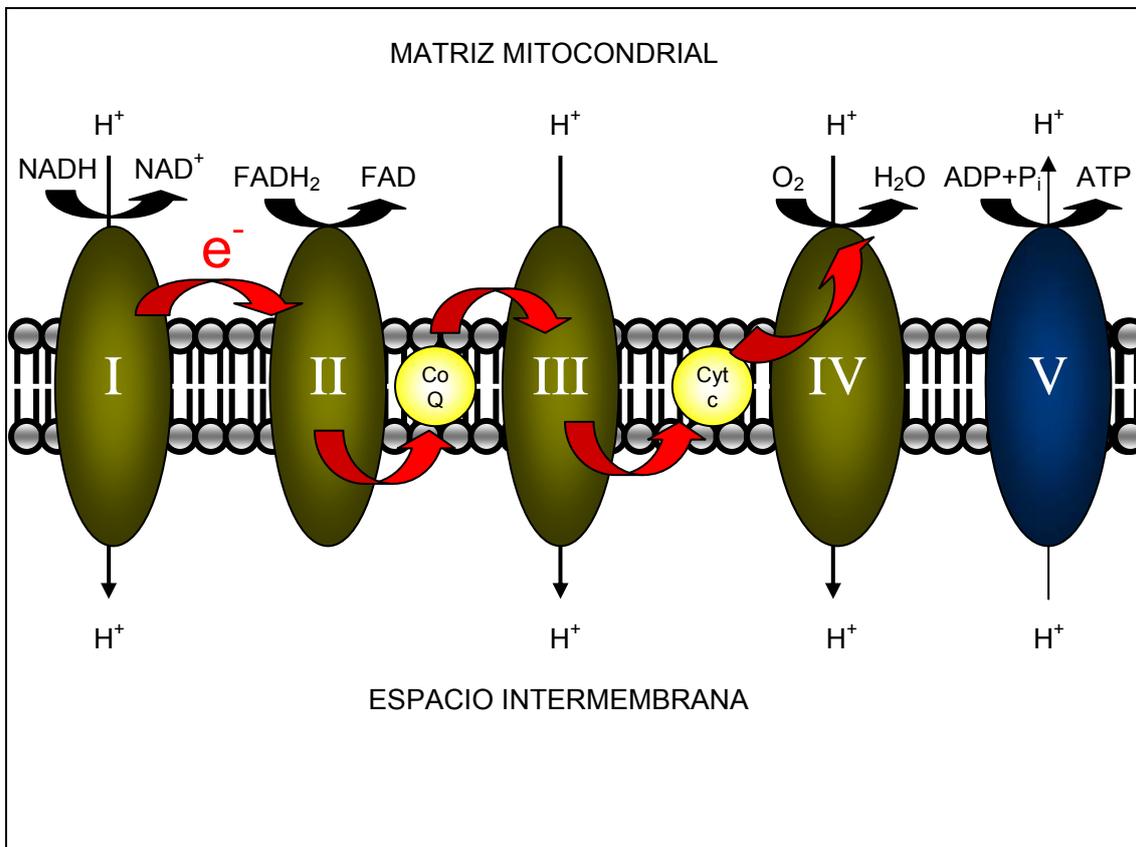


Figura 2. Representación gráfica de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna. Los donadores de electrones $NADH$ y $FADH_2$ cederán los electrones en los complejos I y II. El flujo de electrones (flechas rojas) alcanzará el complejo IV donde los electrones serán empleados para reducir O_2 en agua. El proceso va acompañado de bombeo de protones hacia el espacio intermembrana por parte de los complejos I, III y IV. Dichos protones serán a continuación bombeados de nuevo hacia la matriz mitocondrial a través del complejo V, generando la energía necesaria para la síntesis de ATP.

La TSPO (*Fig. 3, A*), previamente conocida como receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), fue descrita inicialmente en tejidos periféricos como segundo lugar de unión para el diazepam. Desde entonces, muchos estudios han demostrado que la TSPO es distinta tanto farmacológicamente como estructuralmente del receptor central de benzodiazepinas. La TSPO es un péptido de 18 kDa localizado principalmente en las membranas mitocondriales y representa un componente crítico para el poro de transición de permeabilidad, un complejo multiproteico implicado en la regulación de la apoptosis. Además, ha sido relacionado con varios eventos fisiológicos, incluyendo el control de la esteroidogénesis. La TSPO se expresa en el sistema nervioso, predominantemente en la glía, en condiciones fisiológicas. Además, distintas formas de daño neural y condiciones neuropatológicas dan lugar a la

Introducción

inducción de la expresión de la TSPO en regiones del sistema nervioso relacionadas con eventos neurodegenerativos. Por ejemplo, la expresión basal de TSPO está aumentada en gliomas, (Cornu *et al*, 1992; Miettinen *et al*, 1995), en enfermedades neurodegenerativas (Owen *et al*, 1983; McGeer *et al*, 1988; Diorio *et al*, 1991) y en varias formas de daño cerebral e inflamación (Kuhlmann y Guilarte, 1997, 1999, 2000; Wilms *et al*, 2003; Chen *et al*, 2004). La inducción de la expresión de TSPO tras lesión en el sistema nervioso central está restringida principalmente a microglía y astrocitos (Kassiou *et al*, 2005).

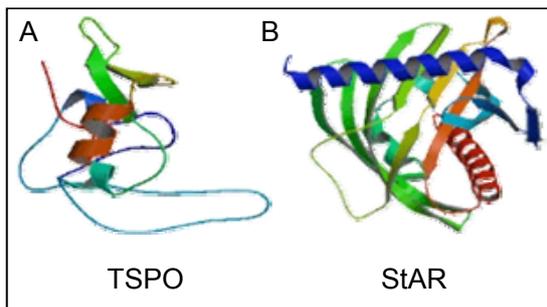


Figura 3.- Estructura tridimensional de los translocadores de colesterol mitocondrial. A.- TSPO. B.- StAR, Imágenes tomadas de la página web <http://www.uscnk.com>

La proteína StAR (*Fig. 3, B*) inicial es un péptido de 37 kDa que se transporta rápidamente a la mitocondria donde es fragmentado, dando lugar a una proteína inactiva y madura de 30 kDa. En el sistema nervioso central, se distribuye a lo largo de todo el cerebro, aunque con diferencias regionales de expresión. Además, la expresión de StAR parece estar restringida a poblaciones muy específicas, tanto neuronales como astrogiales, aunque su expresión es predominante en neuronas (Sierra *et al*, 2003).

2.3.- LA REGULACIÓN DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL

La regulación de la morfología de la mitocondria presenta consecuencias importantes para su funcionalidad. Hay dos tipos de proteínas cuya actividad está implicada en la morfología de la mitocondria, regulando la fusión y la fisión mitocondrial. Las GTPasas mitocondriales, la mitofusina 1 (Mfn1) y la mitofusina 2 (Mfn2), y la proteína homóloga de atrofia óptica 1 (OPA1) se encargan de los procesos de fusión. Por otra parte, el homólogo de fisión (membrana mitocondrial externa) (Fis1) y la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1) son esencialmente proteínas de fisión. (Santel y Fuller, 2001; Rojo *et al*, 2002; Chen *et al*, 2003; Olichon *et al*, 2003; Cipolat *et al*, 2004; Griparic *et al*, 2004; Chen y Chan, 2005). En condiciones fisiológicas, la mitocondria se caracteriza por un equilibrio dinámico entre fusión y

fusión mitocondrial. La descompensación del balance entre proteínas de fusión y de fisión da lugar a una ruptura de dicho equilibrio y causa cambios dramáticos en la morfología y función mitocondriales (Yaffe, 1999; Karbowski y Youle, 2003).

En humanos, mutaciones en la Mfn2 causan la enfermedad de Charcot Marie Tooth, una neuropatía de tipo 2A (Zuchner *et al*, 2004; Kijima *et al*, 2005). Una disminución de las proteínas de fusión junto con un deterioro de los procesos de fusión mitocondrial o una sobreexpresión de proteínas de fisión dan lugar a fragmentación de la red tubular mitocondrial (James *et al*, 2003; Olichon *et al*, 2003; Yoon *et al*, 2003; Lee *et al*, 2004; Stojanovski *et al*, 2004; Chen *et al*, 2005; Detmer y Chan, 2007a,b). Como consecuencia, aumenta la susceptibilidad a la muerte celular y a la apoptosis. Los ratones knock-out tanto de Mfn1 como de Mfn2 son letales, demostrando el papel esencial de la fusión mitocondrial para el desarrollo embrionario y la viabilidad celular (Chen *et al*, 2003). En contraste, la sobreexpresión de ambas mitofusinas a la vez proporciona protección frente a distintos estímulos apoptóticos (Sugioka *et al*, 2004).

Por otra parte, tanto las proteínas como los procesos de fisión mitocondrial son esenciales para la división celular así como para la muerte celular programada (James *et al*, 2003; Yoon *et al*, 2003; Lee *et al*, 2004; Stojanovski *et al*, 2004). En el gusano *C. elegans*, la sobreexpresión de Dpr1 aumenta el número de divisiones mitocondriales (Labrousse *et al*, 1999). La sobreexpresión de Fis 1 también da lugar a agregación y fragmentación mitocondrial (Stojanovski *et al*, 2004). Por el contrario, la disrupción de la fisión mediante la sobreexpresión de una forma mutante de Drp1 o la sobreexpresión de proteínas de fusión provocan la elongación y la formación de redes mitocondriales interconectadas por el aumento de la fusión (Smirnova *et al* 2001, Santel *et al* 2003).

2.4.- EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SNC

Una parte del oxígeno consumido por la célula es reducido por una vía alternativa a la de la citocromo c oxidasa, dando lugar a las especies reactivas de oxígeno (ROS), responsables del estrés oxidativo. El cerebro, al ser uno de los órganos con mayor demanda energética, es muy susceptible a dicho estrés. Además, muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos, sobre todo aquellos neurodegenerativos, presentan la formación de ROS como parte de su mecanismo patogénico (Sáez, 2005; Cumsee y Landshamer, 2006), así como alteraciones de las funciones bioenergéticas y mitocondriales y procesos neuroinflamatorios. Existen

Introducción

estudios que relacionan la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, de la enfermedad de Parkinson y de la esclerosis múltiple, entre otros, con la generación de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) asociadas con la disfunción mitocondrial.

El ADN mitocondrial, por su situación cercana a la membrana mitocondrial interna, lugar de generación de las ROS, y su falta de histonas protectoras, resulta una diana inmediata para las ROS, que pueden producir mutaciones que alteren las proteínas implicadas en la síntesis de ATP, de tal forma que se generan más ROS que finalmente darán lugar a daño oxidativo a nivel celular. Para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo, las células han desarrollado mecanismos antioxidantes que, en situación fisiológica, mantienen a las ROS en niveles no tóxicos. Sin embargo, en situación patológica o de lesión, la síntesis de ROS aumenta, sobrepasando la capacidad de tamponamiento de los antioxidantes naturales y dando lugar a daño citotóxico.

3.- ESTEROIDOGÉNESIS, HORMONAS SEXUALES Y EFECTOS NEUROPROTECTORES

3.1.- LA ESTEROIDOGÉNESIS

La síntesis de hormonas esteroideas (*Fig. 4*) parte del colesterol localizado en la membrana externa mitocondrial. El primer paso en la ruta esteroideogénica, que además es limitante de la síntesis de esteroides, es la internalización del colesterol, pasando de la membrana mitocondrial externa a la interna gracias a la acción de dos proteínas translocadoras, la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO) y la proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda (StAR). En la membrana mitocondrial interna se localiza la enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol o P450-scc, encargada de la transformación del colesterol en pregnenolona, primera reacción enzimática de la esteroideogénesis. La pregnenolona va a sufrir diferentes transformaciones enzimáticas, y finalmente dará lugar a la androstenediona, un andrógeno que será convertido en testosterona que, a su vez, será aromatizada y convertida en estradiol. Alternativamente, la androstenediona puede ser aromatizada a estrona, que posteriormente es convertida en estradiol. La aromatasa es la enzima que cataliza dichas aromatizaciones y sintetiza diversos estrógenos utilizando como sustrato distintos andrógenos, siendo capaz de metabolizar la testosterona en

estradiol, la androstenediona en estrona y la dehidroepiandrosterona (DHEA) en estriol (Simpson *et al*, 1994).

La esteroidogénesis presenta muchos otros metabolitos intermedios, en su ruta están implicadas muchas más enzimas, y además de dar lugar a andrógenos y estrógenos también da lugar a progestinas, mineralocorticoides y glucocorticoides, que no nos ocupan en este trabajo.

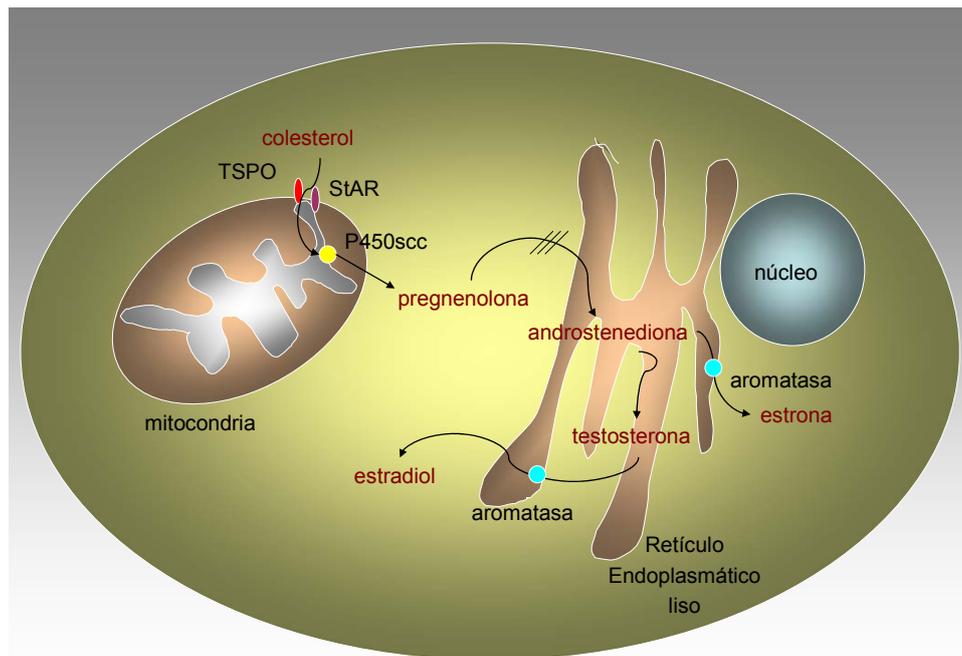


Figura 4. Representación esquemática de los pasos más importantes de la esteroidogénesis y su localización intracelular.

3.2.- LA TESTOSTERONA Y EL ESTRADIOL: ESTRUCTURA MOLECULAR Y SÍNTESIS

La testosterona es la principal hormona sexual masculina. Es un esteroide compuesto por 19 carbonos (*Fig. 5, A y B*) derivado de la reducción de la androstenediona por la 17β HSD. Su síntesis se produce principalmente en los testículos en machos y por los ovarios en hembras, aunque también se produce en menor cantidad en la placenta y la corteza suprarrenal. Puede metabolizarse en otras hormonas sexuales activas, como son la dihidrotestosterona, un andrógeno, por acción de la enzima del citocromo P450 5α -reductasa, o en estradiol, un estrógeno, por acción de la aromatasa.

Introducción

El estradiol, junto con la progesterona, constituyen las principales hormonas sexuales femeninas. Es un esteroide compuesto por 18 carbonos (*Fig 5I, C y D*) derivado de la aromatización de la testosterona por la enzima aromatasa. Como hemos descrito previamente, hay tres compuestos estrogénicos principales: el estradiol, la estrona y el estriol. El estradiol presenta 2 grupos hidroxilo, la estrona sólo tiene uno y el estriol tiene tres. Los tres compuestos presentan actividad estrogénica, siendo el estradiol el más potente de ellos (10 veces más potente que la estrona y 80 veces más potente que el estriol). Su síntesis se produce principalmente en los ovarios en hembras, aunque también se produce en menor cantidad en la corteza suprarrenal, en el tejido adiposo, en las paredes arteriales y en el cerebro. En machos, se sintetiza también en los testículos.

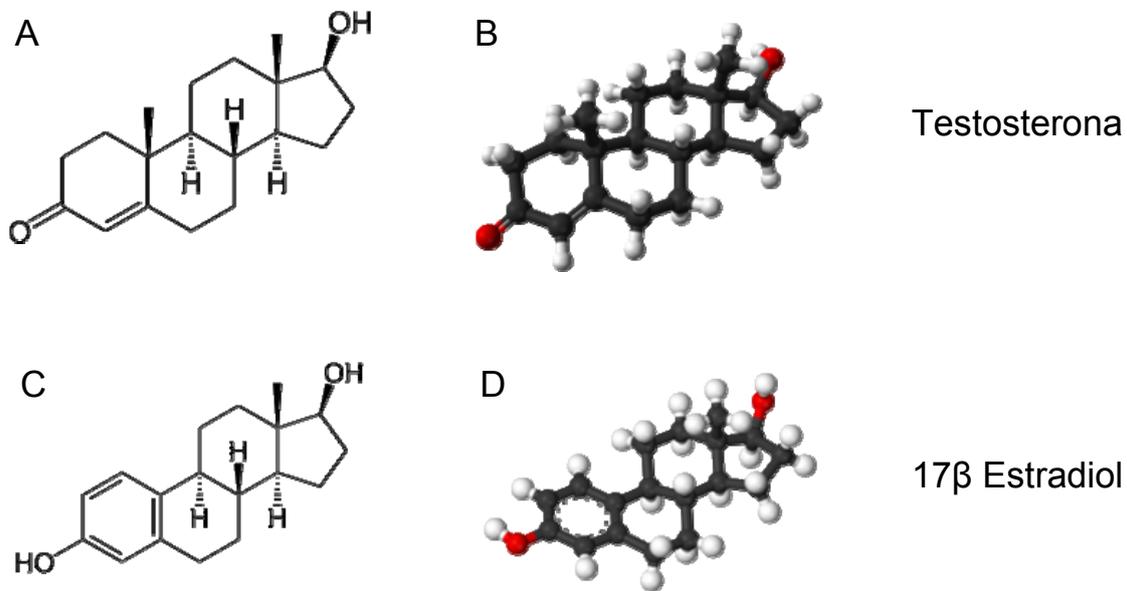


Figura 5.- Estructura molecular de la testosterona (A y B) y del 17 β -estradiol (C y D). A y C.- Fórmula geométrica de la molécula. B y D.- Estructura tridimensional de la molécula. Los carbonos se representan por una esfera negra, los hidrógenos por una esfera gris claro y los oxígenos por una esfera roja.

3.2.1.- La aromatasa: transformación de la testosterona en estradiol.

La enzima aromatasa constituye el último eslabón en la síntesis de estrógenos. Es una proteína de entorno a 55 kDa, con cierta variabilidad según la especie, perteneciente a la superfamilia de los citocromos P450. Posee una serie de residuos susceptibles de ser fosforilados. Algunos de ellos deben estar fosforilados de forma constitutiva para que la enzima sea activa (Balthazart *et al*, 2005), mientras que la fosforilación de otros residuos, llevada a cabo por las quinasas PKC, PKA y

posiblemente la CAMK, conduciría a una rápida inhibición de la enzima (Balthazart *et al*, 2005).

La actividad de la aromatasa en el cerebro fue descrita por primera vez por Naftolin y colaboradores (Naftolin *et al*, 1971a, 1971b, 1972) en el sistema límbico de embriones humanos y en el hipotálamo de rata. A continuación, fue detectada en regiones del telencéfalo, donde su actividad ha sido relacionada con la diferenciación sexual del cerebro o la regulación del comportamiento sexual y reproductivo (Lephart y Ojeda, 1990; Hutchison, 1991; Hutchison *et al*, 1994). La expresión de la enzima en muchas de estas regiones parece ser máxima en etapas perinatales, siendo mayor en machos que en hembras durante los primeros días postnatales (Lauber *et al*, 1997). Además, se ha detectado expresión de aromatasa en el hipocampo (Sanghera *et al*, 1991; MacLusky *et al*, 1994; Saldanha y Schlinger, 1997; Wehrenberg *et al*, 2001; Yague *et al*, 2008, 2010), la corteza cerebral (Sanghera *et al*, 1991; MacLusky *et al*, 1994; Yague *et al*, 2006, 2008) o el cerebelo (Sakamoto *et al*, 2003). En una revisión realizada por Azcoitia *et al* (2011) se resumen los datos existentes sobre la expresión de aromatasa en el cerebro humano, indicando su presencia en el hipotálamo, la amígdala, el área preóptica y septal, ciertas regiones del prosencéfalo basal, la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, el cerebelo y el bulbo raquídeo.

En todas estas regiones, la expresión de aromatasa se detectaba en neuronas. Por el contrario, las células gliales no suelen expresar la enzima en condiciones normales en el cerebro del ratón y la rata. Sin embargo, se ha observado expresión de aromatasa por parte de células gliales tras daño cerebral en respuesta a la lesión, sugiriendo que la síntesis de estradiol por parte de estas células constituye un mecanismo neuroprotector (García-Segura *et al*, 1999; Peterson *et al*, 2001, 2004; Carswell *et al*, 2005).

3.2.2.- Mecanismos de acción de las hormonas sexuales.

Las hormonas sexuales son capaces de atravesar fácilmente la membrana plasmática y la nuclear debido a su naturaleza esteroide. El mecanismo de acción denominado clásico, genómico o de señalización iniciada en el núcleo (Falkenstein *et al*, 2000) comienza con la unión de la hormona a su correspondiente receptor intracelular. Tanto los receptores de andrógenos como los de estrógenos son miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, que también incluye otros receptores de hormonas esteroides (Evans, 1988). La unión de la hormona al receptor

Introducción

da lugar a cambios conformacionales que provocan la disociación de proteínas de choque térmico que se encuentran unidas al receptor para bloquear su translocación al núcleo. Una vez disociado, el receptor dimeriza, entra en el núcleo, recluta coactivadores, correpresores y proteínas reguladoras de la transcripción y se une a elementos de respuesta específicos de los promotores de genes diana de las hormonas, pudiendo tanto estimular como inhibir su transcripción (Carson-Jurica *et al*, 1990; Onate *et al*, 1995; Mckenna *et al*, 1999; Mckenna y O'Malley, 2002).

Además del mecanismo de acción iniciado en el núcleo, las hormonas sexuales pueden desencadenar respuestas iniciadas en la membrana plasmática. Estas respuestas son rápidas y no requieren modificar ni la transcripción ni la síntesis de nuevas proteínas para producir su efecto primario. Los mecanismos de acción rápida están mediados por receptores de membrana o por los propios receptores intracelulares que se asocian transitoriamente a la membrana plasmática. Estas vías de señalización implican la activación de quinasas y la modificación de los niveles de calcio intracelular y además pueden regular secundariamente la actividad genómica de las hormonas sexuales iniciada en el núcleo (Falkenstein *et al*, 2000; Heinlein y Chang, 2002).

3.2.2.1.- Los receptores nucleares de estrógeno

Para ejercer la mayoría de sus acciones, el estradiol requiere interaccionar y activar los receptores de estrógeno. En mamíferos, sólo se han caracterizado dos isoformas del receptor nuclear de estrógenos (*Fig. 6*), el receptor de estrógenos alfa (ER α), descrito en 1985 (Walter *et al*, 1985), y el beta (ER β), descrito en 1996 (Kuiper *et al*, 1996).

Los receptores de estrógeno pueden formar homo- o heterodímeros que se unen al elemento de respuesta a estrógenos en el promotor de los genes diana (Klein-Hitpass *et al*, 1986; Evans, 1988; Beato *et al*, 1996), pudiendo observarse en algunos casos efectos antagónicos de la señalización a través de ER α y β (Lindberg *et al*, 2003). La actividad transcripcional de los receptores de estrógeno está finamente regulada, dependiendo del tejido, el tipo celular y el entorno en el que ocurre. Este control tan específico parece depender de la composición del complejo de iniciación de la transcripción (Lieberman, 1997).

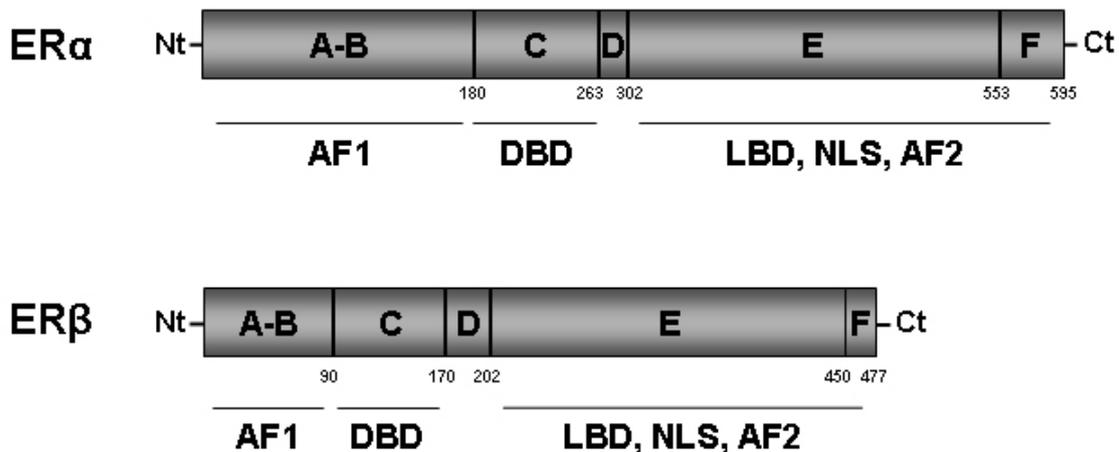


Figura 6.- Estructura básica de ER α y ER β en humanos. En la región A-B reside la primera de las dos funciones de activación (AF) de los receptores. La otra está en la región E, que junto con la región F contiene el dominio de unión al ligando (LBD) y parte de la secuencia de localización nuclear (NLS). La región C es la que contiene el dominio de unión al ADN.

3.3.- EFECTOS NEUROPROTECTORES DEL ESTRADIOL

La existencia de efectos neuroprotectores ejercidos por el estradiol ha sido probada tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Singer *et al*, 1999; Garcia-Segura *et al*, 2001; Lee y McEwen, 2001; Rau *et al*, 2003; D'Astous *et al*, 2004; Zhao y Brinton, 2007; Choi *et al*, 2008; Quesada *et al*, 2008). Los efectos beneficiosos del estradiol en el cerebro implican la regulación de muchos procesos como la supervivencia celular y la apoptosis, la respuesta inflamatoria, el control de la transmisión sináptica o la regeneración axonal (Maggi *et al*, 2004) y afectan tanto a las neuronas, como a las células gliales (Bruce-Keller *et al*, 2000; Tripanichkul *et al*, 2007; Dhandapani y Brann, 2007; Zhu y Glaser, 2008).

La molécula de estradiol ejerce un efecto neuroprotector en sí misma debido a sus propiedades antioxidantes (Behl *et al*, 1997). Sin embargo, se necesitan dosis suprafisiológicas de la hormona para poder observar dicho efecto neuroprotector en estudios *in vitro* (Moosmann y Behl, 1999). Por otra parte, no se debe descartar la posibilidad de que, *in vivo*, el estradiol ejerza este papel antioxidante, puesto que tras una lesión se activa la expresión de la aromatasa en los astrocitos (Garcia-Segura *et al*, 1999; Peterson *et al*, 2001) lo cual podría generar altas concentraciones locales de estradiol.

Además de sus propiedades antioxidantes, el estradiol ejerce efectos neuroprotectores a través de sus receptores. El bloqueo de los receptores de

Introducción

estrógeno mediante su antagonista, el ICI182780, bloquea la neuroprotección promovida por el estradiol en cultivos neuronales privados de suero (Chowen *et al*, 1992) y en cultivos de células corticales tratadas con dosis excitotóxicas de glutamato (Singer *et al*, 1999). *In vivo*, la administración de este mismo antagonista exacerba la lesión por isquemia en el estriado de ratones hembra no ovariectomizados (Sawada *et al*, 2000) y bloquea la capacidad protectora del estradiol en neuronas hipocampales tras administración de ácido kaínico (Azcoitia *et al*, 1999). Además, el estradiol promueve la generación de nuevas proyecciones sinápticas en respuesta a un daño en distintas regiones cerebrales (Matsumoto y Arai, 1979; 1981, Morse *et al*, 1986, 1992). En este proceso está implicada la proteína ApoE (Stone *et al*, 1998; Teter *et al*, 1999), involucrada en la movilización y la reutilización de lípidos en la reparación, el crecimiento y el mantenimiento de la mielina y de la membrana axonal durante el desarrollo o tras una lesión.

El estradiol también debe sus propiedades neuroprotectoras a la regulación de moléculas implicadas en la supervivencia y muerte celulares, como las proteínas de la familia de proteínas relacionadas con Bcl-2. Entre ellas encontramos proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-XL, y proapoptóticas, como Bax, Bad y Bid (Merry y Korsmeyer, 1997; Sastry y Rao, 2000). El estradiol aumenta la expresión de Bcl-2 en neuronas de rata adulta (García-Segura *et al*, 1998) y previene la disminución de su expresión asociada con la isquemia cerebral (Dubai *et al*, 1999). Además, aumenta la expresión de Bcl-XL en cultivos neuronales de hipocampo (Pike, 1999) y puede reducir la expresión de Bad (Patrone *et al*, 1999).

Finalmente, el estradiol puede bloquear la inducción de la actividad de algunas proteínas de la familia de las caspasas, esenciales para el programa apoptótico (Pike, 1999, Rau *et al*, 2003). Asimismo, disminuye la liberación de citocromo c de la mitocondria (Bagetta *et al*, 2004, Zhang y Bhavnani, 2005), un proceso clave en la activación de las caspasas y de la apoptosis.

La expresión de la aromatasa por parte de astrocitos en respuesta a una lesión, por lo tanto, puede constituir un mecanismo importante de neuroprotección ya que permite la síntesis de estradiol en la región dañada (García-Segura *et al*, 1999; Peterson *et al*, 2001, 2004; Carswell *et al*, 2005).

3.4.- LOS SERMs

La menopausia se caracteriza por la disminución de los niveles de estradiol y progesterona circulantes y va asociada, además de con síntomas visibles como los sofocos, con un aumento del riesgo de padecer osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y alteraciones cognitivas (Mhyre y Dorsa, 2006). Con la finalidad de aliviar estos síntomas se realizan tratamientos, tanto a corto como a largo plazo, con estrógenos y/o progestágenos, en la denominada terapia hormonal. A pesar de sus efectos beneficiosos, entre los que destacan la reducción de la disminución de la densidad ósea, la protección del tejido cardiovascular y un posible aumento de las capacidades cognitivas (Sherwin, 2002; Turgeon *et al*, 2004), el uso de la terapia hormonal, especialmente a largo plazo, está limitado por el riesgo de desarrollar cáncer de mama y útero que conlleva. Por ello, se ha considerado el desarrollo y estudio de nuevas drogas que conserven la función beneficiosa del estradiol sin activar sus funciones neuroendocrinas y prooncogénicas. Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) constituyen un grupo de compuestos tanto naturales como sintéticos, de diversa estructura, con capacidad de unión a los receptores de estrógeno. Pueden ejercer tanto efectos agonistas como antagonistas, dependiendo del tejido y del contexto celular. Su mecanismo de acción se basa primariamente en la competición directa con el estradiol en la unión a los receptores de estrógeno, alterando su conformación (*Fig. 7*).

En función de su familia química, los SERMs se clasifican como trifeniletlenos, benzotiofenos o compuestos bezopiranos. El tamoxifeno y sus derivados, los SERMs trifeniletlenos, son también conocidos como SERMs de primera generación. Los SERMs benzotiofenos incluyen a los SERMs de segunda generación, como el raloxifeno, y a los SERMs de tercera generación. Los SERMs de cuarta generación son compuestos bezopiranos (Dowers *et al*, 2006)

Actualmente, los SERMs son empleados en la clínica como tratamiento contra el cáncer y la osteoporosis. Además, se han iniciado estudios sobre su potencial neuroprotector (Arevalo *et al*, 2011). Según algunos de estos estudios, el tamoxifeno podría disminuir el riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer (Breuer y Anderson, 2000) y los episodios maníacos agudos en mujeres con desorden afectivo bipolar (Kulkarni *et al*, 2006; Zarate *et al*, 2007). Asimismo, el raloxifeno podría prevenir el deterioro cognitivo (Yaffe *et al*, 2005) y disminuir la ansiedad (Strickler *et al*, 2000;

Introducción

Florio *et al*, 2001) y la depresión (Carranza-Lira *et al*, 2004; Grigoriadis *et al*, 2005; Sugiyama *et al*, 2007) en mujeres postmenopáusicas.

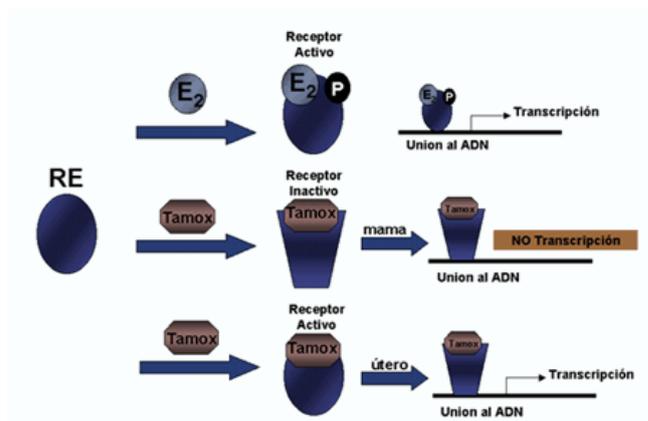
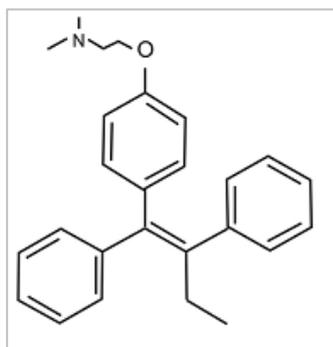


Figura 7. Mecanismo de acción del tamoxifeno. La unión del estradiol (E_2) al receptor de estrógeno (RE) causa la activación de receptor y la consecuente inducción de la transcripción. Usualmente, los SERMs, en este caso el tamoxifeno (Tamox), actúan compitiendo con el estradiol e induciendo un cambio conformacional en el receptor, que dependiendo del tejido, hace que el tamoxifeno actúe como agonista o como antagonista estrogénico.

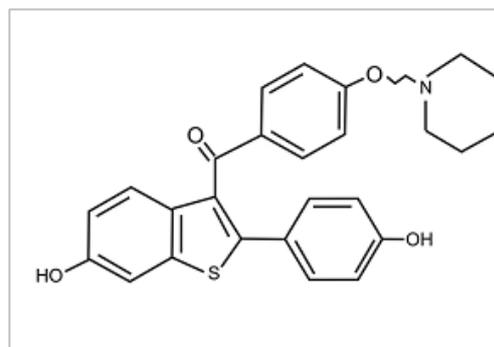
3.4.1.- El tamoxifeno

El tamoxifeno es el SERM más conocido y estudiado, y es empleado como tratamiento contra el cáncer de mama dependiente de estrógenos. *In vitro*, produce el estancamiento del ciclo celular en la fase G1 en células de cáncer de mama que expresan receptores de estrógeno (Sutherland *et al*, 1983) y disminuye los niveles de ciclina D1 (Watts *et al*, 1994). En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, el tamoxifeno inhibe la fosforilación del receptor del IGF-I (Guvakova y Surmacz, 1997), ejerciendo de antiestrógeno, pero en una línea celular endometrial produce el efecto contrario, induciendo la fosforilación del receptor y actuando como agonista del estradiol (Kleinman *et al*, 1996). *In vivo*, inhibe el crecimiento de tumores de células MCF-7 implantadas en ratones y previene el desarrollo de tumores mamarios experimentales en ratones (Jordan, 1976; Gottardis y Jordan, 1987). Al igual que el estradiol, estimula la síntesis de IGF-I y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en el útero (Huynh y Pollak, 1993; Hyder *et al*, 1996).

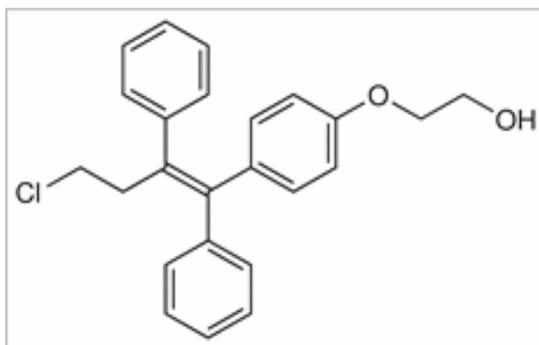
El uso clínico del tamoxifeno ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de tumores de mama que expresan receptores de estrógeno. Sin embargo, aumenta la incidencia de cáncer de endometrio, dado que ejerce acciones agonistas a las del estradiol en el útero (Fisher *et al*, 1999), aunque sus efectos positivos son mucho mayores que el riesgo a desarrollar cáncer de endometrio.



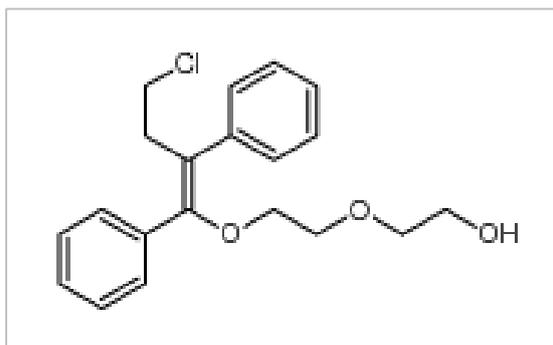
Tamoxifeno



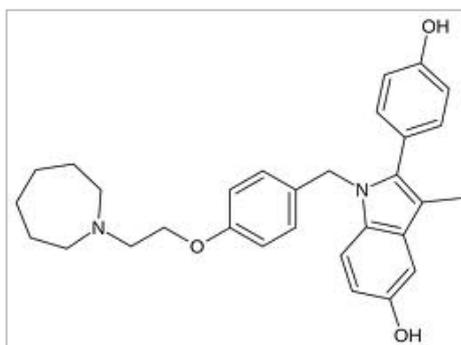
Raloxifeno



Ospemifeno



Fispemifeno



Bazedoxifeno

Figura 8.- Estructura molecular de algunos de los SERMs empleados en nuestros estudios.

3.4.2.- El raloxifeno

El raloxifeno es otro SERM empleado para el tratamiento de la osteoporosis por su efecto en el mantenimiento de la densidad ósea en mujeres postmenopáusicas (Pelayo *et al*, 2008; Jochems *et al*, 2007). Al igual que el tamoxifeno, también ejerce efectos antiestrogénicos en la mama, pero sin agonizar el efecto del estradiol en el útero. Por otra parte, intensifica los síntomas vasomotores y su efecto protector sobre el tejido óseo es limitado (Meczekalski y Czyzyk, 2009)

3.4.3.- El ospemifeno

El ospemifeno es un metabolito del trifeniletileno, otro SERM muy parecido estructuralmente al tamoxifeno. Está actualmente en desarrollo para la prevención y el tratamiento del cáncer de mama y la osteoporosis (Kleinman *et al*, 1996; Guvakova y Surmacz, 1997). Ejerce una acción positiva en el sistema óseo de mujeres postmenopáusicas, donde actúa como agonista del estradiol y, además, disminuye los niveles de colesterol LDL (Qu *et al*, 2000) y tiene un efecto semejante al del raloxifeno en el endometrio. Asimismo, actúa como antiestrógeno puro en la mama (DeGregorio *et al*, 2000; Taras *et al*, 2001). Al contrario que tamoxifeno y raloxifeno, actúa como agonista del estradiol en la vagina, y no agrava los síntomas climatéricos (Rutanen *et al*, 2003).

3.4.4.- El bazedoxifeno

El bazedoxifeno es un SERM de tercera generación que actúa como agonista de los receptores de estrógeno en el hueso y el sistema cardiovascular y como un antagonista de los receptores de estrógeno en la mama y el útero (Hyder *et al*, 1996). Ha sido aprobado para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica en la Unión Europea y en el Japón. Además, inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama independiente de hormonas y disminuye la expresión de ER α y la ciclina D1 (Lewis-Wambi *et al*, 2011).

3.4.5.- El fispemifeno

El fispemifeno es otro SERM antagonista del estradiol en el tejido mamario y con actividad agonista en el hueso. Por su baja estrogenicidad en ratas macho, podría ser aplicable en hombres (Savolainen-Peltonen *et al*, 2004).

4.- DIFERENCIAS SEXUALES: IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DEL SNC Y EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

4.1.- DESARROLLO SEXUAL

Existen siete parámetros biológicos que pueden analizarse para el establecimiento del sexo (Sánchez y Vilain, 2010):

- a) Los cromosomas sexuales: en humanos, los cromosomas X e Y. Van a determinar el sexo por tres motivos. En primer lugar, sólo los machos presentan los genes del cromosoma Y. En segundo lugar, en hembras existen dos copias de algunos de los genes del cromosoma X, aunque exista inactivación de algunos de estos genes. Finalmente, dado que la inactivación del cromosoma X puede afectar a genes heredados tanto del padre como de la madre, los tejidos femeninos representarán un mosaico de expresión de los genes del cromosoma X procedentes de cada progenitor.
- b) Los genes determinantes del sexo: genes implicados en el desarrollo de los fenotipos típicos masculinos y femeninos, como *Sry*, *Sox9* o *Wnt-4*.
- c) Las gónadas.
- d) Las hormonas gonadales: esteroides producidos por los testículos y los ovarios, implicados en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales tanto primarias como secundarias.
- e) Las estructuras reproductoras internas: el sistema de órganos interconectados implicados en la reproducción.
- f) Las estructuras reproductoras externas: los órganos externos implicados en el acto sexual.
- g) El sexo cerebral: la presencia de parámetros neuroanatómicos específicos de cada sexo, que suelen ser el resultado de la acción de las hormonas gonadales circulantes sobre el SNC.

Durante la embriogénesis suceden varios eventos que dan lugar al desarrollo de los fenotipos específicos de cada sexo (Vilain, 2000). En primer lugar, ocurre la determinación sexual durante la cual las gónadas indiferenciadas se convierten en testículos u ovarios en función de la herencia paterna. A continuación ocurrirá la diferenciación sexual, que consiste en el desarrollo de las estructuras reproductoras

Introducción

tanto internas como externas. El desarrollo de testículos inducirá la producción de testosterona, el péptido similar a la insulina 3 y la hormona anti-Mülleriana, que definirán el desarrollo de los órganos masculinos (Fig. 9). Por su parte, el desarrollo de ovarios no inducirá la producción de estas tres biomoléculas, definiendo así el desarrollo de los órganos femeninos. Además, durante la diferenciación sexual, se produce la masculinización o feminización del cerebro como resultado de la presencia o ausencia de testosterona.

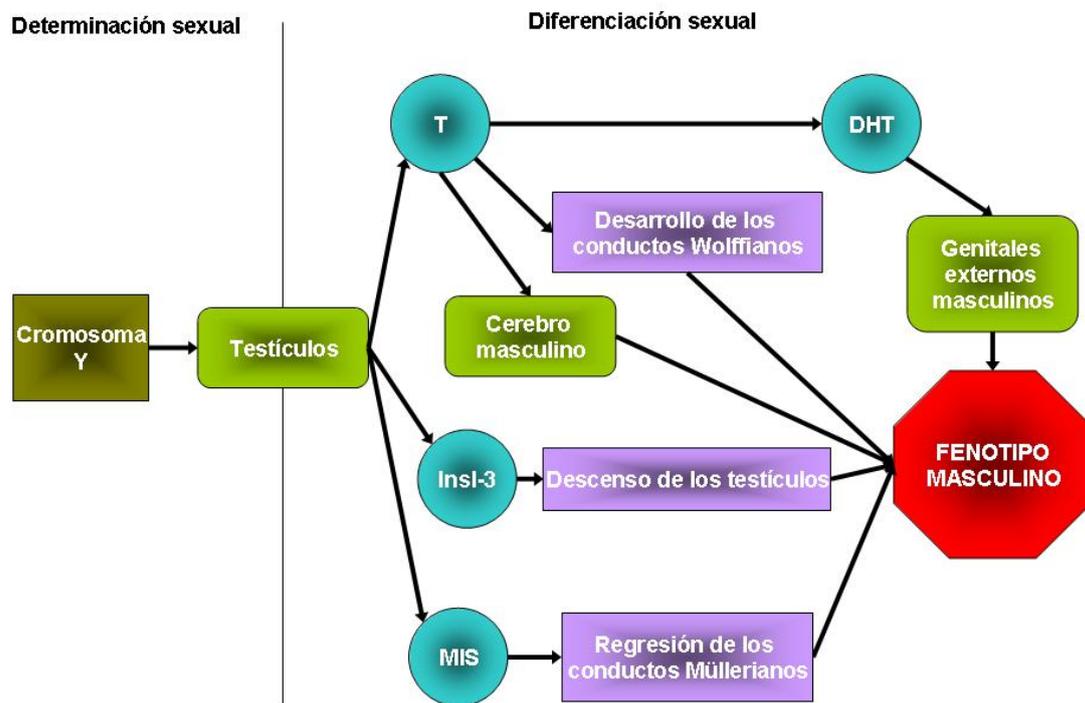


Figura 9.- Esquema de la diferenciación sexual en machos. T: testosterona. Insl-3: péptido similar a la insulina 3. MIS: hormona anti-Mülleriana. DHT: dihidrotestosterona. Adaptado de Vilain (2000, 2006)

4.2.- DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL CEREBRO. EFECTOS ORGANIZADORES Y EFECTOS ACTIVADORES DE LAS HORMONAS GONADALES

La determinación sexual del cerebro procede tanto de efectos cromosómicos como de efectos hormonales. Históricamente se ha creído que la testosterona en exclusiva daba lugar a los efectos masculinizantes en el cerebro del feto en desarrollo. Esta teoría surgió a partir de 1959, cuando Phoenix y colaboradores describieron que la exposición a las hormonas durante el desarrollo determinaba el comportamiento

adulto. Sin embargo, también hay un componente genético detrás de la diferenciación sexual del cerebro. Por ejemplo, en cultivos mesencefálicos y diencefálicos de embriones de rata de 14 días, cuando todavía no se ha producido el pico de testosterona perinatal, se han encontrado diferencias sexuales en el número de neuronas que expresan la tirosina hidroxilasa, mayor en las hembras que en los machos (Beyer *et al*, 1991).

Las hormonas gonadales ejercen dos tipos de efecto en la diferenciación sexual del cerebro. Por una parte, ejercen efectos organizadores, modificaciones permanentes e irreversibles que ocurren durante el desarrollo y dan lugar a patrones típicos de machos o de hembras en la organización corporal. Dichos efectos son característicos del desarrollo embrionario. Por otra parte, ejercen efectos activadores, modificaciones a corto plazo y reversibles que sólo permanecen mientras la hormona esté presente. Estos efectos ocurren a partir de la pubertad y su resultado final depende de la acción organizadora hormonal previa.

La testosterona, durante la embriogénesis en humanos o durante el periodo perinatal en roedores, va a ejercer efectos organizadores. Una vez sintetizada por los testículos, va a atravesar la barrera hematoencefálica para alcanzar el SNC en periodos críticos del desarrollo. Una vez allí, será convertida por la enzima aromatasa a estradiol (Balthazart y Ball, 1998), que actuará sobre su receptor masculinizando regiones cerebrales específicas. Además, el estradiol promueve activamente el desarrollo de circuitos neurales típicos de machos y suprime el desarrollo de los femeninos. Aunque los ovarios producen estrógenos durante el desarrollo, se ha propuesto que son incapaces de entrar en el cerebro al ser secuestrados por la alfa-fetoproteína, una proteína hepática cuya expresión es muy alta en el periodo perinatal y las primeras semanas postnatales (Bakker *et al*, 2006). Además, en el periodo crítico perinatal, los niveles de estradiol en plasma son equivalentes en machos y hembras (Pang *et al*, 1979). Según esta teoría, denominada teoría de la protección, la aromatización de la testosterona en el cerebro daría lugar al fenotipo masculino y la ausencia de testosterona y, por lo tanto, de estradiol sintetizado *de novo* en el cerebro, daría lugar al desarrollo del fenotipo femenino. Sin embargo, en los últimos años, está cobrando fuerza la hipótesis de la liberación, que postula que es necesaria cierta liberación de estrógenos para el desarrollo normal femenino. Según esta última teoría, distinta concentración de estradiol en el cerebro, procedente de la aromatización de la testosterona circulante, cuyos niveles son mayores en machos que en hembras, daría lugar a la formación del fenotipo masculino o femenino (Kandel *et al*, 2000). Estudios

Introducción

recientes basados en el estudio de ratones hembra *knock out* para aromatasa apoyan la teoría de la necesidad de cierta exposición a estradiol para el correcto desarrollo del sistema nervioso en hembras. En estas ratonas se han observado menor comportamiento sexual de lordosis que en hembras control (Bakker *et al*, 2002), cambios en la expresión de c-Fos en respuesta a estímulos olorosos sexualmente relevantes (Pierman *et al*, 2008), una cantidad de neuronas kisspeptina positivas equivalente a la de machos y menor que la de hembras salvajes (Bakker *et al*, 2010) y menor cantidad de receptor de progesterona en el hipotálamo en edad prepuberal (Brock *et al*, 2010).

En cualquier caso, parece claro el papel principal de la síntesis local de estradiol en la diferenciación sexual del cerebro. En un estudio previo sobre el efecto organizador de la testosterona, hembras recién nacidas fueron inyectadas con testosterona o estradiol o con dihidrotestosterona, que no puede convertirse en estradiol y que activa el receptor de andrógenos. Se observó que tanto la testosterona como el estradiol eran efectivos androgenizando el cerebro, mientras que la dihidrotestosterona no ejercía ningún efecto (Whalen y Olsen, 1981). El estradiol va a generar diferencias volumétricas mediante la regulación de la apoptosis, como ocurre en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (Meisel y Sachs; 1994) o en el núcleo periventricular anteroventral (Simerly *et al*, 1997). También da lugar al crecimiento de neuritas en el área preóptica, el hipotálamo y la corteza cerebral (Toran-Allerand, 1976, 1980; Toran-Allerand *et al*, 1983), y regula el patrón sináptico en el núcleo arcuato (Matsumoto y Arai, 1980), el área preóptica (Anderson *et al*, 1986; Todd *et al*, 2005) y el núcleo ventromedial del hipotálamo mediobasal (Matsumoto y Arai, 1986; Pozzo-Miller y Auki, 1991).

4.3.- LA TESTOSTERONA PERINATAL

En el ratón, uno de los periodos críticos en los que se generan diferencias sexuales en el cerebro ocurre perinatalmente. Los niveles plasmáticos de testosterona son mayores en machos que en hembras a partir del 14º día de desarrollo embrionario (Pointis *et al*, 1980; vom Saal y Bronson, 1980). Tanto en ratones macho como en otros mamíferos (*Fig. 10*) se observa un dramático incremento en la testosterona circulante 2 horas tras el parto, generando un pico que decrece inmediatamente hasta alcanzar los niveles característicos de hembras tras el nacimiento (Motelica-Heino *et al*, 1988). En cualquier caso, los niveles en plasma de testosterona son

significativamente mayores en los ratones macho que en los hembra entre los días postnatales 1 y 5 (Pang y Tang, 1984).

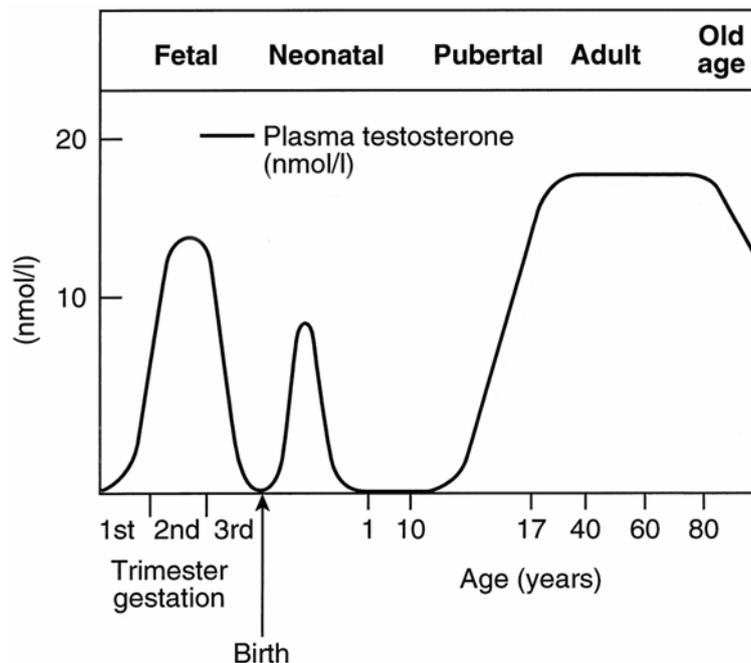


Figura 10.- Niveles de testosterona circulante a lo largo de la vida en hombres. La testosterona plasmática presenta un pico durante la gestación y otro inmediatamente tras el nacimiento. Durante la pubertad ascienden de nuevo y se mantienen a lo largo de toda la vida reproductiva del hombre. Se observa una disminución progresiva de la testosterona circulante al alcanzar la senescencia. Imagen modificada de Wilson, 1999

La inyección con propionato de testosterona en hembras recién nacidas ha sido ampliamente empleada para mimetizar la situación de los machos con la finalidad de estudiar las diferencias sexuales asociadas a dicho pico de testosterona (Ramírez *et al*, 2010; Orikasa y Sakuma, 2010; Broida y Svare, 1984; Hisasue *et al*, 2010). El tratamiento con propionato de testosterona en el día del nacimiento da lugar a la androgenización de algunos parámetros, mientras que no afecta a otros (Ramírez *et al*, 2010)

4.4.- DIFERENCIAS SEXUALES EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

Numerosas enfermedades neurológicas y psiquiátricas presentan diferencias sexuales en la incidencia, edad de inicio de la enfermedad, sintomatología y progreso (Cosimo Melcangi y Garcia-Segura, 2010). Por ejemplo, se dan más casos de enfermedad de Alzheimer en mujeres que en hombres (Fratiglioni *et al*, 1997; Andersen *et al*, 1999; Azad *et al*, 2007), mientras que la incidencia de enfermedad de Parkinson y Huntington es mayor en hombres (Roos *et al*, 1991; Foroud *et al*, 1999;

Introducción

Van Den Eeden *et al*, 2003; Benito-Leon *et al*, 2003; de Lau *et al*, 2004; Wooten *et al*, 2004; Pekmezovic *et al*, 2007). En el caso de la esclerosis múltiple, la incidencia es mayor en mujeres y la enfermedad comienza antes (Noonan *et al*, 2002; Orton *et al*, 2006; Schwendimann y Alekseeva, 2007), mientras que la patología es más grave en hombres (Confavreux *et al*, 2003; Jobin *et al*, 2010). Otro tipo de desórdenes se dan mayoritariamente en mujeres, como la ansiedad (Foot y Koszycki, 2004; Afifi, 2007), la depresión durante la pubertad (Hankin y Abramson, 1999) y los desórdenes alimentarios (Kaye, 2008). Por otra parte, las mujeres presentan menor riesgo a sufrir infarto cerebral hasta los 85 años aunque su recuperación es peor (Rosamond *et al*, 2007; Reeves *et al*, 2008; Turtzo y McCullough, 2008), menor tendencia al autismo (Volkmar *et al*, 1993; Fombonne, 1999, 2003) y mejor recuperación tras daño traumático cerebral (Groswasser *et al*, 1998; Slewa-Younan *et al*, 2004; Niemeier *et al*, 2007; Ratcliff *et al*, 2007). En el caso de la esquizofrenia, no se observan diferencias sexuales significativas en el número de pacientes, pero sí en cuanto a la edad de aparición, el progreso de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (Riecher-Rossler y Hafner, 2000; Hafner, 2003; Halbreich y Kahn, 2003; Rao y Kolsch, 2003).

El origen de todas estas diferencias puede ser multifactorial. Por una parte, podría ser una consecuencia directa de los cromosomas sexuales. Asimismo, podría proceder de los distintos niveles circulantes de hormonas gonadales en hombres y mujeres adultos. Las diferencias sexuales tanto estructurales como funcionales del cerebro, generadas durante los periodos críticos del desarrollo, pueden dar lugar a distinta predisposición a sufrir ciertas enfermedades, o a responder tanto al daño como al tratamiento de distinta forma. Por ejemplo, en la amígdala se encuentran diferencias sexuales tanto morfológicas como funcionales (Hines *et al*, 1992; Cahill *et al*, 2004; Kilpatrick *et al*, 2006; Johnson *et al*, 2008; Rubinow y Juraska, 2009) y el tamaño del núcleo sexualmente dimorfo del área preóptica es 5 veces mayor en machos (Gorski, 1987). La base celular de estas diferencias puede recaer tanto en las neuronas, puesto que el patrón sináptico de algunas regiones cerebrales como el núcleo arcuato, el área preóptica y el núcleo ventromedial del hipotálamo mediobasal son diferentes en hombres y mujeres, como en los astrocitos, puesto que se han descrito diferencias sexuales en la distribución de la inmunorreactividad para GFAP en el hipocampo y el globo pálido de la rata (García-Segura *et al*, 1988), la cantidad total de glía en ciertas regiones de la amígdala es mayor en machos (Morris *et al*, 2008) y la inmunorreactividad para GFAP también en ciertas regiones de la amígdala es mayor en hembras (Rasia-Filho *et al*, 2002).

5.- EL PROCESO NEUROINFLAMATORIO. MODELOS EMPLEADOS

La neuroinflamación es un proceso asociado, además de a procesos infecciosos tanto centrales como sistémicos, a las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Lee *et al*, 2010), de Parkinson (Li *et al*, 2011), de Huntington (Möller, 2010) o la esclerosis múltiple (Siffrin *et al*, 2010). También está asociada al dolor neuropático (Myers y Shubayev, 2011) y al daño traumático en el sistema nervioso central (Alexander y Popovich, 2009). Históricamente, la vigilancia inmune del sistema nervioso central se ha considerado limitada, puesto que en condiciones normales se pueden detectar muy pocas células inmunes periféricas en su interior y se consideraba la barrera hematoencefálica como un escudo inmunológico. Sin embargo, las células T activadas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Wekerle *et al*, 1987, Hickey *et al*, 1991) y los antígenos del sistema nervioso central pueden cruzar dicha barrera en sentido opuesto (Cserr y Knopf, 1992).

5.1.- TIPOS DE NEUROINFLAMACIÓN.

Si consideramos la neuroinflamación como cualquier proceso inflamatorio en el que se vea afectado el sistema nervioso, podemos clasificarla en tres tipos.

En primer lugar, podemos encontrar casos de inflamación clásica, producida por infecciones bacterianas o virales y por parásitos. En este tipo de inflamación, se van a acumular células inmunes móviles tanto innatas como adaptativas en el tejido afectado, tanto por reclutamiento de la circulación sanguínea como por proliferación, sobre todo en el caso de la microglía. Además de la invasión de células móviles, la definición clásica de la inflamación incluye un componente vascular, proliferativo y parenquimal que altera el tejido. Este tipo de inflamación también incluye la reacción que acompaña y sigue a la reparación tisular y la regeneración (Graeber *et al*, 2011). El sistema inmune innato del sistema nervioso central, además de la microglía, incluye los macrófagos perivasculares, que actúan como una barrera hematoencefálica inmunológica (Graeber *et al*, 1991). En este tipo de inflamación, en cualquier caso, la barrera hematoencefálica se debe encontrar comprometida, puesto que los síntomas son el resultado de cambios en la vasculatura local.

En segundo lugar, si la inflamación es el resultado de un trauma, de daño isquémico o de daño químico y ocurre en ausencia de microorganismos, se denomina

Introducción

inflamación estéril (Rock *et al*, 2010; Chen y Núñez, 2010). Uno de los modelos que explica este tipo de inflamación propone que tras la muerte celular se liberan moléculas proinflamatorias que se encontraban intracelularmente (Rock *et al*, 2010). El denominado “inflammasoma”, un gran complejo intracelular multimérico que regula la activación de la caspasa 1, se encuentra activado durante la infección y el daño directo y durante la inflamación estéril (Davis *et al*, 2011). La inflamación estéril se caracteriza por el reclutamiento de células móviles y por la producción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias (Chen y Núñez, 2010). En condiciones de muerte celular estéril, la respuesta inflamatoria puede incrementar la cantidad de tejido dañado (Rock *et al*, 2010)

Finalmente, cuando se produce activación glial pero no existe movilización de células inmunes periféricas, nos encontramos con la definición más estricta de neuroinflamación. En este proceso, que no suele ir acompañado de ruptura de la barrera hematoencefálica, son las células inmunes del sistema nervioso las implicadas en la regulación de la inflamación, aunque sólo lo sean en algún aspecto específico.

5.2.- CÉLULAS DEL SNC IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN

Hay tres tipos celulares residentes implicados en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central. La microglía constituye el principal tipo celular implicado en el proceso inflamatorio, activándose y promoviéndolo en respuesta a estímulos tanto agudos como crónicos (Liu y Hong, 2003; Block *et al*, 2005; Griffin, 2006; Vegeto *et al*, 2008). Asimismo, los astrocitos se activan en respuesta a un estímulo inflamatorio, hipertrofiándose y expresando mediadores reguladores como el factor de crecimiento transformante beta (Constam *et al*, 1992; Khoury *et al*, 1992). Además son capaces de inducir la apoptosis de células T, lo que sugiere que son capaces de ejercer una función reguladora que restrinja la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso (Matsumoto *et al*, 1993; Gold *et al*, 1996). Las neuronas constituyen el tercer tipo celular implicado. Son capaces de expresar el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (Neumann *et al*, 1997a), de producir citoquinas como el interferón gamma (Olsson *et al*, 1994; Neumann *et al*, 1997b) y de inducir la muerte apoptótica de las células T (Flugel *et al*, 2000). Además, son capaces de regular la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II por parte de la glía circundante (Neumann *et al*, 1996).

5.3.- LAS CITOQUINAS Y LAS QUEMOQUINAS

Durante el proceso neuroinflamatorio se va a producir la liberación de moléculas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias por parte de las células implicadas en la respuesta.

Las citoquinas son pequeñas proteínas reguladoras liberadas por varios tipos celulares para modular interacciones célula-célula, la inflamación y la respuesta inmune. Las citoquinas presentan actividades pleiotrópicas y pueden desencadenar multitud de respuestas celulares dependiendo del tipo celular, el momento y el entorno celular. Se pueden clasificar de varias formas. Por una parte, pueden agruparse en interleuquinas (IL), factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN), factores estimulantes de colonia y factores de crecimiento transformante (TGF). También se pueden clasificar en función de la homología estructural de sus receptores como citoquinas de clase I o de clase II (Boulay *et al*, 2003; Langer *et al*, 2004). La mayoría de las ILs, los factores estimulantes de colonia y los IFNs median sus efectos a través de la ruta de señalización JAK-STAT. Los miembros de las familias de la IL1 y de los TNF activan las vías de señalización del factor nuclear NF- κ B y de MAP, mientras que los miembros de la superfamilia de TGF- β activan proteínas de señalización de la familia de Smad. Otra clasificación se basa en su capacidad para contribuir al proceso inflamatorio. Así, encontraremos citoquinas proinflamatorias, como TNF α , IL1 β , IL6, IL12, IL18 y IFN γ , y citoquinas antiinflamatorias como IL4, IL10, IL13, y TGF β (Shubayev *et al*, 2010).

Las quemoquinas, que en algunos casos han sido consideradas otro subgrupo de las citoquinas, son asimismo proteínas reguladoras de pequeño tamaño, cuyo nombre procede de la primera función que se les asoció *in vitro*, la quimioatracción. En humanos existen 50 quemoquinas y 20 receptores, con homólogos en otras especies de mamíferos (Charo y Ransohoff, 2006). Esta superfamilia de ligandos está dividida en dos grupos, las quemoquinas CC y las quemoquinas CXC. Asimismo, pueden agruparse en quemoquinas homeostáticas (que se expresan constitutivamente en órganos como los nódulos linfáticos y el bazo) e inflamatorias (cuya expresión es inducida en los lugares de inflamación para atraer leucocitos infiltrados y cuya función es esencial para la respuesta a estímulos infecciosos e inflamatorios) (Charo y Ransohoff, 2006).

5.4.- MODELOS DE NEUROINFLAMACIÓN EMPLEADOS

En el presente trabajo hemos empleado varios modelos que cursaban con inflamación. Hemos empleado, tanto *in vivo* como *in vitro*, un modelo de estímulo inflamatorio mediante administración de lipopolisacárido (LPS). Este modelo estaría mimetizando un tipo de inflamación “clásica”. Asimismo, hemos utilizado un modelo de lesión cerebral penetrante, en el cual estaríamos observando el resultado de la inflamación estéril.

5.4.1.- Modelos de administración de LPS

El LPS es una endotoxina derivada de la pared externa de las bacterias Gram negativas ampliamente utilizada para generar una respuesta inflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro*. Está formado por un fosfoglicolípido denominado lípido A anclado a la membrana bacteriana (Fig. 11) y unido mediante enlace covalente a un heteropolisacárido hidrofílico (Raetz, 1990) que confiere la actividad biológica a la molécula (Mayeux, 1997; Rietschel *et al*, 1996). El heteropolisacárido, a su vez, está compuesto por dos regiones, la cadena O-específica o antígeno O, formada por varias repeticiones de oligosacárido y el núcleo o core, subdividido a su vez en core externo, que sirve de unión al antígeno O y el core interno, que sirve de unión al lípido A (Bermejo y Duarte, 2003).

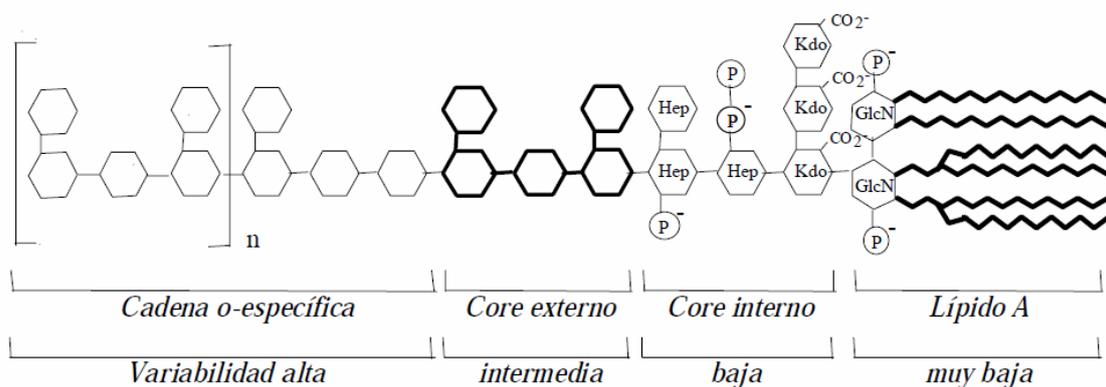


Figura 11.- Estructura y variabilidad del LPS. Imagen tomada de Bermejo y Duarte, 2003.

5.4.1.1.-Administración de LPS a astrocitos en cultivo

En astrocitos en cultivo, el LPS aumenta la expresión de marcadores proinflamatorios como la interleuquina 6 o la quemoquina denominada proteína inducible por interferón 10 (IP10 o Cxcl 10) (Cerciat *et al*, 2010) y de efectores inflamatorios como las prostaglandinas (Pistritto *et al*, 1998, 1999). Los astrocitos expresan el receptor toll-like 4 (TLR4), que media las acciones inflamatorias del LPS (Blanco *et al*, 2005; Krasowska-Zoladek *et al*, 2007; Konat *et al*, 2008; Liao *et al*, 2010). Tras su unión al receptor, el LPS va a activar distintas cascadas de señalización, entre ellas la del factor de transcripción NFκB. Su subunidad p65 se activará y translocará al núcleo (Cerciat *et al*, 2010), donde promoverá la expresión de genes relacionados con inflamación, regulación inmune, supervivencia y proliferación (Fig. 12)

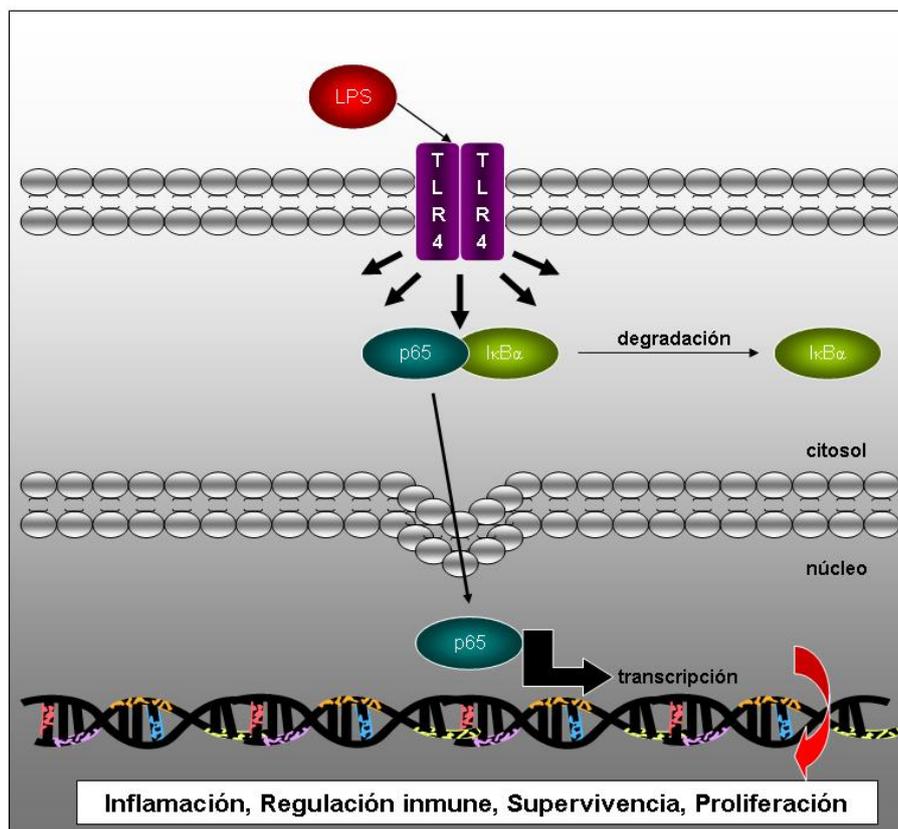


Figura 12.- Mecanismo de acción del LPS.

4.4.1.2.- Administración sistémica de LPS

La administración sistémica de LPS es una técnica que ha sido utilizada con éxito en estudios previos para inducir la activación microglial en cerebro tanto de rata como de ratón (Godbout *et al*, 2005; Semmler *et al*, 2005; Qin *et al*, 2007; Tapia-Gonzalez *et al*, 2008). La activación microglial es probablemente en su mayor parte secundaria a la inflamación periférica, puesto que el paso del LPS a través de la barrera hematoencefálica es reducido (Nadeau y Rivest, 1999). Las citoquinas sistémicas proinflamatorias, como el TNF α o ciertas interleuquinas, son críticas para la transferencia de la señal inflamatoria periférica producida por el LPS al SNC (Qin *et al*, 2007). Dichas citoquinas atraviesan la barrera hematoencefálica y activan tanto la microglía como la astrogliá para producir más factores inflamatorios (Laye *et al*, 1994; Pitossi *et al*, 1997; Eriksson *et al*, 2000; Combrinck *et al*, 2002; Choi *et al*, 2003; Zuurman *et al*, 2003; Sierra *et al*, 2007) que finalmente serán la causa de la inflamación crónica del SNC y la neurodegeneración progresiva (Perry *et al*, 2003; Cunningham *et al*, 2005; Semmler *et al*, 2005; Qin *et al*, 2007).

5.4.2.- El modelo de lesión penetrante

La lesión penetrante cursa con ruptura de la barrera hematoencefálica y da lugar a varias fases en el tejido afectado por el daño. En primer lugar ocurre una fase aguda, en la cual se produce la activación microglial y la secreción de citoquinas, seguida por una fase subaguda en la que se activa la astrogliá y se secretan factores tróficos (Taupin *et al*, 1993; Fagan y Gage, 1994; Woodroffe, 1995; Rothwell y Strijbos, 1995; Amat *et al*, 1996; Moore y Thanos, 1996; Jensen *et al*, 1997; Knerlich *et al*, 1999; Herx *et al*, 2000).

La astrogliá, así como la microglía, se activan en respuesta a la lesión. Durante este proceso aumenta, entre otras, la expresión de vimentina en los astrocitos (Eddleston y Mucke, 1993; Janeczko, 1993; Ridet *et al*, 1997) y de MHC-II en la microglía (Streit *et al*, 1999), dos proteínas prácticamente indetectables en la glía en reposo y ampliamente utilizadas como marcadores de reactividad glial por su sobreexpresión como respuesta al daño celular. Su activación es máxima a los 7 días de la generación de la herida según está descrito por García-Ovejero (2004), dando lugar a la formación de la cicatriz glial, en la que, además de los astrocitos y la microglía, participan células NG2, macrófagos y otras células que migran desde la meninge (Carbonell y Boya, 1988; Hampton *et al*, 2006).

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

La glía, las hormonas gonadales y los esteroides producidos en el sistema nervioso pueden estar implicados en la generación de diferencias sexuales en la manifestación de las enfermedades neurodegenerativas. Puesto que dichas enfermedades cursan con neuroinflamación, nos planteamos explorar la existencia de diferencias sexuales y el efecto de moduladores de la esteroidogénesis y de compuestos estrogénicos sobre la respuesta glial a la neuroinflamación.

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que podrían existir diferencias en la expresión de marcadores relacionados con la inflamación, con la síntesis y señalización de las hormonas sexuales y con la correcta morfología y funcionamiento mitocondrial en los astrocitos procedentes de machos y hembras que pudieran estar contribuyendo a la generación de diferencias sexuales en las enfermedades neurodegenerativas.

Asimismo, conocida la capacidad neuroprotectora de los compuestos estrogénicos, analizamos si podrían reducir la reactividad glial en modelos de neuroinflamación tanto *in vitro* como *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Analizar la existencia de diferencias sexuales y la implicación de la testosterona perinatal en la respuesta al LPS de los astrocitos corticales en cultivo.

2.- Analizar el efecto de dos moduladores de la esteroidogénesis, el Ro5-4864, ligando de la TSPO, y el letrozol, inhibidor de la aromatasa, sobre la respuesta al LPS de los astrocitos corticales masculinos y femeninos.

3.- Analizar el efecto de compuestos estrogénicos sobre la respuesta al LPS de los astrocitos corticales masculinos y femeninos.

4.- Analizar la existencia de diferencias sexuales y la implicación de la testosterona perinatal en la respuesta cortical al LPS *in vivo*.

5.- Analizar el efecto de compuestos estrogénicos sobre la reactividad microglial en un modelo de administración sistémica de LPS en ratas ovariectomizadas.

6.- Analizar el efecto de compuestos estrogénicos, la influencia de la edad y del tiempo de ovariectomía sobre la reactividad glial en un modelo de lesión cerebral penetrante en rata.

Objetivos

MATERIAL Y **MÉTODOS**

1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

En el presente trabajo se han llevado a cabo estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios *in vitro* se realizaron a partir de cultivos primarios de astrocitos corticales de ratón CD1 y Balb/c. Para los estudios *in vivo* se emplearon tanto ratas albinas de la raza Wistar como ratones de la cepa CD1.

En todos los casos los animales fueron criados en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y recibieron agua y comida *ad libitum*. El cuidado y manipulación de los animales se ajustó en todo momento a las directivas de la Unión Europea (86/609/EEC; 2010/63/UE) y a la Legislación Española (BOE 250; 18-10-1989 y BOE 256; 25-10-1990). Todos los diseños experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de uso y cuidado de animales (Subcomité de Bioética del CSIC). Se tuvo especial cuidado para minimizar el sufrimiento del animal y para reducir el número de animales empleados al mínimo necesario para alcanzar significación estadística.

2. DISEÑOS EXPERIMENTALES

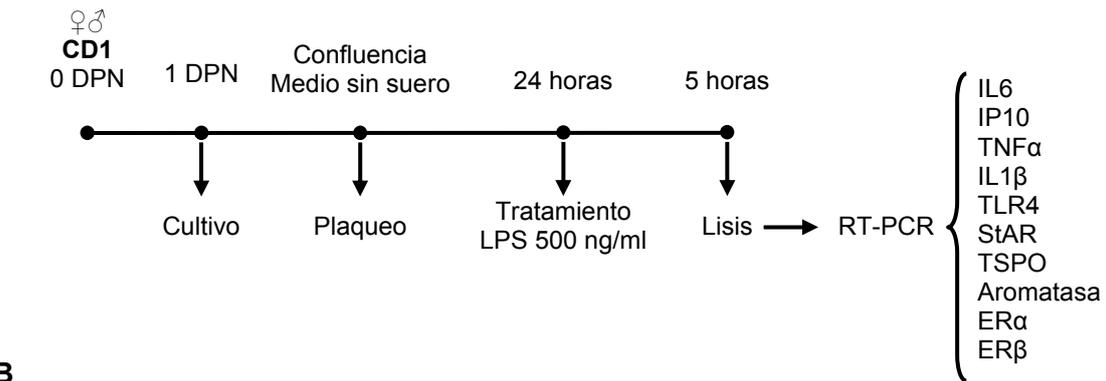
2.1.- EFECTOS DEL LPS SOBRE ASTROCITOS CORTICALES PRIMARIOS PROVENIENTES DE MACHOS O HEMBRAS

En este estudio, esquematizado en la *figura 13*, nos planteamos determinar la respuesta de los astrocitos corticales al LPS y si existían diferencias entre las células procedentes de animales macho y hembra. Para ello, realizamos cultivos primarios de astrocitos corticales de machos y hembras por separado, a partir de ratones de la cepa CD1 (para estudiar la expresión de genes relacionados con inflamación, con la transducción de la señal del LPS, con la esteroidogénesis y con la señal estrogénica) o Balb/c (para estudiar la expresión de genes relacionados con la función y morfología mitocondrial, la proliferación y la apoptosis).

Una vez el cultivo estuvo preparado, ya fuera 24 horas tras el plaqueo de 200.000 células por pocillo en medio sin suero o 24 horas tras el cambio a medio sin suero de células confluentes en pocillo, se suplementó con LPS (500 ng/ml, *Escherichia coli* 026:B6, Sigma). Tras dejar actuar al compuesto durante 5 horas, las células fueron lisadas, el ARN extraído y retrotranscrito y el ADNc resultante fue analizado mediante RT-PCR.

Material y métodos

A



B

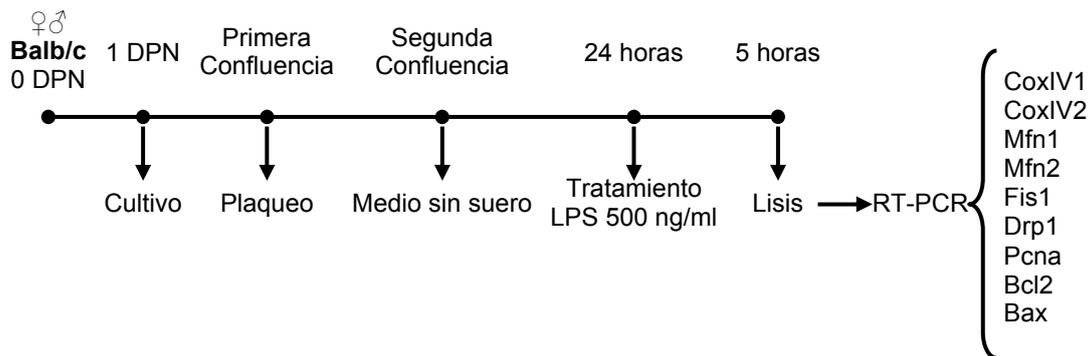


Fig. 13.- Diseño experimental para el estudio sobre diferencias sexuales en la respuesta de los astrocitos corticales al LPS. A.- Cultivos primarios de astrocitos corticales procedentes de crías de ambos sexos de la cepa CD1. B.- Cultivos primarios de astrocitos corticales procedentes de crías de ambos sexos de la cepa Balb/c. DPN: Días post-natales. RT-PCR: "Real-time" PCR.

2.2.- EFECTOS DEL LPS SOBRE ASTROCITOS CORTICALES PRIMARIOS PROVENIENTES DE HEMBRAS INYECTADAS CON PROPIONATO DE TESTOSTERONA O VEHÍCULO

Tras la observación de diferencias sexuales en la respuesta al LPS de cultivos primarios de astrocitos corticales, nos planteamos repetir el mismo estudio (*Fig. 13*) pero realizando los cultivos primarios a partir de animales hembra control e inyectados con propionato de testosterona (PT) el día del nacimiento (*Fig. 14*), de tal forma que se mimetizaba el pico de testosterona que ocurre de forma natural en machos.

Para ello, crías recién nacidas (con 0 días postnatales, 0 DPN) de sexo femenino fueron inyectadas con PT o su vehículo, aceite de maíz. Un día después (con 1 DPN), se realizaron los cultivos primarios de ambas cepas de ratón. El tratamiento de los cultivos fue el mismo que en el experimento anterior: una vez los cultivos estuvieron preparados, fueron tratados durante 5 horas con LPS, tras las que se extrajo el ARN que fue retrotranscrito y amplificado por RT-PCR.

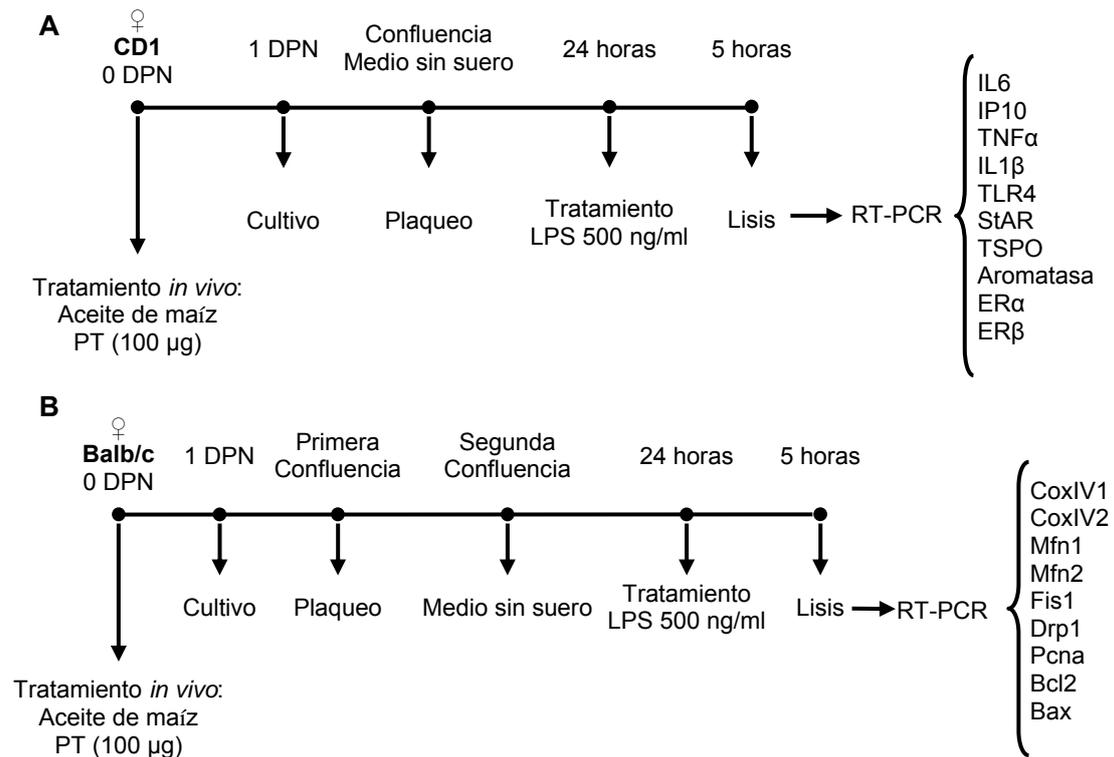


Fig. 14.- Diseño experimental para el estudio del efecto de la testosterona perinatal sobre la respuesta de los astrocitos corticales al LPS. A.- Experimento con ratones hembra de la cepa CD1. B.- Experimento con ratones hembra de la cepa Balb/c. PT: propionato de testosterona. DPN: Días post-natales. RT-PCR: "Real-time" PCR.

2.3.- EFECTO DEL LIGANDO DE LA TSPO RO5-4864 SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS

En este estudio analizamos el efecto de un ligando de la TSPO en la respuesta de los astrocitos corticales al LPS (Fig. 15). Para ello se realizaron cultivos de sexos diferenciados a partir de ratones de la cepa CD1. Una vez los cultivos estuvieron preparados, fueron tratados durante 5 horas con LPS (500 ng/ml), Ro5-4864 (10^{-5} M, Sigma) o una combinación de ambos. Una vez finalizado el tratamiento, los astrocitos fueron lisados y el ARN extraído y retrotranscrito. Se realizó RT-PCR para analizar la expresión de genes relacionados con inflamación.

Material y métodos

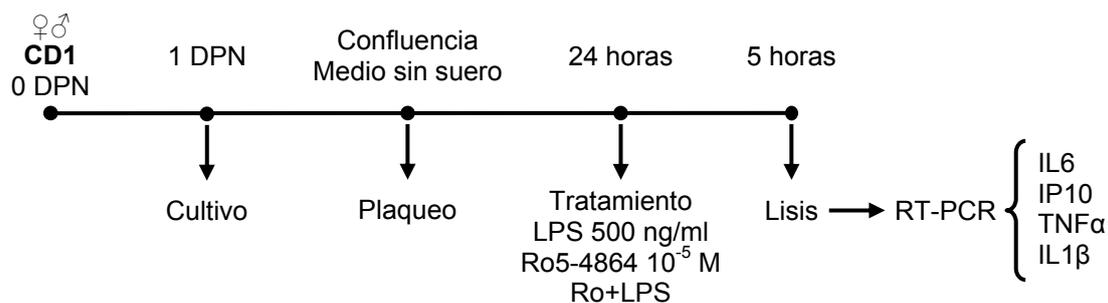


Fig. 15.- Diseño experimental para el estudio sobre el efecto del ligando de la TSPO Ro5-4864 sobre la respuesta de los astrocitos corticales al LPS. DPN: Días post-natales. RT-PCR: "Real-time" PCR.

2.4.- EFECTO DE DISTINTOS COMPUESTOS ESTROGÉNICOS SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS

En este estudio analizamos el efecto de tres compuestos estrogénicos y un inhibidor de la síntesis endógena de estradiol sobre la respuesta al LPS de astrocitos corticales obtenidos de ratones de la cepa CD1 (Fig. 16). Para ello se realizaron cultivos a partir de machos y a partir de hembras. Una vez los cultivos estuvieron preparados, fueron tratados durante 5 horas con estradiol (10^{-9} M, Sigma), tamoxifeno (10^{-9} M, Sigma), raloxifeno (10^{-9} M, Sigma) o letrozol (10^{-6} M, Novartis) solos o en combinación con LPS (500 ng/ml), que también se administró en solitario. Una vez finalizado el tratamiento, los astrocitos fueron lisados y el ARN extraído y retrotranscrito. Se realizó RT-PCR para analizar la expresión de genes relacionados con inflamación.

2.5.- EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS *IN VIVO* EN MACHOS, HEMBRAS Y HEMBRAS TRATADAS PERINATALMENTE CON PROPIONATO DE TESTOSTERONA

Con la finalidad de analizar *in vivo* algunos de los parámetros referentes a diferencias sexuales en la respuesta de los astrocitos al LPS, realizamos un experimento de administración perinatal de PT y posterior tratamiento con LPS *in vivo* (Fig. 17). Para ello, estudiamos 6 grupos experimentales. Todos ellos recibieron una inyección subcutánea de aceite de maíz o PT el día del nacimiento y 29 días después otra inyección con PBS (vehículo del LPS) o LPS (5mg/kg, L2630 Sigma). Así, los grupos experimentales fueron: hembras vehículo – PBS, hembras vehículo – LPS, hembras PT – PBS, hembra PT – LPS, machos vehículo – PBS, machos vehículo – LPS.

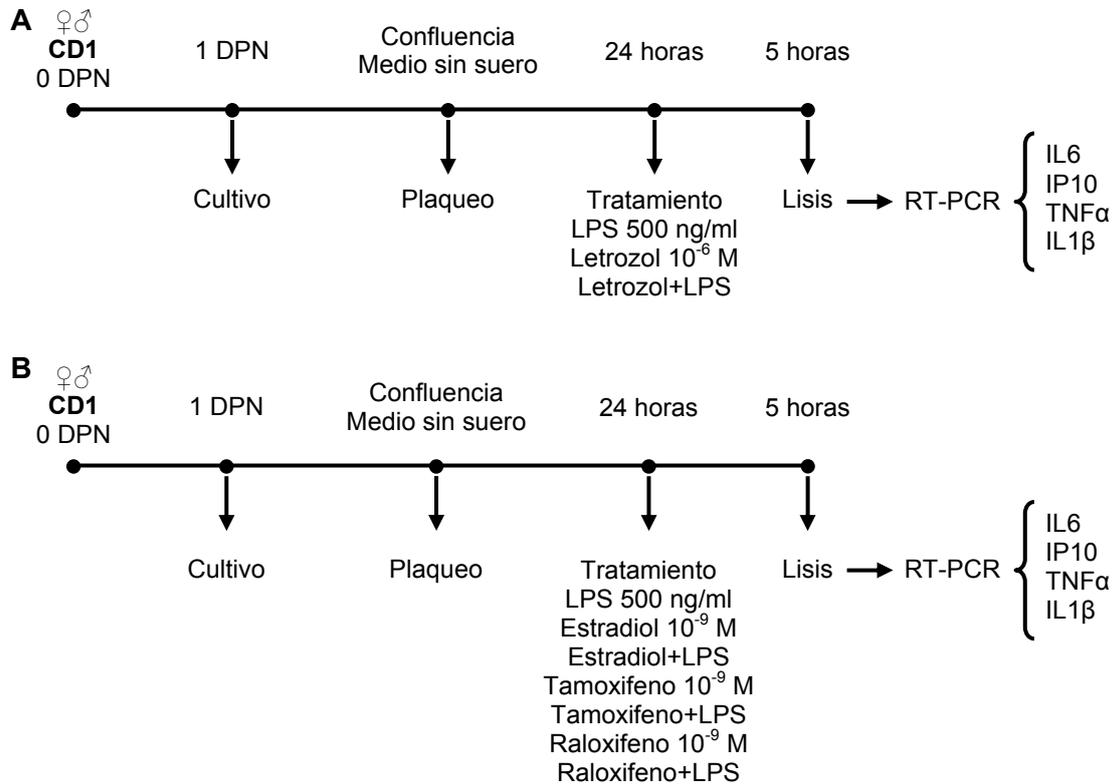


Fig. 16.- Diseño experimental para el estudio sobre el efecto de distintos compuestos estrogénicos sobre la respuesta de los astrocitos corticales al LPS. A.- Experimento con cultivos de sexos separados para analizar el efecto de un inhibidor de la aromatasa, el letrozol. B.- Experimento con cultivos de sexos separados para analizar el efecto de compuestos estrogénicos (estradiol, tamoxifeno y raloxifeno). DPN: Días post-natales. RT-PCR: "Real-time" PCR.

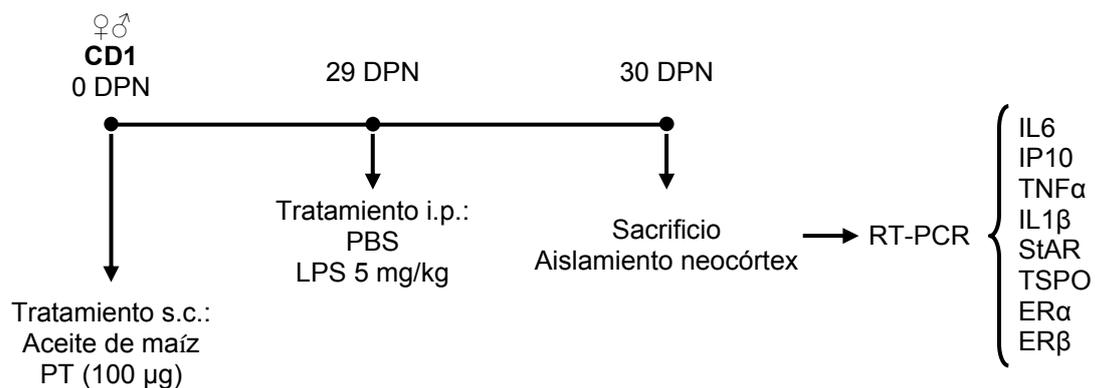


Fig. 17.- Diseño experimental para el estudio sobre los efectos de la administración de LPS *in vivo* en machos, hembras y hembras tratadas perinatalmente con propionato de testosterona. DPN: Días post-natales; s.c.: inyección subcutánea; PT: propionato de testosterona; i.p.: inyección intraperitoneal; PBS: tampón fosfato salino; RT-PCR: "Real-time" PCR.

Un día después de la inyección con PBS o LPS, los animales fueron sacrificados mediante decapitación, el neocórtex aislado, el ARN extraído y retrotranscrito y el ADNc resultante analizado mediante RT-PCR. Los genes analizados fueron: IL6, IP10, TNF α , IL1 β , StAR, TSPO, ER α y ER β .

2.6.- EFECTO DE LOS SERMs SOBRE LA REACTIVIDAD MICROGLIAL EN UN MODELO *IN VIVO* DE INFLAMACIÓN PERIFÉRICA

En este estudio analizamos el efecto de una batería de 8 SERMs sobre la reactividad microglial en cerebelo de ratas Wistar ovariectomizadas y tratadas de forma sistémica con LPS o vehículo (*Fig. 18*). Para ello, ratas hembra de 3 meses de edad, con una semana de ovariectomía, fueron inyectadas por vía intraperitoneal (i.p.) con el compuesto estrogénico correspondiente y una hora después con LPS (1 mg/kg, L2880, Sigma) disuelto en tampón fosfato salino (PBS). Tres días más tarde, los animales recibieron una segunda inyección del compuesto estrogénico y una hora después una segunda inyección de LPS (1,33 mg/kg, L2880, Sigma). El patrón y las dosis de administración del LPS se basaron en un estudio previo (Ng y Ling, 1997). Además, se realizaron dos grupos control: uno de ellos fue inyectado con el vehículo de los compuestos estrogénicos, solución salina (0,9% NaCl) con 40 μ l/mg de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), y el vehículo del LPS, PBS. El otro grupo control fue inyectado con el vehículo de los compuestos estrogénicos y LPS, con la finalidad de analizar el efecto inflamatorio sin tratamiento complementario.

Los compuestos estrogénicos analizados fueron: tamoxifeno 1mg/kg, raloxifeno 1mg/kg, ospemifeno 1mg/kg, fispemifeno 1mg/kg, bazedoxifeno 1mg/kg, HM-280 1mg/kg, HM-281 1mg/kg y HM-282 1mg/kg. Fueron obtenidos de Hormos Medical Ltd, Finlandia. Se disolvieron en 40 μ l/mg DMSO disuelto en solución salina y se administraron en dosis empleadas en estudios previos donde demostraron efectos neuroprotectores (Ciriza et al, 2004; Tapia-Gonzalez et al, 2008).

Una semana después de la primera inyección (4 días tras la segunda), los animales fueron perfundidos, el cerebro extraído, el cerebelo aislado y seccionado en cortes de 50 μ m de grosor con un Vibratomo. Se realizó inmunohistoquímica simple para detectar las células inmunorreactivas para MHC-II y se realizaron recuentos en la sustancia blanca central del cerebelo mediante la técnica del conteo por puntos.

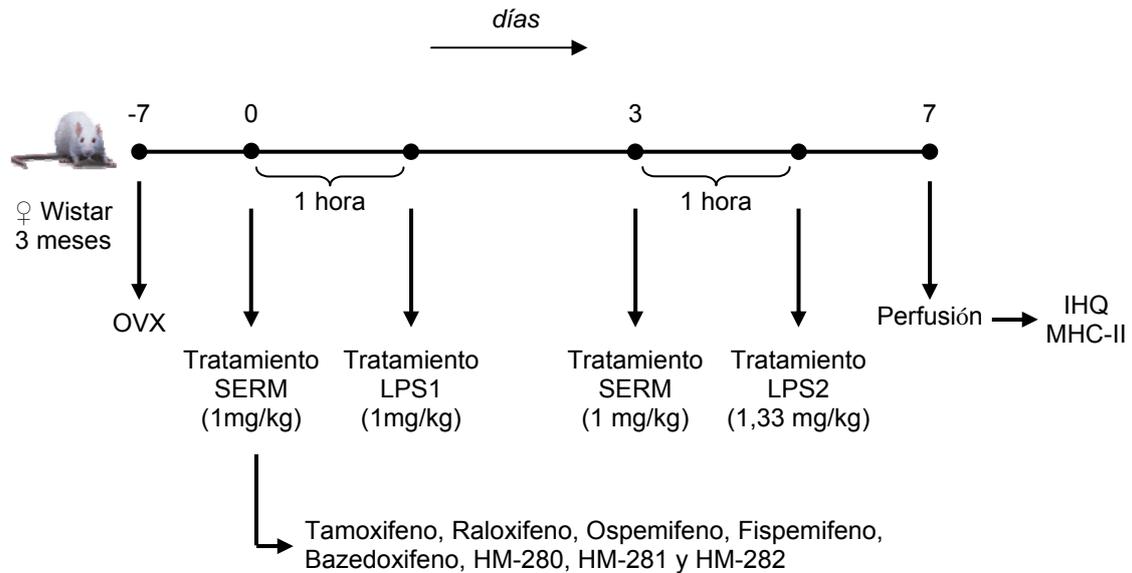


Fig. 18.- Diseño experimental para el estudio sobre el efecto de los SERMs sobre la reactividad microglial en un modelo *in vivo* de inflamación periférica. OVX: ovariectomía; IHQ: inmunohistoquímica.

2.7.- EFECTO DE LA EDAD, EL TIEMPO DE OVARIECTOMÍA, EL ESTRADIOL Y LOS SERMs SOBRE LA REACTIVIDAD GLIAL TRAS LESIÓN PENETRANTE EN RATA

En este estudio, esquematizado en las *figuras 19 y 20*, analizamos el efecto del estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno sobre la respuesta de las células gliales a la lesión penetrante en ratas ovariectomizadas. Para determinar si el efecto de los compuestos estrogénicos se ve alterado por la edad, estudiamos tres grupos de animales: 1) ratas jóvenes ovariectomizadas a los 2 meses de edad; 2) ratas de mediana edad ovariectomizadas a los 8 meses de edad; y 3) ratas viejas ovariectomizadas a los 18 meses de edad. Todos los animales fueron lesionados 15 días después de la ovariectomía. Además, para determinar si el efecto de los compuestos estrogénicos en animales viejos se veía modificado por el tiempo de privación hormonal, otro grupo de ratas fue ovariectomizado a los 2 meses de edad (a la misma edad que el grupo de animales jóvenes) y falsamente operado (sham) a los 18 meses de edad (a la misma edad a la que el otro grupo de animales viejos fue ovariectomizado), 15 días antes de la lesión penetrante. De esta forma, ambos grupos de animales viejos tuvieron la misma edad, 18 meses y medio, cuando recibieron la lesión y el tratamiento con los compuestos estrogénicos. Debido a los elevados niveles de estrógenos en plasma en las ratas Wistar hembra de 18 meses de edad de nuestra colonia (68 ± 9 pg/ml), el primer grupo de ratas sufrió privación de hormonas ováricas

Material y métodos

únicamente durante los 15 días anteriores a ser lesionadas. En contraste, el segundo grupo de animales viejos estuvo privado de hormonas ováricas durante 16 meses y 15 días antes de ser lesionadas.

Los animales recibieron una inyección subcutánea de aceite de maíz (vehículo), estradiol (100µg/kg, E2758, Sigma), tamoxifeno (1mg/kg, T5648, Sigma) o raloxifeno (1mg/kg, R1402, Sigma) inmediatamente tras la realización de la lesión, una segunda inyección 24 horas después y una tercera inyección 48 horas después. Las dosis empleadas fueron seleccionadas en base a estudios previos. Además, se realizaron 3 inyecciones del análogo de timidina 5'-bromodeoxiuridina (BrdU, 50 mg/kg, Sigma), para poder reconocer posteriormente proliferación celular, a las 24, 48 y 72 horas de la lesión.

Además, en el grupo de animales jóvenes, se realizaron tratamientos con otros dos compuestos estrogénicos, agonistas selectivos de los receptores de estrógeno: el PPT (agonista del receptor β) y el DPN (agonista del receptor α), con la finalidad de discernir a través de qué receptor estaban actuando los compuestos previamente empleados. Para ello, se realizaron 3 inyecciones en días consecutivos con PPT (1mg/kg, Tocris Cookson Inc.), DPN (1mg/kg, Tocris Cookson Inc.) o una combinación de ambos con el patrón previamente descrito.

Una semana después de realizar la lesión penetrante, los animales fueron sacrificados mediante perfusión intracardiaca y el cerebro extraído y seccionado en cortes de 50 µm de grosor con un Vibratomo. Se realizó inmunohistoquímica simple para detectar las células inmunorreactivas para vimentina y MHC-II e inmunohistoquímica doble (de fluorescencia o mediante revelado con DAB-Ni) para los mismos marcadores en combinación con BrdU. A continuación, se realizaron recuentos en la región lateral a la lesión del hipocampo mediante las técnicas correspondientes a cada tinción.

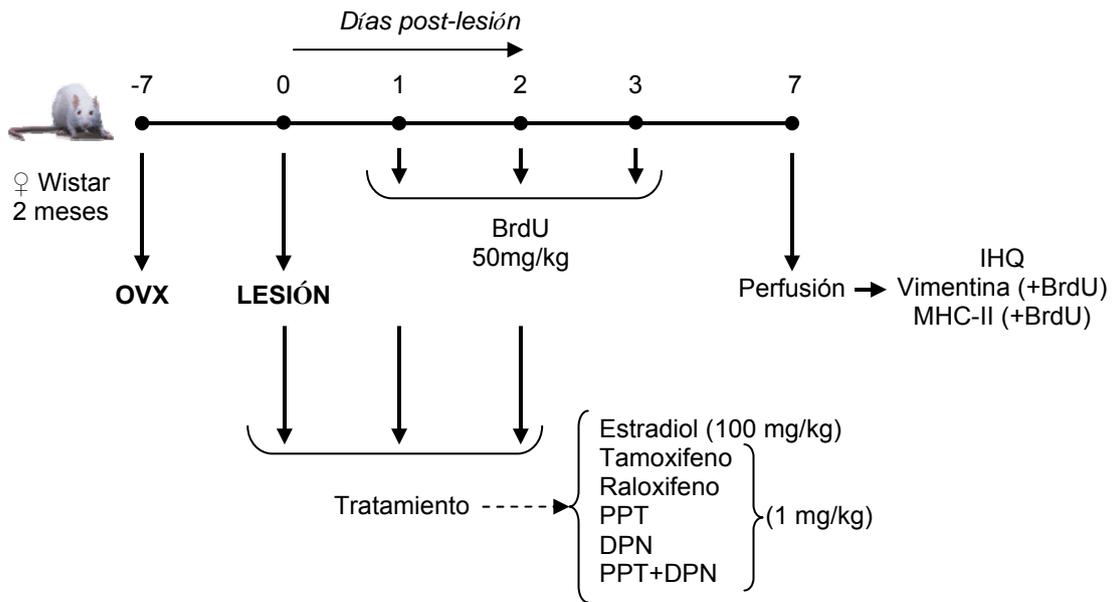


Fig. 19.- Diseño experimental para el estudio en animales jóvenes sobre el efecto del estradiol y los SERMs sobre la reactividad glial tras lesión penetrante. OVX: ovariectomía; IHQ: inmunohistoquímica.

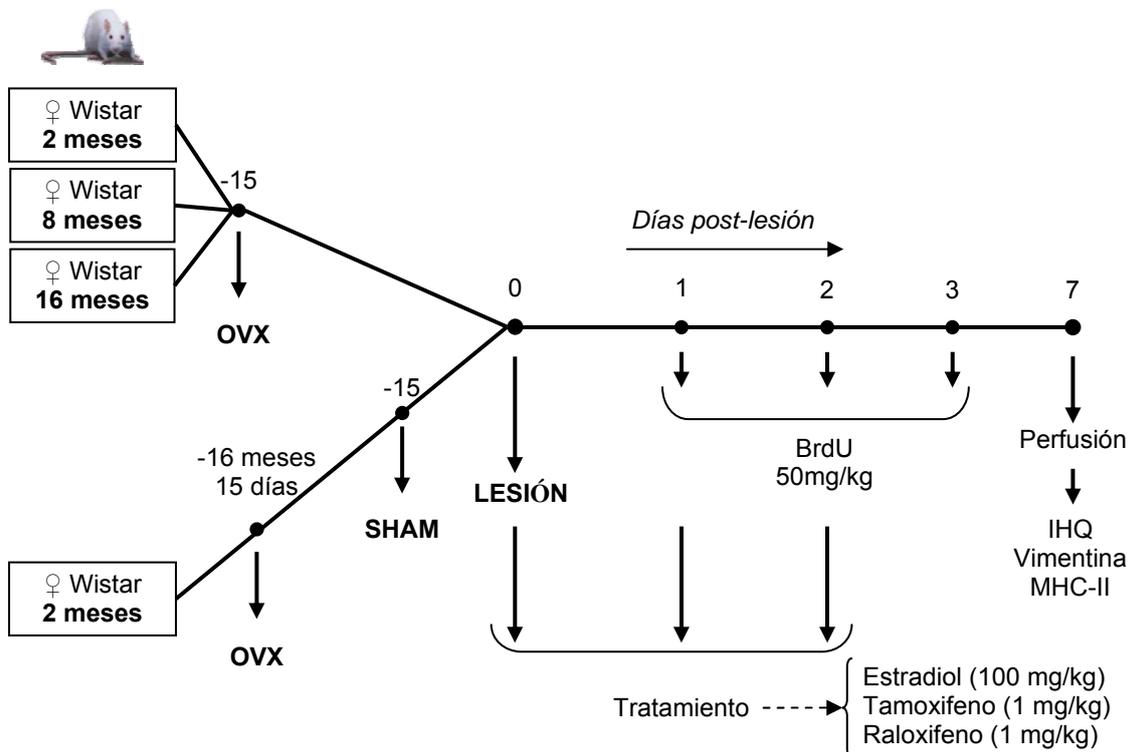


Fig. 20.- Diseño experimental para el estudio sobre el efecto de la edad, el tiempo de ovariectomía, el estradiol y los SERMs sobre la reactividad glial tras lesión penetrante en rata. OVX: ovariectomía; SHAM: operación simulada; IHQ: inmunohistoquímica.

3. MÉTODOS

3.1.- CULTIVO DE ASTROCITOS CORTICALES DE RATÓN CD1

Estos cultivos de astrocitos corticales se realizaron a partir de crías de ambos sexos de forma separada, a partir de animales postnatales de un día de edad, realizando un cultivo a partir de una sola cría. El sexo de las crías fue definido a partir del tamaño de la papila genital y de la distancia anogenital, que es mayor en machos que en hembras.

Utilizando el microscopio de disección, se extrajo el cerebro, se eliminaron las meninges y se aisló el neocórtex completo en HBSS 1x (Hank's balanced salt solution, Invitrogen, Paisley, UK). A continuación, el córtex fue disociado mecánicamente, lavado dos veces en HBSS y filtrado a través de una maya de nylon de 40 μm en medio DMEM/F12 sin rojo fenol (Invitrogen) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; Invitrogen) y un 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen). La suspensión de células fue centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos y el pellet con las células fue resuspendido en el mismo medio de cultivo y plaqueado en botellas para cultivo celular de 75 cm^2 . Las botellas fueron mantenidas a 37°C con una concentración del 5% de CO_2 . El medio fue cambiado tras un día *in vitro* y a continuación dos veces por semana hasta que las células alcanzaron confluencia. A partir de estos cultivos se obtuvieron cultivos enriquecidos de astrocitos tras agitación durante la noche a 37°C y 280 rpm en un agitador de sobremesa (Thermo Forma, Marietta, OH, USA) para minimizar la contaminación de oligodendroglía y microglía. Tras lavar las botellas con PBS, los astrocitos fueron levantados mediante incubación con tripsina 0,5% (tipo II-S; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y ácido etilendiaminotetraacético 0,04% (EDTA, Sigma-Aldrich). El proceso de tripsinización fue detenido con medio DMEM/F12 suplementado con FBS, la suspensión celular fue centrifugada y el pellet resuspendido y sembrado en placas de 6 pocillos cubiertas con poli-L-lisina (Sigma) a una densidad de 200.000 células por pocillo en medio libre de suero para su uso tras 24 horas.

3.2.- CULTIVO DE ASTROCITOS CORTICALES DE RATÓN BALB/C

Estos cultivos de astrocitos corticales se realizaron de forma separada a partir de crías postnatales de un día de edad hembra y macho, realizando un cultivo a partir de todas las crías del mismo sexo procedentes de la misma madre (entre 2 y 4 crías por cultivo).

El proceso de disección y los tampones y medios de cultivo empleados fueron los mismos que para los cultivos de ratón CD1. Una vez aisladas las cortezas, fueron incubadas durante 10 minutos con TrypLE Express sin rojo fenol (Invitrogen), disgregadas mecánicamente, filtradas a través de una malla de nylon y centrifugadas durante 5 minutos a 1400 rpm. El pellet fue resuspendido y sembrado en placas de 10 cm de diámetro cubiertas con poli-L-ornitina (Sigma). El medio fue cambiado a las 24 horas con sumo cuidado y a las 48 horas de forma vigorosa para eliminar los residuos tisulares aparecidos sobre las células adheridas a la placa. A continuación, el medio fue cambiado dos veces por semana hasta que las células alcanzaron confluencia. En ese momento, fueron agitadas vigorosamente de forma manual en campana, lavadas con tampón fosfato salino (PBS, Invitrogen) e incubadas con tripsina 0,5% para levantar los astrocitos, que fueron centrifugados, resuspendidos y sembrados nuevamente en placas de 6 pocillos cubiertas con poliornitina, esta vez con medio DMEM/F12 completo. Dicho medio fue cambiado 2 veces por semana hasta que las células alcanzaron de nuevo confluencia, momento en el cual fue sustituido por DMEM/F12 sin suero durante las 24 horas previas al tratamiento.

3.3.- ANDROGENIZACIÓN PERINATAL

Para simular el pico de testosterona que sufren los machos en torno al nacimiento, se inyectaron animales recién nacidos de ambos sexos con aceite de maíz (50 µl, vehículo) y a hembras con propionato de testosterona (100 µg por animal, 2 mg/ml, Sigma) por vía subcutánea. Un día más tarde, los cultivos de astrocitos fueron preparados a partir de las cortezas cerebrales de estos animales.

3.4.- OVARIECTOMÍA DE RATA WISTAR

Para minimizar los niveles circulantes de hormonas gonadales, en los experimentos con ratas hembra postpuberales se ovariectomizó bilateralmente a los animales bajo anestesia inhalatoria con halotano (Fluothane, AstraZeneca).

Material y métodos

Se escogió la ruta de acceso dorsal para proceder a la ovariectomía, tomando como referencia las vértebras lumbares. Una vez rasurada y desinfectada la piel, se realizó una incisión medial única, desde la cual se accedió a la musculatura abdominal de cada uno de los lados del animal. Se separaron los correspondientes paquetes musculares con la punta de unas tijeras romas para dar acceso a la cavidad peritoneal. Se extrajo la trompa uterina, en cuyo extremo se encuentra el ovario, y se hizo un lazo con sutura reabsorbible estéril alrededor de la parte distal del oviducto. Se seccionó el ovario por encima del lazo y se suturaron el músculo y la piel. El proceso se repitió con el ovario del otro lado del animal.

3.5.- LESIÓN PENETRANTE DE LA CORTEZA PARIETAL Y EL HIPOCAMPO ANTERIOR DORSAL EN RATA WISTAR

Se practicó una lesión cerebral penetrante (*Fig. 21*) en ratas hembra previamente ovariectomizadas de 3 grupos de edad: jóvenes (2,5 meses de edad), de mediana edad (8,5 meses de edad) y viejas (18,5 meses de edad).

Durante todo el proceso, los animales permanecieron anestesiados con halotano y colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Se rasuró el pelo de la cabeza, se limpió la zona con etanol y se realizó una incisión con bisturí en la piel para exponer el cráneo, donde se practicó un carril en el hemisferio izquierdo con una broca dental con las siguientes coordenadas: 2 mm lateral para ratas jóvenes o 2,4 mm lateral para ratas de mediana edad y viejas, en todos los casos desde 2 mm posterior a bregma hasta 5 mm posterior a bregma (longitud final del carril: 3 mm). Por este carril se desplazó una aguja de acero, roma, de 0,45 mm de diámetro, introducida hasta una profundidad de 5,5 mm desde la superficie del cráneo. A continuación, se retiró la aguja, se detuvo la eventual pérdida de sangre con gasas estériles y se suturó la piel de la cabeza.

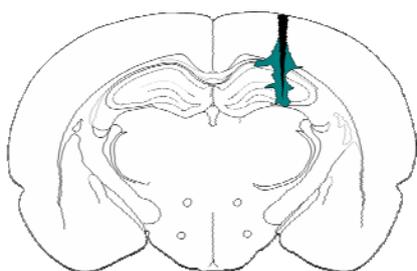


Fig. 21.- Representación esquemática de una lesión penetrante y cicatriz glial (en azul) en la corteza parietal y el hipocampo anterior dorsal. La figura muestra el recorrido de la aguja desde su inserción hasta una profundidad de 5,5 mm. Si la lesión se encontraba demasiado alejada o dentro del giro dentado, el animal era descartado. Todas las secciones utilizadas fueron seleccionadas para obtener la máxima homogeneidad, con el fin de mantener las mismas condiciones para todos los experimentos.

3.6.- SACRIFICIO

3.6.1.- Perfusión de rata Wistar

Para obtener tejido cerebral fijado, los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (100 mg/kg peso corporal, Normon, Madrid, España) y perfundidos a través del ventrículo izquierdo, primero con 50 ml de solución salina (0,9% NaCl) para limpiar los tejidos de sangre y a continuación con 250 ml de solución de fijación (4% paraformaldehído en tampón fosfato 0,1M; pH 7,4). El cerebro fue extraído, mantenido en post-fijación por inmersión en la misma solución a 4°C durante una noche y aclarado en tampón fosfato. Se obtuvieron secciones frontales de los cerebros y sagitales de los cerebelos, de 50 μ m de grosor, empleando un Vibratomo (VT 1000 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

3.6.2.- Decapitación de ratón CD1

Para obtener tejido cerebral fresco, los animales fueron decapitados y el cerebro extraído para su disección. Sobre una superficie metálica fría, se retiraron las meninges y se aisló el neocórtex en su totalidad. El tejido fue congelado a -80°C hasta su uso.

3.7.-EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN se realizó tanto a partir de tejido como de cultivos celulares. En el caso de la extracción a partir de tejido y de cultivos de ratón CD1, se aisló el ARN total empleando el kit comercial illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE-Healthcare, Buckinghamshire, UK) mientras que en el caso de la extracción a partir de cultivos de ratón Balb/c se empleó peqGOLD RNAPure (PeqLab, Erlangen, Germany). En ambos casos se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. La cantidad de ARN aislada fue medida empleando un espectrofotómetro de alta sensibilidad (Nanodrop, Wilmington, USA).

3.8.-RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción (RT) se realizó a partir de 1 μ g de ARN para cultivos celulares y a partir de 2 μ g para tejido. El protocolo llevado a cabo fue diferente para las muestras extraídas con distintos kits comerciales de aislamiento de ARN.

Material y métodos

Para las muestras de tejido y de cultivos de ratón CD1, se incubaron las muestras en un primer paso de desnaturalización para eliminar estructuras secundarias a 70°C durante 5 minutos junto con una mezcla de hexámeros de nucleótidos (Random Primers, Gibco Life Technologies), empleados como cebadores para el inicio de la RT. A continuación, se incubaron durante 5 minutos en hielo y se añadió una solución que incluía la retrotranscriptasa (M-MLV, Promega) y los desoxinucleótidos fosfato (dNTPs, Invitrogen). Esta mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C y a continuación 15 minutos a 70°C para inactivar la retrotranscriptasa. El ADN complementario resultante fue conservado a -20°C hasta su uso.

Para las muestras de cultivos de ratón Balb/c, se empleó la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen) junto con una mezcla de hexámeros de nucleótidos (Random Primers, Invitrogen) y los desoxinucleótidos fosfato (Roti-mix PCR3, Roth). Para su uso se siguieron las instrucciones del fabricante de la retrotranscriptasa. Los tiempos y temperaturas de incubación fueron los mismos que en el caso anterior.

En ambos casos, se realizaron controles negativos añadiendo agua en lugar de ARN.

3.9.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (RT-PCR)

Las PCR cuantitativas en tiempo real fueron llevadas a cabo en dos termocicladores diferentes: ABI Prism 7500 Thermal Cycler (Applied Biosystems) e iQ5 detection system (Bio-Rad).

3.9.1.-RT-PCR en termociclador ABI Prism 7500 Thermal Cycler

3.9.1.1.- Diseño de oligonucleótidos cebadores específicos (primers)

Los primers (*Tabla 1*) fueron diseñados empleando el software Primer Express 3.0 teniendo en cuenta los siguientes parámetros: temperatura de anillamiento a 60°C, longitud del primer entre 15 y 30 bases, longitud del amplicón entre 100 y 200 bases. La especificidad de cada pareja de oligonucleótidos obtenidos con el programa fue comprobada en primer lugar realizando un primer-BLAST (basic local alignment search tool, NCBI) y más adelante secuenciando el producto de PCR amplificado. Para ello,

se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. La banda de PCR (única y coincidente con el peso de amplicón predicho por el programa Primer Express y el primer-BLAST) fue purificada con un kit de purificación de productos de PCR (QIAquick PCR purification Kit, Qiagen) y secuenciada posteriormente (Servicio de Secuenciación Automática de ADN, Secugen SL, Madrid).

3.9.1.2.- Validación de los oligonucleótidos cebadores: realización de curvas estándar (o curvas patrón) y elección del control endógeno

Para comprobar la funcionalidad de los primers diseñados se realizaron curvas estándar, tanto de los genes incógnita que deseamos medir como de los genes que potencialmente podrían servir como control endógeno, con concentración de muestra decreciente (realizando diluciones seriales en agua destilada) y por separado para cada tipo de muestra (de tejido o procedente de cultivos celulares). Sólo se emplearon aquellos primers que dieron lugar a una curva con pendiente cercana a -3,3. Para realizar los ensayos se escogió la dilución de muestra media en la que dicha pendiente estaba presente, esto es, una dilución 1:4 o 1:8 a partir del producto de la RT para los genes incógnita y 1:100 para el control endógeno designado, un primer comercial con sonda Taqman para la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, Applied Biosystems)

3.9.1.3.- RT-PCR

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos. Para cada reacción se depositaron 5µl del ADNc en la dilución correspondiente en cada pocillo y a continuación se añadió un volumen de 10 µl de una solución que contenía los oligonucleótidos cebadores a una concentración de 500nM junto con la mezcla de reacción (SYBR GREEN PCR Master Mix o TaqMan Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems). Cada muestra fue analizada por duplicado. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo durante 40 ciclos con 2 etapas: la primera a 95°C durante 15 segundos para desnaturalizar el ADN y la segunda a 60°C durante 1 minuto para el anillamiento y elongación de los primers. Para detectar la presencia de posibles contaminaciones de ADN genómico, en cada ensayo se incluyeron pocillos en los que el producto de la RT fue sustituido por agua destilada. Para detectar la posible presencia de dos productos de amplificación y la aparición de dímeros de oligonucleótidos, se realizó una curva de fusión (melting curve) al final del ensayo. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el método relativo del ΔC_t ,

Material y métodos

normalizando los resultados de los genes incógnita a los valores para cada muestra de GAPDH, empleada como control interno de la cantidad total de ADNc. La cantidad relativa (RQ, "relative quantity") de cada gen, normalizada a nivel de grupo experimental como porcentaje relativo (el grupo designado como 100% aparece indicado en cada figura de resultados), fue empleada para realizar los análisis estadísticos.

Tabla 1.- Oligonucleótidos cebadores no comerciales empleados para RT-PCR con el sistema Abi-Prism 7500.

Gen	Forward Primer (5'→ 3')	Reverse Primer (5'→ 3')
IL6	GAAACCGCTATGAAGTTCCTCTCTG	TGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
IP10	CAGTGAGAATGAGGGCCATAGG	CGGATTCAGACATCTCTGCTCAT
TNF α	GAAAAGCAAGCAGCCAACCA	CGGATCATGCTTTCTGTGCTC
IL1 β	CGACAAAATACCTGTGGCCT	TTCTTTGGGTATTGCTTGGG
TLR4	GGCTCCTGGCTAGGACTCTGA	TCTGATCCATGCATTGGTAGGT
StAR	GTCCCTCCAAGACTAAACTCACTTG	GGTGGTTGGCGAACTCTATCTG
TSPO	GAGGTTTCACAGAGGACGCTATG	ATCTGCCGGGCACCAAA
Aro	GGATGTGTTGACCCTCATGAGAC	GATGTTTGGTTTGATGAGGAGAGC
ER α	GATCCCACCATGCACAGTGA	GGAGCATCTACAGGAACACAGGTA
ER β	CCTGGTCTGGGTGATTTCA	ACTGATGTGCCTGACATGAGAAAG

IL6: interleuquina 6. IP10: proteína inducible por interferón 10, TNF α : factor de necrosis tumoral α . IL1 β : interleuquina 1 β . TLR4: receptor toll-like 4. StAR: proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis. TSPO: proteína translocadora de 18kda. Aro: aromatasa. ER α : receptor de estrógenos α . ER β : receptor de estrógenos β .

3.9.2.-RT-PCR con el sistema de detección iQ5

En este caso, los oligonucleótidos empleados habían sido diseñados y validados previamente (Arnold S. et al, 2008) (Tabla 2).

Los ensayos se realizaron igualmente en placas de 96 pocillos. Para cada reacción se depositaron 2 μ l del ADNc diluido 1:10 en agua destilada a partir del producto de la RT en cada pocillo y a continuación se añadió un volumen de 8 μ l de una solución que contenía los oligonucleótidos cebadores junto con la mezcla de reacción (IQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad). Cada muestra fue analizada por

duplicado. El protocolo de RT-PCR estuvo compuesto por una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguida de 40 ciclos consistentes en 10 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento apropiada para cada gen, 30 segundos a 72°C y 10 segundos a 78°C. Para obtener la curva de fusión de los distintos productos de PCR, se añadió una etapa consistente en 81 ciclos con temperatura creciente desde los 55°C hasta los 81°C en intervalos de 0,5°C para cada ciclo de 10 segundos. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el método de la SQ. Para ello, en cada uno de los ensayos se incluyó una curva estándar de las muestras, en donde la cantidad de ARN existente previa a la retrotranscripción era conocida, de tal manera que el resultado para cada pocillo fue interpolado en dicha curva para obtener una cantidad inicial (Starting Quantity, SQ) del ARN presente en cada muestra y para cada gen. Dicha SQ fue normalizada a la cantidad inicial de ARN ribosomal 18S, que fue empleado en este caso como control interno de la cantidad total de ADNc en cada muestra. La SQ, normalizada a nivel de grupo experimental como porcentaje relativo (el grupo designado como 100% aparece indicado en cada figura de resultados), fue empleada para realizar los análisis estadísticos.

Tabla 2.- Oligonucleótidos cebadores no comerciales empleados para RT-PCR con el sistema iQ5, descritos por Arnold et al (2008).

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	T ^a de anillamiento
CoxIV1	TATGCTTTCCCCACTTACGC	GCCCACAACACTGTCTTCCATT	60°C
CoxIV2	AGATGAACCATCGCTCCAAC	ATGGGGTTGCTCTTCATGTC	65°C
Mfn1	CAGAGAAGAGGGTTTATTCA	ACTCATCAACCAAAACAGAT	53°C
Mfn2	ATGTTGTGTTCTTTCTG	AAGTGCTCTCTGCTAAATGT	53°C
Fis1	CTACAGGGGTGCAGGAGAAA	AGATGGACTGGTAGGCATGG	58°C
Drp1	TTTGCTCGTGTGAAGACTGG	TCCTGGAGCTTCCTTTCTGA	58°C
Pcna	TCAGGAGCAATCTTCAAAGG	TTTTTCACAAAAGCCACTCC	59°C
Bcl2	CATCCCAGCTTCACATAACC	GCAATCCGACTCACCAATAC	59°C
Bax	GGCAGACAGTGACCATCTTT	AGGGGACCTGAGGTTTATTG	59°C
18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	60°C

CoxIV1: citocromo c oxidasa subunidad IV isoforma 1. CoxIV2: citocromo c oxidasa subunidad IV isoforma 2. Mfn1: mitofusina 1. Mfn2: mitofusina 2. Fis1: homólogo de fisión (membrana mitocondrial externa). Drp1: proteína relacionada con la dinamina 1. Pcna: antígeno nuclear de células en proliferación. Bcl2: proteína de linfoma de célula B 2. Bax: proteína X asociada a Bcl2. 18S: ARNr 18S.

3.10.-INMUNOHISTOQUÍMICA

Las inmunohistoquímicas se realizaron siempre a partir de secciones de 50 μm de tejido cerebral o cerebelar fijado y en flotación. En el caso de tejido cerebral, las secciones histológicas fueron seleccionadas de tal modo que mostraran una lesión completa desde el límite dorsal hasta el ventral del hipocampo. En el caso de tejido cerebelar, se seleccionaron cortes en los que apareciera la sustancia blanca central, donde se realizaron los recuentos.

3.10.1.- Inmunohistoquímica simple

Todos los lavados e incubaciones fueron realizados en agitación moderada, utilizando una solución de lavado compuesta por tampón fosfato 0,1M; pH 7,4; con 0,3% de Tritón X-100 y 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA). Este tampón también se utilizó para diluir los anticuerpos.

Una vez lavadas, las secciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en una solución del 3% de peróxido de hidrógeno en metanol al 30% para inhibir la actividad peroxidasa endógena. Tras lavarlas profusamente, las secciones se incubaron durante dos noches a 4°C en el anticuerpo primario diluido en solución de lavado con un 5% de suero normal de cabra (Gibco). Se utilizaron anticuerpos primarios para vimentina (1:500; monoclonal, DAKO), para GFAP (1:1000, monoclonal, Sigma) y para MHC-II (1:250, monoclonal, MCA46G, Serotec). A continuación, las secciones fueron aclaradas en solución de lavado e incubadas durante 2 h. a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con biotina, generado en cabra contra inmunoglobulinas G de ratón. Una vez realizados los lavados pertinentes, los cortes fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (diluido 1:250; ImmunoPure ABC peroxidase staining kit, Pierce). El producto de la reacción fue revelado mediante 2 $\mu\text{g/ml}$ de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España) y 0,01% de H_2O_2 en tampón fosfato 0,1M. A continuación, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, deshidratadas, cubiertas con DEPEX (BDH Laboratory Supplies, Inglaterra) y cubreobjetos y observadas con un microscopio Leica DMRB-E.

3.10.2.- Inmunohistoquímica doble de fluorescencia con marcaje para BrdU

Todos los lavados e incubaciones fueron realizados en agitación moderada. Los anticuerpos se diluyeron en tampón fosfato 0,1M; pH 7,4 y los lavados también se realizaron con este tampón.

Tras lavar los cortes, los sometimos a tratamiento ácido para exponer el ADN de la célula utilizando una solución de HCl 2N durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron profusamente las secciones y se incubaron con anticuerpo primario anti-BrdU policlonal generado en oveja (Abcam, UK), diluida 1:50, durante dos noches a 4°C. Después de ser lavadas, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas G de oveja, conjugado con el fluorocromo Alexa 594 (rojo; diluido 1:1000, Invitrogen, EEUU), durante 2 horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, que se mantuvieron a partir de este momento en todo el proceso. A continuación, se lavó de nuevo y se realizó la incubación con el segundo anticuerpo primario, monoclonal para vimentina, durante dos noches a 4°C. Los cortes fueron lavados e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas G de ratón, generado en cabra y conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (verde; diluido 1:1000, Invitrogen, EEUU). Tras realizar nuevos lavados, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, cubiertas con gerbatol y cubreobjetos y observadas con un microscopio confocal Leica TCS SP5.

3.10.3.- Inmunohistoquímica doble con marcaje para BrdU y MHC-II mediante revelado con DAB-Ni

Tras realizar varias pruebas, observamos que la inmunofluorescencia doble con marcaje para BrdU y MHC-II no daba resultados. Por ello, nos planteamos realizar dicha inmunohistoquímica doble de tal forma que las preparaciones pudieran ser observadas en el microscopio óptico, empleando una técnica basada en la observación de los precipitados resultantes de una reacción enzimática y no en la visualización directa de los anticuerpos empleados. Nos decantamos por el marcaje de la BrdU con DAB-Ni, que da lugar a un precipitado azul, y del MHC-II con DAB, que da lugar a un precipitado marrón. Dichos precipitados se podían distinguir claramente en la observación al microscopio haciendo posible los recuentos de colocalización.

Material y métodos

Todos los lavados e incubaciones fueron realizados en agitación moderada, utilizando una solución de lavado compuesta por tampón fosfato 0,1M; pH 7,4; con 0,3% de Tritón X-100 y 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA). Este tampón también se utilizó para diluir los anticuerpos.

Tras lavar los cortes, fueron sometidos a tratamiento ácido para exponer el ADN de la célula con una solución de HCl 2N durante 30 minutos a 37°C. A continuación, fueron lavados profusamente e incubados con el anticuerpo primario policlonal anti-BrdU, diluido 1:50 (Abcam, UK) durante dos noches a 4°C. Las secciones fueron aclaradas en solución de lavado e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario, generado en conejo, contra inmunoglobulinas G de oveja, conjugado con biotina (diluido 1:300; Pierce, Rockford, IL, USA). Una vez realizados los lavados pertinentes, los cortes fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, diluido 1:250. El producto de la reacción fue revelado en un medio que contenía 2 µg/ml de DAB y 0,01% de H₂O₂ diluidos en tampón fosfato 0,1M. Con el fin de intensificar la reacción y facilitar la visualización de los núcleos celulares positivos para BrdU, se añadió al medio sulfato de níquel-amonio (concentración final del 2%) y cloruro de cobalto (concentración final del 2%). Después de lavar, las secciones se incubaron durante 2 noches a 4°C con un anticuerpo monoclonal para MHC-II (diluido 1:250, Serotec). A continuación, los cortes se lavaron e incubaron, durante 2 h a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario, generado en cabra, contra inmunoglobulinas G de ratón y conjugado con biotina (diluido 1:300; Pierce, Rockford, IL, USA). Una vez realizados los lavados pertinentes, los cortes se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente, con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (diluido 1:250). El producto de la reacción fue revelado en un medio que contenía 2 µg/ml de DAB y 0,01% de H₂O₂ diluidos en tampón fosfato 0,1M. A continuación, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, deshidratadas, cubiertas con DEPEX y cubreobjetos y observadas con un microscopio Leica DMRB-E.

3.10.4.- Controles de especificidad

En las pruebas inmunohistoquímicas se llevaron en paralelo distintos controles de especificidad. Sólo se consideraron válidas para estudio las pruebas en las que los siguientes controles aparecían sin marcajes:

A.- Omisión del anticuerpo primario: realizado para descartar que la señal se debiera a uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios o a fondo derivado de otras etapas del proceso.

B.- Control de reactividad cruzada: empleado en los experimentos de colocalización, para descartar posibles interferencias entre las dos parejas de anticuerpos. Se incubaron las secciones con uno de los anticuerpos primarios para marcadores gliales (todos generados en ratón), y a continuación con ambos anticuerpos secundarios: un anti IgG de conejo marcado con Alexa verde y un anti IgG de ratón marcado con Alexa roja.

C.- Control de autofluorescencia: Para descartar fluorescencia intrínseca del tejido, en la inmunohistoquímica con fluorescencia se incluyeron cortes incubados en ausencia tanto del anticuerpo primario como del secundario.

Tabla 3.- Anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpos Primarios	Especie	Dilución	Referencia
Vimentina (V9)	Ratón	1:500	DAKO
MHC-II (MCA46G)	Ratón	1:250	Serotec
GFAP	Ratón	1:1000	Sigma
BrdU policlonal	Oveja	1:50	Abcam, UK

Tabla 4.- Anticuerpos secundarios empleados.

Anticuerpos Secundarios	Especie	Dilución	Referencia
Cabra anti IgG de ratón biotinado	Cabra	1:300	Pierce
Conejo anti IgG de oveja biotinado	Conejo	1:300	Pierce
Cabra anti IgG de ratón Alexa-488 (verde)	Cabra	1:1000	Invitrogen
Burro anti IgG de oveja Alexa-594 (rojo)	Burro	1:1000	Invitrogen

3.11.- ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

3.11.1.- Técnica del disector óptico

Esta técnica se empleó para realizar recuentos del número de células inmunorreactivas en los experimentos de administración sistémica de LPS y de lesión penetrante.

Estudios preliminares han demostrado la presencia de células inmunorreactivas para MHC-II en distintas regiones del cerebro de animales tratados con LPS, siendo muy abundantes en la sustancia blanca del cerebelo, tanto en la sustancia blanca central como en la capa molecular de la corteza cerebelar. Por este motivo, el cerebelo fue seleccionado para realizar el análisis morfométrico de la microglía reactiva en el modelo de administración sistémica de LPS. El número de células inmunorreactivas para MHC-II fue evaluado en la sustancia blanca central del cerebelo en una región dorsal y anterior al núcleo lateral cerebelar, localizado entre los lóbulos 2 y 5 y a una distancia lateral de entre 2,4 y 2,9 mm de la línea central, de acuerdo con el atlas estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1986). El visor de recuento empleado fue de 220 x 220 micras. Se contaron entre 25 y 30 campos por animal.

El número de astrocitos reactivos en el modelo de lesión penetrante fue evaluado dentro de los límites del hipocampo y hasta una distancia de 350 micras desde el borde exterior de la lesión. El visor de recuento empleado fue de 55 x 55 micras. Se contaron 78 campos por animal.

El número de células inmunorreactivas se estimó con la técnica del disector óptico, tal y como está descrita por Howard y Reed (Howard y Reed, 1998). Se utilizó el grosor total de la sección, medido utilizando un microcator (Heidenhain-Metro MT 12/ND221, Traunreut, Alemania) acoplado a un microscopio Leitz, como altura del disector (von Bartheld, 1999; Hatton y von Bartheld, 1999). El volumen de la región de recuento fue estimado de acuerdo al principio de Cavalieri usando el método de conteo por puntos de Weibel (1979). Como no se observaron diferencias significativas en este parámetro entre los distintos grupos experimentales, los cambios en el número de células inmunorreactivas por unidad de volumen se interpretaron como cambios en el número de dichas células y no como variaciones en el volumen de referencia. Se

aplicó la siguiente fórmula para conocer el número de células por milímetro cúbico a partir del número de células por campo:

$$N^{\circ}\text{cels/mm}^3 = (N \times 1000) / (A \times Z), \text{ donde}$$

$N = n^{\circ}$ células por campo
 $A = \text{área del campo (mm}^2\text{)}$
 $Z = \text{grosor del corte}$

Se contaron todas las células cuyo núcleo entrase en foco cuando se barría toda la altura del disector. Con el fin de minimizar el sesgo en la evaluación, todos los recuentos fueron realizados sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las secciones.

3.11.2.- Fracción de volumen de células inmunorreactivas para MHC-II.

Para los recuentos de microglía reactiva en el modelo de lesión cerebral penetrante no fue posible emplear la técnica del disector óptico por la enorme densidad de células en la zona perilesional, que hacía imposible distinguirlas individualmente. Por ello se empleó la técnica del conteo por puntos, descrita en detalle por Weibel (Weibel, 1979) para evaluar la fracción de volumen ocupada por el material inmunorreactivo para MHC-II. Se dibujó la línea lateral del hipocampo hasta el borde externo de la lesión y las áreas en las que aparecía material inmunorreactivo para MHC-II empleando un microscopio Leitz equipado con una cámara lúcida. Una rejilla de puntos se superpuso a los dibujos y se contó el número total de puntos incluidos en el hipocampo (volumen de referencia) y el número de puntos incluidos en células MHC-II inmunorreactivas hasta una distancia de 350 micras desde el borde de la lesión. El área asociada a cada punto fue de $614 \mu\text{m}^2$. La fracción de volumen ocupado por células MHC-II inmunorreactivas fue calculada para cada animal como la relación entre la suma de puntos incluidos en células inmunorreactivas y el número de puntos incluidos en el volumen de referencia. Al menos 3 secciones fueron evaluadas para cada animal. Todos los recuentos se realizaron sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las secciones.

3.11.3.- Colocalización con BrdU

Para realizar los recuentos de colocalización se tuvo siempre en cuenta el número de células que expresaban ambos marcadores (BrdU y el marcador glial correspondiente) por unidad de volumen (mm^3). Por la incompatibilidad entre las

Material y métodos

técnicas de inmunofluorescencia y el marcaje doble de BrdU y MHC-II (microglía reactiva), se realizaron recuentos por dos métodos diferentes. En el caso de la inmunohistoquímica doble para la observación en el microscopio óptico, se realizaron recuentos por la técnica del disector óptico tal y como aparece descrita en el apartado 3.10.1. En el caso de la inmunohistofluorescencia doble, se realizaron fotografías sobre las que se realizaron los recuentos tal y como aparece descrito a continuación.

Para contar aquellos astrocitos reactivos (vimentina positivos) que habían incorporado BrdU se emplearon fotos de las secciones histológicas obtenidas con el objetivo de 20x y zoom 1,4 en el microscopio confocal. Se realizaron fotos a lo largo del espesor del corte, hasta un total de 10 micras de profundidad y cada 2 micras, de tal forma que se aseguraba la captura de todos los núcleos celulares marcados. Se utilizó el programa informático ImageJ 1.37m (National Institute of Health, USA), en cuyo visor situamos una rejilla con un área por sector de 50x50 μm sobre los distintos planos tomados a las secciones. En la rejilla se contaron el número de células que mostraban colocalización de ambos marcadores desde el borde exterior de la lesión y hasta 400 micras hacia el lateral del hipocampo (8 sectores) en los distintos planos tomados de cada corte. Se contaron un total de 144 sectores por animal. Para calcular el número de células con colocalización por unidad de volumen (mm^3), se tuvieron en cuenta 10 micras de grosor, y se empleó la misma fórmula que la utilizada para la técnica del disector óptico. Todos los recuentos se realizaron sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las secciones.

3.12.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el paquete estadístico GraphPad Prism 5. El número de experimentos o animales utilizados para realizar cada análisis aparece indicado en la figura correspondiente. En los experimentos en los que se realizó inmunohistoquímica, se realizó la media entre las distintas secciones de cada animal y este dato fue introducido para el análisis. En los experimentos en los que se realizó RT-PCR, se emplearon los datos de la normalización porcentual de la RQ o de la SQ para cada cultivo o para cada animal en el análisis estadístico.

Se aplicaron pruebas paramétricas a las muestras que cumplían los requisitos de normalidad e igualdad de varianzas. El nivel de significación estadística se estableció siempre en valores de p menores de 0,05. La igualdad de varianzas se

determinó mediante el test F, de tal forma que se determinaban varianzas desiguales cuando la $p < 0,05$. En tal caso, se emplearon pruebas no paramétricas.

Los análisis que comparaban sólo 2 grupos experimentales se llevaron a cabo con el test t de Student no pareado, con corrección de Welch en el caso de que las varianzas no resultaran homogéneas.

Para los experimentos en los que se comparaban más de dos grupos, cuando pasaban positivamente los test de normalidad y homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba ANOVA de una vía. En el caso de que la p obtenida fuera menor de 0,05, se realizaron test post-hoc para realizar las comparaciones entre los distintos grupos por parejas. Se emplearon los test post-hoc de Tukey para comparar todos los grupos entre sí, y el test post-hoc de Dunnett para comparar todos los grupos con un solo grupo (correspondiente al grupo control o vehículo).

En el caso de la comparación de más de dos grupos en los que no se encontró normalidad y/u homogeneidad de varianzas, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con test post-hoc de Dunn.

En aquellos casos en los que se tenían en cuenta dos variables, se utilizó la prueba ANOVA de dos vías. En el caso de que la p obtenida fuera menor de 0,05, se empleó el test post-hoc de Bonferroni para realizar las comparaciones por parejas entre los distintos grupos de cada variable.



Resultados

RESULTADOS

Resultados

1.- DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS

Conocidas las diferencias sexuales que aparecen en distintas enfermedades neurodegenerativas que cursan con inflamación, nos planteamos estudiar a nivel de expresión génica las posibles diferencias sexuales en marcadores inflamatorios y, más adelante, en marcadores relacionados con la esteroidogénesis y con la morfología y función mitocondrial, así como con la viabilidad celular, que pudieran aparecer al exponer cultivos primarios de astrocitos corticales de ratón a un estímulo inflamatorio, como es el LPS.

1.1.- NIVELES BASALES DE LOS MARCADORES ESTUDIADOS

En primer lugar, nos planteamos estudiar las posibles diferencias basales entre cultivos procedentes de machos y hembras en la expresión de distintos marcadores:

1.1.1.-Marcadores relacionados con inflamación.

Analizamos la expresión de tres citoquinas, la interleuquina 6, (IL6), la interleuquina 1 β (IL1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α). También analizamos la expresión de una quemoquina, la proteína inducible por interferón 10 (IP10).

No se detectaron diferencias significativas al comparar los niveles basales de ARNm de IL6, IP10, TNF α e IL1 β en cultivos primarios de astrocitos procedentes de animales macho y hembra (*Fig. 22*).

1.1.2.- Marcadores relacionados con la transducción de la señal inflamatoria.

Analizamos los niveles de ARNm del receptor toll-like 4 (TLR4), que es el receptor para el LPS.

No se detectaron diferencias al comparar los niveles de expresión basales de TLR4 en cultivos primarios de astrocitos procedentes de animales macho y hembra (*Fig. 23*).

Resultados

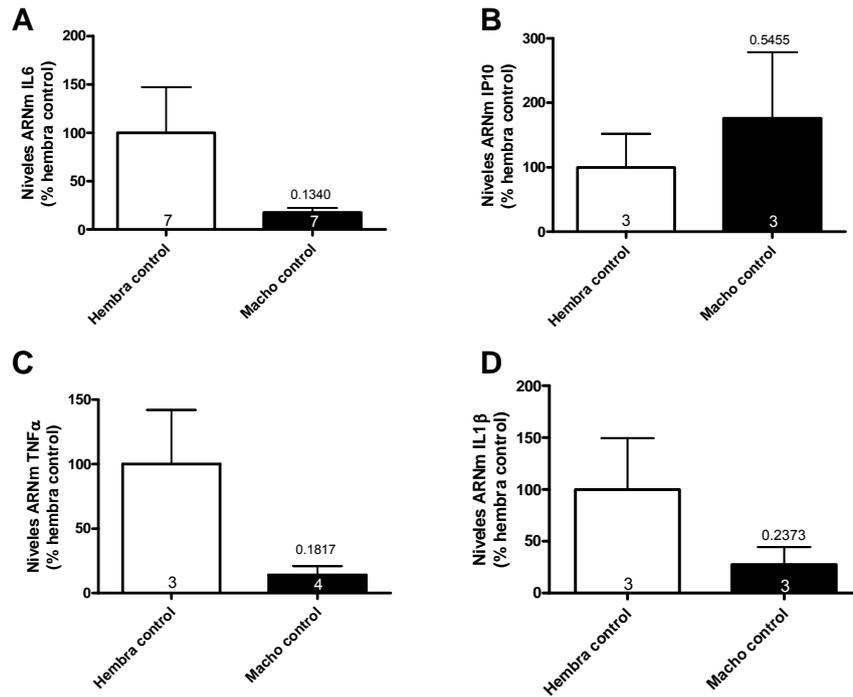


Figura 22.- Expresión basal de genes relacionados con inflamación en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras. A.- Niveles de IL6. B.- Niveles de IP10. C.- Niveles de TNF α . D.- Niveles de IL1 β . El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “macho control”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

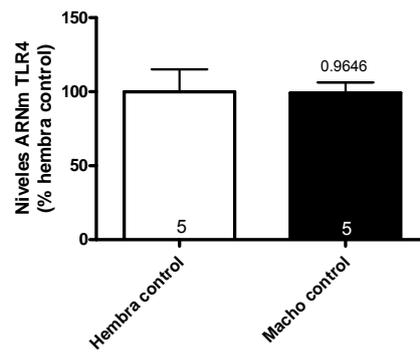


Figura 23.- Expresión basal del receptor de LPS, TLR4, en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “macho control”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

1.1.3.-Marcadores relacionados con la esteroidogénesis.

Analizamos la expresión de dos translocadores de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna, la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) y la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO). También analizamos la expresión de la enzima encargada de transformar la testosterona en estradiol, la aromatasa.

No se detectaron diferencias al comparar los niveles de expresión basales de StAR, TSPO y aromatasa en cultivos primarios de astrocitos procedentes de animales macho y hembra (*Fig. 24*).

1.1.4.- Marcadores relacionados con la señal estrogénica.

Analizamos la expresión de los receptores de estrógeno alfa (ER α) y beta (ER β).

No se detectaron diferencias al comparar los niveles de expresión basales de ER α en cultivos primarios de astrocitos procedentes de animales macho y hembra. Sin embargo, los niveles de expresión basales de ER β son significativamente menores en machos que en hembras (*Fig. 25*).

1.1.5.-Marcadores relacionados con la función mitocondrial.

Analizamos la expresión de una subunidad del complejo IV de la cadena transportadora de electrones, la citocromo c oxidasa IV, isoformas 1 (CoxIV1) y 2 (CoxIV2).

No se detectaron diferencias al comparar los niveles de expresión basales de CoxIV1 y CoxIV2 en cultivos primarios de astrocitos procedentes de animales macho y hembra (*Fig. 26*).

1.1.6.-Marcadores relacionados con la morfología mitocondrial.

Analizamos la expresión de genes implicados en la fusión mitocondrial, mitofusina 1 (Mfn1) y 2 (Mfn2); y en la fisión mitocondrial, homólogo de fisión (membrana mitocondrial externa) (Fis1) y la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1).

No se detectaron diferencias al comparar los niveles de expresión basales Fis1, Drp1 y Mfn2 en cultivos primarios de astrocitos procedentes de animales macho y hembra. Sin embargo, los niveles de expresión de Mfn1 son significativamente mayores en cultivos procedentes de machos (*Fig. 27*).

Resultados

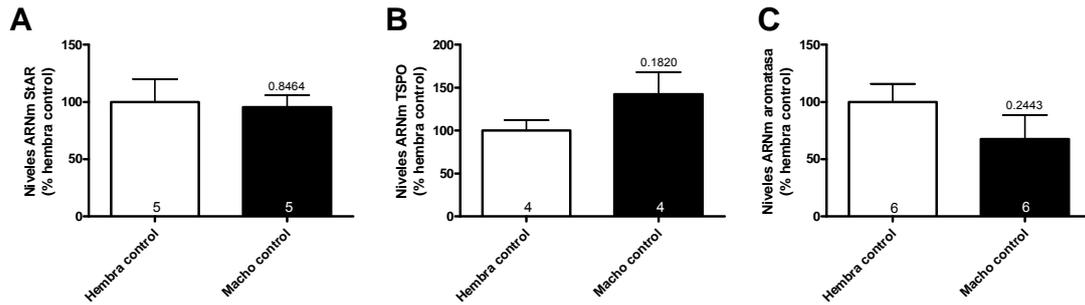


Figura 24.- Expresión basal de genes relacionados con la esteroidogénesis en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras. A.- Niveles de StAR. B.- Niveles de TSPO. C.- Niveles de aromatasa. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “macho control”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

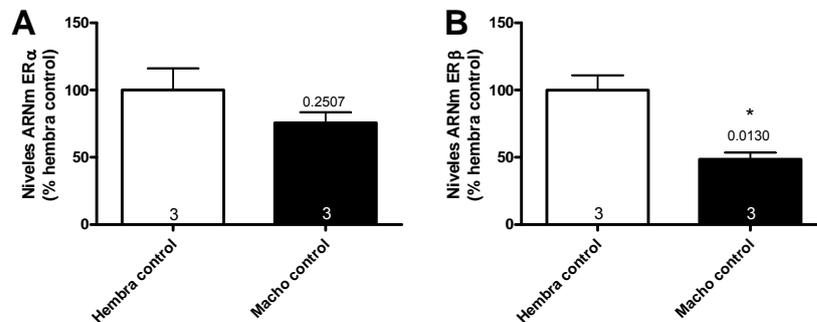


Figura 25- Expresión basal de los receptores de estrógeno α y β en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras. A.- Niveles de ER α . B.- Niveles de ER β . El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas en ER α mientras que en ER β se detectó una disminución significativa en cultivos de machos (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “macho control”, * p<0.05 vs. hembra control). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

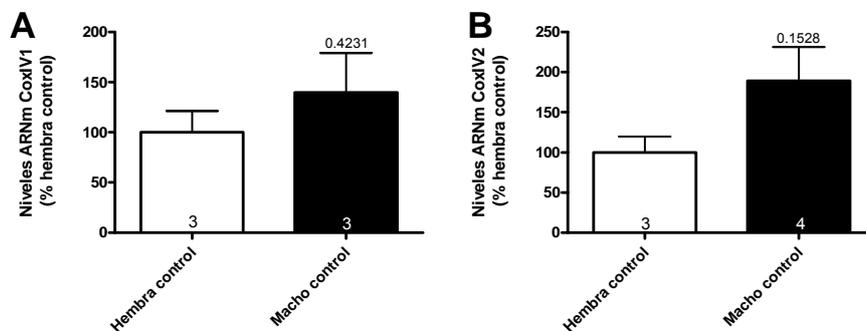


Figura 26.- Expresión basal de dos isoformas de CoxIV en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras. A.- Niveles de CoxIV1. B.- Niveles de CoxIV2. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “macho control”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

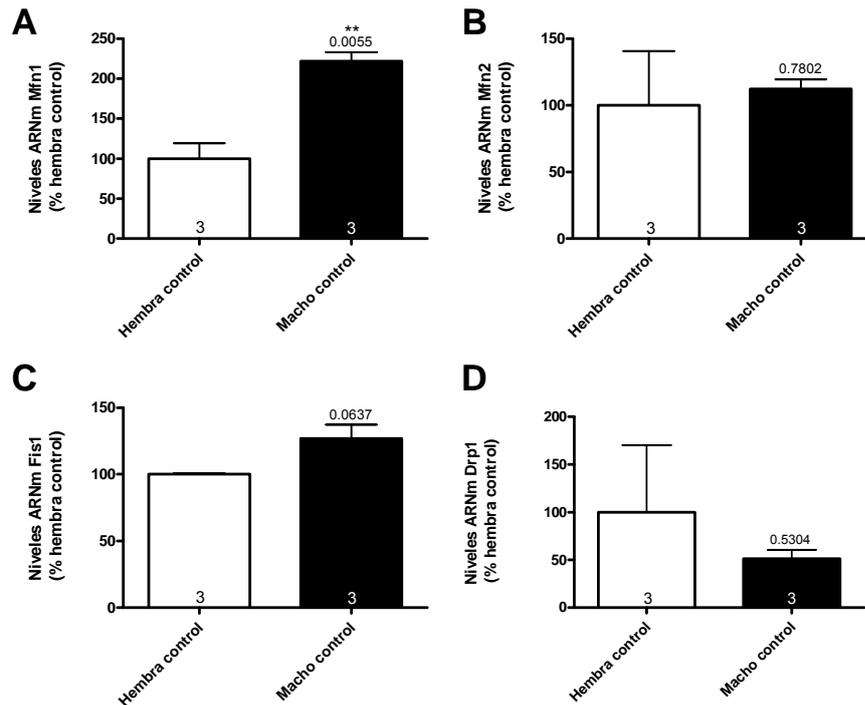


Figura 27.- Expresión basal de genes relacionados con la morfología mitocondrial en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras. A.- Niveles de Mfn1. B.- Niveles de Mfn2. C.- Niveles de Fis1. D.- Niveles de Drp1. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. Se observó un aumento significativo de la expresión de Mfn1 en cultivos procedentes de machos (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “macho control”, ** p<0.01 vs. hembra control). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

1.1.7.- Marcadores de proliferación y apoptosis.

Analizamos la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (Pcna), la proteína de linfoma de célula B 2 (Bcl2) y la proteína X asociada a Bcl2 (Bax)

No se detectaron diferencias al comparar los niveles de expresión basales de Pcna, Bcl2 y Bax en cultivos primarios de astrocitos procedentes de animales macho y hembra (*Fig. 28*).

1.1.8.- Ratio Drp1/Fis1, Pcna/Bax y Bcl2/Bax.

Con la finalidad de describir eventos de proliferación y apoptosis en los cultivos estudiados, calculamos las ratios entre Drp1/Fis1, Pcna/Bax y Bcl2/Bax. En todas ellas, un valor mayor que 1 (es decir, una expresión relativa mayor de Drp1, Pcna y Bcl2 que de sus compañeros Fis1 y Bax), indicaría una tendencia del cultivo hacia la proliferación y supervivencia, mientras que una relación menor que 1 (con mayores expresiones relativas de Fis1 y Bax) indicaría una tendencia del cultivo hacia la apoptosis.

Resultados

No se detectaron diferencias al comparar las ratio pro-mitosis/pro-apoptosis en cultivos primarios de astrocitos procedentes de animales macho y hembra (*Fig. 29*).

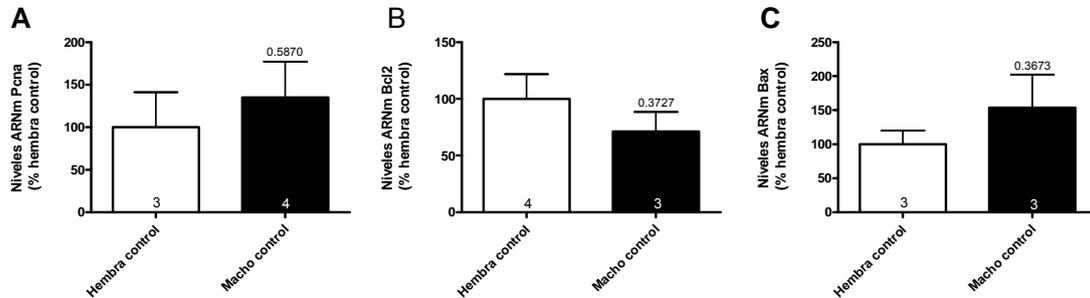


Figura 28.- Expresión basal de marcadores de proliferación y apoptosis en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras. A.- Niveles Pcna. B.- Niveles de Bcl2. C.- Niveles de Bax. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “macho control”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

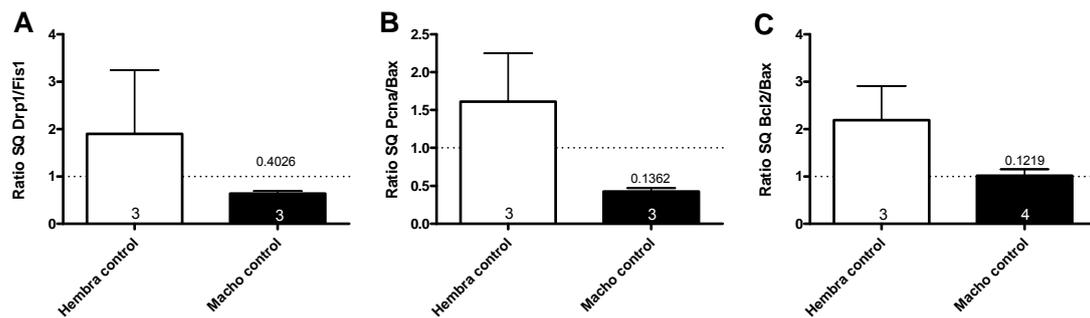


Figura 29.- Ratio de expresión de genes promitóticos o antiapoptóticos con genes proapoptóticos en cultivos procedentes de machos y hembras. A.- Ratio Drp1/Fis1. B.- Ratio Pcna/Bax. C.- Ratio Bcl2/Bax. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea punteada marca el valor de ratio=1. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “macho control”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

1.1.9.- Resumen de los resultados.

En condiciones basales, no se encontraron diferencias sexuales en la expresión de los marcadores estudiados con dos excepciones: ER β , en el que los niveles de expresión fueron mayores en cultivos procedentes de astrocitos hembra, y Mfn1, en el que los niveles de expresión resultaron significativamente mayores en astrocitos macho.

1.2.- EFECTO DEL LPS EN CULTIVOS DE ASTROCITOS PROCEDENTES DE MACHOS Y HEMBRAS

A continuación, nos propusimos analizar los posibles efectos que pudiera tener el LPS, y si dichos efectos presentaban dimorfismo sexual. Para ello, se administró a los cultivos de astrocitos macho y hembra LPS durante 5h y posteriormente se analizaron los niveles de expresión de los distintos marcadores estudiados por RT-PCR.

1.2.1.-Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con inflamación.

En todos los casos, el LPS produjo una inducción significativa en los niveles de expresión de los cuatro marcadores. Sin embargo, dicha inducción fue significativamente mayor en machos que en hembras en el caso de las tres citoquinas, mientras que fue significativamente mayor en hembras en el caso de la quemoquina, IP10 (Fig. 30).

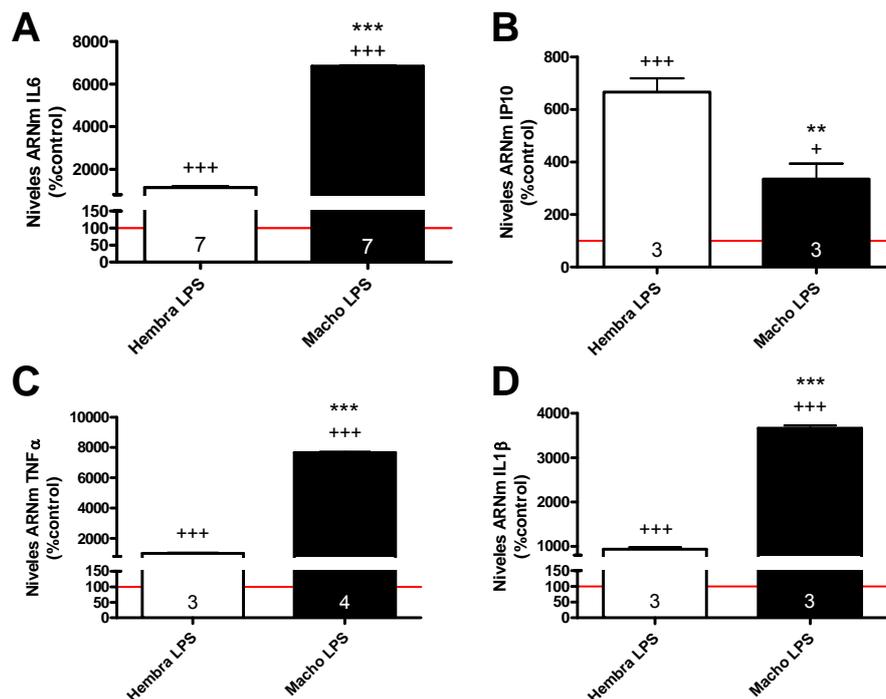


Figura 30.- Expresión de genes relacionados con inflamación tras exposición a LPS en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras. A.- Niveles de IL6. B.- Niveles de IP10. C.- Niveles de TNF α . D.- Niveles de IL1 β . El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). El LPS produjo un aumento significativo de la expresión de todos los genes estudiados. La expresión de IL6, TNF α e IL1 β fue significativamente mayor en cultivos de machos tratados con LPS que en los de hembras tratadas. Los niveles de IP10 fueron significativamente mayores en cultivos de hembras que en cultivos de machos tras el tratamiento con LPS (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, + p<0.05, +++ p<0.001 vs. cultivos sin tratar; ** p<0.01, *** p<0.001 vs. hembra LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

Resultados

1.2.2.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la transducción de la señal inflamatoria.

Los niveles de expresión del receptor TLR4 no sufrieron cambios al administrar LPS a los cultivos de astrocitos de machos ni a los de hembras (*Fig. 31*).

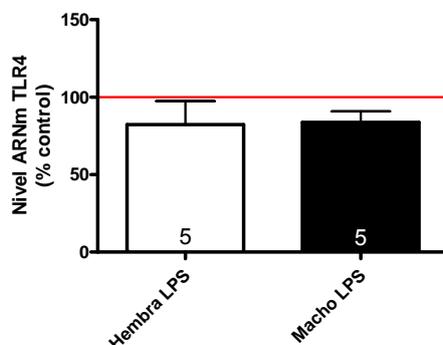


Figura 31.- Expresión TLR4 en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras tras exposición a LPS. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). No se observaron diferencias significativas (ANOVA de una vía). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

1.2.3.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la esteroidogénesis.

No se observaron diferencias en los niveles de expresión del translocador de colesterol StAR tras administración de LPS. Sin embargo, en cultivos procedentes de hembras, el LPS indujo una sobreexpresión de TSPO dando lugar a una situación significativamente distinta en cultivos procedentes de ambos sexos tras el estímulo inflamatorio. Asimismo, se observaron diferencias sexuales tras dicho estímulo en la expresión de aromatasa: tras la exposición a LPS los niveles resultaron significativamente mayores en machos que en hembras (*Fig. 32*).

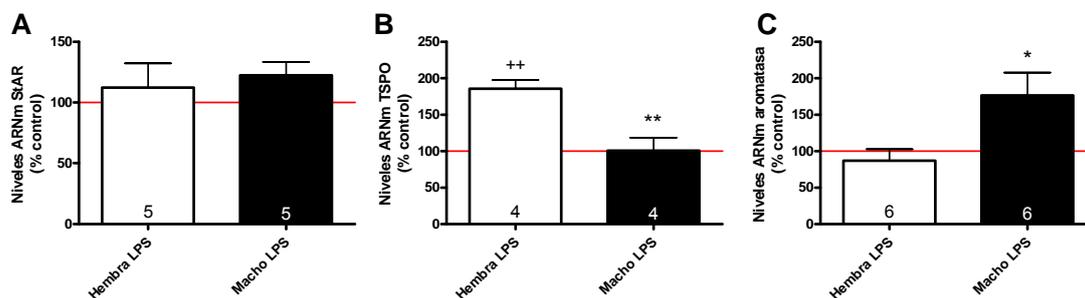


Figura 32.- Expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras tras exposición a LPS. A.- Niveles de StAR. B.- Niveles de TSPO. C.- Niveles de aromatasa. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). La expresión de TSPO aumentó significativamente en cultivos de hembras tratados con LPS. Los niveles de expresión de TSPO resultaron significativamente menores y los de aromatasa significativamente mayores en cultivos de machos que en los de hembras tras exposición a LPS (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey, ++ $p < 0.01$ vs. control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. hembra LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

1.2.4.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la señal estrogénica.

En cultivos procedentes de hembras, el LPS tuvo un efecto análogo en la expresión de ambos receptores, disminuyendo significativamente sus niveles. En el caso de machos, el LPS no afectó a la expresión de ER α mientras que aumentó significativamente los niveles de expresión de ER β , dando lugar asimismo a una diferencia sexual en los niveles de ER β tras exposición a LPS (Fig. 33).

1.2.5.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la función mitocondrial.

No se observó ningún efecto del LPS en ninguno de los sexos para las dos isoformas de CoxIV estudiadas (Fig. 34).

1.2.6.- Efecto del LPS sobre marcadores relacionados con la morfología mitocondrial.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes relacionados con fisión, Fis1 y Drp1, ni con uno de los genes relacionados con fusión, Mfn2. Sin embargo, los niveles de expresión de Mfn1 en machos tras exposición a LPS disminuyeron significativamente mientras que no cambiaron en hembras, dando lugar a una diferencia sexual significativa en este marcador tras el estímulo inflamatorio (Fig. 35).

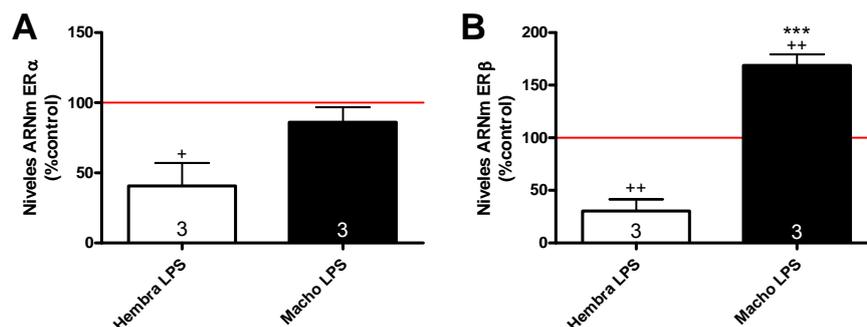


Figura 33.- Expresión de los receptores de estrógeno α y β en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras tras exposición a LPS. A.- Niveles de ER α . B.- Niveles de ER β . El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). La expresión de ambos receptores disminuyó significativamente en cultivos de hembras tratados con LPS. Los niveles de expresión de ER β aumentaron significativamente en cultivos de machos tratados con LPS, resultando significativamente mayores que en cultivos de hembras tratadas (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs. control; *** $p < 0.001$ vs. hembra LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

Resultados

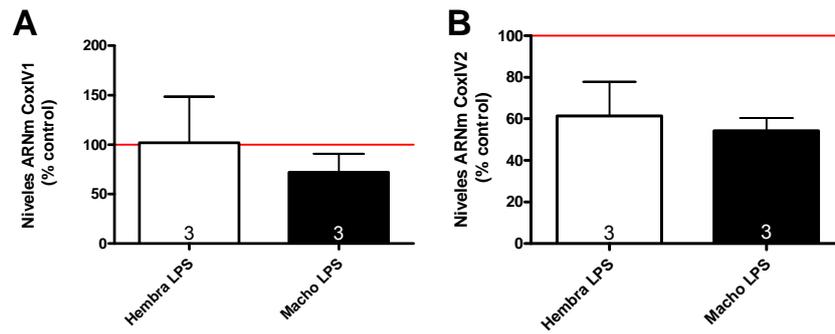


Figura 34.- Expresión de dos isoformas de CoxIV en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras tras exposición a LPS. A.- Niveles de CoxIV1. B.- Niveles de CoxIV2. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). No se observaron diferencias significativas (ANOVA de una vía). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

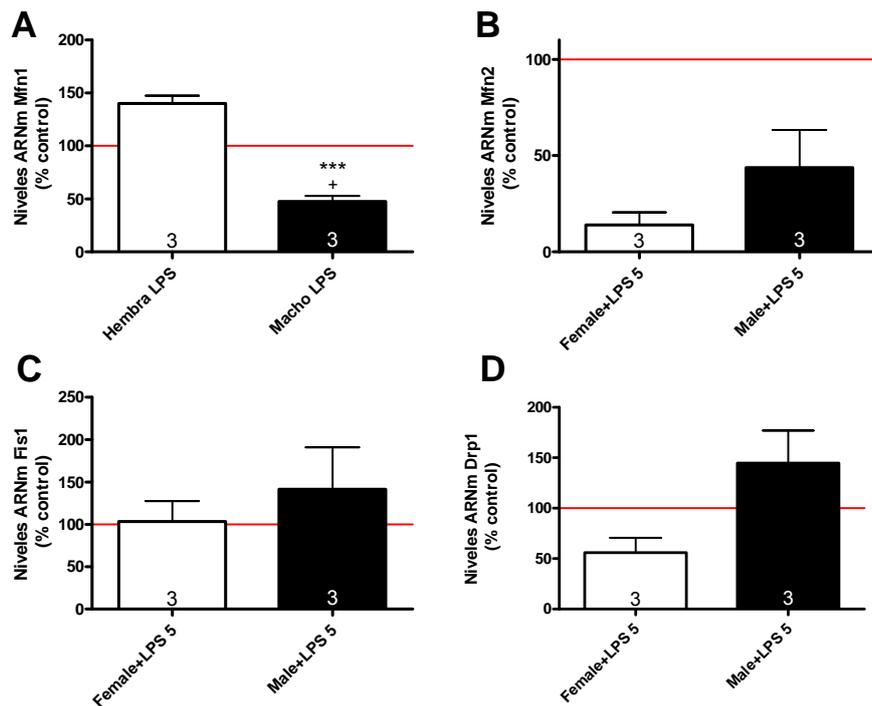


Figura 35.- Expresión de genes relacionados con la morfología mitocondrial en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras tras exposición a LPS. A.- Niveles de Mfn1. B.- Niveles de Mfn2. C.- Niveles de Fis1. D.- Niveles de Drp1. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). Los niveles de expresión de Mfn1 disminuyeron significativamente en cultivos de machos tratados con LPS, resultando significativamente menores que los de cultivos de hembras con el mismo tratamiento (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey, + $p < 0.05$ vs. control, *** $p < 0.001$ vs. hembra LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

1.2.7.- Efecto del LPS sobre marcadores de proliferación y apoptosis.

No se observaron diferencias significativas ni respecto a sus controles ni entre los dos sexos estudiados en ninguno de los tres marcadores como resultado de la exposición a LPS (Fig. 36).

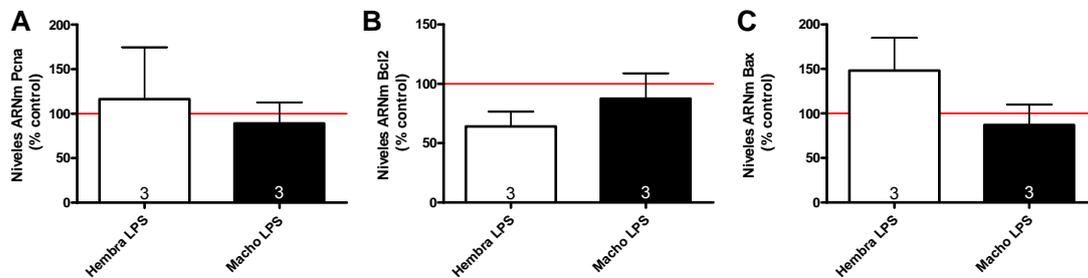


Figura 36.- Expresión de marcadores de proliferación y apoptosis en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras tras exposición a LPS. A.- Niveles Pcna. B.- Niveles de Bcl2. C.- Niveles de Bax. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (ANOVA de una vía). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

1.2.8.- Efecto del LPS sobre la ratio Drp1/Fis1, Pcna/Bax y Bcl2/Bax.

No se observaron diferencias significativas en las ratio pro-mitosis/proapoptosis entre cultivos procedentes de machos y hembras tratados y sin tratar con LPS (Fig. 37).

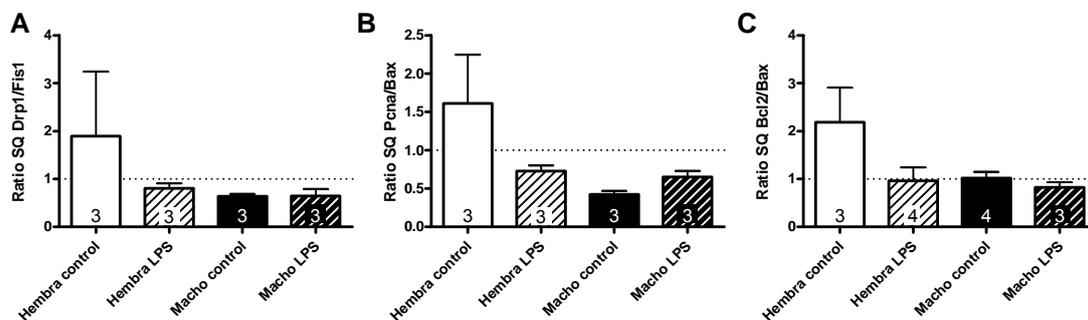


Figura 37.- Ratio de expresión de genes promitóticos o antiapoptóticos con genes proapoptóticos en cultivos procedentes de machos y hembras tras exposición a LPS. A.- Ratio Drp1/Fis1. B.- Ratio Pcna/Bax. C.- Ratio Bcl2/Bax. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea punteada indica un valor de ratio=1. No se observaron diferencias significativas (ANOVA de una vía). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

1.2.9.- Resumen de los resultados.

Tras la exposición a LPS se revelaron diferencias sexuales en los cuatro marcadores relacionados con inflamación, resultando mayor la inducción producida en machos en las citoquinas y mayor en hembras en la quemoquina. Igualmente, el LPS afectó a los niveles de TSPO, aumentándolos en hembras, y a los de aromatasa,

Resultados

aumentándolos en machos. En cuanto a los receptores de estrógeno, el LPS indujo una disminución significativa de la expresión de ambos receptores en hembras y un aumento significativo en la expresión de ER β en machos. En cuanto a los marcadores relacionados con la mitocondria y con supervivencia y apoptosis, no se observaron efectos del LPS con la excepción de la mitofusina 1, cuya expresión se encuentra disminuida en machos tras exposición a LPS.

2.- EFECTO DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA SOBRE LA RESPUESTA AL LPS DE CULTIVOS ASTROCITARIOS CORTICALES PROCEDENTES DE HEMBRAS

Una vez establecidas diferencias sexuales en la respuesta de los astrocitos procedentes de machos y hembras al LPS, y conocido el distinto estado hormonal de las crías en el momento de la realización del cultivo, nos propusimos mimetizar el estado hormonal masculino en hembras mediante la inyección de propionato de testosterona (PT) en las crías el día del nacimiento, y analizar posteriormente en cultivos realizados a partir de estas crías los mismos marcadores estudiados anteriormente.

2.1.- EFECTO DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA ADMINISTRADO *IN VIVO* SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS CORTICALES FEMENINOS

En primer lugar, analizamos el efecto que pudiera tener el PT *per se* en los distintos marcadores estudiados.

2.1.1.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con inflamación.

No se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de ninguno de los cuatro marcadores al comparar hembras control (inyectadas *in vivo* con vehículo) y hembras tratadas con PT (*Fig. 38*).

2.1.2.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la transducción de la señal inflamatoria.

En los cultivos de hembras tratadas con PT se observó un ligero aumento en los niveles de expresión de TLR4 en comparación con las hembras tratadas con vehículo, pero no alcanzó una diferencia significativa (*Fig. 39*, $p=0,0555$).

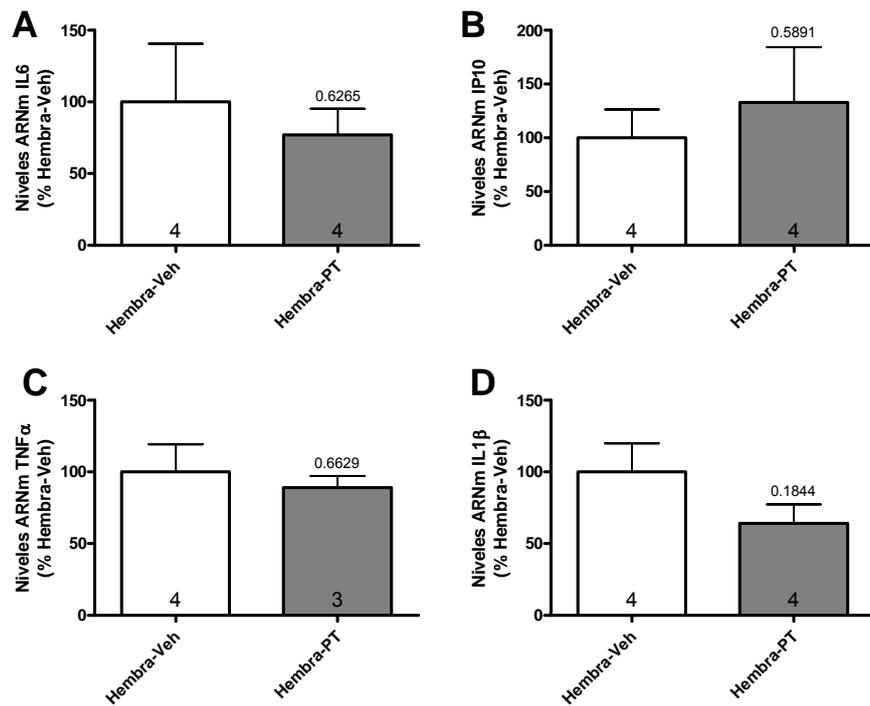


Figura 38.- Expresión basal de genes relacionados con inflamación en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT. A.- Niveles de IL6. B.- Niveles de IP10. C.- Niveles de TNF α . D.- Niveles de IL1 β . El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “Hembra-PT”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

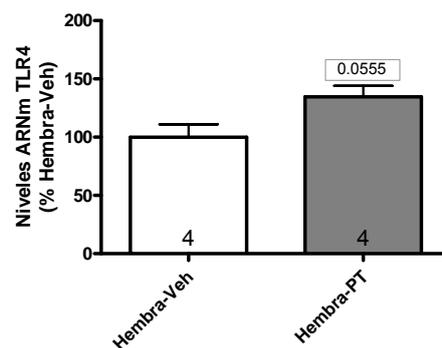


Figura 39.- Expresión basal de TLR4 en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “Hembra-PT”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

Resultados

2.1.3.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la esteroidogénesis.

El tratamiento con PT no produjo ningún cambio significativo en la expresión de aromatasa ni en la del translocador de colesterol StAR, pero indujo una sobreexpresión de TSPO (*Fig. 40*).

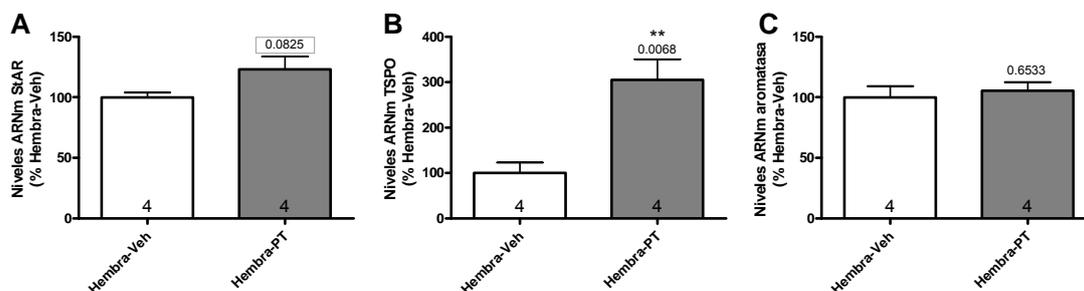


Figura 40.- Expresión basal de genes relacionados con la esteroidogénesis en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT. A.- Niveles de StAR. B.- Niveles de TSPO. C.- Niveles de aromatasa. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La expresión de TSPO aumentó significativamente en el grupo tratado con PT (t-Student, p indicada sobre la barra “Hembra-PT”, ** p<0.01 vs. hembra control). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.1.4.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la señal estrogénica.

Se observó una sobreexpresión significativa de ER α en los cultivos procedentes de hembras tratadas con PT el día del nacimiento (*Fig. 41*).

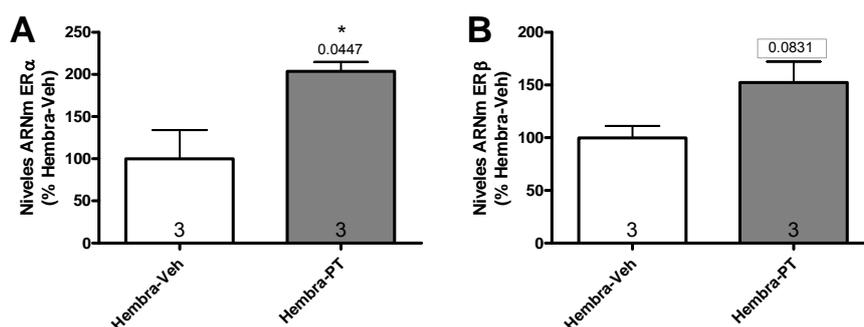


Figura 41.- Expresión basal de los receptores de estrógeno α y β en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT. A.- Niveles de ER α . B.- Niveles de ER β . El número de experimentos se indica dentro de cada barra. Se observó un aumento significativo de los niveles de ER α en cultivos de hembras tratadas con PT (t-Student, p indicada sobre la barra “Hembra-PT”, * p<0.05 vs. hembra control). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.1.5.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la función mitocondrial.

Tras analizar el efecto del PT sobre las dos isoformas de CoxIV, se observó una sobreexpresión significativa en el caso de la isoforma 1, mientras que no se apreció ningún efecto del PT en la isoforma 2 (Fig. 42).

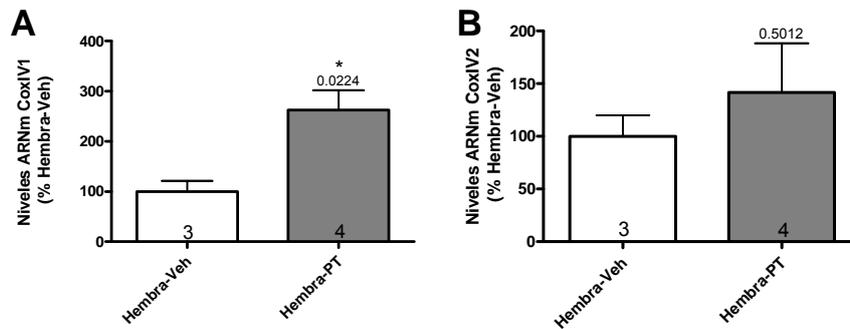


Figura 42.- Expresión basal de dos isoformas de CoxIV en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT. A.- Niveles de CoxIV1. B.- Niveles de CoxIV2. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. Se observó un aumento significativo de los niveles de CoxIV1 en los cultivos de hembras tratadas con PT (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “Hembra-PT”, * p<0.05 vs. hembra control). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.1.6.- Efecto del PT sobre marcadores relacionados con la morfología mitocondrial.

No se observó ningún efecto significativo del PT en los cuatro marcadores estudiados, apareciendo una tendencia no significativa a la alza en la Mfn1, que mimetiza parcialmente la diferencia observada al comparar los cultivos procedentes de machos y hembras (Fig. 43).

2.1.7.- Efecto del PT sobre marcadores de proliferación y apoptosis.

Al igual que en los cultivos procedentes de machos y hembras, no se encontraron diferencias en la expresión de los tres marcadores escogidos al comparar hembras control y hembras tratadas con PT (Fig. 44).

Resultados

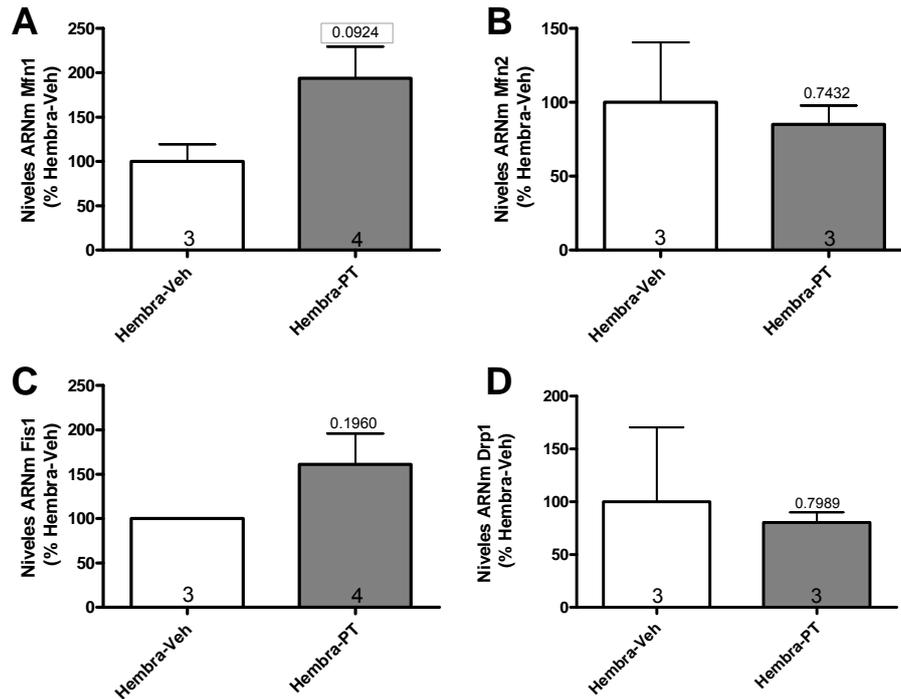


Figura 43.- Expresión basal de genes relacionados con la morfología mitocondrial en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT. A.- Niveles de Mfn1. B.- Niveles de Mfn2. C.- Niveles de Fis1. D.- Niveles de Drp1. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo "Hembra-PT"). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

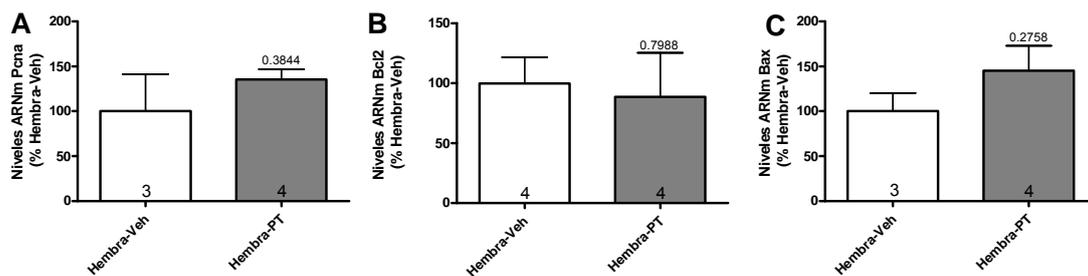


Figura 44.- Expresión basal de marcadores de proliferación y apoptosis en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT. A.- Niveles PcnA. B.- Niveles de Bcl2. C.- Niveles de Bax. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo "Hembra-PT"). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.1.8.- Efecto del PT sobre la ratio Drp1/Fis1, Pcna/Bax y Bcl2/Bax.

El tratamiento *in vivo* con PT no produjo ningún cambio significativo en las ratio pro-mitosis/pro-apoptosis analizadas (Fig. 45).

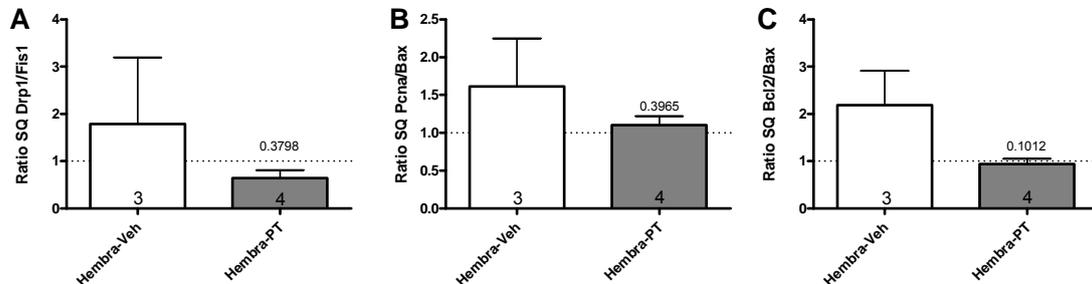


Figura 45.- Ratio de expresión de genes promitóticos o antiapoptóticos con genes proapoptóticos en cultivos procedentes de hembras control y tratadas con PT. A.- Ratio Drp1/Fis1. B.- Ratio Pcna/Bax. C.- Ratio Bcl2/Bax. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea punteada marca el valor de ratio=1. No se observaron diferencias significativas (t-Student, p indicada sobre la barra del grupo “Hembra-PT”). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.1.9.- Resumen de los resultados.

A diferencia de la comparación de los niveles basales de expresión de los marcadores en cultivos procedentes de machos y hembras, donde sólo se encontraron diferencias significativas en la expresión de ER β y Mfn1, el tratamiento con PT el día del nacimiento en hembras produjo diversos efectos. Por una parte, mimetizó parcialmente la diferencia observada en Mfn1, teniendo en este caso un efecto androgenizante. Además, produjo la sobreexpresión de TSPO, ER α y CoxIV1 de forma significativa y sólo como tendencia en TLR4, StAR y ER β . Estos efectos serían independientes del pico de testosterona perinatal que sufren los machos. En ningún caso el PT produjo una regulación negativa de la expresión de ningún gen.

2.2.- EFECTO DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA ADMINISTRADO *IN VIVO* SOBRE LA RESPUESTA AL LPS DE CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS CORTICALES FEMENINOS

A continuación, nos propusimos observar el efecto que pudiera tener el propionato de testosterona sobre la respuesta al LPS de los astrocitos procedentes de hembras, para determinar si las diferencias sexuales previamente observadas pudieran ser debidas al pico perinatal de testosterona en los machos. Para ello, se administró a los cultivos de astrocitos hembra (tanto control como inyectada con PT)

Resultados

LPS durante 5h y posteriormente se analizaron los niveles de expresión de los distintos marcadores estudiados por RT-PCR.

2.2.1.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con inflamación en respuesta al LPS.

En los cuatro marcadores estudiados el LPS produjo un incremento significativo de sus niveles de expresión. Además, dicha inducción fue significativamente mayor en hembras tratadas con PT que en hembras control en el caso de las tres citoquinas, mientras que fue significativamente mayor en hembras control en el caso de la quemoquina, IP10. En este caso, la inyección *in vivo* de PT da lugar a resultados análogos a los observados al comparar cultivos procedentes de machos y hembras. Por lo tanto, podríamos decir que en cuanto a los marcadores relacionados con inflamación, el tratamiento con PT da lugar a la androgenización del cultivo (*Fig. 46*).

2.2.2.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la transducción de la señal inflamatoria en respuesta al LPS.

El tratamiento con LPS de por sí no modifico significativamente los niveles de TLR4 ni en los cultivos de las hembras control ni en los de las hembras tratadas con PT. Sin embargo, cierta tendencia a la alza en los cultivos de hembra control que se invirtió en los cultivos de hembras PT dio lugar a una diferencia significativa en los niveles de TLR4 entre ambos grupos tras el tratamiento con LPS (*Fig. 47*).

2.2.3.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la esteroidogénesis en respuesta al LPS.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de aromatasa en respuesta al LPS, ni en los cultivos de hembras control ni en los de las hembras tratadas con PT. Sin embargo, el LPS causó un aumento significativo de la expresión de StAR y TSPO en los cultivos de hembras inyectadas con vehículo, dando lugar a una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo PT tras la administración de LPS. La diferencia observada en la expresión de TSPO resultó equivalente a la observada al comparar cultivos de machos y hembras tratados con LPS. Por el contrario, en el caso de StAR, la sobreexpresión causada en el grupo control por tratamiento con LPS no aparecía en los cultivos iniciales de hembras. Para este gen en concreto, aparece una diferencia relacionada con la administración del vehículo de la hormona, el aceite de maíz (*Fig. 48*).

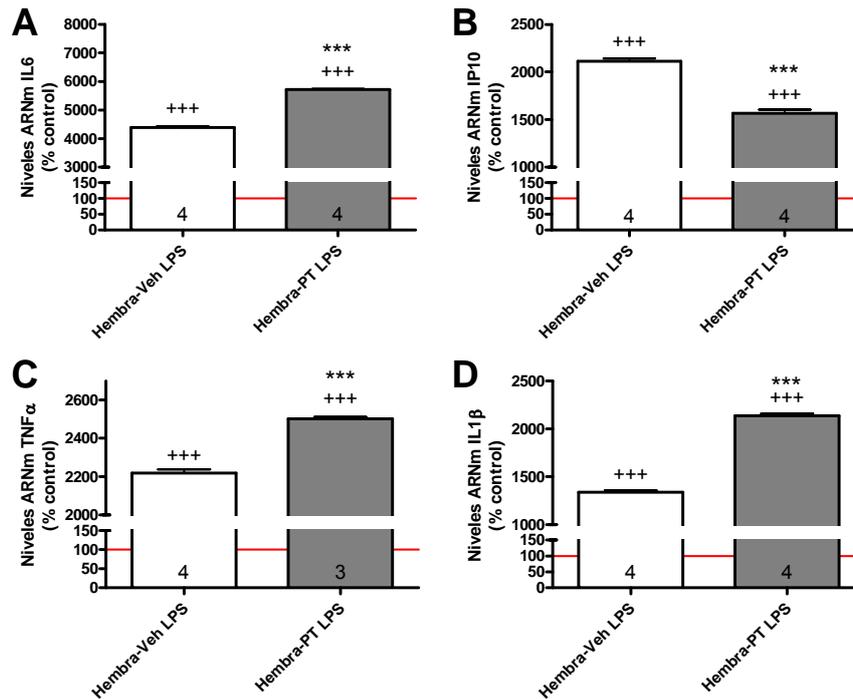


Figura 46.- Expresión de genes relacionados con inflamación tras exposición a LPS en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT. A.- Niveles de IL6. B.- Niveles de IP10. C.- Niveles de TNF α . D.- Niveles de IL1 β . El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). El LPS produjo un aumento significativo de la expresión de todos los genes estudiados. La expresión de IL6, TNF α e IL1 β fue significativamente mayor en cultivos de hembra-PT tratados con LPS que en los de hembra-vehículo. Los niveles de IP10 fueron significativamente mayores en cultivos de hembra-vehículo que en cultivos de hembra-PT tras el tratamiento con LPS (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, +++ $p < 0.001$ vs. cultivos sin tratar; *** $p < 0.001$ vs. Hembra-Veh LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

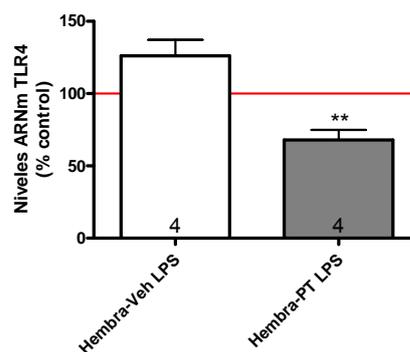


Figura 47.- Expresión TLR4 en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT tras exposición a LPS. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). Se observó una diferencia significativa entre los cultivos de hembra-vehículo y hembra-PT tras el tratamiento con LPS (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, ** $p < 0.01$ vs. Hembra-Veh LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

Resultados

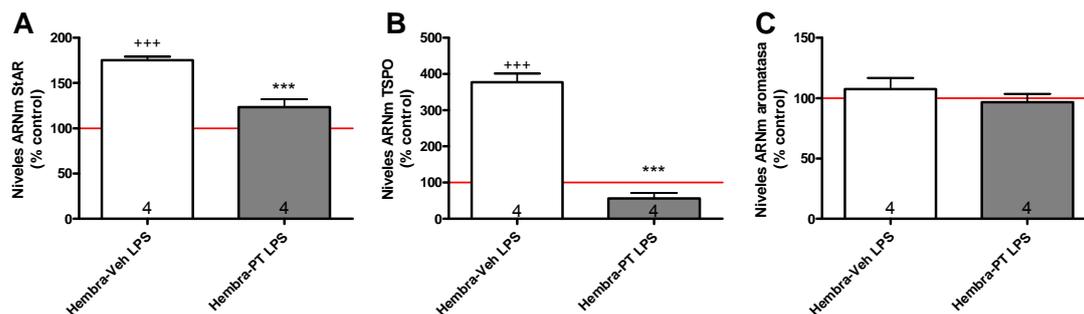


Figura 48.- Expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT tras exposición a LPS. A.- Niveles de StAR. B.- Niveles de TSPO. C.- Niveles de aromatasa. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). La expresión de StAR y TSPO aumentó significativamente en cultivos de hembra-vehículo tratados con LPS. Los niveles de expresión de TSPO y StAR resultaron significativamente menores en cultivos de hembra-PT que en los de hembra-vehículo tras exposición a LPS (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, +++ $p < 0.001$ vs. control; *** $p < 0.001$ vs. Hembra-Veh LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.2.4.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la señal estrogénica en respuesta al LPS.

En lo que respecta a los receptores de estrógeno, se observó un aumento de la expresión de ER β en los cultivos de las hembras inyectadas con aceite tras el tratamiento con LPS. También se detectó una diferencia significativa para ambos receptores entre los cultivos tratados con LPS procedentes de hembras control y de hembras tratadas con PT (*Fig. 49*).

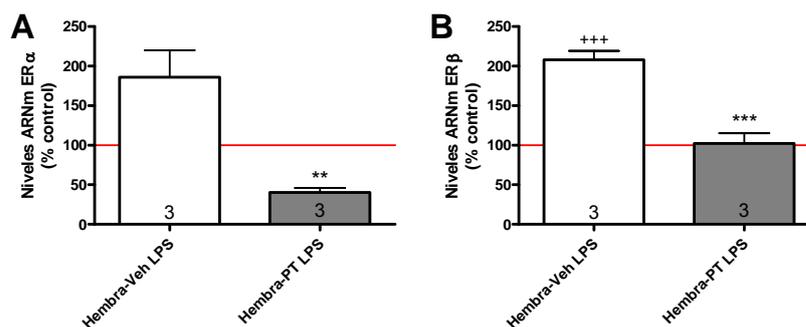


Figura 49.- Expresión de los receptores de estrógeno α y β en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT tras exposición a LPS. A.- Niveles de ER α . B.- Niveles de ER β . El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). La expresión de ER β aumentó significativamente en cultivos de hembra-PT tratados con LPS. Se observó una diferencia significativa en la expresión de ambos receptores entre cultivos de hembra-vehículo y hembra-PT tras el tratamiento con LPS (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, +++ $p < 0.001$ vs. control; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Hembra-Veh LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.2.5.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la función mitocondrial en respuesta al LPS.

Se detectó una disminución significativa de los niveles de expresión de CoxIV1 en el grupo PT tras administración de LPS. Esta disminución no dio lugar a una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo PT post-LPS. No se detectaron cambios en CoxIV2 (Fig. 50).

2.2.6.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores relacionados con la morfología mitocondrial en respuesta al LPS.

No se observaron diferencias en los niveles de expresión de Mfn1, Fis1 y Drp1. Sin embargo, se produjo una disminución no significativa de los niveles de Mfn2 tras administración de LPS en los cultivos procedentes de hembras control que reveló una diferencia post-LPS entre ambos grupos analizados (Fig. 51).

2.2.7.- Efecto del PT sobre la expresión de marcadores de proliferación y apoptosis en respuesta al LPS.

El tratamiento con LPS aplicado en cultivos procedentes de hembras tratadas con PT produjo un aumento significativo de la expresión de PcnA. En el caso de Bcl2, se produjo un descenso no significativo de expresión en el grupo control que dio lugar a una diferencia significativa entre ambos grupos tras exposición a LPS. No se detectaron cambios en la expresión de Bax (Fig. 52).

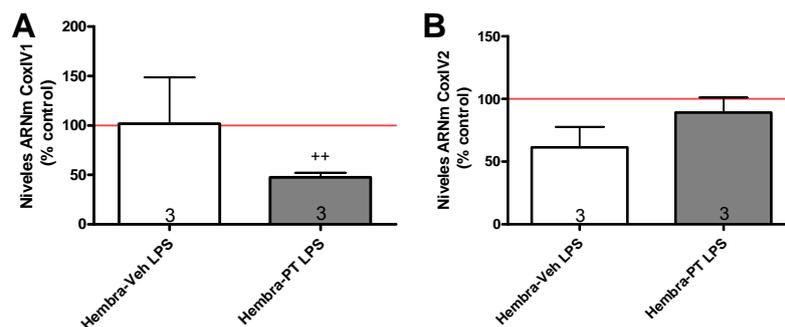


Figura 50.- Expresión de dos isoformas de CoxIV en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT tras exposición a LPS. A.- Niveles de CoxIV1. B.- Niveles de CoxIV2. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). Se observó una disminución significativa de la expresión de CoxIV1 en cultivos de hembra-PT tras administración de LPS (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, ++ $p < 0.01$ vs. control). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

Resultados

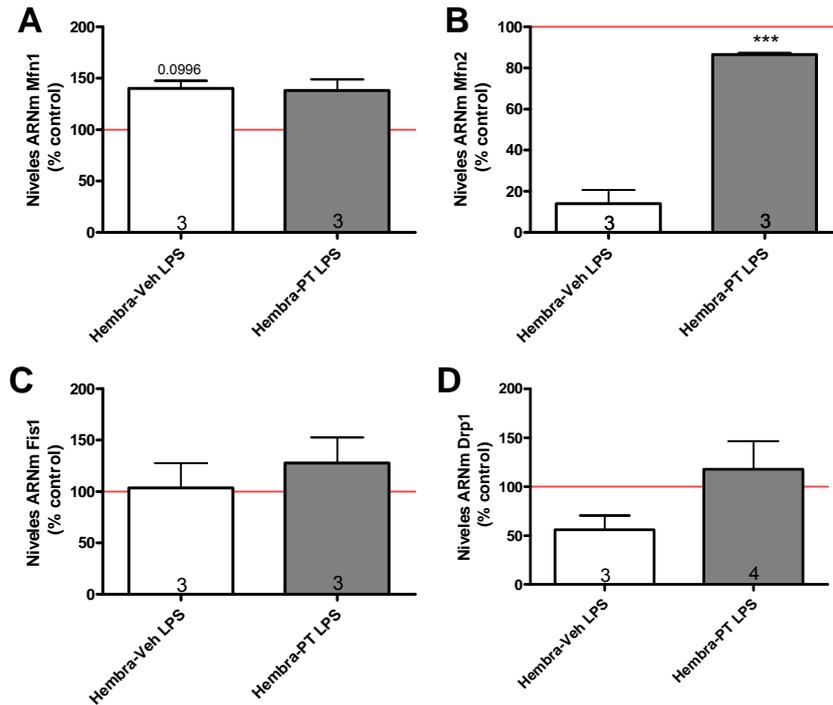


Figura 51.- Expresión de genes relacionados con la morfología mitocondrial en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT tras exposición a LPS. A.- Niveles de Mfn1. B.- Niveles de Mfn2. C.- Niveles de Fis1. D.- Niveles de Drp1. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). Se observó una diferencia significativa en los niveles de expresión de Mfn2 entre los cultivos de hembra-vehículo y hembra-PT tras el tratamiento con LPS (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, *** $p < 0.001$ vs. Hembra-Veh LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

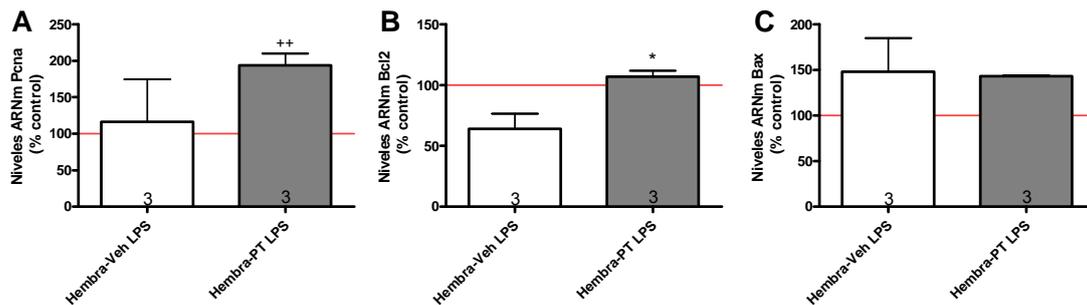


Figura 52.- Expresión de marcadores de proliferación y apoptosis en cultivos de astrocitos procedentes de hembras control y tratadas con PT tras exposición a LPS. A.- Niveles Pcna. B.- Niveles de Bcl2. C.- Niveles de Bax. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. Los niveles de ARNm de Pcna aumentaron significativamente en cultivos de hembra-PT tras el tratamiento con LPS. Se observó una diferencia significativa entre los cultivos de hembra-vehículo y de hembra-PT tras el tratamiento con LPS (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, ++ $p < 0.01$ vs. control, * $p < 0.05$ vs. Hembra-Veh LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.2.8.- Efecto del PT sobre el ratio Drp1/Fis1, Pcnal/Bax y Bcl2/Bax en respuesta al LPS.

El tratamiento *in vitro* con LPS tras la aplicación *in vivo* de PT no produjo ningún cambio significativo en las ratio pro-mitosis/pro-apoptosis analizadas (Fig. 53).

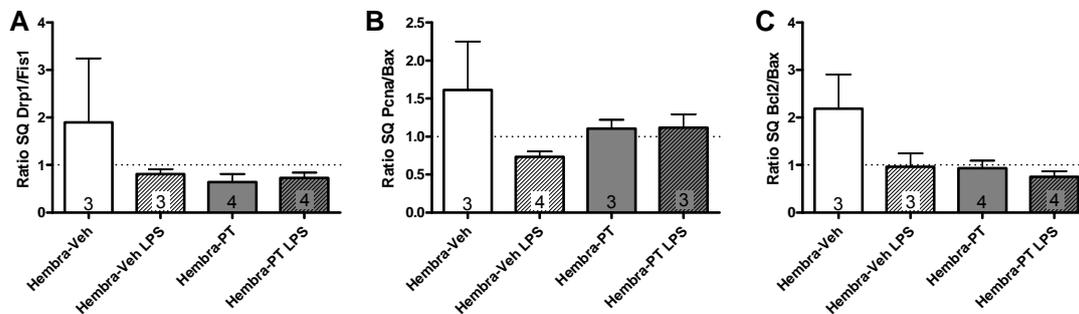


Figura 53.- Ratio de expresión de genes pro-mitóticos o antiapoptóticos con genes proapoptóticos en cultivos procedentes de hembras control y tratadas con PT tras exposición a LPS. A.- Ratio Drp1/Fis1. B.- Ratio Pcnal/Bax. C.- Ratio Bcl2/Bax. El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea punteada indica un valor de ratio=1. No se observaron diferencias significativas (ANOVA de una vía). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

2.2.9.- Resumen de los resultados.

La administración *in vitro* de LPS a cultivos procedentes de hembras inyectadas con vehículo o propionato de testosterona modificó significativamente la expresión de varios de los genes estudiados, revelando en algunos casos diferencias entre ambos grupos paralelas a las observadas entre cultivos procedentes de machos y hembras expuestos a LPS. Así ocurrió con los marcadores relacionados con inflamación, en los que se observó una sobreexpresión en todos los casos, pero significativamente mayor en el grupo PT que en el grupo control para las citoquinas, mientras que fue significativamente menor en el grupo PT para la quemoquina. Igualmente, se produjo un aumento de la expresión de TSPO tras la administración de LPS en el grupo control dando lugar a una diferencia post-LPS entre ambos grupos.

También se detectaron diferencias que no se correspondían con las detectadas entre los cultivos de machos y hembras. En algunos casos, se observaron diferencias en el efecto del LPS en los cultivos de las hembras tratadas con vehículo que no se detectaron en cultivos procedentes de hembras sin inyectar, como fue el caso de StAR y ER β , sobreexpresados en los cultivos de hembras inyectadas con vehículo tras exposición a LPS. Asimismo, se detectaron cambios en el grupo PT que no aparecían en machos, es decir, que el PT ejerció algún efecto no relacionado con el pico natural

Resultados

de testosterona que sufren los machos perinatalmente. Esto ocurrió en el caso de CoxIV1 y TLR4, cuya expresión disminuyó, y de Pcn1, cuya expresión aumentó, tras exposición a LPS. En otros de los genes estudiados, se reveló una diferencia entre ambos grupos tras la aplicación de LPS, debida a tendencias contrarias no significativas en cada grupo o a diferencias significativas en alguno de ellos. Esto sucedió para los genes StAR, ER α , ER β , Mfn2 y Bcl2.

Por otra parte, el tratamiento perinatal de las hembras con PT no consiguió mimetizar las diferencias observadas en los niveles de expresión de aromatasa y Mfn1 entre cultivos de machos y hembras tras la exposición a LPS.

3.- EFECTO DEL LIGANDO DE LA TSPO RO5-4864 SOBRE LA RESPUESTA AL LPS DE LOS ASTROCITOS CORTICALES

Una vez detectadas ciertas diferencias sexuales en la respuesta de los astrocitos corticales al LPS y la posible intervención del translocador de colesterol TSPO, nos propusimos analizar el posible efecto sobre los marcadores inflamatorios estudiados de uno de sus ligandos, Ro5-4864, en solitario y administrado en combinación con LPS.

Se analizaron por RT-PCR los niveles de IL6, IP10, TNF α e IL1 β . El tratamiento con Ro5-4864 en solitario no dio lugar a cambios significativos en la expresión de ninguno de los genes estudiados ni en cultivos procedentes de machos ni de hembras. El tratamiento con LPS en solitario aumentó significativamente los niveles de todos los genes estudiados tanto en machos como en hembras. El tratamiento combinado con Ro5-4864 acompañado del estímulo inflamatorio no dio lugar a cambios significativos en los cultivos procedentes de hembras, pero disminuyó significativamente los niveles de IL6 en comparación con el tratamiento con LPS en solitario en el caso de los cultivos procedentes de machos (*Fig. 54*).

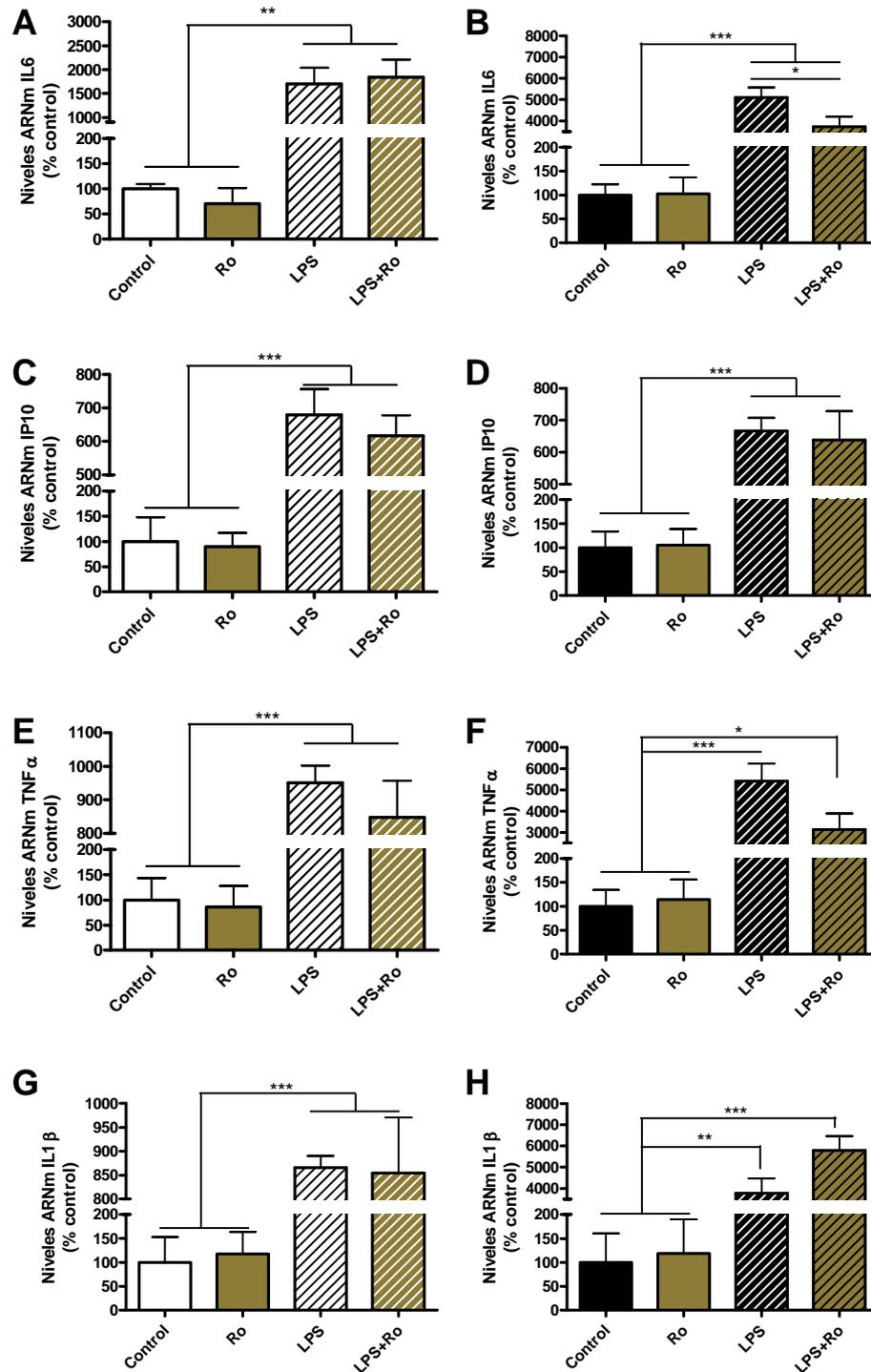


Figura 54.- Efecto del Ro5-4874 sobre la respuesta al LPS de cultivos de astrocitos de machos y hembras por separado. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A.- Cultivos de hembras, B.- Cultivos de machos), IP10 (C.- Cultivos de hembras, D.- Cultivos de machos), TNF α (E.- Cultivos de hembras, F.- Cultivos de machos) e IL1 β (G.- Cultivos de hembras, H.- Cultivos de machos). N=3-4. El Ro5-4864 en solitario no afectó a la expresión de los marcadores estudiados. Los niveles de expresión de los 4 genes aumentaron significativamente con el tratamiento con LPS independientemente de su coadministración con Ro5-4864. El tratamiento combinado disminuyó significativamente la expresión de IL6 sólo en cultivos de machos (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre los grupos señalados). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

4.- EFECTO DE DISTINTOS COMPUESTOS ESTROGÉNICOS SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS

Sabido el efecto de ciertos compuestos estrogénicos en la expresión de marcadores relacionados con inflamación en cultivos de astrocitos mixtos (Cerciat et al, 2010) y dadas las diferencias sexuales observadas en la respuesta astrocitaria al LPS, nos planteamos estudiar qué efecto podría tener sobre dichos marcadores el tratamiento con distintos compuestos estrogénicos, a saber, el estradiol y dos SERMs, el tamoxifeno y el raloxifeno, en cultivos de astrocitos corticales sexualmente diferenciados. También estudiamos el efecto del letrozol, un inhibidor de la aromatasas y, por tanto, de la síntesis endógena de estradiol. Se analizaron los niveles de IL6, IP10, TNF α e IL1 β en cultivos tratados con los distintos compuestos, con LPS o con una combinación de ambos.

4.1.- EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS

4.1.1.- Efecto del estradiol en solitario.

En primer lugar, analizamos el efecto del estradiol por sí solo sobre los cuatro marcadores en astrocitos procedentes de machos y hembras. Se observó un aumento significativo de la expresión de los cuatro marcadores tras el tratamiento con estradiol en cultivos procedentes de hembras, mientras que no tuvo efecto en machos (*Fig. 55*).

4.1.2.- Efecto del estradiol sobre la respuesta de los astrocitos al LPS.

A continuación, analizamos si el tratamiento combinado de estradiol con LPS modulaba la respuesta de los astrocitos al estímulo inflamatorio. No se observó ningún efecto significativo del estradiol sobre la respuesta al LPS, ni en los cultivos procedentes de hembras ni en los procedentes de machos (*Fig. 56*).

4.2.- EFECTO DEL LETROZOL SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS

4.2.1.- Efecto del letrozol en solitario sobre cultivos de astrocitos de machos y hembras por separado.

A continuación, analizamos el efecto del letrozol por sí solo sobre los cuatro marcadores en astrocitos procedentes de machos y hembras. Se observó un aumento significativo de la expresión de TNF α e IL1 β en cultivos procedentes de hembras

dando lugar a una diferencia sexual significativa tras el tratamiento con letrozol sólo en el caso de $TNF\alpha$. No se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de expresión de IL6 e IP10 (Fig. 57).

4.2.2.- Efecto del letrozol sobre la respuesta al LPS en cultivos de astrocitos de machos y hembras por separado.

Asimismo, analizamos si el tratamiento combinado de letrozol con LPS modulaba la respuesta de los astrocitos al estímulo inflamatorio. En los cultivos procedentes de hembras, el letrozol no modificó en ningún caso los niveles de expresión de los marcadores estudiados al aplicarlo en combinación con el LPS. Sin embargo, en los cultivos de machos, el tratamiento combinado con letrozol y LPS dio lugar a una inducción significativamente menor de IL6 e IL1 β que la alcanzada al tratar los cultivos con LPS en solitario. El letrozol no tuvo ningún efecto sobre los niveles de IP10 y $TNF\alpha$ (Fig. 58).

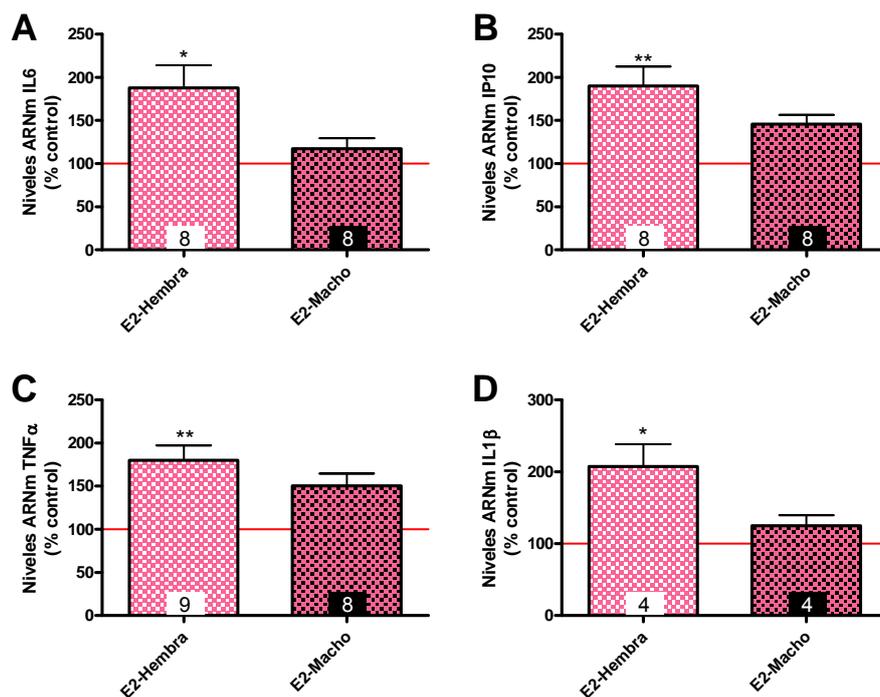
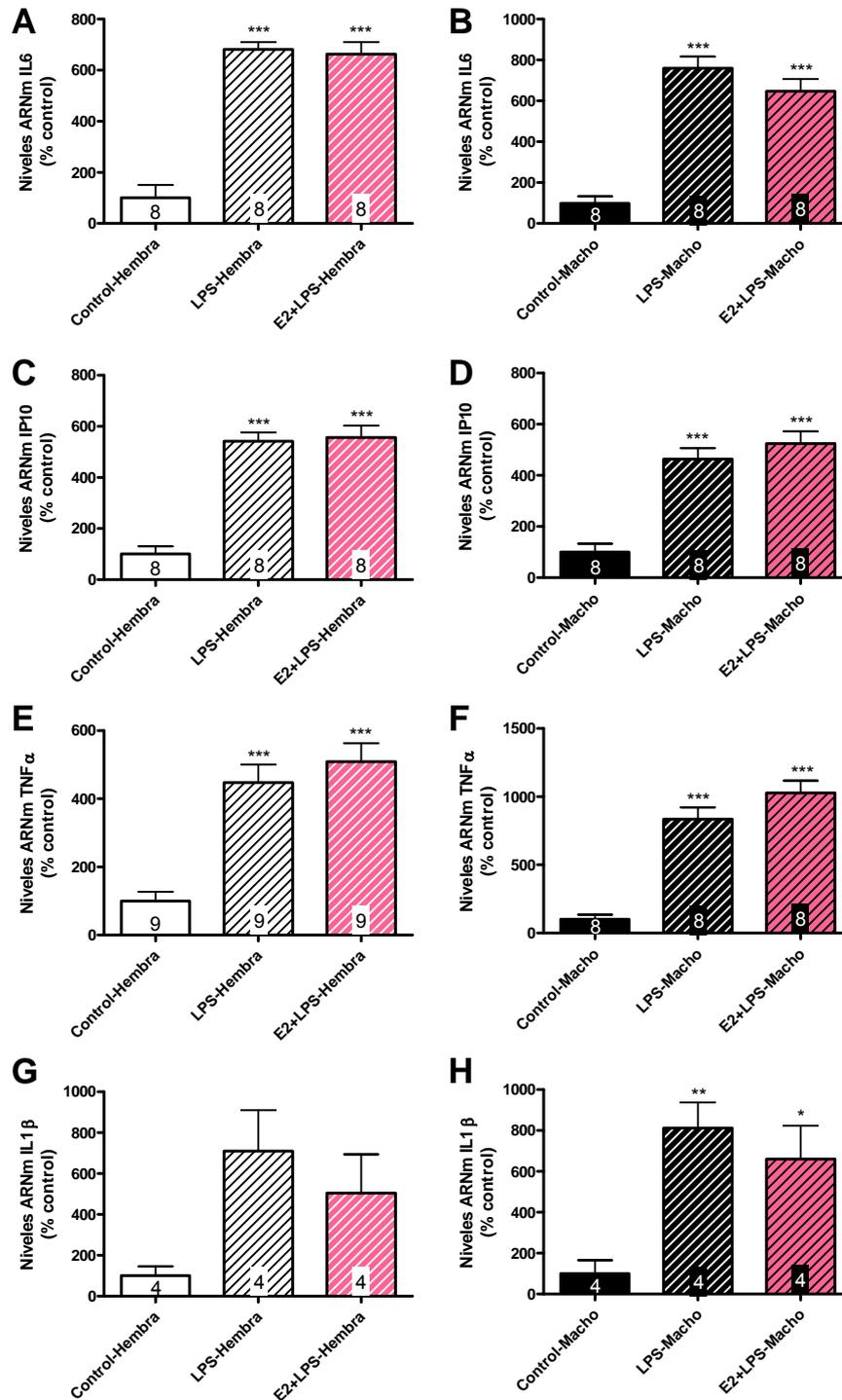


Figura 55.- Efecto del estradiol en cultivos de astrocitos de machos y hembras. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A), IP10 (B), $TNF\alpha$ (C) e IL1 β (D). El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). El estradiol aumentó significativamente la expresión de los cuatro genes en cultivos de hembras, mientras que no presentó ningún efecto significativo en machos (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

Resultados



*Figura 56.- Efecto del estradiol sobre la respuesta al LPS de cultivos de astrocitos de machos y hembras. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A.- Cultivos de hembras, B.- Cultivos de machos), IP10 (C.- Cultivos de hembras, D.- Cultivos de machos), TNFα (E.- Cultivos de hembras, F.- Cultivos de machos) e IL1β (G.- Cultivos de hembras, H.- Cultivos de machos). El número de experimentos se indica dentro de cada barra. Los niveles de expresión de los 4 genes aumentaron significativamente con el tratamiento con LPS independientemente del tipo de cultivo y de su coadministración con estradiol salvo en el caso de la expresión de IL1β en cultivos de hembras. No se observaron diferencias significativas con el tratamiento combinado de LPS+estradiol (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control). Los datos aparecen representados como la media ±SEM.*

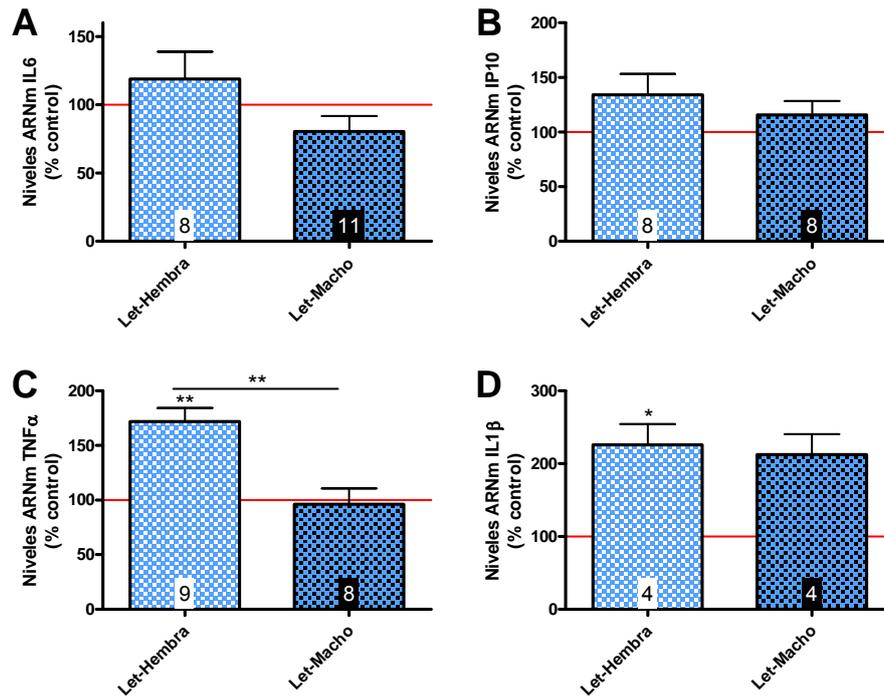
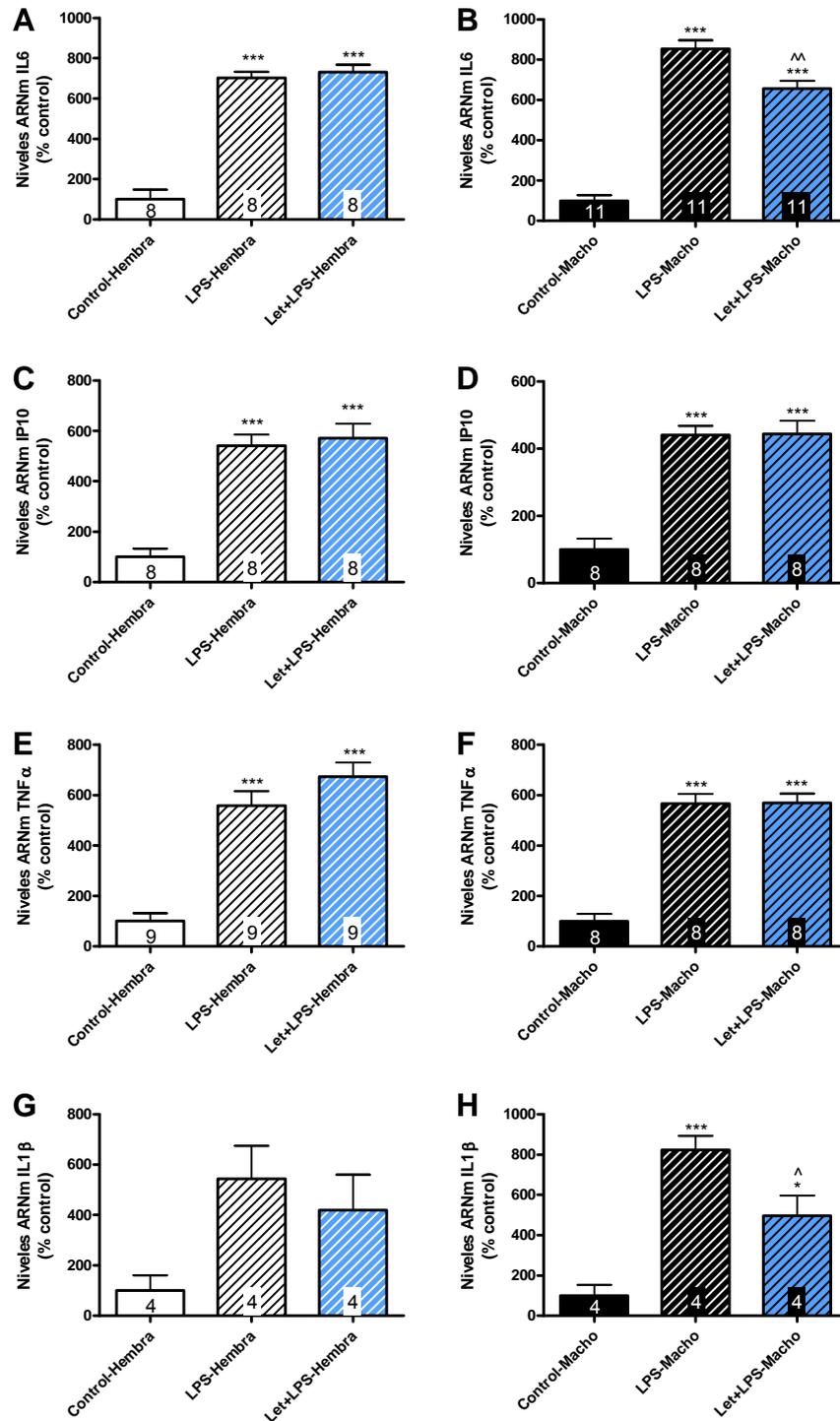


Figura 57.- Efecto del letrozol en cultivos de astrocitos de machos y hembras. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A), IP10 (B), TNF α (C) e IL1 β (D). El número de experimentos se indica dentro de cada barra. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). El letrozol aumentó significativamente la expresión de TNF α e IL1 β en cultivos de hembras. Se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de cultivo tras el tratamiento con letrozol en la expresión de TNF α (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, significación indicada sobre cada barra para la comparación con el control sin tratar y en la línea para la comparación entre cultivos de machos y hembras tras el tratamiento, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

Resultados



*Figura 58.- Efecto del letrozol sobre la respuesta al LPS de cultivos de astrocitos de machos y hembras. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A.- Cultivos de hembras, B.- Cultivos de machos), IP10 (C.- Cultivos de hembras, D.- Cultivos de machos), TNF α (E.- Cultivos de hembras, F.- Cultivos de machos) e IL1 β (G.- Cultivos de hembras, H.- Cultivos de machos). El número de experimentos se indica dentro de cada barra. Los niveles de expresión de los 4 genes aumentaron significativamente con el tratamiento con LPS independientemente del tipo de cultivo y de su coadministración con letrozol salvo en el caso de la expresión de IL1 β en cultivos de hembras. El tratamiento combinado de LPS+letrozol disminuyó significativamente los niveles de IL6 e IL1 β al compararlos con el tratamiento con LPS en solitario en cultivos de machos (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control, ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ vs. LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.*

4.3.- EFECTO DEL TAMOXIFENO SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS

4.3.1.- Efecto del tamoxifeno en solitario.

En primer lugar, analizamos el efecto del tamoxifeno por sí solo en astrocitos procedentes de machos y hembras. Se observó un aumento significativo de la expresión de IL6 y TNF α sólo en cultivos de hembras. Esto dio lugar a una diferencia significativa entre cultivos procedentes de ambos sexos tras el tratamiento con tamoxifeno, siendo significativamente mayor la expresión de ambos marcadores en los cultivos procedentes de hembras. No se observaron diferencias en la expresión de IP10 (*Fig. 59*).

4.3.2.- Efecto del tamoxifeno sobre la respuesta de los astrocitos al LPS.

A continuación, analizamos si el tratamiento combinado de tamoxifeno con LPS modulaba la respuesta de los astrocitos al estímulo inflamatorio. No se observó ningún efecto del tamoxifeno en el caso de cultivos procedentes de machos. En los cultivos procedentes de hembras, el tamoxifeno aumentó significativamente la inducción de IL6 provocada por el LPS en su administración conjunta, sin alterar los niveles de expresión de IP10 y TNF α (*Fig. 60*).

4.4.- EFECTO DEL RALOXIFENO SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS

4.4.1.- Efecto del raloxifeno en solitario.

En primer lugar, analizamos el efecto del raloxifeno por sí solo en astrocitos procedentes de machos y hembras. No se observó ningún cambio significativo de la expresión de los marcadores analizados tras el tratamiento con raloxifeno (*Fig. 61*).

4.4.2.- Efecto del raloxifeno sobre la respuesta de los astrocitos al LPS.

A continuación, analizamos si el tratamiento combinado de raloxifeno con LPS modulaba la respuesta de los astrocitos al estímulo inflamatorio. En cultivos procedentes de hembras, el raloxifeno potenció el efecto inductor del LPS de forma significativa para la expresión de IL6 e IP10, sin afectar a los niveles de TNF α . En los cultivos procedentes de machos, el tratamiento combinado de raloxifeno con LPS da lugar a una inducción intermedia y no significativamente distinta ni del grupo control ni del grupo tratado en exclusiva con LPS para los tres marcadores estudiados (*Fig. 62*).

Resultados

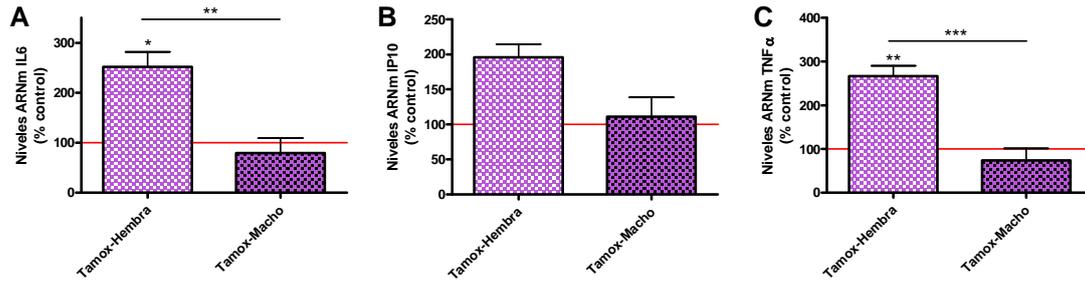


Figura 59.- Efecto del tamoxifeno en cultivos de astrocitos de machos y hembras. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A), IP10 (B) y TNFα (C). N=4. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). El tamoxifeno aumentó significativamente la expresión de los 3 genes estudiados en cultivos de hembras. Se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de cultivo tras el tratamiento con tamoxifeno en la expresión de IL6, IP10 y TNFα (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, significación indicada sobre cada barra para la comparación con el control sin tratar y en la línea para la comparación entre cultivos de machos y hembras tras el tratamiento, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

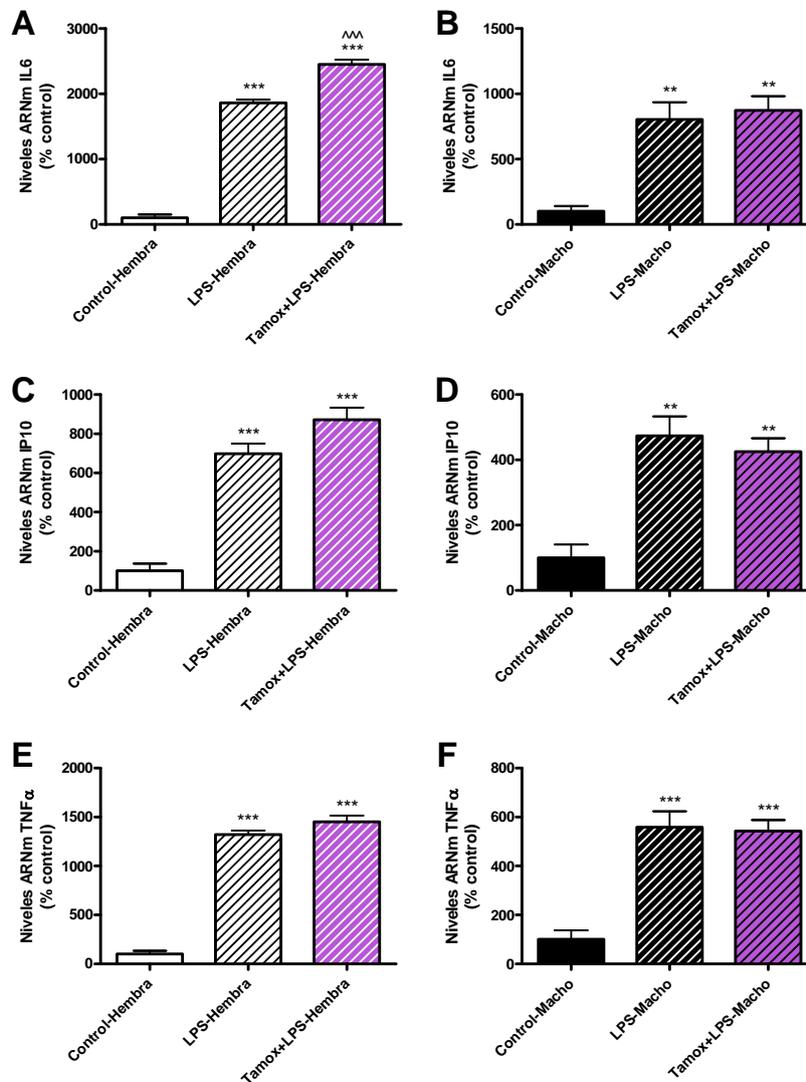


Figura 60.- Efecto del tamoxifeno sobre la respuesta al LPS de cultivos de astrocitos de machos y hembras. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A.- Cultivos de hembras, B.- Cultivos de machos), IP10 (C.- Cultivos de hembras, D.- Cultivos de machos) y TNFα (E.- Cultivos de hembras, F.- Cultivos de machos).

Cultivos de hembras, F.- Cultivos de machos). N=4. Los niveles de expresión de los 3 genes aumentaron significativamente con el tratamiento con LPS independientemente del tipo de cultivo y de su coadministración con tamoxifeno. El tratamiento combinado de LPS+tamoxifeno aumentó significativamente los niveles de IL6 al compararlos con el tratamiento con LPS en solitario en cultivos de hembras (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control, ^^ p<0.001 vs. LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

5.- EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS *IN VIVO* EN MACHOS, HEMBRAS Y HEMBRAS TRATADAS PERINATALMENTE CON PROPIONATO DE TESTOSTERONA

Una vez observadas diferencias sexuales en la respuesta astrocitaria al LPS, nos planteamos analizar los mismos parámetros con un experimento *in vivo*. Para ello, ratones CD1 fueron inyectados s.c. el día del nacimiento con vehículo o PT. A los 29 días se administró vehículo o LPS por vía intraperitoneal y tras 24 horas se analizó por RT-PCR la expresión de distintos genes. Además se analizaron los efectos sobre el peso corporal.

5.1.- DIFERENCIAS SEXUALES EN EL PESO CORPORAL BASAL Y TRAS ADMINISTRACIÓN DE LPS EN RATÓN CD1 PREPUBERAL

En primer lugar, y como control del efecto del LPS, tomamos los pesos de los animales. A los 29 días de edad, los ratones macho así como los ratones hembra que habían recibido PT el día del nacimiento presentaron un peso significativamente mayor que el de los ratones hembra control (*Fig. 63 A*). En los animales inyectados con el vehículo del LPS se pudo observar una ganancia de peso en los machos y en las hembras inyectadas con PT que no se dio en las hembras tratadas con vehículo. La ganancia de peso fue significativamente mayor en los machos que en las hembras inyectadas con vehículo (*Fig. 63 B*).

Todos los grupos sufrieron una pérdida significativa de peso 24 horas después de la administración del LPS. Esta pérdida de peso fue significativamente más acusada en los machos y las hembras tratadas con PT que en las hembras tratadas con vehículo (*Fig. 63 B*).

Resultados

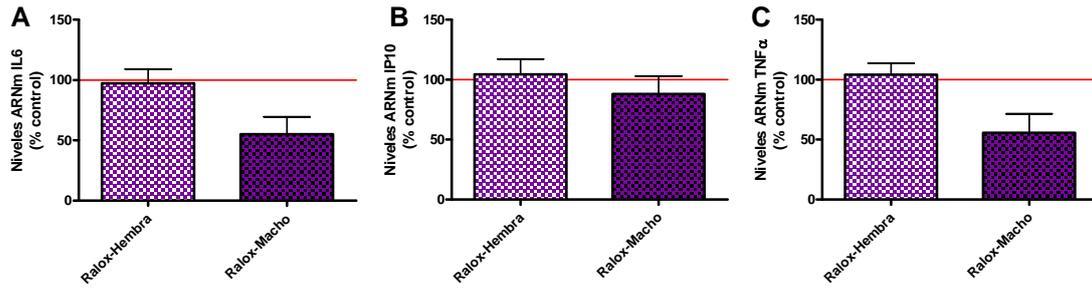


Figura 61.- Efecto del raloxifeno en cultivos de astrocitos de machos y hembras. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A), IP10 (B) y TNF α (C). N=4. La línea roja indica los niveles control (cultivos sin tratar). El raloxifeno no modificó significativamente la expresión de los 3 genes estudiados (ANOVA de una vía). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

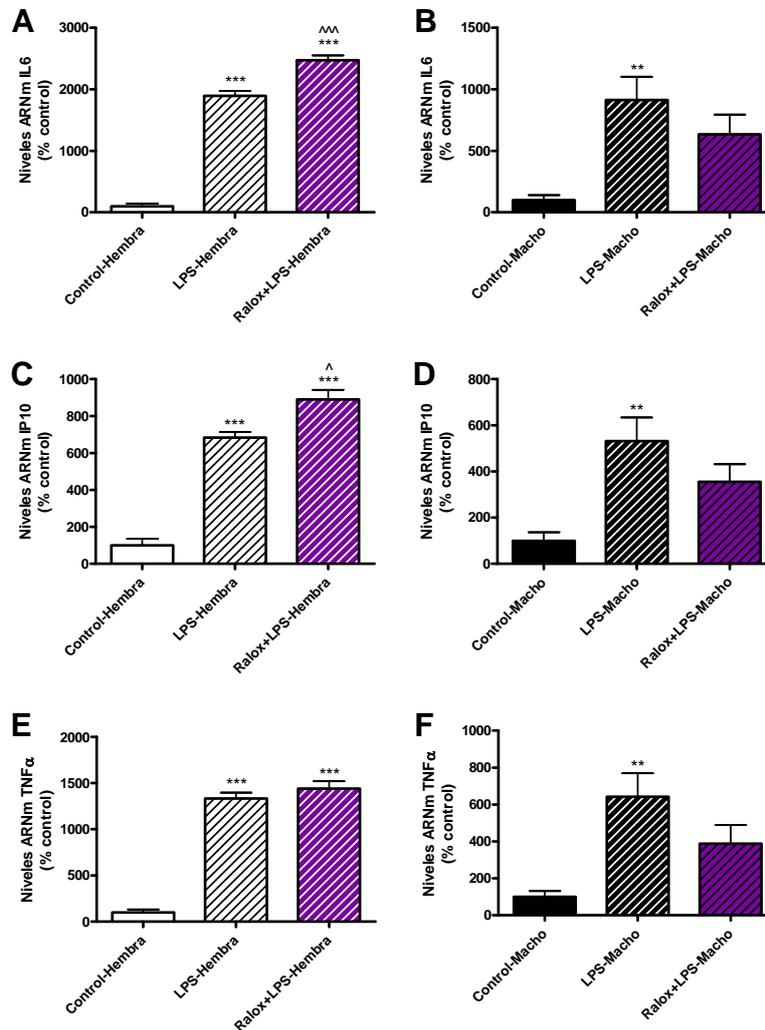


Figura 62.- Efecto del raloxifeno sobre la respuesta al LPS de cultivos de astrocitos de machos y hembras. Se analizaron los niveles de expresión de IL6 (A.- Cultivos de hembras, B.- Cultivos de machos), IP10 (C.- Cultivos de hembras, D.- Cultivos de machos) y TNF α (E.- Cultivos de hembras, F.- Cultivos de machos). N=4. Los niveles de expresión de los 3 genes aumentaron significativamente en ambos tipos de cultivo con el tratamiento con LPS. El tratamiento combinado de LPS+raloxifeno aumentó significativamente los niveles de IL6 e IP10 al compararlos con el tratamiento con LPS en solitario en cultivos de hembras (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control, ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.001$ vs. LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

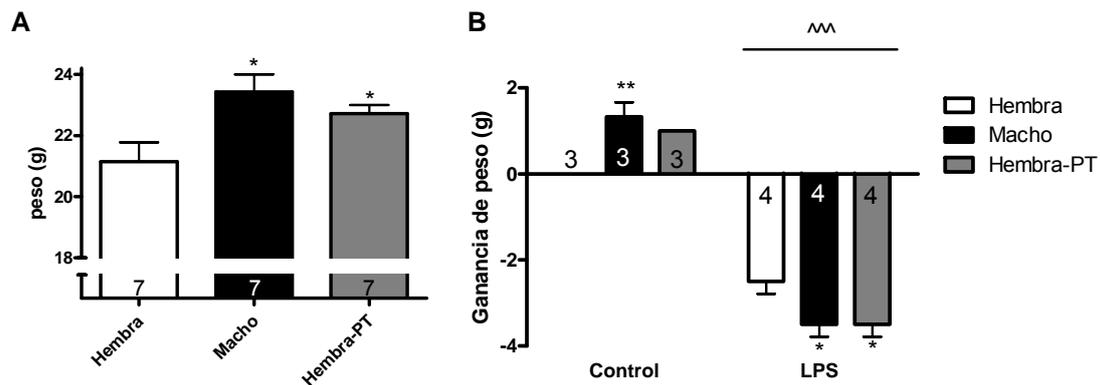


Figura 63.- Peso corporal inicial (A) y ganancia de peso tras el tratamiento con LPS (B) en ratones CD1 prepuberales machos, hembras y hembras tratadas con PT el día del nacimiento. El número de animales por grupo aparece indicado dentro de cada barra. El peso corporal inicial resultó significativamente mayor en machos y hembras tratadas con PT. La ganancia de peso fue significativamente mayor en machos que en hembras sin tratar. Todos los grupos sufrieron una pérdida significativa de peso tras el tratamiento con LPS. Dicha pérdida de peso fue significativamente mayor en machos y hembras tratadas con PT que en hembras sin tratar. Análisis: ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey (A) o ANOVA de dos vías con test post-hoc de Bonferroni (B). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

5.2.- DIFERENCIAS SEXUALES Y EFECTO DEL PT EN LA RESPUESTA AL LPS DE RATONES CD1 PREPUBERALES

Una vez controlada la efectividad del LPS y la existencia de diferencias sexuales en la respuesta al estímulo inflamatorio, tomando como parámetro el peso corporal, pasamos a analizar algunos de los genes que habían mostrado diferencias sexuales en su respuesta al LPS en los cultivos primarios de astrocitos corticales.

5.2.1.- Niveles basales.

En primer lugar, se asesoraron los niveles de expresión basal de los distintos genes analizados en ratones machos, hembras y hembras tratadas con PT.

En lo que respecta a los marcadores relacionados con inflamación, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de IL6, IP10, TNF α e IL1 β . Tampoco se detectaron diferencias en el translocador de colesterol StAR, mientras que los niveles basales de TSPO resultaron significativamente mayores en animales macho que en los dos grupos de animales hembra. No se observaron cambios significativos en la expresión de ambos receptores de estrógeno (Fig. 64).

Resultados

5.2.2.- Efecto del LPS.

A continuación, se analizaron los niveles de expresión de IL6, IP10, TNF α , IL1 β , StAR, TSPO, ER α y ER β en ratones machos, hembras y hembras tratadas con PT tras 24 horas de exposición a LPS (*Fig. 65*).

El único marcador relacionado con inflamación cuya expresión no se modificó significativamente en ningún grupo tras el tratamiento con LPS fue la IL6. El LPS indujo un incremento significativo en los niveles de IP10 y TNF α en el grupo de hembras control, mientras que los otros dos grupos experimentales no sufrieron cambios. En cuanto a la IL1 β , se pudo observar un incremento de la expresión tras la administración de LPS en el grupo de machos. Además, se observaron diferencias entre los grupos tras la exposición a LPS en los tres marcadores: la sobreexpresión de IP10 fue significativamente mayor en hembras control que en los demás grupos, la de TNF α mayor en hembras control que en machos y la de IL1 β mayor en machos que en ambos grupos de hembras. (*Fig. 65 A-D*).

En cuanto a los niveles de expresión de los transportadores de colesterol, el LPS no produjo cambios significativos en la expresión de StAR en ningún grupo. Por el contrario, el LPS aumentó significativamente los niveles de TSPO en las hembras tratadas con vehículo, pero no en los machos y en las hembras tratadas con PT. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de TSPO entre los distintos grupos tras la exposición a LPS (*Fig. 65 E-F*).

Los receptores de estrógeno no sufrieron cambios significativos en su expresión tras la administración de LPS. Sin embargo, las tendencias a la baja en los machos dieron lugar a una diferencia significativa entre los grupos, resultando la expresión post-LPS de ER α significativamente mayor en el grupo de hembras control que en el de machos (*Fig. 65 G-H*).

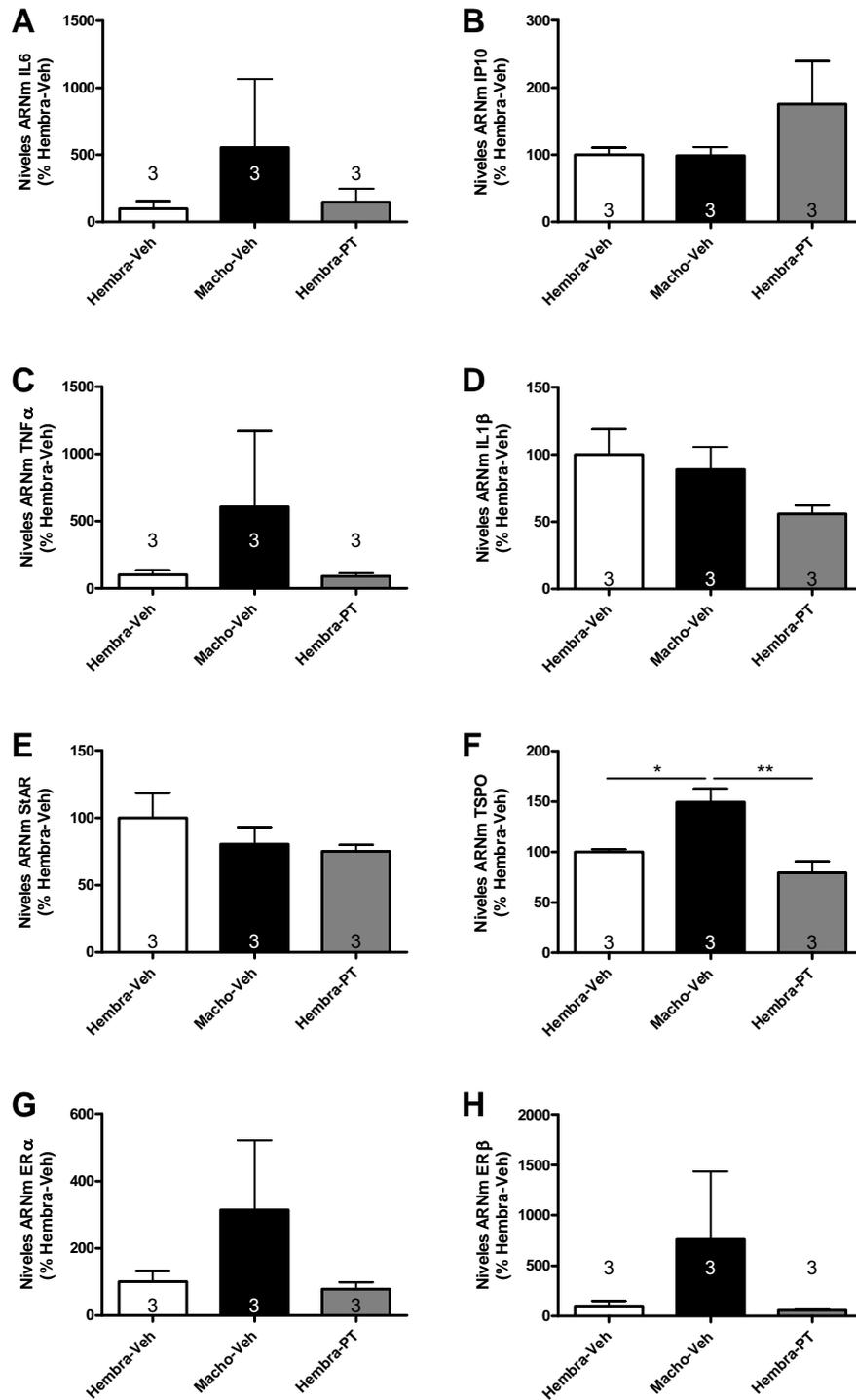


Figura 64.- Expresión basal de IL6 (A), IP10 (B), TNF α (C), IL1 β (D), StAR (E), TSPO (F), ER α (G) y ER β (H) en ratones CD1 prepuberales machos, hembras y hembras tratadas con PT. El número de experimentos aparece indicado en cada barra. La expresión de TSPO resultó significativamente mayor en machos que en los dos grupos de hembras (ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ entre los grupos señalados). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

Resultados

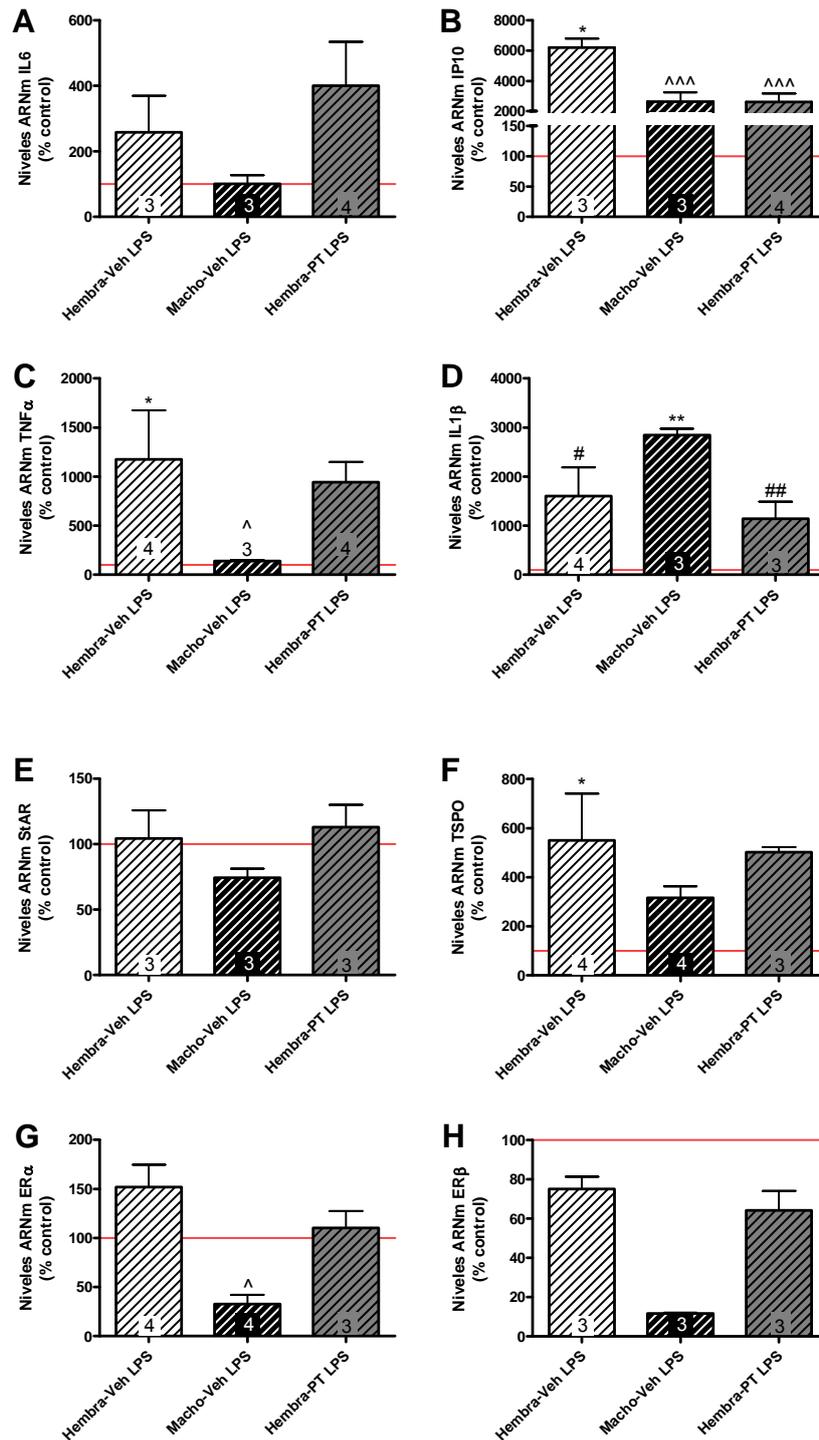


Figura 65.- Expresión de IL6 (A), IP10 (B), TNF α (C), IL1 β (D), StAR (E), TSPO (F), ER α (G) y ER β (H) en ratones CD1 prepuberales machos, hembras y hembras tratadas con PT tras exposición a LPS. El número de experimentos aparece indicado en cada barra. Tras la exposición a LPS, aumentaron significativamente los niveles de IP10, TNF α y TSPO en hembras control y de IL1 β en machos. Tras el tratamiento con LPS, la expresión fue significativamente mayor en hembras control que en machos y hembras PT para IP10, en hembras control que en machos para TNF α , en machos que en ambos grupos de hembras para IL1 β y los de hembras control que los de machos para ER α (ANOVA de dos vías con test post-hoc de Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control, ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.001$ vs. Hembra-Veh LPS, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Macho-Veh LPS). Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

6.- EFECTO DE LOS SERMS SOBRE LA REACTIVIDAD MICROGLIAL EN UN MODELO *IN VIVO* DE INFLAMACIÓN PERIFÉRICA

En este experimento, nos centramos en la respuesta de otro tipo de célula glial, la microglía, a la administración de LPS así como al efecto que sobre dicha respuesta pudieran tener una batería de SERMs. Por la interacción de los SERMs con los receptores de estrógeno y para evitar efectos de las hormonas circulantes que pudieran alterar las acciones específicas de los compuestos analizados, las ratas hembras Wistar empleadas en este experimento fueron castradas.

6.1.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EN SOLITARIO DE SERMs SOBRE LA REACTIVIDAD MICROGLIAL

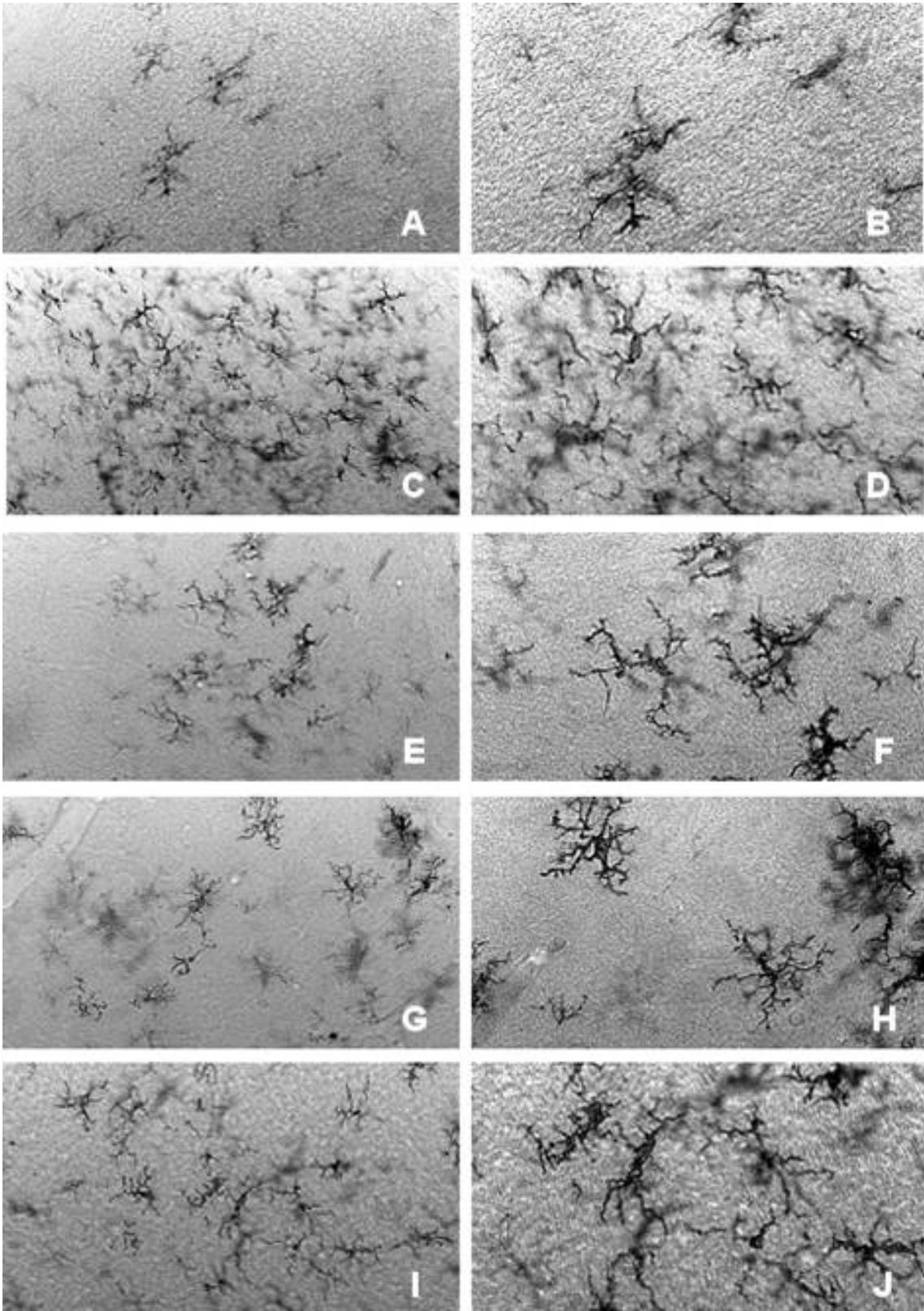
En primer lugar, analizamos el posible efecto que pudieran tener los SERMs *per se* sobre el número de células de microglía reactivas, es decir, de células positivas para MHC-II, en cerebelo de rata. Se realizaron recuentos en la sustancia blanca central del cerebelo mediante el método del disector óptico. Las observaciones cualitativas de las preparaciones mostraron un reducido número de células inmunorreactivas en el grupo control, inyectado con vehículo (*Fig. 66, A-B*), y en varios de los grupos tratados con SERMs. Por el contrario, las preparaciones de animales inyectados con otros de los SERMs presentaron mayor número de células inmunorreactivas (*Fig. 66, M-N, Q-R, W-X*). En los recuentos, se observó un aumento significativo en el número de células inmunorreactivas para MHC-II tras la administración de tres de los ocho SERMs empleados: fispemifeno, HM-280 y HM-282 (*Fig. 67*). Dichos SERMs tendrían, por tanto, un efecto proinflamatorio al ser administrados en condiciones basales.

6.2.- EFECTO DE LOS SERMS SOBRE LA REACTIVIDAD MICROGLIAL TRAS UN ESTÍMULO INFLAMATORIO

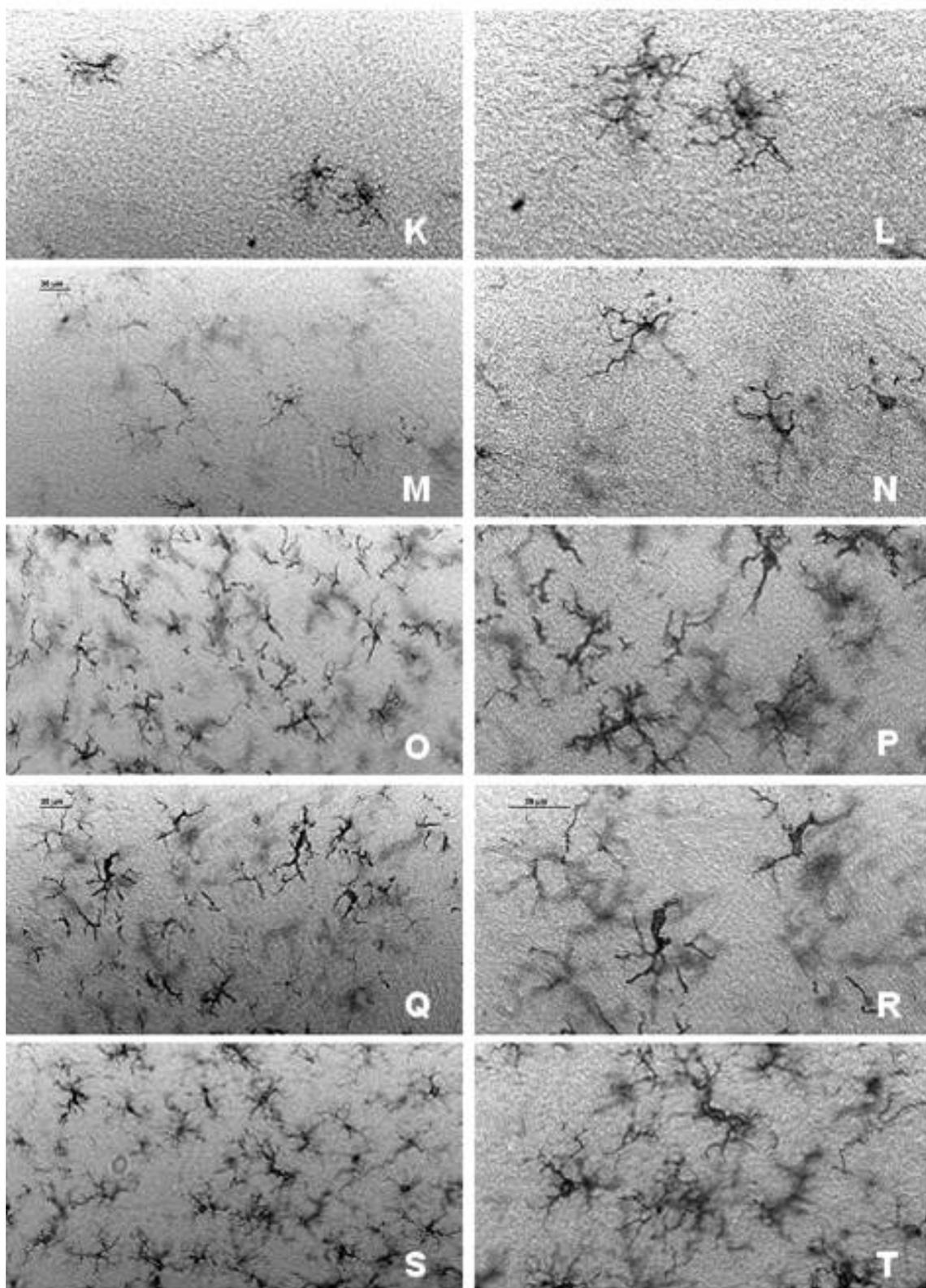
A continuación, medimos el efecto del LPS sobre el número de células de microglía reactivas, y el efecto que sobre dicha respuesta microglial pudieran tener los distintos SERMs analizados. La observación de las preparaciones mostró un incremento del número de células de microglía reactivas tras el tratamiento con LPS. Dichas células mostraban una morfología claramente más reactiva, con somas de mayor tamaño y prolongaciones más finas y retraídas (*Fig. 66, C-D*). Dicho cambio en el número y la morfología microglial se vio contrarrestado con el tratamiento

Resultados

combinado con algunos de los SERMs mientras que otros no tuvieron ningún efecto (*Fig. 66, E-L, O-P, S-V, Y-Z*). En los recuentos se observó un aumento significativo de la reactividad microglial al tratar con LPS. Dicho efecto no fue revertido por los SERMs ospemifeno, HM-280, HM-281 y HM-282. Sin embargo, el tratamiento combinado de LPS con tamoxifeno, raloxifeno, fispemifeno o bazedoxifeno dio lugar a una disminución significativa del número de células inmunorreactivas para MHC-II al compararlo con el tratamiento con LPS en solitario y dando lugar a niveles control (*Fig. 68*). Por lo tanto, estos SERMs presentan actividad antiinflamatoria tras la administración de LPS.



Resultados



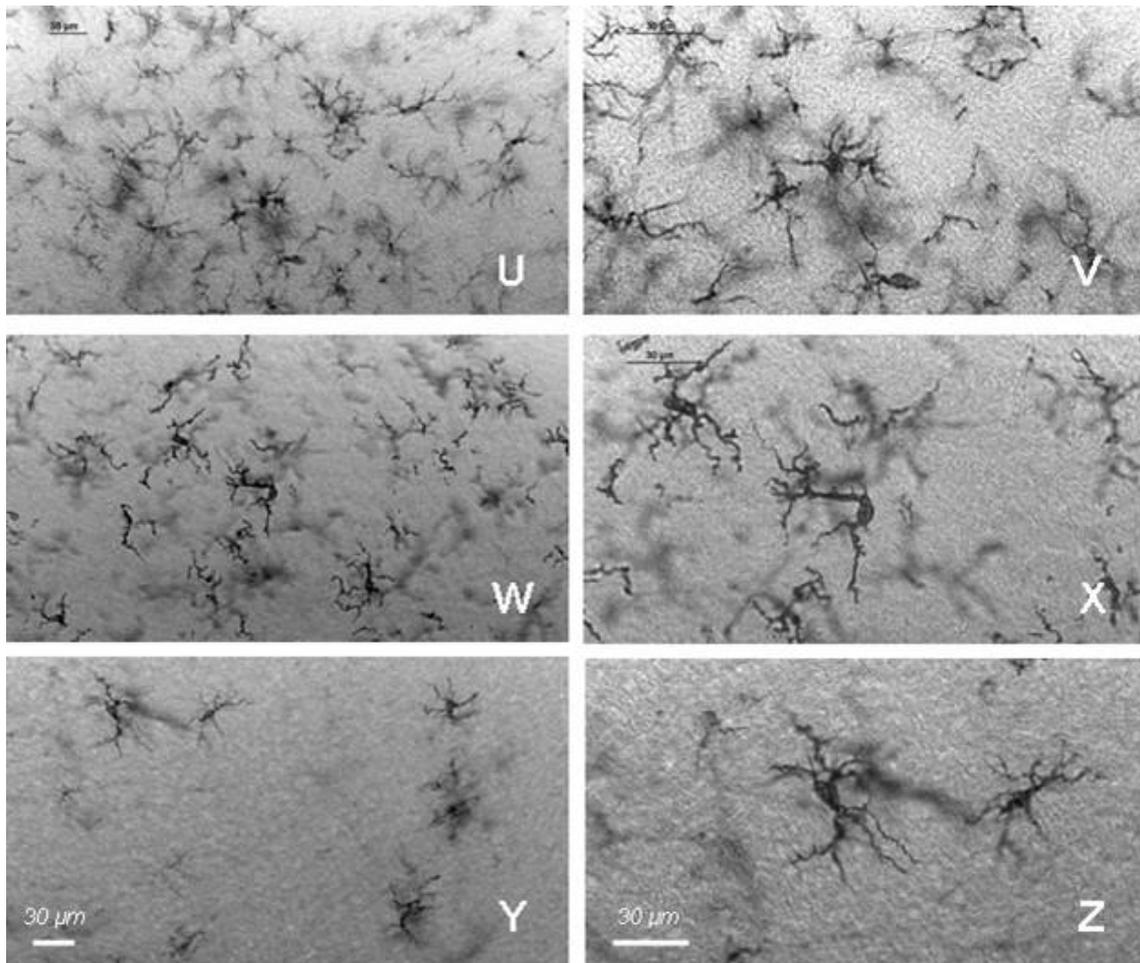


Figura 66.- Imágenes representativas de la sustancia blanca central del cerebelo de ratas hembra ovariectomizadas tratadas con SERMs y LPS y marcadas con un anticuerpo para MHC-II. Cada fila de imágenes representa un tratamiento diferente. Las imágenes en la columna izquierda fueron tomadas con el objetivo de 20x, las de la columna derecha con el objetivo de 40x. La barra de escala se corresponde con 30 μ m (en las imágenes Y y Z).

A,B vehículo; C,D LPS; E,F Tamoxifeno y LPS; G,H Raloxifeno y LPS; I,J Ospemifeno y LPS; K,L Fispemifeno y LPS; M,N Fispemifeno y Veh; O,P HM-280 y LPS; Q,R HM-280 y Veh; S,T HM-281 y LPS; U,V HM-282 y LPS; W,X HM-282 y Veh; Y,Z Bazedoxifeno y LPS.

Resultados

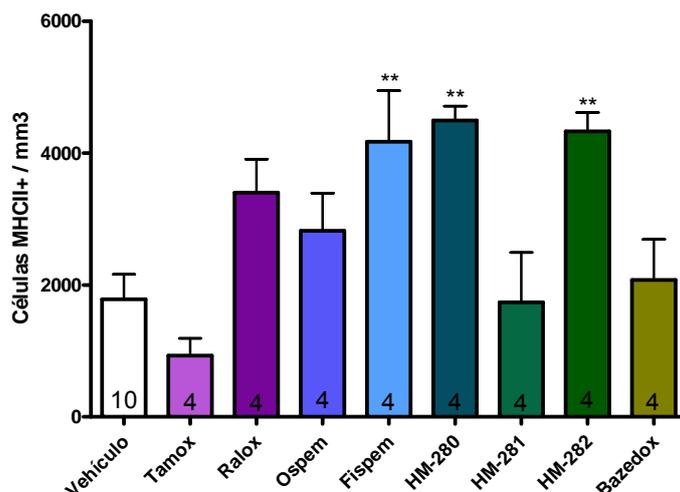


Figura 67.- Número de células inmunorreactivas para MHC-II por mm^3 en sustancia blanca central del cerebelo de ratas hembra ovariectomizadas tras el tratamiento con diferentes SERMs. El número de animales por grupo aparece indicado dentro de cada barra. Se observó un aumento significativo del número de células de microglía reactivas tras el tratamiento con fispemifeno, HM-280 y HM-282. Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnet, ** $p < 0,01$ vs. vehículo. Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

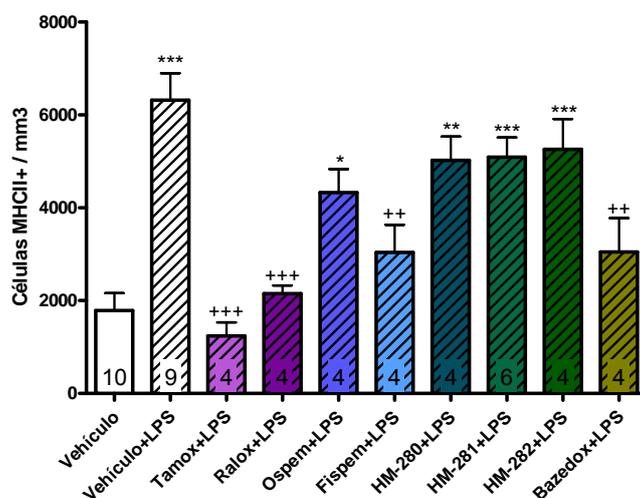


Figura 68.- Número de células inmunorreactivas para MHC-II por mm^3 en sustancia blanca central del cerebelo de ratas hembra ovariectomizadas tras el tratamiento con LPS en solitario o combinado con diferentes SERMs. El número de animales por grupo aparece indicado dentro de cada barra. Se observó un aumento significativo del número de células de microglía reactivas tras el tratamiento con LPS. Este aumento de reactividad microglial sólo fue reducido significativamente con el tratamiento combinado de LPS con tamoxifeno, raloxifeno, fispemifeno y bazedoxifeno. Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Vehículo, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ vs. Vehículo+LPS. Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

7.- EFECTO DEL TIEMPO DE OVARIECTOMÍA, EL ESTRADIOL Y LOS SERMS SOBRE LA REACTIVIDAD GLIAL TRAS LESIÓN CEREBRAL PENETRANTE EN RATA

Para determinar el efecto del estradiol y dos de los SERMs, tamoxifeno y raloxifeno, en otro modelo experimental que cursara con inflamación, diseñamos un estudio sobre el efecto de dichos compuestos y el tiempo desde la ovariectomía tras lesión cerebral penetrante. Se analizó el número de células de astroglia reactiva en animales jóvenes tras ovariectomía reciente, animales de mediana edad tras ovariectomía reciente y animales viejos recientemente ovariectomizados o tras un largo periodo desde la ovariectomía. Asimismo, se analizó la reactividad microglial mediante el análisis de la fracción de volumen de material inmunorreactivo para MHC-II en los grupos de animales jóvenes y viejos.

La lesión, que se extendió a través de la corteza frontoparietal y el cuerpo calloso atravesando las regiones CA1 y CA3-4 del hipocampo, provocó una gliosis reactiva, con hipertrofia progresiva de los astrocitos y la microglía. Dicha gliosis culminó alrededor del día 7^o dando lugar a la cicatriz glial, que se extendía aproximadamente unas 500 μm desde el margen de la lesión.

El fenotipo observado de los distintos tipos celulares cambió a lo largo de la cicatriz glial. Los astrocitos mostraron un fenotipo más reactivo y fibroso en la zona cercana a la lesión (*Fig. 69 A*). Además, en el borde de la herida y disminuyendo al aumentar la distancia al mismo, se encontró microglía con morfología ameboide inmunorreactiva para MHC-II junto con macrófagos extravasados, más redondeados (*Fig. 69 B*).

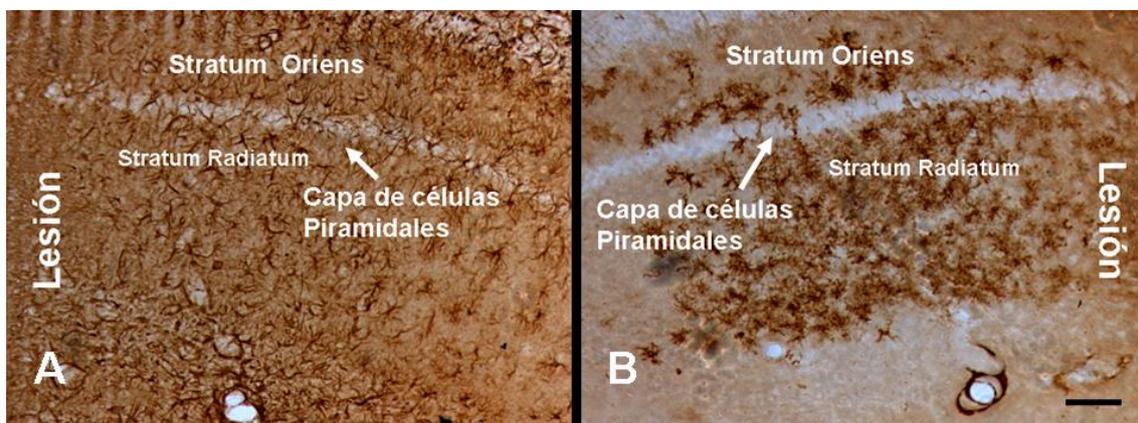


Figura 69.- Imágenes representativas del hipocampo lateral a la lesión marcado con vimentina para astrocitos reactivos (A) y MHC-II para microglía reactiva (B). Barra de aumento 100 μm (en B).

Resultados

7.1.- ESTUDIO EN ANIMALES JÓVENES

7.1.1.- Efecto de los SERMs sobre la reactividad glial tras lesión cerebral penetrante.

En el examen cualitativo de las preparaciones se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales: los animales tratados con compuestos estrogénicos, tanto con estradiol como con los SERMs tamoxifeno y raloxifeno, presentaron una cicatriz glial con una menor densidad celular que los animales control inyectados con vehículo. Esta menor densidad celular afectó a los dos marcadores de glía estudiados (*Fig. 70*).

El análisis estereológico de las preparaciones, realizado lateralmente a la lesión y hasta 350 μm de distancia al borde de la misma, confirmó las observaciones cualitativas. El número de células inmunorreactivas para vimentina (astrocitos reactivos) y la fracción de volumen de material MHC-II inmunorreactivo (microglía reactiva) disminuyeron significativamente tras la administración tanto de estradiol como de los dos SERMs, tamoxifeno y raloxifeno, en animales con lesión penetrante (*Fig. 71*).

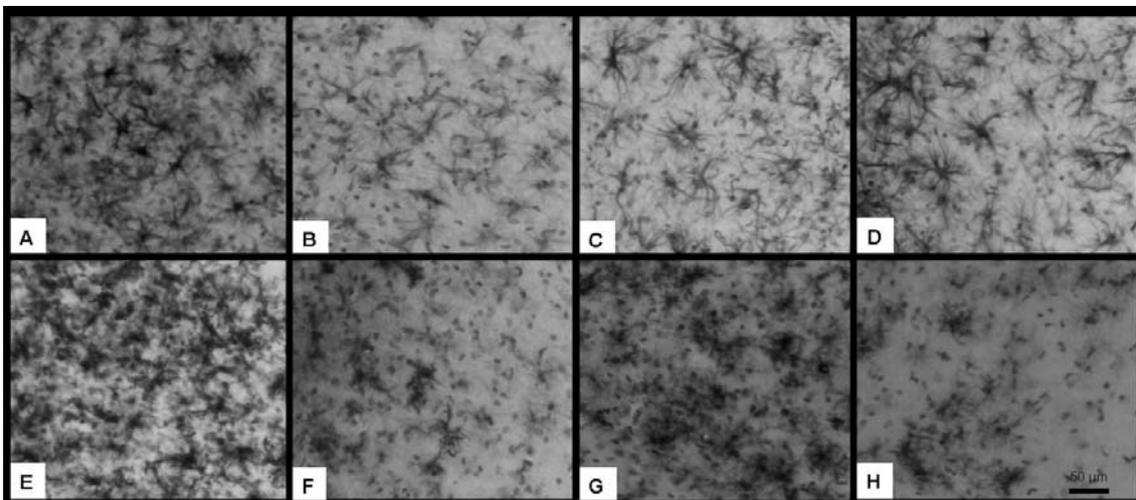
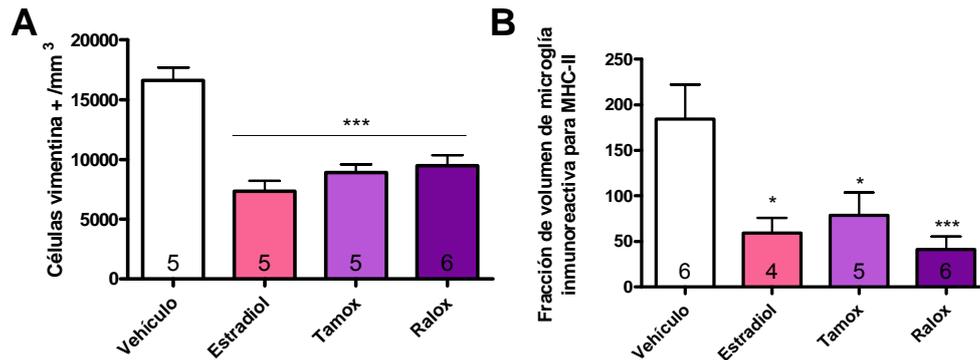


Figura 70.- Imágenes representativas del hipocampo lateral a la lesión en ratas hembra jóvenes lesionadas y tratadas con distintos compuestos estrogénicos. Marcaje con vimentina para astrocitos reactivos (A-D) y MHC-II para microglía reactiva (E-H). A,E.- Vehículo. B,F.- Estradiol. C,G.- Tamoxifeno. D,H.- Raloxifeno. Los núcleos celulares aparecen contrastados con toluidina. Barra de escala: 50 μm (H).



*Figura 71.- Efecto del estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno en lesión cerebral penetrante en rata joven ovariectomizada. A.- Número de células inmunorreactivas para vimentina por mm³. B.- Fracción de volumen de microglía inmunorreactiva para MHC-II. El número de animales por grupo aparece indicado dentro de cada barra. Se observó una disminución significativa en la reactividad glial tras el tratamiento con los tres compuestos en los dos tipos celulares estudiados. Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * p<0,05, *** p<0,001 vs. Vehículo. Los datos aparecen representados como la media ±SEM.*

7.1.2.- Efecto de los SERMs sobre la proliferación glial tras lesión cerebral penetrante.

Con el fin de analizar la proliferación de tipos específicos de glía, se realizaron tinciones dobles de vimentina y MHC-II en combinación con BrdU. Se fotografiaron las secciones en el microscopio confocal en el caso de las tinciones dobles con vimentina y en el microscopio óptico para las tinciones con MHC-II y se contó el número de células que colocalizaban los dos marcadores hasta una distancia de 400 μm del borde de la lesión en el hipocampo (*Fig. 72*).

La disminución en el número de células de glía reactiva fue acompañada de una disminución significativa en su proliferación en el caso de astrocitos. Además, dicha disminución fue más potente tras el tratamiento con tamoxifeno para la astrogliá. No se observaron cambios significativos en la proliferación de la microglía reactiva (*Fig. 73*).

Resultados

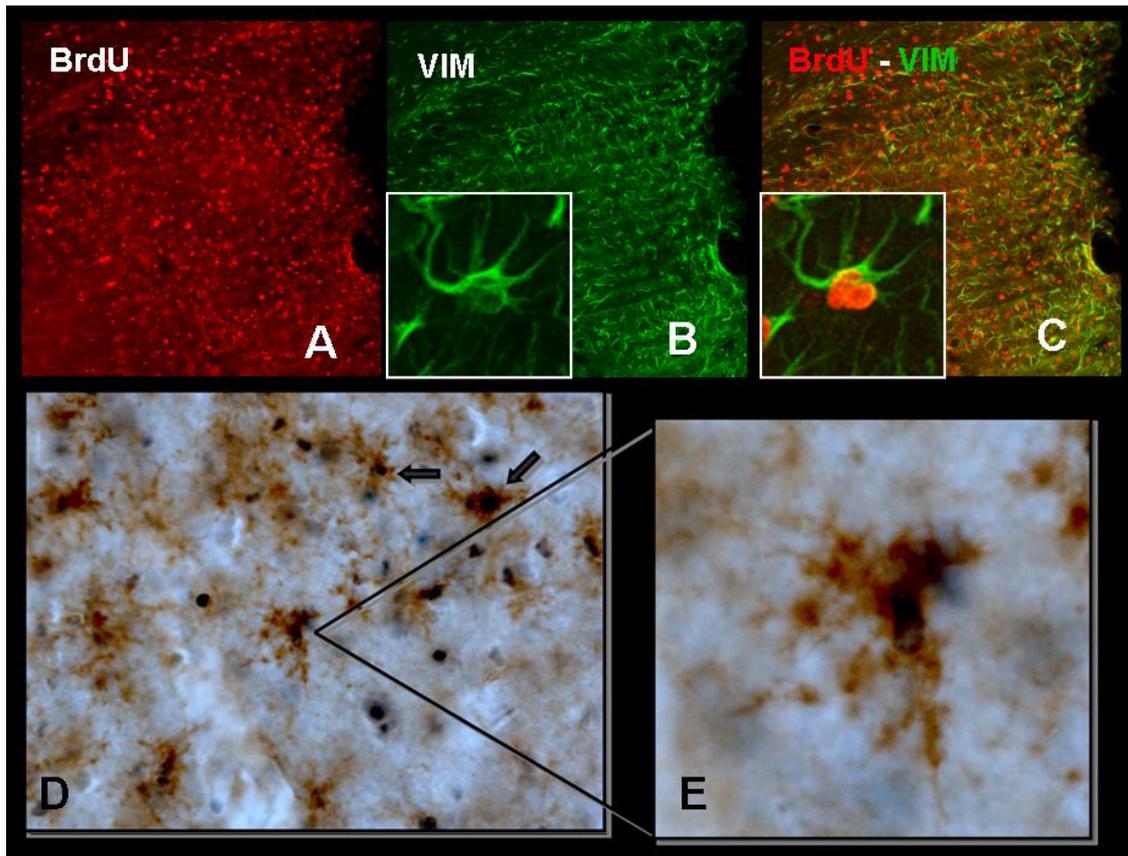


Figura 72.- Ejemplo de los marcajes dobles de BrdU combinada con vimentina para astrocitos reactivos (A-C) y MHC-II para microglía reactiva (D-E) en el hipocampo de ratas hembra jóvenes, lateralmente a la lesión.

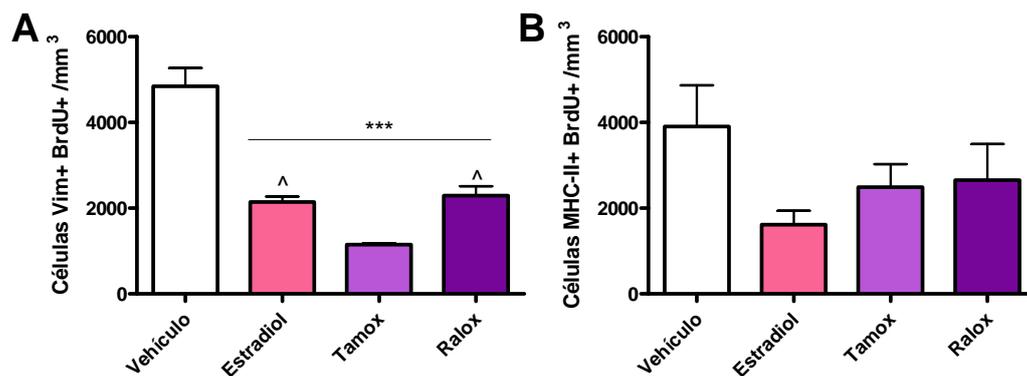
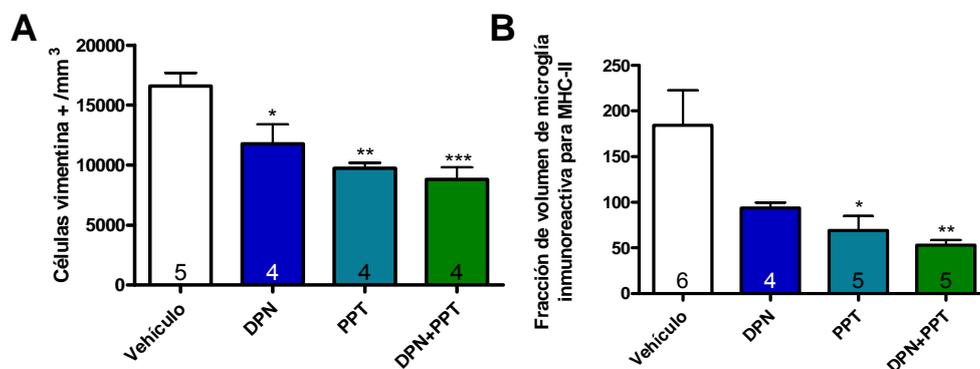


Figura 73.- Efecto del estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno sobre la proliferación glial tras lesión cerebral penetrante en rata joven ovariectomizada. A.- Número de células inmunorreactivas para BrdU y vimentina por mm³. B.- Número de células inmunorreactivas para BrdU y MHC-II por mm³. N=4. Se observó una disminución significativa en la proliferación glial tras el tratamiento con los tres compuestos en astrocitos. No se observaron diferencias significativas en la proliferación de microglía reactiva. Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, *** p<0,001 vs. Vehículo, ^ p<0.05 vs. Tamox. Los datos aparecen representados como la media ±SEM.

7.1.3.- Efecto de los agonistas selectivos de ER α (PPT) y ER β (DPN) sobre la reactividad glial tras lesión cerebral penetrante.

Para discernir a través de qué receptor llevaban a cabo sus efectos el estradiol y los SERMs, tratamos a los animales con dos agonistas selectivos de los receptores de estrógeno en solitario o combinados. En el caso de la astroglia reactiva, se observó una disminución significativa tras el tratamiento con ambos agonistas solos o en combinación respecto a los valores del grupo vehículo. Sin embargo, la fracción de volumen ocupada por las células de microglía reactiva sólo disminuyó significativamente con el tratamiento con el agonista del receptor alfa, el PPT, o la combinación de ambos agonistas respecto a los valores del grupo vehículo (*Fig. 74*).



*Figura 74.- Efecto del DPN, el PPT y su combinación sobre la reactividad glial tras lesión penetrante en rata joven ovariectomizada. A.- Número de células inmunorreactivas para vimentina por mm³. B.- Fracción de volumen de microglía inmunorreactiva para MHC-II. El número de animales por grupo aparece indicado dentro de cada barra. Se observó una disminución significativa en la reactividad glial tras el tratamiento con PPT sólo o en combinación con DPN en los dos tipos celulares estudiados. EL DPN en solitario disminuyó exclusivamente la cantidad de astrocitos reactivos. Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * p<0,05, ** p<0.01, *** p<0,001 vs. Vehículo. Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.*

7.1.4.- Efecto del PPT y el DPN sobre la proliferación glial tras lesión cerebral penetrante.

Ambos agonistas fueron capaces de disminuir el número de células de astroglia BrdU positivas. La proliferación de microglía reactiva no fue alterada por el tratamiento con ninguno de los agonistas empleados (*Fig. 75*).

Resultados

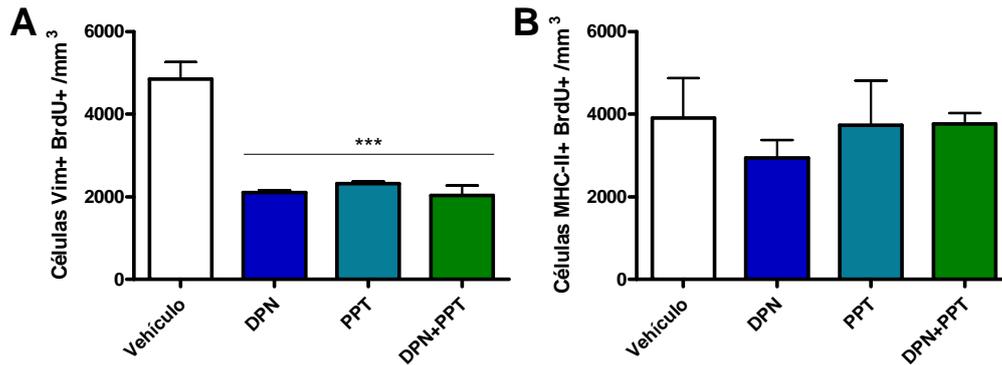


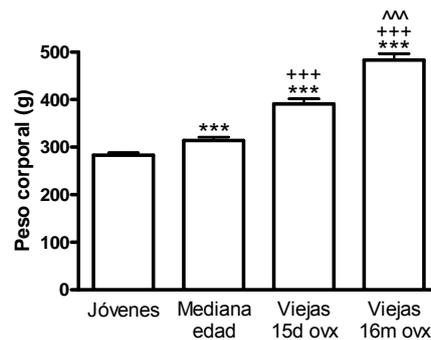
Figura 75.- Efecto del DPN, el PPT y su combinación sobre la proliferación glial tras lesión cerebral penetrante en rata joven ovariectomizada. A.- Número de células inmunorreactivas para BrdU y vimentina por mm³. B.- Número de células inmunorreactivas para BrdU y MHC-II por mm³. N=4. Se observó una disminución significativa en la proliferación glial tras el tratamiento con los dos compuestos solos o combinados en astrocitos. No se observaron diferencias significativas en la proliferación de microglía reactiva. Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, *** p<0,001 vs. Vehículo. Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.

7.2.- EFECTO DE LA EDAD, EL TIEMPO TRAS LA OVARIECTOMÍA, EL ESTRADIOL Y LOS SERMs SOBRE LA RESPUESTA DE LA GLÍA REACTIVA A UNA LESIÓN CEREBRAL PENETRANTE

Una vez observados los efectos del estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno sobre la glía reactiva en animales jóvenes, nos planteamos si dicho efecto podría ser diferente dependiendo de la edad y el tiempo de privación hormonal al que estuvieran sujetos los animales. Por ello, estudiamos la reactividad glial en nuestro modelo de lesión cerebral penetrante en animales jóvenes y de mediana edad tras un corto periodo de privación de hormonas gonadales y en animales viejos después de un corto o un largo periodo de privación hormonal.

7.2.1.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre el peso corporal.

En los tres grupos de ovariectomía reciente se observó que según aumentaba la edad se producía una ganancia de peso significativa. Además, el tiempo tras la ovariectomía afectó de forma significativa a los animales viejos: el grupo con un largo periodo de tiempo tras la ovariectomía (16 m ovx) presentó un peso significativamente mayor que el grupo de ovariectomía reciente (15d ovx) (Fig. 76).



*Figura 76.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre el peso de ratas hembra. Se observó un aumento de peso significativo y progresivo proporcional a la edad. Los animales viejos con un largo periodo de tiempo tras la ovariectomía (16m ovx) presentaron un peso corporal significativamente mayor que los animales viejos con un corto periodo de tiempo tras la ovariectomía (15d ovx). Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, *** $p < 0,001$ vs. Jóvenes, +++ $p < 0.001$ vs. Mediana edad, ^^ $p < 0.001$ vs. Viejas 15d ovx. Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.*

7.2.2.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre la reactividad astroglial.

La reactividad astroglial basal tras la lesión cerebral penetrante fue significativamente mayor en los animales viejos que en los animales jóvenes, siendo todavía más acusada en los animales viejos con un largo periodo de tiempo tras la ovariectomía. El estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyeron significativamente el número de astrocitos inmunorreactivos para vimentina en los cuatro grupos experimentales estudiados. El número de astrocitos reactivos en animales jóvenes resultó menor que en los dos grupos de animales viejos tras el tratamiento con estradiol, tamoxifeno y raloxifeno. Asimismo, los animales de mediana edad presentaron menor número de astrocitos reactivos que ambos grupos de animales viejos tras el tratamiento con estradiol y raloxifeno. Además, se observó mayor reactividad astroglial tras el tratamiento con estradiol en animales viejos con depleción hormonal prolongada en comparación con los de corta privación hormonal (*Fig. 77*).

Para descartar la posibilidad de un efecto de los compuestos estrogénicos sobre la expresión de vimentina, más que sobre la cantidad de astrocitos reactivos, se analizó el número de células inmunorreactivas para GFAP en los animales de mediana edad. Los tres compuestos administrados redujeron significativamente el número de células GFAP positivas (*Fig. 78*).

Resultados

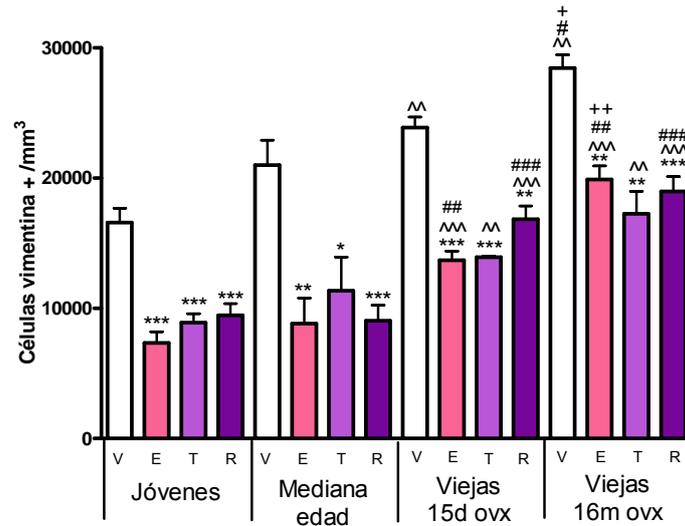


Figura 77.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre la respuesta a estradiol, tamoxifeno y raloxifeno de la astrogliá reactiva tras lesión cerebral penetrante. V.- Vehículo. E.- Estradiol. T.- Tamoxifeno. R.- Raloxifeno. N=4-6. El número de células inmunorreactivas para vimentina fue significativamente mayor en animales viejos que en jóvenes con independencia del tiempo tras la ovariectomía y del tratamiento aplicado. Los animales viejos con 16 meses tras la ovariectomía (16m ovx) presentaron mayor astrogliosis que los demás grupos. El estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyeron significativamente la cantidad de astrogliá reactiva en todos los grupos. El número de astrocitos positivos para vimentina fue mayor en los dos grupos de ratas viejas que en el grupo de mediana edad tras el tratamiento con estradiol y raloxifeno. Tras el tratamiento con estradiol, el número de células inmunorreactivas para vimentina fue significativamente mayor en los animales viejos con un largo periodo de tiempo tras la ovariectomía (16m ovx) que en las ratas viejas recientemente ovariectomizadas (15d ovx). Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0,001 vs. Vehículo; ^ p<0.01, ^^ p<0.001 vs. Jóvenes, # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs. Mediana edad; + p<0.05, ++ p<0.01 vs. Viejas 15d ovx. Los datos aparecen representados como la media ±SEM.

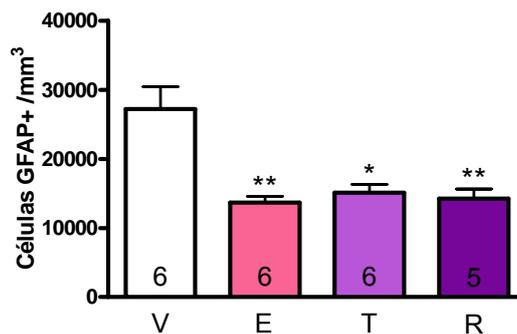
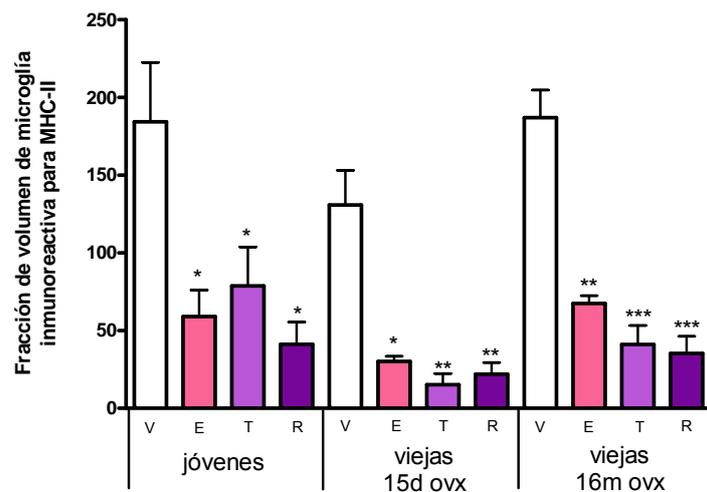


Figura 78.- Efecto del estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno sobre el número de astrocitos inmunorreactivos para GFAP tras lesión cerebral penetrante en ratas ovariectomizadas de mediana edad. El número de animales por grupo aparece indicado dentro de cada barra. Se observó una disminución significativa en la reactividad glial tras el tratamiento con los tres compuestos. Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * p<0,05, ** p<0,01 vs. Vehículo. Los datos aparecen representados como la media ±SEM.

7.2.3.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre la reactividad microglial.

El estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyeron significativamente la fracción de volumen de material inmunorreactivo frente a MHC-II en animales jóvenes y viejos, con independencia del tiempo de depleción hormonal. En este caso, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de edad, ni ningún efecto del tiempo tras la ovariectomía (Fig. 79).



*Figura 79.- Efecto de la edad y el tiempo tras la ovariectomía sobre la respuesta a estradiol, tamoxifeno y raloxifeno de la microglía reactiva tras lesión cerebral penetrante. V.- Vehículo. E.- Estradiol. T.- Tamoxifeno. R.- Raloxifeno. N=4. El estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyeron significativamente la fracción de volumen de material inmunorreactivo para MHC-II en todos los grupos. No se observaron diferencias relacionadas con la edad o el tiempo tras la ovariectomía. Análisis mediante ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Vehículo. Los datos aparecen representados como la media \pm SEM.*



DISCUSIÓN

1.- DIFERENCIAS SEXUALES EN LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES AL LPS. REGULACIÓN POR MODULADORES DE LA ESTEROIDOGENESIS

En este estudio hemos analizado la expresión de distintos genes a nivel de ARN mensajero en cultivos de astrocitos procedentes de la corteza cerebral de ratones macho y hembra por separado. Puesto que es bien conocida la existencia de diferencias sexuales en las enfermedades neurodegenerativas, el estudio de la respuesta de los astrocitos, el tipo celular más numeroso en el sistema nervioso central, podría revelar algunos de los aspectos y mecanismos básicos de dichas diferencias. Por ello, en primer lugar analizamos la expresión de los genes objetivo del estudio en condiciones basales para conocer la situación inicial de los cultivos y, a continuación, tras la administración de un estímulo inflamatorio, poder analizar las diferencias entre los astrocitos procedentes de machos y hembras.

En primer lugar, hemos analizado la expresión de IL6, IP10, TNF α e IL1 β . Los niveles basales de estos marcadores resultaron equivalentes en cultivos de astrocitos procedentes de ratones macho y hembra. Además, la expresión de estos marcadores inflamatorios aumentó significativamente tras la incubación con LPS en astrocitos de ambos sexos. Estos resultados coinciden con estudios previos que muestran que el LPS induce una respuesta inflamatoria en astrocitos en cultivo (Pistritto et al, 1999; Cerciati et al, 2010; Gorina et al, 2011). Sin embargo, nuestros resultados indican que los astrocitos procedentes de machos y hembras difieren en las características de su respuesta inflamatoria. En respuesta al LPS, los astrocitos masculinos mostraron mayor sobreexpresión de IL6, TNF α e IL1 β , mientras que dicha inducción era mayor en astrocitos femeninos para IP10. Estos resultados sugieren que la respuesta astrocitaria al LPS es sexualmente dimórfica, mientras que los mecanismos que regulan la expresión basal de los marcadores no lo es. Nuestros resultados coinciden con observaciones previas que indican que los astrocitos femeninos son más resistentes que los masculinos a la privación de oxígeno y glucosa y a la muerte celular inducida por oxidantes (Liu et al, 2007; Liu et al, 2008). Si estos resultados se reprodujeran *in vivo*, la respuesta astrocitaria a la inflamación podría contribuir a las diferencias sexuales en la manifestación de muchas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, la diferente expresión de IP10 en astrocitos masculinos y femeninos podría dar lugar, *in vivo*, a diferencias sexuales en el reclutamiento de linfocitos T, células natural killer y monocitos en el sistema nervioso central (Farber, 1997; Dufour et al, 2002). Asimismo, diferencias sexuales en la

Discusión

expresión de IL1 β por los astrocitos *in vivo* podría dar lugar a diferencias sexuales en daño neuronal (Rothwell, 2003) y en la remielinización en esclerosis múltiple (Mason et al, 2001). Una mayor producción de IL6 en astrocitos masculinos podría generar diferencias sexuales en la recuperación de condiciones patológicas tanto agudas como crónicas, ya que la producción astrocitaria de IL6 *in vivo* aumenta el daño inflamatorio crónico (Campbell et al, 1993) pero protege al sistema nervioso central frente a daño focal agudo (Swartz et al, 2001; Penkowa et al, 2003; Quintana et al, 2008). Finalmente, distinta producción de TNF α en astrocitos de machos y hembras podría dar lugar a diferencias sexuales en la reactividad microglial (Syed et al, 2007), en la disfunción de la barrera hematoencefálica (Worrall et al, 1997) y en la supervivencia de precursores de oligodendrocitos (Kim et al, 2011; Su et al, 2011).

La respuesta al LPS está mediada por el TLR4, un miembro de la superfamilia del receptor IL1/TLR. Este receptor se expresa en astrocitos (Blanco et al, 2005; Krasowska-Zoladek et al, 2007; Konat et al, 2008; Liao et al, 2010; Gorina et al, 2011). Nuestros resultados indican que los niveles de ARNm del TLR4 no difieren en astrocitos procedentes de machos y hembras tanto en condiciones de reposo como tras el tratamiento con LPS, sugiriendo que las diferencias en la respuesta inflamatoria de los astrocitos no están mediadas por una expresión diferente del receptor del LPS. Sin embargo, no podemos excluir diferencias en la señalización del TLR4 entre machos y hembras.

Las diferencias sexuales en la manifestación de muchas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con diferencias en los niveles locales de esteroides en el sistema nervioso (Caruso et al, 2010; Pesaresi et al, 2010). Los astrocitos expresan proteínas, como la TSPO, que están involucradas en el transporte de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna, donde la primera enzima de la ruta esteroidogénica, la P450scc, se encuentra localizada (García-Segura y Melcangi, 2006; Rone et al, 2009). Por lo tanto, los astrocitos pueden convertir el colesterol en pregnenolona a través de la enzima P450scc. Además, los astrocitos de roedores expresan todas las enzimas esteroidogénicas necesarias para metabolizar pregnenolona en otros esteroides, como la progesterona o el estradiol (García-Segura y Melcangi, 2006). Como alguno de los esteroides derivados de la pregnenolona presentan propiedades antiinflamatorias y reducen la astrogliosis (García-Estrada et al, 1993; Barreto et al, 2007), y dado que la expresión de la TSPO se encuentra aumentada tras distintas formas de daño neural (Gehlert et al, 1997; Chen y Guilarte, 2008), hemos examinado si el LPS induce cambios en la expresión de la TSPO en

astrocitos. Estudios previos muestran que la TSPO está involucrada en el control de la gliosis reactiva (Veiga et al, 2005, 2007) y regula funciones mitocondriales, incluyendo el control de la apoptosis (Veenman et al, 2007, 2008), lo que podría asimismo afectar a la respuesta inflamatoria. Nuestros resultados indican que no existen diferencias en la expresión basal de este transportador en cultivos astrogiales procedentes de machos y hembras. Sin embargo, el LPS aumenta los niveles de la TSPO en cultivos primarios de astrocitos procedentes de ratones hembra pero no en aquellos procedentes de machos, dando lugar a una expresión significativamente diferente tras el tratamiento con LPS en cultivos de ambos sexos. En cualquier caso, es posible que las diferencias en la respuesta de la TSPO al LPS entre astrocitos de ambos sexos no sean suficientes para explicar la respuesta inflamatoria sexualmente dimórfica observada, al desconocer si existen o no diferencias funcionales. Para esclarecer este punto, realizamos tratamientos combinados con LPS y un ligando de la TSPO denominado Ro5-4864, considerado agonista por sus propiedades termodinámicas (Le Fur et al, 1983). Estudios previos indican que dicho ligando ejerce efectos neuroprotectores en distintos modelos: tras lesión cortical el Ro5-4864 recupera la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, reduce la activación de caspasa 3 y 9 y aumenta el número de neuronas supervivientes (Soustiel et al, 2008). El Ro5-4864 también promueve la supervivencia neuronal y la regeneración nerviosa en daño de nervio ciático (Lacor et al, 1999; Leonelli et al, 2005; Mills et al, 2005, 2008) y disminuye la gliosis reactiva y previene la pérdida neuronal inducida por ácido kaínico (Veiga et al, 2005). Sin embargo, en otros estudios, el ligando PK-11195 (considerado antagonista por sus propiedades termodinámicas, Le Fur et al, 1983) pero no el Ro5-4864 presenta efectos neuroprotectores: en un modelo de inyección intracerebroventricular de LPS, sólo el PK-11195 redujo la reactividad microglial (Veiga et al, 2007). En nuestro modelo, no observamos ningún efecto del Ro5-4864 sobre la expresión de los marcadores de inflamación estudiados al aplicarse en solitario. En combinación con el LPS, no modificó la respuesta de astrocitos femeninos y sólo redujo la inducción de IL6 provocada por el LPS en los masculinos. La ausencia de efectos anti-inflamatorios claros por parte de Ro5-4864 en nuestro modelo podría tener distintas causas. Como hemos descrito previamente, el Ro5-4864 presenta o no efectos neuroprotectores según el tipo de lesión practicada, siendo incapaz de actuar, por ejemplo, en el modelo de inyección intracerebroventricular de LPS, donde el daño era causado por el mismo compuesto empleado en nuestro estudio. Los resultados obtenidos con el ligando de la TSPO sugieren que las diferencias observadas en su expresión no son la causa de la respuesta sexualmente dimórfica de los marcadores relacionados con inflamación. No obstante sería

Discusión

necesario estudiar otros ligandos del TSPO para poder excluir completamente la participación de esta molécula en las diferencias sexuales de la respuesta inmune astrocitaria.

También hemos analizado el efecto del LPS en la expresión de la proteína StAR, otra molécula implicada en el transporte de colesterol al interior mitocondrial (Sierra, 2004; Lavaque et al, 2006a). En el cerebro *in vivo*, StAR es expresada en poblaciones específicas de astrocitos y neuronas, aunque la mayoría de las células que expresan esta proteína son neuronas (Sierra et al, 2003; Lavaque et al, 2006a). Como en el caso de la TSPO, estudios previos han demostrado que la expresión de StAR se encuentra incrementada en el sistema nervioso lesionado (Sierra et al, 2003; Lavaque et al, 2006b). Sin embargo, en contraste con la TSPO, el LPS no indujo cambios en la expresión de StAR en astrocitos. Además, no detectamos diferencias en la expresión de StAR entre astrocitos masculinos y femeninos. En cualquier caso, no podemos excluir la posibilidad de que existan diferencias en la actividad de la proteína, que se regula por modificaciones post-translacionales (Lavaque et al, 2006a).

Asimismo, hemos analizado el efecto del LPS en la expresión de aromatasa, la enzima encargada de transformar la testosterona en estradiol. Estudios previos indican una regulación sexualmente distinta de la expresión y la actividad de la aromatasa en astrocitos en cultivo (Liu et al, 2007). En condiciones de privación de oxígeno y glucosa (OGD) los astrocitos femeninos muestran una mayor resistencia al daño que los masculinos. Esta diferencia correlaciona con una mayor actividad y expresión de aromatasa en astrocitos femeninos. Además, la diferencia sexual en la respuesta a OGD se suprime mediante un tratamiento con un inhibidor de la aromatasa (Liu et al, 2007). Otros estudios en los que no se realizan comparativas entre animales macho y hembra indican un aumento de la expresión de aromatasa en ambos sexos tras distintos tipos de lesión. Duncan y Saldanha describieron un aumento de aromatasa en pinzón cebrado macho tras lesión penetrante y tras inducción de neuroinflamación en respuesta a un aumento de citoquinas proinflamatorias (Duncan y Saldanha, 2011). Por otra parte, Azcoitia y colaboradores describieron un aumento de aromatasa tanto en rata como en ratón de ambos sexos tras administración de ácido kaínico y tras lesión mecánica (García-Segura et al, 1999). En nuestro estudio, hemos observado una respuesta contraria a la observada tras OGD. Mientras que no se observaron diferencias en la expresión basal de aromatasa en cultivos de astrocitos masculinos y femeninos, tras la estimulación con LPS encontramos una sobreexpresión de la aromatasa sólo en astrocitos masculinos. Sin embargo, los niveles de ARNm de

aromatasa no resultaron diferentes entre astrocitos masculinos estimulados con LPS y astrocitos femeninos tanto en reposo como tras el tratamiento inflamatorio. A pesar de las diferencias interespecíficas y metodológicas entre nuestro estudio y el realizado en pinzón cebra, ambos cursan con un aumento significativo de señales proinflamatorias, que podrían ser la causa de este aumento en la expresión de aromatasa en los animales macho.

Para profundizar en el papel de la aromatasa y la síntesis endógena de estradiol en nuestro modelo experimental, realizamos tratamientos en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras con letrozol, un inhibidor de la aromatasa. Observamos que al aplicar el letrozol en solitario se producía un aumento de la expresión de TNF α e IL1 β en astrocitos femeninos, mientras que no afectaba a los masculinos. Este aumento en las citoquinas en cultivos exclusivamente femeninos expuestos a letrozol sugiere que la actividad aromatasa en estas células y por lo tanto su síntesis de estradiol puede estar inhibiendo la expresión de TNF α e IL1 β en condiciones basales. Por el contrario, esto no ocurriría en los astrocitos masculinos, por alguna razón que aún desconocemos. La regulación de los niveles basales de TNF α e IL1 β por la aromatasa en astrocitos femeninos puede tener consecuencias fisiológicas relevantes ya que las citoquinas ejercen diversas funciones, cuando no existe señal inflamatoria, que incluyen la regulación del desarrollo neuronal, de la homeostasis iónica, de la liberación de neuropéptidos y de la plasticidad sináptica (Raber et al, 1998; Albeni y Mattson, 2000; Skoff et al, 2009; Park y Bowers, 2010).

A diferencia de la acción del letrozol en condiciones basales, en su administración combinada con LPS no se observó efecto en astrocitos femeninos mientras que fue capaz de disminuir los niveles de IL6 e IL1 β en astrocitos masculinos. Esto indica que la actividad aromatasa regula al alza los niveles de IL6 e IL1 β en los astrocitos masculinos expuestos a LPS. Este efecto de la aromatasa podría ser debido a que está disminuyendo los niveles de testosterona al metabolizarla a estradiol. Estudios previos han demostrado la capacidad neuroprotectora de la testosterona (Bialek et al, 2004) que en este caso podría estar regulando, de forma exclusiva en machos, la expresión de interleuquinas proinflamatorias en respuesta al LPS. Además, previamente observamos que la exposición a LPS causaba un aumento en la expresión de aromatasa en astrocitos masculinos a la vez que una mayor inducción de ambas interleuquinas al compararla con la expresión inducida en astrocitos femeninos. Dicha diferencia podría ser debida a una mayor aromatización de la testosterona en estradiol, perdiendo los astrocitos masculinos su protección natural frente a la

Discusión

inflamación al disminuir la cantidad de testosterona disponible. Por lo tanto, al bloquear la actividad aromatasa con el letrozol, los astrocitos masculinos recuperarían su protección natural.

La existencia de una regulación diferente en astrocitos procedentes de machos y hembras de la enzima responsable de la síntesis de estradiol nos impulsó a analizar, a continuación, la expresión de los dos receptores clásicos de estrógeno, ER α y ER β . Observamos que, en reposo, los niveles de ER α son equivalentes en astrocitos masculinos y femeninos, mientras que la expresión de ER β es mayor en astrocitos femeninos. Tras el tratamiento con LPS, se produjo una disminución significativa de ambos receptores en astrocitos femeninos y un aumento significativo de ER β en astrocitos masculinos, dando lugar a una diferencia sexual significativa en la inducción de ER β tras exposición a LPS. Un estudio previo realizado en cultivos de astrocitos procedentes del bulbo olfatorio de ratones hembra muestra que el pretratamiento con un agonista específico del ER β disminuye la inducción de IL1 β , TNF α y la actividad de MMP-9, mientras que el agonista de ER α sólo reduce la inducción de IL1 β , tras administración de LPS (Lewis et al, 2008). Además, se observa una respuesta inflamatoria exacerbada en respuesta a agonistas de TLR4 tras la reducción de la expresión de ER β en microglía (Saijo et al, 2011). Los niveles basales de ER β en nuestro estudio son mayores en cultivos procedentes de hembras que en los procedentes de machos, pudiendo estos niveles basales conferir mayor protección natural frente a la inflamación en los astrocitos femeninos. Este dato correlaciona con la mayor represión de la inducción de las citoquinas analizadas tras el tratamiento con LPS en los cultivos procedentes de hembras que en los procedentes de machos, sugiriendo que la señalización a través del ER β es la principal responsable de la protección frente a inflamación. La sobreexpresión de ER β tras la administración de LPS en astrocitos masculinos podría, por lo tanto, ser una respuesta al daño de los astrocitos para disminuir, con cierto retraso en comparación con los astrocitos femeninos, la respuesta inflamatoria inducida por el LPS.

A continuación pasamos a explorar la posible implicación de la mitocondria en la respuesta de los astrocitos corticales al LPS. Estudios previos muestran diferencias sexuales en la regulación de la morfología mitocondrial y la viabilidad astroglial en cultivo por el tratamiento estradiol y progesterona (Arnold et al, 2008). Además, la mitocondria podría ser un orgánulo diana del estradiol en la ejecución de sus efectos neuroprotectores, puesto que actúa sobre ellas tanto de forma directa como indirecta (Arnold y Beyer, 2009). En nuestro estudio, no encontramos diferencias significativas

ni en los niveles basales ni en la respuesta al LPS en la expresión de genes relacionados con la función (CoxIV1 y CoxIV2) y con la fisión mitocondrial (Fis1 y Drp1). En relación a la fusión mitocondrial, observamos mayor expresión de la mitofusina 1 en astrocitos masculinos que en femeninos en condiciones basales. Tras la administración de LPS, en astrocitos masculinos se produce una disminución de la expresión de Mfn1 que da lugar a una diferencia sexual significativa en la respuesta al LPS. Por otra parte, la expresión de Mfn2 no se vio modificada en ningún caso. Nuestros resultados indican que los astrocitos derivados de hembras y machos podrían presentar diferencias en la maquinaria de fusión mitocondrial y, por lo tanto, una regulación distinta de las redes mitocondriales. La mitofusina 1 está también implicada en la respuesta mitocondrial a las especies reactivas de oxígeno (ROS). Recientemente se ha descrito que la depleción de Mfn1 protege a los cardiomiocitos frente a la disfunción mitocondrial inducida por ROS (Papanicolaou et al, 2011). Por lo tanto, los niveles incrementados de Mfn1 en astrocitos masculinos en comparación con los femeninos puede causar una respuesta sexualmente dimórfica al estrés oxidativo y puede ser en parte la causa de la mayor sensibilidad de los astrocitos masculinos a la hipoxia química (Roemgens, 2011) y a toxinas mitocondriales (Sundar Boyalla et al, 2011). Igualmente, esta mayor expresión basal de Mfn1 en astrocitos masculinos podría estar implicada en la distinta respuesta al LPS en la expresión de citoquinas inflamatorias observadas previamente, puesto que la Mfn1 también está implicada en la respuestas inmune innata (Castanier et al, 2010; Onoguchi et al, 2010; Stavru et al, 2011). El hecho de que el LPS sea capaz de modificar la expresión de este marcador apoya esta hipótesis.

Para finalizar, dada la relación directa entre la mitocondria y los procesos apoptóticos y puesto que estamos provocando un daño celular por la administración de LPS, analizamos genes relacionados con la proliferación y supervivencia celular. No encontramos diferencias en la expresión de PcnA, Bcl2 y Bax en astrocitos procedentes de machos y hembras ni en condiciones basales ni tras exposición a LPS. Asimismo, no pudimos encontrar diferencias en las ratio calculadas relacionadas con eventos de proliferación/apoptosis en la célula, Drp1/Fis1, PcnA/Bax (Arnold et al, 2008) y Bcl2/Bax (Chen et al, 2012; Mela et al, 2012), sugiriendo que la administración de LPS a la dosis y el periodo empleado no produce apoptosis.

Como conclusión final de este apartado es interesante remarcar la importancia de la realización de cultivos celulares sexualmente diferenciados. La literatura acostumbra a mostrarnos estudios realizados en cultivos en los que se desconoce el

Discusión

sexo de los animales con los que se realizaron y la proporción entre ambos sexos en el caso de haberse analizado. Como hemos demostrado en nuestro estudio, la respuesta de los astrocitos procedentes de animales macho y hembra puede llegar a ser significativamente diferente al menos en lo que a expresión génica se refiere, tanto a nivel basal como tras la administración de un agente deletéreo. Por lo tanto, habría que reevaluar los resultados obtenidos de estudios en los que el tipo de cultivo no se especifica con especial atención, puesto que los efectos neuroprotectores de nuevos fármacos, por ejemplo, podrían ser beneficiosos sólo en uno de ambos sexos, o su efecto neuroprotector podría enmascarse por actuar de forma contraria en células procedentes de animales de distinto sexo.

2.- EFECTO DEL PROPIONATO DE TESTOSTERONA SOBRE LA RESPUESTA AL LPS DE CULTIVOS ASTROCITARIOS CORTICALES PROCEDENTES DE HEMBRAS

Las diferencias sexuales observadas previamente pueden ser el resultado directo de los cromosomas sexuales en estas células y/o proceder de la diferente exposición a esteroides sexuales durante el desarrollo (Arnold, 2009). Estudios previos *in vivo* indican que las acciones perinatales de los andrógenos están implicadas en la generación de diferencias sexuales en la expresión de GFAP y en la diferenciación y el número de astrocitos en distintas regiones cerebrales (Amateau y McCarthy, 2002; Garcia-Segura et al, 1988; Conejo et al, 2005; Mong et al, 1999). Por ello, nos planteamos estudiar la implicación de los andrógenos perinatales en los resultados observados al comparar cultivos procedentes de hembras y machos. Para ello, analizamos la expresión de los genes del estudio previo en cultivos de astrocitos corticales procedentes de hembras tratadas el día del nacimiento con vehículo o con propionato de testosterona. La administración de propionato de testosterona en hembras el día del nacimiento ha sido empleada previamente para mimetizar el pico natural de testosterona que aparece perinatalmente en machos (Pang y Tang, 1984), previniendo la muerte neuronal en núcleos sexualmente dimórficos del área preóptica (Yang et al, 2004) y compensando las diferencias sexuales en la respuesta a estrés (Goel y Bale, 2008), entre otros.

Nuestros resultados indican que los cultivos de astrocitos procedentes de hembras androgenizadas el día del nacimiento muestran una respuesta al LPS similar a la observada en cultivos de astrocitos procedentes de machos en lo que a genes

relacionados con inflamación se refiere. No se observaron diferencias significativas en los niveles basales de IL6, IP10, TNF α e IL1 β al comparar cultivos procedentes de hembras control y de hembras androgenizadas. El LPS aumentó significativamente la expresión de los cuatro marcadores en ambos tipos de cultivo, pero indujo un incremento significativamente mayor en los niveles de ARN mensajero de IL6, TNF α e IL1 β en los cultivos procedentes de hembras androgenizadas que en los de hembras control. Por el contrario, los niveles de IP10 fueron mayores en los cultivos de hembras control. Además el LPS produjo un aumento significativo en la expresión de la TSPO en los cultivos procedentes de hembras control mientras que no se observaron cambios en los cultivos procedentes de hembras androgenizadas. Esto concuerda con el hecho de que la expresión de la TSPO aumenta en los astrocitos femeninos y no en los masculinos tras exposición al LPS. Estos resultados indican que la acción *in vivo* de la testosterona el día del nacimiento es capaz de producir modificaciones en los astrocitos que se mantienen a largo plazo, incluso tras su extracción del cerebro y posterior crecimiento *in vitro*. La testosterona estaría generando efectos organizadores en los astrocitos de tal modo que la respuesta al LPS de astrocitos femeninos se modificaría dando lugar a la respuesta característica de los astrocitos masculinos.

Por otra parte, la administración de propionato de testosterona modificó la expresión basal de la TSPO: sus niveles en cultivos procedentes de hembras tratadas fueron mayores que los observados en los procedentes de hembras control. Por el contrario, los niveles de expresión de la TSPO no fueron diferentes entre los cultivos procedentes de machos control y de hembras control. También hemos detectado este tipo de efecto de la administración de propionato de testosterona sobre la expresión de ER α y CoxIV1. Ambos genes mostraron un nivel de expresión mayor en los cultivos procedentes de hembras tratadas con propionato de testosterona que en los cultivos procedentes de hembras control, mientras que no se detectaron diferencias en su expresión entre cultivos procedentes de machos control y de hembras control. Estos resultados indican que la administración de propionato de testosterona en el día del nacimiento tiene otros efectos en los astrocitos que también se mantienen a largo plazo pero que no imitan la situación natural que aparece en los astrocitos procedentes de machos.

Si no se produjesen modificaciones post-transcripcionales del mensajero, cabría esperar una mayor translocación de colesterol, mayor señalización a través del ER α y mayor actividad de la isoforma 1 de la CoxIV en los astrocitos procedentes de hembras tratadas con propionato de testosterona que en los de hembras control.

Discusión

Hipotéticamente, un aumento en la expresión de la TSPO podría producir una mayor esteroidogénesis, aumentando la síntesis de estradiol el cual, a su vez, podría dar lugar a una mayor expresión de ER α ya que estudios previos en anguila japonesa demuestran un aumento de la expresión de ER α inducido por el tratamiento con estradiol (Jeng et al, 2012). Además, el estradiol ejerce efectos neuroprotectores en la zona pericontusional tras contusión traumática cerebral mediante la sobreexpresión de ER α (Bao et al, 2011). Asimismo, Irwin y colaboradores (2012) han descrito un aumento en la expresión de CoxIV tras el tratamiento con estradiol. De esta forma, la sobreexpresión de la TSPO provocada por el tratamiento con propionato de testosterona podría estar dando lugar al aumento en los niveles de ER α y CoxIV1. Este efecto del propionato de testosterona se vio revertido por el tratamiento con LPS *in vitro*, puesto que la expresión de los tres genes disminuyó significativamente, dando lugar a una respuesta análoga a la observada en cultivos procedentes de machos y hembras en el caso de la TSPO y ejerciendo un efecto no androgenizante sobre ER α y CoxIV1. Esto indica una interacción entre el tratamiento *in vivo* con propionato de testosterona y el tratamiento posterior con LPS *in vitro*. Al igual que en el caso anterior, la disminución en ER α y CoxIV1 podría ser consecuencia de la disminución de TSPO provocada por el tratamiento de los cultivos procedentes de hembras androgenizadas con LPS.

En el caso de la expresión de StAR, hemos observado un efecto combinado de la administración del vehículo del propionato de testosterona *in vivo* y el LPS *in vitro*. No observamos diferencias significativas en los niveles de StAR en condiciones basales en los cultivos procedentes de hembras control y androgenizadas, pero tras la administración de LPS *in vitro*, se produjo una inducción de StAR en los cultivos procedentes de hembras tratadas con aceite. Este inesperado efecto del aceite empleado como vehículo remarca la importancia de una cuidadosa selección del medio empleado para disolver los tratamientos. En nuestro experimento, no hemos encontrado ningún gen cuya expresión estuviera alterada por el tratamiento en exclusiva con el aceite de maíz. Sin embargo, hemos encontrado alguna modificación en la expresión de StAR y de los receptores de estrógeno causada por la administración de aceite *in vivo* en combinación con el tratamiento con LPS *in vitro*. En todos los casos se trató de una sobreexpresión tras administrar LPS a cultivos procedentes de hembras control. Igual que hipotetizamos previamente respecto a la TSPO, en este caso la sobreexpresión de StAR podría estar dando lugar a una mayor síntesis de estradiol que a su vez estuviera aumentando los niveles de sus receptores. Esta sobreexpresión de StAR podría ser causada por el ácido linoleico, que conforma

el 58,7% del aceite de maíz y es capaz de aumentar la expresión de StAR en células Y-1 y MA-10 (Artemenko y Jefcoate, 2004).

En lo que respecta a la expresión del ER β , la respuesta tanto al propionato de testosterona como al LPS es compleja. Por una parte, no se observa un efecto del propionato de testosterona en la expresión basal del ER β , de tal forma que se mantiene el fenotipo femenino y no se mimetiza la diferencia sexual observada al comparar cultivos procedentes de machos y hembras. Sin embargo, tras la administración de LPS, observamos un efecto tanto en cultivos procedentes de hembras control como de hembras tratadas. En el caso de las hembras control, como se acaba de discutir, se produce una sobreexpresión del receptor, quizá causada por un aumento en la síntesis de estradiol al aumentar la translocación mitocondrial de colesterol a través de StAR. Por otra parte, en los astrocitos procedentes de hembras androgenizadas, el LPS no provoca cambios significativos en su expresión, dando lugar a niveles medios entre los observados en cultivos procedentes de hembras, en los que se producía un descenso significativo de su expresión, y de machos, en los que su expresión aumentaba significativamente. En estos momentos, desconocemos los mecanismos implicados en la interacción de los efectos causados por el LPS *in vitro* y el propionato de testosterona *in vivo* sobre la expresión del ER β , pero pareciera que dichos efectos se compensaran, de tal forma que la modulación de la expresión del receptor desaparece.

La expresión de TLR4 también se ve modificada por la combinación del tratamiento con propionato de testosterona *in vivo* y con LPS *in vitro*. Mientras que no se detecta un efecto del propionato de testosterona en condiciones basales, se observa una diferencia significativa entre los cultivos procedentes de hembras control y los procedentes de hembras androgenizadas tras la administración de LPS, sin que ninguno de los grupos presente diferencias significativas con sus respectivos controles. Parece por lo tanto desenmascararse una ligera sobreexpresión de TLR4 producida por el aceite de maíz que acompañada por una leve disminución provocada por el propionato de testosterona dan lugar a la diferencia observada tras el estímulo inflamatorio *in vitro*. Dado que no se observan diferencias significativas entre los cultivos control y los tratados con LPS en ninguno de los casos, la relevancia biológica de este resultado es discutible. Este mismo tipo de regulación transcripcional fue observada para Bcl-2. En este caso, se observaron mayores niveles de ARNm de Bcl-2 en cultivos procedentes de hembras androgenizadas que en aquellos procedentes de hembras control tras el tratamiento con LPS, mientras que no se observaron

Discusión

diferencias en ausencia de estímulo inflamatorio. En ninguno de los dos casos se detectaron diferencias entre el grupo control y el tratado con LPS.

Asimismo, pudimos observar un efecto de la combinación del tratamiento con propionato de testosterona *in vivo* y con LPS *in vitro* sobre la expresión de Mfn2 y PcnA. En el caso de Mfn2, su expresión aumentó en comparación con los cultivos procedentes de hembras control tratadas con LPS. En el caso de PcnA, su expresión aumentó en comparación con los cultivos también procedentes de hembras androgenizadas pero sin el tratamiento inflamatorio. Esto sugiere que el estímulo proinflamatorio podría estar desvelando un efecto del propionato de testosterona que en condiciones basales permanecería enmascarado, puesto que en ambos casos no se observaron diferencias significativas en la expresión basal al comparar cultivos procedentes de hembras control y androgenizadas. Un aumento en la expresión de Mfn2 en condiciones patológicas podría favorecer la supervivencia celular a través de la inhibición de rutas apoptóticas, puesto que la ausencia de esta proteína da lugar a fragmentación mitocondrial, activación de Bak y liberación de citocromo c (Sugioka et al, 2004; Chen et al, 2005). Asimismo, Chen y colaboradores (2005) observaron una menor tasa de división celular en ausencia de ambas isoformas de la mitofusina, por lo que la sobreexpresión de una de ellas hipotéticamente podría dar lugar a un aumento de la proliferación, explicando de esta forma el aumento de la expresión de PcnA observado en cultivos procedentes de hembras androgenizadas tras exposición a LPS.

En el resto de genes analizados encontramos una ausencia total de efecto de la androgenización, tal y como ya discutimos para el ER β en condiciones basales. En algunos casos, encontramos que las diferencias observadas al comparar cultivos procedentes de machos y hembras no son detectables al comparar cultivos procedentes de hembras control y hembras androgenizadas. Estudios previos también han mostrado diferencias sexuales no revertidas por la administración de propionato de testosterona a hembras en el día del nacimiento. Ramirez et al (2010) describieron diferencias sexuales en el eje de la hormona del crecimiento y en proteínas urinarias murinas, algunas de las cuales eran suprimidas por el tratamiento con propionato de testosterona en hembras, mientras que no se suprimían las diferencias sexuales en los niveles de somatostatina ni se masculinizaban los niveles del gen hepático predominantemente masculino Cyp2d9. Igualmente, Orikasa y Sakuma (2010) no observaron el fenotipo masculino en la distribución neuronal de la porción central del área preóptica medial en hembras tratadas con propionato de testosterona. En nuestro estudio, mientras que los niveles de aromatasa eran mayores en astrocitos

procedentes de machos control que en los astrocitos procedentes de hembras control, no pudimos observar diferencias significativas en sus niveles, ni en condiciones basales ni tras el tratamiento con LPS, al comparar cultivos procedentes de hembras control y androgenizadas. Asimismo, las diferencias observadas en la expresión de Mfn1 entre astrocitos procedentes de hembras y machos control, tanto en condiciones basales como tras la administración de LPS, no se detectaron entre astrocitos procedentes de hembras control y androgenizadas. Estos resultados indican que la regulación de ambos genes no recae en efectos organizadores de la testosterona perinatal, sino que, probablemente, son debidos a diferencias cromosómicas.

Por otra parte, algunos de los genes analizados no presentaron diferencias ni al comparar cultivos procedentes de machos y hembras control ni al comparar los de hembras control y androgenizadas. Resulta evidente que la expresión de CoxIV2, Fis1, Drp1, Bax y las distintas ratios calculadas no presentan diferencias sexuales en astrocitos corticales ni en su expresión basal ni en su respuesta al LPS. Tampoco están regulados por la administración de propionato de testosterona *in vivo* en animales hembra, puesto que no fue posible detectar diferencias en este tipo de cultivo ni en condiciones basales ni tras un estímulo inflamatorio. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la fisión mitocondrial es independiente del sexo en astrocitos corticales en reposo y que no se ve modificada por exposición a LPS. Asimismo, la cascada apoptótica, en términos de los niveles de ARNm de Bax, tampoco lo sería. La función mitocondrial tampoco parece verse afectada por el sexo o la exposición a LPS, puesto que en ningún caso hemos detectado diferencias significativas en la expresión de CoxIV2 y de CoxIV1 entre astrocitos procedentes de hembras control y machos control, ni en condiciones basales ni tras el tratamiento con LPS.

En resumen, en este estudio hemos observado que el propionato de testosterona administrado *in vivo* a hembras en el día de su nacimiento puede actuar de diversas formas sobre los cultivos de astrocitos derivados de las mismas. Por una parte, puede tener un efecto masculinizante, tanto en condiciones basales como tras administración *in vitro* de LPS, como hemos observado en la expresión de los marcadores inflamatorios. En otros casos, ha ejercido un efecto distinto, que no generaba en los cultivos una respuesta análoga a la previamente observada en astrocitos masculinos en condiciones basales. Este ha sido el caso para TSPO, ER α y CoxIV1. En el caso de TSPO, la administración de propionato de testosterona *in vivo* generó un efecto que no imitaba la situación de los cultivos procedentes de machos en cuanto a la expresión basal, pero tras el estímulo inflamatorio la respuesta fue

Discusión

equivalente a la masculina. Esto puede ser debido al distinto estado celular en presencia o en ausencia de LPS. El estímulo inflamatorio genera una respuesta que va a dar lugar a la expresión de distintas moléculas, podrá modificar la actividad de algunas enzimas y activar o inhibir cascadas de señalización intracelular, entre otras. La acción organizadora del propionato de testosterona puede dar lugar, por lo tanto, a una regulación diferencial de ciertos genes, como el de la TSPO, en condiciones de reposo y tras la administración de LPS.

También hemos detectado efectos del propionato de testosterona *in vivo* que sólo podían observarse tras la administración de LPS *in vitro*. Tales han sido las respuestas observadas en la expresión de TLR4, Mfn2, Pcn1, Bcl2 y, parcialmente, ER β .

Finalmente, hemos observado diferencias sexuales en los niveles de Mfn1, la expresión basal de ER β y la expresión tras exposición a LPS de aromatasa que no se revierten mediante la administración *in vivo* de propionato de testosterona. Por lo tanto, dichas diferencias sexuales tienen que deberse a una causa diferente del pico perinatal de testosterona que ocurre de una manera natural en los animales macho.

3.- EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS *IN VIVO* EN MACHOS, HEMBRAS Y HEMBRAS TRATADAS PERINATALMENTE CON PROPIONATO DE TESTOSTERONA

Una vez analizada la existencia de diferencias sexuales y el efecto de la androgenización de las hembras sobre la respuesta de los astrocitos corticales al LPS *in vitro*, nos planteamos analizar algunos de los genes estudiados en un modelo similar *in vivo*. Para ello realizamos el tratamiento con propionato de testosterona o vehículo en hembras recién nacidas y, además, incorporamos un grupo de machos tratados el día del nacimiento con aceite de maíz. Cuando los animales contaban con 29 días de vida, de tal forma que las hembras todavía no habían empezado a ciclar y evitábamos posibles interferencias en los resultados de los niveles circulantes de hormonas ováricas, fueron inyectados con LPS o vehículo para analizar su efecto tras 24 horas.

Coincidiendo con los resultados observados en los astrocitos corticales *in vitro*, no detectamos ninguna diferencia en la expresión basal de IL6, IP10, TNF α e IL1 β en

la corteza cerebral *in vivo*. Tampoco fueron significativamente diferentes los niveles basales de los receptores de estrógeno en la corteza cerebral de hembras, machos y hembras androgenizadas. Por lo tanto, no detectamos en la corteza cerebral el efecto del propionato de testosterona para ER α ni la diferencia sexual en ER β que encontramos en los astrocitos corticales en cultivo. La expresión de los receptores de estrógeno por otros tipos celulares de la corteza cerebral podría estar enmascarando las diferencias observadas en los astrocitos, puesto que tanto las neuronas como la microglía y la oligodendroglía expresan ambos receptores clásicos de estrógeno (Mendez y García-Segura, 2006, Vegeto et al, 2001, Zhang et al, 2004). Por otra parte, cabe reseñar que en otras regiones cerebrales, como el estriado, de ratones en desarrollo y adultos, tampoco se han detectado diferencias sexuales en la expresión de ER α y ER β (Küppers y Beyer, 1999).

Por otra parte, mientras que en los astrocitos *in vitro* no se observaron diferencias sexuales en la expresión basal de TSPO, sus niveles en la corteza cerebral *in vivo* resultaron mayores en animales macho que en hembras. Esta diferencia sexual en la expresión basal de TSPO debe de tener un origen distinto a los niveles de testosterona perinatal, ya que las hembras tratadas con propionato de testosterona presentaron niveles equivalentes a los de las hembras control. Existen pocos estudios en los que se comparen los niveles de TSPO en machos y hembras. Mirzatonl y colaboradores (2010) realizaron un estudio comparativo en el cerebelo del pinzón cebrá en el que analizaron varios genes de la ruta esteroideogénica. En animales falsamente operados, la expresión tanto de TSPO como de StAR resultó ser mayor en hembras que en machos. Además estos autores detectaron un incremento de la expresión de TSPO en ambos sexos dos días después de una lesión del cerebelo. También detectaron una tendencia a la baja en la expresión de StAR en hembras y una tendencia a la alza en la expresión de StAR en machos. En nuestro estudio no detectamos modificaciones en la expresión de StAR causadas por el sexo, por el tratamiento con propionato de testosterona o por el tratamiento con LPS. En cuanto a los niveles de TSPO, observamos una mayor expresión basal en machos y un aumento de su expresión tras la administración de LPS sólo en hembras control, pero no dando lugar a diferencias significativas ni con los machos ni con las hembras androgenizadas. La sobreexpresión de TSPO tras daño al sistema nervioso ha sido descrita tanto en humanos (Oh et al, 2011) como en roedores (Yanamoto et al, 2007; Arlicot et al, 2008). En nuestro estudio, sólo hemos observado un aumento de su expresión en animales hembra. Cabría hipotetizar que la mayor expresión de TSPO en

Discusión

machos en reposo alcance niveles suficientemente altos como para no ser capaz de responder al daño, mientras que en las hembras se mantiene la sensibilidad al LPS.

La respuesta al LPS de los marcadores de inflamación en la corteza cerebral *in vivo* tampoco se corresponde totalmente con la observada en los astrocitos corticales *in vitro*. Los cambios de expresión de IP10 en corteza cerebral coinciden con los observados en los cultivos de astrocitos, de tal forma que el LPS produjo mayor inducción en hembras que en machos y hembras androgenizadas. La diferencia sexual observada en los astrocitos para IL1 β también se mantuvo en la corteza *in vivo*, de tal forma que la inducción fue significativamente mayor en machos que en hembras tras la administración de LPS. Sin embargo, en los cultivos de astrocitos dicha diferencia sexual era mimetizada por el tratamiento con propionato de testosterona, mientras que *in vivo*, los niveles de expresión de IL1 β en la corteza cerebral de hembras androgenizadas tras la administración de LPS se corresponden a los observados en hembras control y son significativamente mayores que los de machos. La contribución de otros tipos celulares a la respuesta al LPS *in vivo*, como la microglía e incluso las células inmunes periféricas puede explicar el diferente efecto del propionato de testosterona sobre los niveles de IL1 β entre los astrocitos *in vitro* y la corteza cerebral *in vivo*. Además, hay que tener en cuenta que los astrocitos corticales *in vitro* no estuvieron expuestos a hormonas circulantes y otros factores presentes en los animales durante el primer mes de vida.

Estudios previos indican un aumento en los niveles de IL6 y TNF α en corteza de ratones macho 4 horas tras la administración tanto periférica como intracerebral de LPS (Beurel y Jope, 2009). En nuestro estudio, no detectamos diferencias significativas en la expresión de IL6 tras la administración periférica de LPS. Por otra parte, la sobreexpresión de TNF α sólo fue observada en el grupo de hembras control. Sería posible que las discordancias entre nuestros resultados y los observados por Beurel y Jope (2009) se deban al distinto tiempo de administración de LPS. El LPS podría provocar una respuesta rápida y transitoria en la expresión de IL6 y TNF α en machos, que ya no sería detectable a las 24 horas de la administración del agente proinflamatorio y que podría desencadenar la sobreexpresión observada en IL1 β tras 24 horas de la administración de LPS. En cuanto a las hembras, podría darse una sobreexpresión de TNF α que se mantuviera a largo plazo y por ello podemos detectarla en nuestro experimento. Además, el estudio previo fue realizado exclusivamente en machos. La distinta respuesta observada entre machos y hembras en la expresión de TNF α puede deberse no sólo a diferencias locales en la corteza

cerebral, sino a diferencias en la señal inflamatoria que llega al cerebro. Cuando el LPS es administrado por vía sistémica, el efecto que podemos observar en el sistema nervioso central se debe principalmente a la secreción periférica de citoquinas proinflamatorias (Qin et al, 2007), puesto que el paso del LPS a través de la barrera hematoencefálica es reducido (Nadeau y Rivest, 1999). Por lo tanto, diferencias sexuales en otros tejidos y en los niveles en plasma de otras moléculas y hormonas podrían modificar la señal inflamatoria que llega al sistema nervioso central, causando diferencias en la respuesta del mismo a la inflamación sistémica.

Finalmente, la respuesta al LPS del ER α en la corteza cerebral fue similar a la del TNF α , detectándose mayor expresión en hembras que en machos y una expresión intermedia en el grupo de hembras androgenizadas. Ya que el estradiol puede aumentar la expresión de TNF α , por lo menos en células de la pituitaria anterior (Zaldivar et al, 2011), sería posible que una mayor señalización estrogénica debida a la mayor expresión de ER α contribuya a los mayores niveles de TNF α en la corteza cerebral de las hembras tratadas con LPS.

4.- EFECTO DE LOS SERMs SOBRE LA GLÍA REACTIVA

Una vez analizadas las diferencias sexuales en la respuesta a inflamación tanto *in vitro* como *in vivo*, nos planteamos estudiar el efecto que en dicha respuesta podrían ejercer compuestos estrogénicos. Para ello, hemos empleado tanto el modelo *in vitro* previamente descrito de astrocitos corticales procedentes de ratones macho y hembra como dos modelos *in vivo* en rata Wistar: el de administración sistémica de LPS y el de lesión cerebral penetrante.

Estudios previos han demostrado que el estradiol tiene efectos antiinflamatorios en el SNC. Actúa sobre las neuronas promoviendo el rescate celular y sobre la glía, que a su vez va a evitar la muerte neuronal secundaria y a provocar la regeneración y remodelación del tejido lesionado, siendo clave para este proceso la activación astrocitaria (Bovolenta et al, 1992; Eddleston y Mucke, 1993; Ridet et al, 1997; Bush et al, 1999; Chen and Swanson, 2003; Jones et al, 2003; Silver and Miller, 2004; Takuma et al, 2004; Iseda et al, 2004). Estudios *in vitro* con microglía muestran que el estrógeno puede disminuir los antígenos de membrana implicados en señalización inmune (Dimayuga et al, 2005), la proliferación y activación de cultivos de microglía y la conversión al fenotipo reactivo (Ganter et al, 1992, Vegeto et al, 2001).

Discusión

Además, el estradiol también afecta a la producción de factores deletéreos producidos por la microglía reactiva, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico (NO), interferón gamma (IFN- γ) y prostaglandina-E2 (PGE2) entre otras (Bruce-Keller et al, 2000; Drew y Chasis, 2000; Vegeto et al, 2001; Baker et al, 2004; Dimayuga et al, 2005; Liu et al, 2005). El efecto inhibitorio del estradiol en inflamación también ha sido observado en modelos *in vivo*: disminuye el número de células microgliales en ratones viejos (Lei et al, 2003), inhibe la activación microglial en distintos modelos de inflamación inducida por LPS o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina) (Vegeto et al, 2003; Tripanichkul et al, 2006, Tapia-Gonzalez et al, 2008), y reduce la reactividad microglial en las inmediaciones de las placas de beta-amiloide en un modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer (Vegeto et al, 2006) y tras lesión cerebral penetrante en ratas (Barreto et al, 2007).

Estudios recientes indican que algunos SERMs pueden presentar efectos neuroprotectores: se ha demostrado que en distintos modelos animales de isquemia cerebral el tamoxifeno puede disminuir el volumen de la zona infartada y mejorar déficits conductuales (Kimelberg et al, 2000; Zhang et al, 2005; Wakade et al, 2008); tanto tamoxifeno como raloxifeno y bazedoxifeno previenen la pérdida neuronal en el hipocampo tras administración intraperitoneal de ácido kaínico, un compuesto excitotóxico (Ciriza et al, 2004). Además, el raloxifeno disminuye la microglía en el cerebro de animales viejos (Lei et al, 2003) y el tamoxifeno reduce el daño cerebral tras isquemia *in vivo* en rata (Kimelberg et al, 2003; Mehta et al, 2003; Feng et al, 2004). Estudios previos indican que el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyen la respuesta inflamatoria en células microgliales *in vitro* (Suuronen et al, 2005), así como que estos SERMs pueden tener efectos neuroprotectores directos en células neuronales (Du et al, 2004; Benvenuti et al, 2005; Biewenga et al, 2005) y que disminuyen la producción de moléculas proinflamatorias por parte de los astrocitos (Cerciat et al, 2010).

4.1 EFECTO DEL ESTRADIOL Y LOS SERMS SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES EN CULTIVO AL LPS

Estudios previos han demostrado acciones antiinflamatorias del estradiol y los SERMs sobre la expresión de IL6 e IP10 en astrocitos en cultivo tratados con LPS (Cerciat et al, 2010). En este trabajo se partía de cultivos procedentes de machos y hembras mezclados en una proporción desconocida y no se analizaba el posible efecto de los compuestos empleados *per se* en la expresión de IL6 e IP10. Por ello,

nos planteamos estudiar tanto el efecto del estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno en solitario como administrados en combinación con LPS en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras por separado.

Nuestros resultados indican que los compuestos estrogénicos, *per se*, pueden afectar a la expresión de algunas citoquinas. Hemos observado un aumento en la expresión de IL6, IP10, TNF α e IL1 β tras la administración de estradiol y un aumento de IL6 y TNF α tras la administración de tamoxifeno en cultivos procedentes de hembras. Por otra parte, no observamos ningún efecto del estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno administrado en solitario en cultivos procedentes de machos. El aumento en los niveles de citoquinas tras los tratamientos con estradiol y tamoxifeno en los cultivos de hembras no tiene por qué ser deletéreo puesto que estas moléculas, como ya se discutió previamente, cumplen funciones fisiológicas en ausencia de agentes nocivos (Raber et al, 1998; Albensi y Mattson, 2000; Skoff et al, 2009; Park y Bowers, 2010).

Tras la administración de LPS, sin embargo, no hemos encontrado en ningún caso una disminución significativa de la inducción en IL6, IP10, TNF α e IL1 β , ni en los cultivos procedentes de hembras ni en los de machos. El estradiol no modificó la expresión de ninguno de los marcadores analizados. El tamoxifeno aumentó significativamente la inducción de IL6 provocada por el LPS en astrocitos femeninos y el raloxifeno aumentó los niveles de IL6 e IP10 también en astrocitos femeninos. En cultivos procedentes de machos, no observamos ningún efecto del tamoxifeno, mientras que el raloxifeno redujo ligeramente la expresión de IL6, IP10 y TNF α , alcanzándose niveles de expresión intermedios entre los grupos control y tratados con LPS y no significativamente distintos de ninguno de ellos. Los distintos efectos del estradiol y los SERMs observados en nuestro estudio pueden responder a varias causas. Por una parte, si la afinidad de cada una de las moléculas analizadas por ambos receptores de estrógeno fuera diferente, los distintos resultados observados podrían deberse en primer lugar a la distinta expresión de ER β en cultivos procedentes de machos y hembras en situación basal y, tras el tratamiento con LPS, a la sobreexpresión de ER β en cultivos masculinos y la menor expresión de ambos receptores en cultivos femeninos. Además, hay que tener en cuenta la distinta conformación tridimensional de los receptores de estrógeno que el estradiol y los SERMs generan (Pike et al, 2000a, 2000b, Hubbard et al, 2000), que darán lugar a la activación y represión de distintos genes. Asimismo, la situación basal y tras el tratamiento con LPS de la célula es diferente, estando disponibles distintas baterías de coactivadores y correpresores que también modificarán la activación y represión de

genes por parte de los receptores (Zhao et al, 2005; Saijo et al, 2011). Nuestros resultados no se corresponden con los descritos en el estudio de Cerciat y colaboradores (2010). A pesar de las similitudes metodológicas y de la analogía en los compuestos utilizados, la influencia que los astrocitos procedentes de machos y hembras pudieran tener entre sí al cohabitar podría dar lugar a un efecto diferente de los SERMs. El hecho de que los resultados obtenidos a partir del mismo diseño experimental pero en cultivos procedentes de ambos sexos mezclados o por separado difieran apoya la necesidad de realizar los estudios sobre el efecto de fármacos de forma sexo-dependiente. Finalmente, las diferencias observadas entre el efecto del estradiol y los SERMs pueden deberse a la unión del estradiol con receptores de membrana, por los que los SERMs no tienen afinidad, que activarían cascadas de señalización intracelular independientes de las que podrían estimular dichos SERMs.

4.2 EFECTO DE LOS SERMS SOBRE LA GLÍA REACTIVA *IN VIVO*

Tras analizar la existencia de diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de los astrocitos *in vitro* y observar que la respuesta de este tipo celular sólo conforma una parte de los efectos que se pueden observar *in vivo*, pasamos a analizar de forma más general la reacción de la glía en dos modelos que cursan con neuroinflamación *in vivo*: un modelo de administración sistémica de LPS y un modelo de lesión cerebral penetrante. En el modelo de administración sistémica de LPS hemos medido únicamente el efecto de los SERMs sobre la microglía reactiva, dado que no encontramos astrogía inmunorreactiva para vimentina, lo que indica que en este modelo no se genera astrogía reactiva. En el modelo de lesión cerebral penetrante hemos analizado el efecto de los SERMs, de ligandos específicos de los receptores de estrógeno, del tiempo de ovariectomía y de la edad sobre la reactividad tanto microglial como astrogial.

En los modelos *in vivo* hemos administrado los esteroides en dosis altas, dentro del rango requerido para una eficaz neuroprotección en otros modelos y para la estimulación de cascadas intracelulares capaces de activar quinasas de señalización en el cerebro de la rata (Azcoitia et al, 1998; Cardona-Gómez et al, 2002; Picazo et al, 2003). Esta activación de quinasas puede ser independiente de la modulación de la actividad transcripcional mediada por los receptores, pero puede depender de la interacción de dichos receptores con otras rutas específicas de señalización (Nguyen et al, 2005; Pawlak et al, 2005; Mendez et al, 2006; Gatson y Singh, 2007). Estudios previos indican que las relativamente elevadas dosis que hemos empleado pueden

tener efectos antioxidantes e inhibir reacciones de peroxidación de lípidos, confiriendo protección frente a la isquemia cerebral (Simpkins et al, 2005). Las propiedades antioxidantes del estradiol pueden participar en la disminución de la gliosis mediante la reducción de mecanismos de estrés oxidativo implicados en la activación glial (Wang et al, 2006), incluyendo la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B (Caccamo et al, 2005). Mediante el control de la localización intracelular del NF- κ B (Dodel et al, 1999; Ghisletti et al, 2005), el estradiol puede disminuir la producción de NOS inducible por parte de la microglía (Bruce-Keller et al, 2000; Baker et al, 2004). Además, el estradiol puede reducir la liberación de citoquinas proinflamatorias como el interferón γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Dimayuga et al, 2005) y disminuir la liberación de superóxido y la fagocitosis (Bruce-Keller et al, 2000). Las dosis de compuestos estrogénicos empleadas también pueden controlar el edema cerebral potenciando la expresión de acuaporina-4 en astrocitos parenquimales reactivos y procesos gliales perivasculares (Gu et al, 2003; Tomas-Camardiel et al, 2005). Además, los esteroides sexuales modulan la reactividad glial mediante el control de la proliferación de astrocitos (García-Estrada et al, 1999) o mediante la modulación de la secreción de factores de crecimiento relacionados con la maduración de la cicatriz glial (Flores et al, 1999; Buchanan et al, 2000; Moroz et al, 2003; Sortino et al, 2004; Dhandapani et al, 2005).

4.2.1.-Efecto de los SERMs sobre la microglía reactiva en un modelo de administración sistémica de LPS

En este estudio hemos analizado el efecto de una batería de SERMs sobre la microglía tras la administración de un estímulo inflamatorio a nivel sistémico. Hemos utilizado como marcador para la observación inmunohistológica de la microglía reactiva el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II), ya que está ampliamente demostrada su fiabilidad. Mientras que su detección es prácticamente imposible en microglía en reposo, su expresión aumenta tras la activación en respuesta a estímulos como exposición a neurotoxinas (Cevolani et al, 2001), daño neural (Popovich et al, 1997, Hong et al, 2006) o estímulos inflamatorios como el LPS (Ng y Ling, 1997, Hauss-Wegrzyniak et al, 1998). Nuestros resultados confirman estos datos, demostrando una alta inmunoreactividad para MHC-II tras la administración de LPS. Además, la microglía positiva para este marcador presenta los cambios morfológicos descritos previamente.

Discusión

Hemos observado que algunos de los SERMs poseen un significativo potencial antiinflamatorio, reduciendo el número de células microgliales inmunorreactivas para MHC-II. Los SERMs efectivos fueron tamoxifeno, raloxifeno, fispemifeno y bazedoxifeno. Los más efectivos fueron tamoxifeno y raloxifeno, SERMs clásicos que ya se emplean en clínica. Sorprendentemente, el fispemifeno mostró una acción proinflamatoria en ausencia de LPS, lo que indica que algunos compuestos estrogénicos pueden inducir inflamación en el cerebro sano, incluso si son capaces de reducir la reactividad microglial en condiciones patológicas. Un estudio previo apoya esta idea, puesto que demuestra que el raloxifeno puede presentar un efecto proinflamatorio en ciertas condiciones (Tapia-Gonzalez et al, 2008). Nuestros resultados no muestran esta acción del raloxifeno, aunque el número de células inmunomarcadas en condiciones basales en este grupo aumentaba de forma no significativa. Los otros SERMs evaluados no han reducido significativamente la reactividad microglial. Además, junto con el fispemifeno, HM-280 y HM-282 aumentaron la inflamación al elevar el número de células positivas para MHC-II en ausencia de LPS.

El mecanismo exacto por el cual estos compuestos estrogénicos son capaces de regular la activación de la microglía es difícil de definir en nuestro estudio, puesto que existen muchos mecanismos potenciales a través de los cuales podrían modular dicha activación. Los SERMs, en este caso, pueden tener un efecto periférico, actuando en tejidos fuera del SNC e inhibiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, de tal manera que se reduciría la activación microglial en el SNC. Por otra parte, los compuestos estrogénicos pueden tener un efecto local en el SNC. Pueden reducir la reactividad microglial directamente o de forma indirecta a través de los otros tipos celulares con los que cohabitan, neuronas y astrocitos principalmente. En este efecto local podrían participar los receptores nucleares de estrógeno, que modificarían la transcripción génica y por tanto la síntesis proteica (García-Segura et al, 2001; McKenna y O'Malley, 2002; Kelly y Rønnekleiv, 2008; Shelly et al, 2008).

Estudios previos confirman la expresión de ER- α y ER- β tanto *in vitro* como *in vivo* en microglía (Bruce-Keller et al, 2000; Vegeto et al, 2001; Sierra et al, 2008; Tapia-Gonzalez et al, 2008; Mor et al, 1999; Vegeto et al, 2001; Takahashi et al, 2004). Estudios *in vitro* han demostrado tanto su presencia como su implicación en la protección ejercida por el estradiol frente a la inflamación inducida por LPS (Liu et al, 2005, Smith et al, 2011). Además, el estradiol es capaz de inhibir la apoptosis microglial y la respuesta inflamatoria de manera dependiente de receptor en cultivos

(Bruce-Keller et al, 2000; Drew y Chavis, 2000; Vegeto et al, 2001). Tanto el papel de ER- α como el de ER β como mediadores de los efectos antiinflamatorios del estradiol han sido demostrados por separado en estudios contradictorios (Vegeto et al, 2003, Baker et al, 2004). Además de este mecanismo genómico a través de receptores nucleares, tanto el estradiol como los SERMs pueden ejercer su efecto neuroprotector modulando cascadas de señalización intracelular, alterando la fosforilación de ciertas enzimas y la liberación de calcio. Específicamente, las rutas de la MAPK y de la PI3K/Akt están implicadas (Mendez y García Segura, 2006). Estos efectos no-genómicos son más rápidos que aquellos que cursan a través de los receptores clásicos nucleares y probablemente dependen de receptores de membrana como GPR30, cuya activación puede dar lugar a señalización a través de dichas rutas en fibroblastos dérmicos humanos (Tsui et al, 2011), o de un efecto directo y todavía desconocido del estradiol y los SERMs en estas cascadas (García-Segura et al, 2001; Dhandapani y Brann, 2002). Serán necesarios futuros estudios para clarificar el mecanismo de acción de los SERMs en nuestro modelo.

4.2.2.- Efecto de los SERMs, la edad y el tiempo de ovariectomía sobre la glía reactiva en un modelo de lesión cerebral penetrante

Además del estudio de la neuroprotección ante el proceso inflamatorio *per se*, implicado en los procesos neurodegenerativos en general, resulta de alto valor práctico y con miras a su aplicación clínica el estudio de la protección y regeneración del tejido nervioso en situaciones mucho más concretas, como puede ser el daño traumático cerebral. Con la finalidad de analizar el efecto de estradiol y SERMs junto con otros parámetros que pudieran influir en la recuperación del daño cerebral y la acción estrogénica, como pueden ser la edad o el estado hormonal del individuo, realizamos lesión cerebral penetrante en rata Wistar y analizamos la gliosis reactiva.

En primer lugar, realizamos un estudio del efecto del estradiol y dos SERMs, tamoxifeno y raloxifeno, sobre la reactividad glial en la región hipocampal próxima a la lesión en ratas hembra ovariectomizadas jóvenes, buscando además una posible causa de los efectos observados a través del análisis de la proliferación glial. Asimismo, para esclarecer el mecanismo de acción de los compuestos estrogénicos, realizamos tratamientos con ligandos selectivos de los dos receptores clásicos de estrógeno, ER α y ER β , con la finalidad de discernir cuál de ellos estaba implicado en los efectos observados.

Discusión

Nuestros resultados indican que tanto es estradiol como los dos SERMs analizados están implicados en la disminución de la reactividad glial en los dos tipos celulares analizados, astrogliá y microgliá. Para esclarecer si el efecto de los distintos compuestos estrogénicos sobre la glía se debe a cambios en su proliferación, hemos evaluado el número de células inmunorreactivas para BrdU (un análogo de timidina) y para los distintos marcadores gliales tras los tratamientos hormonales. Hemos observado que el tratamiento tanto con estradiol como con los SERMs disminuye el número de células que colocalizan BrdU y vimentina, mientras que el número de células de microgliá reactiva que incorporó BrdU no se vio modificada. Estudios previos confirman que una lesión penetrante da lugar a un aumento de la proliferación de astrocitos en sus cercanías (Cavanaugh, 1979; Lindsay, 1986; Takamiya et al, 1988). Nuestros datos indican que el tratamiento con compuestos estrogénicos puede disminuir la proliferación de astrocitos, resultado que correlaciona con la disminución en el número total de este tipo celular en la zona perilesional. De esta forma, podemos hipotetizar que la disminución en la astrogliosis puede deberse a una disminución en su proliferación causada por el tratamiento aplicado. Dicha reducción en la proliferación puede tener lugar a través de distintos mecanismos, entre los que se incluye la regulación de los niveles de neurotransmisores, neuromoduladores y factores tróficos, o de sus receptores (Kimmelberg, 1988; Höslí y Höslí, 1993). Por otra parte, no observamos cambios en la proliferación microglial mientras que sí se observó una disminución en la microgliá reactiva tras el tratamiento, que podría ser debida, al no cursar con menor proliferación, a una menor infiltración de células inmunes desde el torrente sanguíneo, que también expresan el marcador MHC-II.

La respuesta de la glía a los SERMs empleados sugiere una implicación de los receptores clásicos de estrógeno, α y β , en los efectos observados. Para establecer la implicación de uno o de ambos receptores, realizamos tratamientos con agonistas específicos, el PPT para el receptor alfa y el DPN para el receptor beta. Observamos que ambos ligandos eran capaces de reducir el número de células inmunorreactivas para vimentina, mientras que sólo el PPT o la combinación de ambos ligandos reducían la microgliá reactiva. Estudios previos plantean que sólo uno de los dos receptores clásicos esté implicado en la reducción de la reactividad microglial: Vegeto y colaboradores (2003) observaron en un modelo de administración intracerebral de LPS que el estradiol reduce la activación microglial en ratones knock-out para ER β , pero no en los knock-out para ER α , indicando la implicación exclusiva de ER α . Sin embargo, el agonista selectivo de ER β , DPN, pero no el agonista selectivo de ER α , PPT, reduce la activación microglial en un modelo *in vitro* (Baker et al, 2004). Nuestros

resultados indican una implicación exclusiva de ER α en la regulación de la microglía reactiva en el modelo de lesión cerebral penetrante, coincidiendo con los resultados encontrados *in vivo* por Vegeto et al. (2003). En cualquier caso, no puede excluirse la posibilidad de que la especificidad de PPT y DPN por el receptor alfa o beta se pierda al emplearlos a dosis relativamente elevadas *in vivo*.

En astrocitos es característica la expresión tanto del receptor alfa como del beta (ER α y ER β) en bajos niveles. La lesión penetrante induce una mayor expresión de receptores de estrógeno en la astrogliá reactiva a partir del tercer día (García-Ovejero et al, 2002), por lo que los astrocitos serán diana directa del estradiol y los SERMs, que también pueden provocar la reducción indirecta de la astrogliosis reactiva al prevenir la muerte neuronal. La localización de dichos receptores es tanto nuclear como citoplásmica, por lo que desempeñarían, además de su acción genómica clásica en el núcleo, un papel distinto e incluso independiente a éste. Chaban y colaboradores han descrito la existencia de receptores de estrógeno en la membrana plasmática de astrocitos en cultivo y han mostrado que el estradiol provoca el incremento rápido del calcio intracelular mediante la activación de un receptor de membrana, que se bloqueaba por el inhibidor del receptor de estrógenos ICI 182,780 (Chaban et al, 2004). El receptor alfa o alguna de sus variantes truncadas, así como el receptor beta, están presentes en la membrana plasmática (Razandi et al, 1999, 2002; Watson et al, 1999; Wade et al, 2001; Chambliss et al, 2002; Beyer et al, 2003; Li et al, 2003) y llevan a cabo acciones no genómicas que dan lugar a protección frente a daño excitotóxico y a la fosforilación de receptores nucleares (Watters et al, 1997; Singer et al, 1999). La expresión en astrocitos de ER α es tardía ya que comienza 3 días tras la lesión y alcanza el máximo a los 7 días (García-Ovejero, 2004). Dicha expresión transcurre en paralelo con la dinámica de activación astrogliá y coincide con la época de formación y maduración de la cicatriz gliá (Takamiya et al, 1988; Calvo et al, 1991; Janeczko, 1993; Amat et al, 1996; Bush et al, 1999). Los estrógenos, a través de estos receptores, disminuyen la proliferación y atenúan la hipertrofia y la extensión de prolongaciones en los astrocitos (García-Estrada et al, 1993; Del Cerro et al, 1996; García-Estrada et al, 1999). Además, promueven la expresión de muchos factores de crecimiento, neuroprotectores y con propiedades detoxificantes.

Al igual que en los grupos experimentales tratados con estradiol, tamoxifeno y raloxifeno, analizamos la proliferación de los dos tipos gliáles tras el tratamiento con los ligandos específicos de los receptores. Análogamente a lo observado anteriormente, todos los tratamientos disminuyeron la proliferación astrogliá mientras

Discusión

que no se observaron cambios en la microglía reactiva. Esto refuerza la hipótesis de que la reducción en la reactividad astrogliar se produce a través de la acción de los compuestos estrogénicos a través de los receptores clásicos mediante la reducción de la proliferación, mientras que en la microglía el proceso de disminución de la reactividad se realiza exclusivamente a través del receptor alfa pero sin modificar la proliferación. Tapia-Gonzalez y colaboradores (2008) sólo fueron capaces de encontrar marca inmunohistoquímica de ER α en células microgliales cerebelares reactivas tras administración sistémica de LPS, por lo que no sería descartable que, en nuestro modelo, la microglía cerebelar exprese exclusivamente ER α , siendo por tanto imposible detectar actividad neuroprotectora del DPN, el ligando específico de ER β .

Finalmente, comparamos los resultados obtenidos en ratas jóvenes ovariectomizadas 15 días antes de la lesión con ratas viejas ovariectomizadas 15 días o 16 meses antes de la lesión para poder analizar el efecto de la edad y la duración de la depleción hormonal en la respuesta de la glía a los compuestos estrogénicos tras la lesión cerebral penetrante. Para asegurar la inexistencia de diferencias entre animales jóvenes y animales de mediana edad, también se analizó la astrogliar reactiva en animales de 8 meses ovariectomizados 15 días antes de la lesión. En todos los tipos celulares y todos los grupos de edad y tiempo de ovariectomía, tanto el estradiol como el tamoxifeno y el raloxifeno redujeron significativamente la astrogliar y microglía reactivas, mostrando ser efectivos independientemente de la situación hormonal del individuo. En el caso de microglía reactiva, no se observó ningún efecto del tiempo de ovariectomía ni de la edad en la capacidad de los compuestos estrogénicos para reducir la reactividad. Sin embargo, en el caso de los astrocitos se pudo observar una regulación mucho más fina. En primer lugar, la edad influye en el número de astrocitos reactivos tras la lesión cerebral penetrante. Esta observación coincide con otras previas realizadas en animales macho, en los que la respuesta gliótica tras lesión cerebral penetrante (Zhu et al, 2003), daño excitotóxico (Castillo-Ruiz et al, 2007), hemorragia intracerebral (Wasserman et al, 2008) e isquemia cerebral (Badan et al, 2003) aumenta con la edad. Además, hemos observado que una depleción prolongada de hormonas ováricas también contribuye a aumentar la astrogliosis reactiva tras daño cerebral. Este dato resulta especialmente relevante para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas en mujeres tras la menopausia, donde la edad va asociada a una pérdida de hormonas ováricas. Sin embargo, los compuestos estrogénicos disminuyeron significativamente la astrogliosis en todos los grupos de edad, incluso en animales viejos con una depleción hormonal prolongada. Nuestros resultados en animales de mediana edad concuerdan con otro estudio que muestra

que el estradiol mantiene su efecto en supervivencia neuronal en el hipocampo de animales de mediana edad en un modelo de isquemia global (De Butte-Smith et al, 2009). Sin embargo, el número de astrocitos reactivos en animales tratados con estradiol y raloxifeno fue mayor en animales de avanzada edad comparado con animales jóvenes y de mediana edad. La depleción prolongada de hormonas ováricas también dio lugar a un mayor número de astrocitos reactivos tras el tratamiento con estradiol en animales de avanzada edad. Los niveles basales de astrogliosis, mayores en animales viejos y con larga depleción hormonal, pueden contribuir a estas diferencias. Además, un estudio previo en un modelo animal de infarto indicó que la depleción prolongada de hormonas ováricas interrumpe las acciones antiinflamatorias tanto periféricas como centrales del estradiol (Suzuki et al, 2007). Por tanto, es posible que la pérdida de hormonas ováricas a largo plazo de lugar a una regulación estrogénica alterada de las citoquinas periféricas y centrales, lo que podría disminuir los efectos protectores de los estrógenos en animales de avanzada edad. Además de la edad y el tiempo de privación hormonal, el peso corporal en el momento de la lesión es también un parámetro importante a tener en cuenta. El peso corporal puede afectar a la farmacocinética de los compuestos estrogénicos y puede afectar a la gliosis reactiva, puesto que un mayor peso corporal *per se* está asociado con inflamación (Hotamisligil, 2006). Por ello, las diferencias observadas en el peso corporal entre los grupos experimentales podrían contribuir a las diferencias observadas en la astrogliosis reactiva tras la lesión y tras los tratamientos con compuestos estrogénicos.



Conclusiones

CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1) Los astrocitos corticales de ratón macho y hembra en cultivo presentan distinta expresión basal del ARNm del receptor de estrógenos β y de la mitofusina 1, lo cual podría influir en su respuesta inflamatoria.
- 2) La respuesta de los astrocitos al LPS *in vitro* difiere en función del sexo. La respuesta al LPS en la expresión del ARNm de marcadores inflamatorios, la proteína translocadora del colesterol, la aromatasa, los receptores de estrógeno y la mitofusina 1 es diferente en cultivos de astrocitos procedentes de machos y hembras.
- 3) La administración de propionato de testosterona a hembras recién nacidas genera una respuesta al LPS parcialmente análoga a la observada en los cultivos procedentes de machos. Las diferencias sexuales observadas en la expresión de los marcadores inflamatorios y la proteína translocadora pueden mimetizarse mediante androgenización perinatal.
- 4) La administración de propionato de testosterona a animales hembra recién nacidas también provoca, en los astrocitos hembra en cultivo, modificaciones en la expresión génica basal y en respuesta al LPS que no imitan el perfil de expresión de los astrocitos macho.
- 5) Existen diferencias sexuales en la respuesta cortical al LPS en ratones prepuberales, algunas de las cuales se mimetizan por la administración perinatal de propionato de testosterona.
- 6) Las diferencias sexuales observadas en respuesta al LPS de los astrocitos corticales en cultivo no se corresponden con las observadas en la corteza *in vivo*. Por lo tanto, la respuesta de otros componentes celulares debe influenciar la respuesta inflamatoria *in vivo*.
- 7) El tratamiento con estradiol y tamoxifeno en cultivos de astrocitos corticales procedentes de hembras produce una sobreexpresión de marcadores inflamatorios, mientras que no se observan cambios en los astrocitos masculinos. Otros compuestos estrogénicos analizados no modifican la expresión basal de los marcadores.

Conclusiones

- 8) El tratamiento con Ro5-4864, estradiol, letrozol, tamoxifeno y raloxifeno en cultivos de astrocitos corticales estimulados con LPS no da lugar a un efecto antiinflamatorio general ni en los astrocitos masculinos ni en los femeninos. En algunos casos da lugar a una respuesta al LPS exacerbada en cultivos procedentes de hembras y a una menor respuesta al LPS en astrocitos masculinos.
- 9) Los SERMs son capaces de modificar la reactividad microglial in vivo, presentando efectos proinflamatorios en solitario, antiinflamatorios tras la administración de LPS o ambos.
- 10) El estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno disminuyen la reactividad glial tras lesión cerebral penetrante, independientemente de la edad y del tiempo previo de privación de hormonas ováricas. Dicha reducción va asociada, en animales jóvenes, a una reducción en la proliferación astrogliar, mientras que la proliferación microglial no se ve modificada.
- 11) Los efectos del estradiol, el tamoxifeno y el raloxifeno sobre la reactividad glial tras lesión cerebral penetrante cursan a través de los receptores clásicos de estrógeno. El receptor α media la disminución de la reactividad microglial y astrogliar. El receptor β sólo media la disminución de la reactividad astrogliar. No se observa sinergismo en los efectos mediados a través de cada receptor.
- 12) La edad y el tiempo de ovariectomía aumentan la susceptibilidad de la astrogliar a activarse tras lesión cerebral penetrante, dando lugar a una reactividad exacerbada en los animales viejos que se acentúa en las ratas con ovariectomía de larga duración.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Abbott NJ. **2002**. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 200(6):629-38.
2. Affi M. **2007**. Gender differences in mental health. *Singapore Med J.* 48(5):385-91.
3. Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K. **2000**. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 14 Suppl 1:S47-53.
4. Albenis BC, Mattson MP. **2000**. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse;* 35(2):151-9.
5. Alexander JK, Popovich PG. **2009**. Neuroinflammation in spinal cord injury: therapeutic targets for neuroprotection and regeneration. *Prog Brain Res;* 175:125-37.
6. Aloisi F. **2001**. Immune function of microglia. *Glia;* 36(2):165-79.
7. Alvarez-Buylla A and Lim DA. **2004**. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
8. Amat JA, Ishiguro H, Nakamura K, and Norton WT. **1996**. Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia* 16:368-382.
9. Amateau SK, McCarthy MM. **2002**. Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area. *J Neuroendocrinol;* 14(11):904-10.
10. Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A. **1999**. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology;* 53(9):1992-7.
11. Anderson RH, Fleming DE, Rhees RW, Kinghorn E. **1986**. Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats. *Brain Res;* 370(1):1-10.
12. Anderson CM, and Nedergaard M. **2003**. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosci* 26:340-344.
13. Araque A. **2008**. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol;* 4(1):3-10.
14. Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, and Buzo W. **2002**. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-2450.
15. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, and Haydon PG. **1998**. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
16. Arevalo MA, Santos-Galindo M, Lagunas N, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. **2011**. Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents. *J Mol Endocrinol;* 46(1):R1-9.
17. Arlicot N, Katsifis A, Garreau L, Mattner F, Vergote J, Duval S, Kousignian I, Bodard S, Guilloteau D, Chalon S. **2008**. Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging;* 35(12):2203-11.
18. Arnold AP. **2009**. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm Behav;* 55(5):570-8.
19. Arnold S, Beyer C. **2009**. Neuroprotection by estrogen in the brain: the mitochondrial compartment as presumed therapeutic target. *J Neurochem;* 110(1):1-11.

Bibliografía

20. Arnold S, de Araújo GW, Beyer C. **2008**. Gender-specific regulation of mitochondrial fusion and fission gene transcription and viability of cortical astrocytes by steroid hormones. *J Mol Endocrinol*; 41(5):289-300.
21. Artemenko IP, Jefcoate CR. **2004**. Multiple contributions from long-chain fatty acid metabolism in Y-1 and MA-10 cells. *Endocr Res*; 30(4):637.
22. Ashwell K. **1990**. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55:219-230.
23. Azad NA, Al Bugami M, Loy-English I. **2007**. Gender differences in dementia risk factors. *Gen Med*; 4(2):120-9.
24. Azcoitia I, Arevalo MA, De Nicola AF, Garcia-Segura LM. **2011**. Neuroprotective actions of estradiol revisited. *Trends Endocrinol Metab*; 22(12):467-73.
25. Azcoitia I, Fernandez-Galaz C, Sierra A, Garcia-Segura LM. **1999**. Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J Neurocytol*; 28(9):699-710.
26. Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. **1998**. Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus. *Neuroreport*; 9(13):3075-9.
27. Badan I, Platt D, Kessler C, Popa-Wagner A. **2003**. Temporal dynamics of degenerative and regenerative events associated with cerebral ischemia in aged rats. *Gerontology*; 49(6):356-65.
28. Bagetta G, Chiappetta O, Amantea D, Iannone M, Rotiroli 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(1):87-91.
29. Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. **2004**. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology*; 145(11):5021-32.
30. Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J, Szpirer C. **2006**. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci*; 9(2):220-6.
31. Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. **2002**. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci*; 22(20):9104-12.
32. Bakker J, Pierman S, González-Martínez D. **2010**. Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav*; 57(4-5):390-5.
33. Balthazart J, Baillien M, Ball GF. **2005**. Interactions between kinases and phosphatases in the rapid control of brain aromatase. *J Neuroendocrinol*; 17(9):553-9.
34. Balthazart J, Ball GF. **1998**. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci*; 21(6):243-9.
35. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. **1993**. Cytotoxicity of microglia. *Glia*; 7(1):111-8.
36. Bao YJ, Li LZ, Li XG, Wang YJ. **2011**. 17Beta-estradiol differentially protects cortical pericontusional zone from programmed cell death after traumatic cerebral contusion at distinct stages via non-genomic and genomic pathways. *Mol Cell Neurosci*; 48(3):185-94.

37. Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Garcia-Ovejero D. **2007**. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *Eur J Neurosci*; 25(10):3039-46.
38. Beato M, Truss M, Chávez S. **1996**. Control of transcription by steroid hormones. *Ann N Y Acad Sci*; 784:93-123.
39. Becher B, Prat A, Antel JP. **2000**. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*; 29(4):293-304.
40. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. **1997**. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*; 51(4):535-41.
41. Benito-León J, Bermejo-Pareja F, Rodríguez J, Molina JA, Gabriel R, Morales JM. **2003**. Prevalence of PD and other types of parkinsonism in three elderly populations of central Spain. *Mov Disord*; 18(3):267-74.
42. Benvenuti S, Luciani P, Vannelli GB, Gelmini S, Franceschi E, Serio M, Peri A. **2005**. Estrogen and selective estrogen receptor modulators exert neuroprotective effects and stimulate the expression of selective Alzheimer's disease indicator-1, a recently discovered antiapoptotic gene, in human neuroblast long-term cell cultures. *J Clin Endocrinol Metab*; 90(3):1775-82.
43. Bermejo A y Duarte J. **2003**. Mecanismos de transducción del lipopolisacárido. *Ars Pharmaceutica*, 44:2; 121-139.
44. Beurel E, Jope RS. **2009**. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *J Neuroinflammation*; 6:9.
45. 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(5):1325-33.
46. Białek M, Zaremba P, Borowicz KK, Czuczwar SJ. **2004**. Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Pol J Pharmacol*; 56(5):509-18.
47. Biewenga E, Cabell L, Audesirk T. **2005**. Estradiol and raloxifene protect cultured SN4741 neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett*; 373(3):179-83.
48. Blanco AM, Vallés SL, Pascual M, Guerri C. **2005**. Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol*; 175(10):6893-9.
49. Block F, Dihné M, Loos M. **2005**. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Prog Neurobiol*; 75(5):342-65.
50. Boulay JL, O'Shea JJ, Paul WE. **2003**. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity*; 19(2):159-63.
51. Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. **1992**. CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res*; 94:367-79.
52. Breuer B, Anderson R. **2000**. The relationship of tamoxifen with dementia, depression, and dependence in activities of daily living in elderly nursing home residents. *Women Health*; 31(1):71-85.
53. Brock O, Duhard Q, Baum MJ, Bakker J. **2010**. Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female aromatase knockout mice. *Endocrinology*; 151(4):1814-21.

Bibliografía

54. Broida J, Svare B. **1984**. Sex differences in the activity of mice: modulation by postnatal gonadal hormones. *Horm Behav*; 18(1):65-78.
55. Bruce-Keller AJ. **1999**. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res*; 58(1):191-201.
56. Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S, Mattson MP. **2000**. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*; 141(10):3646-56.
57. Buchanan CD, Mahesh VB, Brann DW. **2000**. Estrogen-astrocyte-luteinizing hormone-releasing hormone signaling: a role for transforming growth factor-beta(1). *Biol Reprod*; 62(6):1710-21.
58. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, and Sofroniew MV. **1999**. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297-308.
59. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, and Ellisman MH. **2002**. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
60. Bushong EA, Martone ME, and Ellisman MH. **2004**. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 22:73-86.
61. Caccamo D, Campisi A, Currò M, Bramanti V, Tringali M, Li Volti G, Vanella A, Ientile R. **2005**. Antioxidant treatment inhibited glutamate-evoked NF-kappaB activation in primary astroglial cell cultures. *Neurotoxicology*; 26(5):915-21.
62. Cadelli DS, Bandtlow CE, Schwab ME. **1992**. Oligodendrocyte- and myelin-associated inhibitors of neurite outgrowth: their involvement in the lack of CNS regeneration. *Exp Neurol*; 115(1):189-92.
63. Cahill L, Uncapher M, Kilpatrick L, Alkire MT, Turner J. **2004**. Sex-related hemispheric lateralization of amygdala function in emotionally influenced memory: an fMRI investigation. *Learn Mem*; 11(3):261-6.
64. Calvo JL, Carbonell AL, Boya J. **1991**. Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res*; 566(1-2):333-6.
65. Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L. **1993**. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90(21):10061-5.
66. Carbonell AL, Boya J. **1988**. Ultrastructural study on meningeal regeneration and meningo-glial relationships after cerebral stab wound in the adult rat. *Brain Res*; 439(1-2):337-44.
67. Cardona-Gomez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM. **2002**. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*; 107(1):80-8.
68. Carranza-Lira S, MacGregor-Gooch AL, Saráchaga-Osterwalder M. **2004**. Mood modifications with raloxifene and continuous combined estrogen plus progestin hormone therapy. *Int J Fertil Womens Med*; 49(3):120-2.
69. Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. **1990**. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev*; 11(2):201-20.

70. Carswell HV, Dominiczak AF, Garcia-Segura LM, Harada N, Hutchison JB, Macrae IM. **2005**. Brain aromatase expression after experimental stroke: topography and time course. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 96(1):89-91.
71. Caruso D, D'Intino G, Giatti S, Maschi O, Pesaresi M, Calabrese D, Garcia-Segura LM, Calza L, Melcangi RC. **2010**. Sex-dimorphic changes in neuroactive steroid levels after chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*; 114(3):921-32.
72. Castanier C, Garcin D, Vazquez A, Arnoult D. **2010**. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep*; 11(2):133-8.
73. Castillo-Ruiz MM, Campuzano O, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. **2007**. Delayed neurodegeneration and early astrogliosis after excitotoxicity to the aged brain. *Exp Gerontol*; 42(4):343-54.
74. Cavanagh JB. **1979**. The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. *J Anat*; 106(Pt 3):471-87.
75. Cerciat M, Unkila M, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. **2010**. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia*; 58(1):93-102.
76. Cevolani D, Bentivoglio M, Stocchi P. **2001**. Glial reaction to volkensin-induced selective degeneration of central neurons. *Brain Res Bull*; 54(4):353-61.
77. Chaban VV, Lakhter AJ, Micevych P. **2004**. A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology*; 145(8):3788-95.
78. Chamak B, Morandi V, Mallat M. **1994**. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res*; 38(2):221-33.
79. Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. **2002**. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol*; 16(5):938-46.
80. Charo IF, Ransohoff RM. **2006**. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*; 354(6):610-21.
81. Chen Y and Swanson RA. **2003**. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149.
82. Chen MK, Baidoo K, Verina T, Guilarte TR. **2004**. Peripheral benzodiazepine receptor imaging in CNS demyelination: functional implications of anatomical and cellular localization. *Brain*; 127(Pt 6):1379-92.
83. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. **2003**. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*; 160(2):189-200.
84. Chen H, Chomyn A, Chan DC. **2005**. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*; 280(28):26185-92.
85. Chen YH, Yeh CW, Lo HC, Su SL, Hseu YC, Hsu LS. **2012**. Generation of reactive oxygen species mediates butein-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncol Rep*; 27(4):1233-7.
86. Chen LW, Zhang JP, Kwok-Yan Shum D, and Chan YS. **2006**. Localization of nerve growth factor, neurotrophin-3, and glial cell line-derived neurotrophic factor in nestin-expressing reactive astrocytes in the caudate-putamen of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/Bl mice. *J Comp Neurol* 497(6):898-909.

Bibliografía

87. Chen MK, Guilarte TR. **2008**. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther*; 118(1):1-17.
88. Chen GY, Nuñez G. **2010**. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*; 10(12):826-37.
89. Chen Y, Swanson RA. **2003**. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*; 23(2):137-49.
90. Cheng B, Christakos S, Mattson MP. **1994**. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron*; 12(1):139-53.
91. Choi JS, Kim SY, Cha JH, Choi YS, Sung KW, Oh ST, Kim ON, Chung JW, Chun MH, Lee SB, Lee MY. **2003**. Upregulation of gp130 and STAT3 activation in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Glia*; 41(3):237-46.
92. Choi JS, Kim SJ, Shin JA, Lee KE, Park EM. **2008**. Effects of estrogen on temporal expressions of IL-1beta and IL-1ra in rat organotypic hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett*; 438(2):233-7.
93. Chowen JA, Torres-Alemán I, García-Segura LM. **1992**. Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*; 56(6):895-901.
94. Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. **2004**. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101(45):15927-32.
95. Ciriza I, Carrero P, Azcoitia I, Lundeen SG, Garcia-Segura LM. **2004**. Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *J Neurobiol*; 61(2):209-21.
96. Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C. **2002**. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience*; 112(1):7-11.
97. 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(4):488-94.
98. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. **2003**. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*; 126(Pt 4):770-82.
99. Constam DB, Philipp J, Malipiero UV, ten Dijke P, Schachner M, Fontana A. **1992**. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol*; 148(5):1404-10.
100. Cornu P, Benavides J, Scatton B, Hauw JJ, Philippon J. **1992**. Increase in omega 3 (peripheral-type benzodiazepine) binding site densities in different types of human brain tumours. A quantitative autoradiography study. *Acta Neurochir (Wien)*; 119(1-4):146-52.
101. Cosimo Melcangi R, Garcia-Segura LM. **2010**. Sex-specific therapeutic strategies based on neuroactive steroids: In search for innovative tools for neuroprotection. *Horm Behav*; 57(1):2-11.
102. Cserr HF, Knopf PM. **1992**. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today*; 13(12):507-12.
103. Culmsee C, Landshamer S. **2006**. Molecular insights into mechanisms of the cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res*; 3(4):269-83.

104. Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K, Perry VH. **2005**. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci*; 25(40):9275-84.
105. D'Astous M, Morissette M, Di Paolo T. **2004**. Effect of estrogen receptor agonists treatment in MPTP mice: evidence of neuroprotection by an ER alpha agonist. *Neuropharmacology*; 47(8):1180-8.
106. Davis BK, Wen H, Ting JP. **2011**. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*; 29:707-35.
107. Davis EJ, Foster TD, and Thomas WE. **1994**. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34:73-78.
108. De Lau LM, Giesbergen PC, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. **2004**. Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology*; 63(7):1240-4.
109. De Butte-Smith M, Gulinello M, Zukin RS, Etgen AM. **2009**. Chronic estradiol treatment increases CA1 cell survival but does not improve visual or spatial recognition memory after global ischemia in middle-aged female rats. *Horm Behav*; 55(3):442-53.
110. DeGregorio MW, Wurz GT, Taras TL, Erkkola RU, Halonen KH, Huupponen RK. **2000**. Pharmacokinetics of (deaminohydroxy)toemifene in humans: a new, selective estrogen-receptor modulator. *Eur J Clin Pharmacol*; 56(6-7):469-75.
111. Del Cerro S, Garcia-Estrada J, Garcia-Segura LM. **1996**. Neurosteroids modulate the reaction of astroglia to high extracellular potassium levels. *Glia*; 18(4):293-305.
112. Del Río-Hortega P. **1919**. El tercer elemento de los centros nerviosos. *Bol Soc Esp Biol* 9, 69-120.
113. Del Río-Hortega P. **1920**. La microglía y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos. *Trab Lab Invest Biol XVIII*:37-82.
114. Detmer SA, Chan DC. **2007a**. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol*; 176(4):405-14.
115. Detmer SA, Chan DC. **2007b**. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 8(11):870-9.
116. Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, Brann DW. **2005**. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*; 146(6):2749-59.
117. Dhandapani KM, Brann DW. **2002**. Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biol Reprod*; 67(5):1379-85.
118. Dhandapani KM, Brann DW. **2007**. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol*; 42(1-2):70-5.
119. Dimayuga FO, Reed JL, Carnero GA, Wang C, Dimayuga ER, Dimayuga VM, Perger A, Wilson ME, Keller JN, Bruce-Keller AJ. **2005**. Estrogen and brain inflammation: effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. *J Neuroimmunol*; 161(1-2):123-36.
120. Ding S, Fellin T, Zhu Y, Lee SY, Auberson YP, Meaney DF, Coulter DA, Carmignoto G, and Haydon PG. **2007**. Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *J Neurosci* 27(40):10674-84.

Bibliografía

121. Diorio D, Welner SA, Butterworth RF, Meaney MJ, Suranyi-Cadotte BE. **1991**. Peripheral benzodiazepine binding sites in Alzheimer's disease frontal and temporal cortex. *Neurobiol Aging*; 12(3):255-8.
122. Dodel RC, Du Y, Bales KR, Gao F, Paul SM. **1999**. Sodium salicylate and 17beta-estradiol attenuate nuclear transcription factor NF-kappaB translocation in cultured rat astroglial cultures following exposure to amyloid A beta(1-40) and lipopolysaccharides. *J Neurochem*; 73(4):1453-60.
123. Dougherty KD, Dreyfus CF, and Black IB. **2000**. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B):574-85.
124. Dowers TS, Qin ZH, Thatcher GR, Bolton JL. **2006**. Bioactivation of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Chem Res Toxicol*; 19(9):1125-37.
125. Drew PD, Chavis JA. **2000**. Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *J Neuroimmunol*; 111(1-2):77-85.
126. Dringen R, Gebhardt R, and Hamprecht B. **1993**. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* 623:208-214.
127. Du B, Ohmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohshima C, Igarashi H, Mori-Abe A, Saitoh M, Ohta T, Ohishi A, Doshida M, Tezuka N, Takahashi T, Kurachi H. **2004**. Both estrogen and raloxifene protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor alpha-transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade. *J Endocrinol*; 183(3):605-15.
128. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. **1999**. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*; 19(15):6385-93.
129. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. **2002**. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol*; 168(7):3195-204.
130. Duncan KA, Saldanha CJ. **2011**. Neuroinflammation induces glial aromatase expression in the uninjured songbird brain. *J Neuroinflammation*; 8:81.
131. Eddleston M, and Mucke L. **1993**. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15-36.
132. Ellison JA, and de Vellis J. **1995**. Amoeboid microglia expressing GD3 ganglioside are concentrated in regions of oligodendrogenesis during development of the rat corpus callosum. *Glia* 14:123-132.
133. Eriksson C, Tehranian R, Iverfeldt K, Winblad B, Schultzberg M. **2000**. Increased expression of mRNA encoding interleukin-1beta and caspase-1, and the secreted isoform of interleukin-1 receptor antagonist in the rat brain following systemic kainic acid administration. *J Neurosci Res*; 60(2):266-79.
134. Evans RM. **1988**. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*; 240(4854):889-95.
135. Fagan AM, Gage FH. **1994**. Mechanisms of sprouting in the adult central nervous system: cellular responses in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus. *Neuroscience*; 58(4):705-25.
136. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. **2000**. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*; 52(4):513-56.

137. Farber JM. **1997**. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol*; 61(3):246-57.
138. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, and Sofroniew MV. **2004**. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.
139. Fawcett JW, Asher RA. **1999**. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*; 49(6):377-91.
140. Fawcett JW. **2006**. The glial response to injury and its role in the inhibition of CNS repair. *Adv Exp Med Biol*; 557:11-24.
141. Feng Y, Fratkins JD, LeBlanc MH. **2004**. Treatment with tamoxifen reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Eur J Pharmacol*; 484(1):65-74.
142. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Mamounas E, Smith R, Begovic M, Dimitrov NV, Margolese RG, Kardinal CG, Kavanah MT, Fehrenbacher L, Oishi RH. **1999**. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet*; 353(9169):1993-2000.
143. Flores C, Salmaso N, Cain S, Rodaros D, Stewart J. **1999**. Ovariectomy of adult rats leads to increased expression of astrocytic basic fibroblast growth factor in the ventral tegmental area and in dopaminergic projection regions of the entorhinal and prefrontal cortex. *J Neurosci*; 19(19):8665-73.
144. Florio P, Quirici B, Casarosa E, Lombardi I, Luisi M, Genazzani AD, Petraglia F, Genazzani AR. **2001**. Neuroendocrine effects of raloxifene hydrochloride in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*; 15(5):359-66.
145. Flügel A, Schwaiger FW, Neumann H, Medana I, Willem M, Wekerle H, Kreutzberg GW, Graeber MB. **2000**. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol*; 10(3):353-64.
146. Fombonne E. **1999**. The epidemiology of autism: a review. *Psychol Med*; 29(4):769-86.
147. Fombonne E. **2003**. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord*; 33(4):365-82.
148. Foot M, Koszycki D. **2004**. Gender differences in anxiety-related traits in patients with panic disorder. *Depress Anxiety*; 20(3):123-30.
149. Foroud T, Gray J, Ivashina J, Conneally PM. **1999**. Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 66(1):52-6.
150. Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, Tontodonati V, Herlitz A, Winblad B. **1997**. Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology*; 48(1):132-8.
151. Frisén J, Haegerstrand A, Fried K, Piehl F, Cullheim S, Risling M. **1994**. Adhesive/repulsive properties in the injured spinal cord: relation to myelin phagocytosis by invading macrophages. *Exp Neurol*; 129(2):183-93.
152. Ganat YM, Silbereis J, Cave C, Ngu H, Anderson GM, Ohkubo Y, Ment LR, and Vaccarino FM. **2006**. Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *J Neurosci* 26(33):8609-21.
153. Ganter S, Northoff H, Männel D, Gebicke-Härter PJ. **1992**. Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res*; 33(2):218-30.

Bibliografía

154. García Ovejero D. **2004**. La glía reactiva como diana de andrógenos y estrógenos.
155. Garcia-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, Garcia-Segura LM. **1993**. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res*; 628(1-2):271-8.
156. García-Estrada J, Luquín S, Fernández AM, Garcia-Segura LM. **1999**. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Dev Neurosci*; 17(2):145-51.
157. García-Ovejero D, Veiga S, García-Segura LM, DonCarlos LL. **2002**. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol*; 450(3):256-71.
158. Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. **1999**. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*; 89(2):567-78.
159. Garcia-Segura LM, Suarez I, Segovia S, Tranque PA, Calés JM, Aguilera P, Olmos G, Guillamón A. **1988**. The distribution of glial fibrillary acidic protein in the adult rat brain is influenced by the neonatal levels of sex steroids. *Brain Res*; 456(2):357-63.
160. Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. **2001**. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*; 63(1):29-60.
161. Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, Chowen JA. **1998**. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport*; 9(4):593-7.
162. Garcia-Segura LM, Melcangi RC. **2006**. Steroids and glial cell function. *Glia*; 54(6):485-98.
163. Gates MA, Dunnett SB. **2001**. The influence of astrocytes on the development, regeneration and reconstruction of the nigrostriatal dopamine system. *Restor Neurol Neurosci*; 19(1-2):67-83.
164. Gatson JW, Singh M. **2007**. Activation of a membrane-associated androgen receptor promotes cell death in primary cortical astrocytes. *Endocrinology*; 148(5):2458-64.
165. Gehlert DR, Stephenson DT, Schober DA, Rash K, Clemens JA. **1997**. Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors in the facial nucleus following motor neuron axotomy. *Neurochem Int*; 31(5):705-13.
166. Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. **2005**. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol*; 25(8):2957-68.
167. Gilroy AM, Tortora GJ, Derrickson B, MacPherson BR, and Ross LM. **2011**. *Prometheus: Atlas De Anatomía*.
168. Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. **1988**. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci*; 8(2):709-14.
169. Giulian D, Vaca K, Noonan CA. **1990**. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science*; 250(4987):1593-6.
170. Giulian D, Haverkamp LJ, Li J, Karshin WL, Yu J, Tom D, Li X, Kirkpatrick JB. **1995**. Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain. *Neurochem Int*; 27(1):119-37.
171. Godbout JP, Berg BM, Krzyszton C, Johnson RW. **2005**. Alpha-tocopherol attenuates NFkappaB activation and pro-inflammatory cytokine production in brain and improves recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. *J Neuroimmunol*; 169(1-2):97-105.

172. Goel N, Bale TL. **2008**. Organizational and activational effects of testosterone on masculinization of female physiological and behavioral stress responses. *Endocrinology*; 149(12):6399-405.
173. Gold R, Schmieid M, Tontsch U, Hartung HP, Wekerle H, Toyka KV, Lassmann H. **1996**. Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis in vivo. *Brain*; 119 (Pt 2):651-9.
174. Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM. **2011**. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*; 59(2):242-55.
175. Gorski RA. **1987**. Sexual differentiation of the brain: a model for drug-induced alterations of the reproductive system. *Environ Health Perspect*; 70:163-75.
176. Gottardis MM, Jordan VC. **1987**. Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Res*; 47(15):4020-4.
177. Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. **2011**. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett*; 585(23):3798-805.
178. Graeber, M.B., Streit, W.J. and Kreutzberg, G.W. **1991**. Toward an immunological definition of the blood-brain barrier: significance of MHC class II positive perivascular cells. Yonezawa T ed. *Proceedings of the XIth International Congress of Neuropathology: Satellite symposium on demyelination, mechanisms and background. Neuropathology Supplement 4, 74-79.*
179. Griffin WS. **2006**. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr*; 83(2):470S-474S.
180. Grigoriadis S, Kennedy SH, Srinivisan J, McIntyre RS, Fulton K. **2005**. Antidepressant augmentation with raloxifene. *J Clin Psychopharmacol*; 25(1):96-8.
181. Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, van der Blik AM. **2004**. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem*; 279(18):18792-8.
182. Groswasser Z, Cohen M, Keren O. **1998**. Female TBI patients recover better than males. *Brain Inj*; 12(9):805-8.
183. Gu F, Hata R, Toku K, Yang L, Ma YJ, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J. **2003**. Testosterone up-regulates aquaporin-4 expression in cultured astrocytes. *J Neurosci Res*; 72(6):709-15.
184. Guvakova MA, Surmacz E. **1997**. Tamoxifen interferes with the insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res*; 57(13):2606-10.
185. Häfner H. **2003**. Gender differences in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*; 28 Suppl 2:17-54.
186. Halbreich U, Kahn LS. **2003**. Hormonal aspects of schizophrenias: an overview. *Psychoneuroendocrinology*; 28 Suppl 2:1-16.
187. Hampton DW, Seitz A, Chen P, Heber-Katz E, Fawcett JW. **2006**. Altered CNS response to injury in the MRL/MpJ mouse. *Neuroscience*; 127(4):821-32.
188. Hankin BL, Abramson LY. **1999**. Development of gender differences in depression: description and possible explanations. *Ann Med*; 31(6):372-9.

Bibliografía

189. Hatton WJ, von Bartheld CS. **1999**. Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol*; 409(2):169-86.
190. Hauss-Wegrzyniak B, Lukovic L, Bigaud M, Stoeckel ME. **1998**. Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. *Brain Res*; 794(2):211-24.
191. Heinlein CA, Chang C. **2002**. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*; 16(10):2181-7.
192. Herx LM, Rivest S, Yong VW. **2000**. Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor. *J Immunol*; 165(4):2232-9.
193. Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, Shooter E, Thoenen H. **1987**. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 84(23):8735-9.
194. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. **1991**. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*; 28(2):254-60.
195. Hines M, Allen LS, Gorski RA. **1992**. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res*; 579(2):321-6.
196. Hisasue S, Seney ML, Immerman E, Forger NG. **2010**. Control of cell number in the bed nucleus of the stria terminalis of mice: role of testosterone metabolites and estrogen receptor subtypes. *J Sex Med*; 7(4 Pt 1):1401-9.
197. Hong SH, Choi HB, Kim SU, McLarnon JG. **2006**. Mitochondrial ligand inhibits store-operated calcium influx and COX-2 production in human microglia. *J Neurosci Res*; 83(7):1293-8.
198. Hong S, Kang UJ, Isacson O, and Kim KS. **2008**. Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. *J Neurochem* 104(2):316-24.
199. Horvat S, Beyer C, Arnold S. **2006**. Effect of hypoxia on the transcription pattern of subunit isoforms and the kinetics of cytochrome c oxidase in cortical astrocytes and cerebellar neurons. *J Neurochem*; 99(3):937-51.
200. Höslí E, Höslí L. **1993**. Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*; 40(4):477-506.
201. Hotamisligil GS. **2006**. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*; 444(7121):860-7.
202. Howard CV, and Reed MG. **1998**. Unbiased Stereology. *Ed Bios Scientific Publishers (UK)*.
203. Hubbard RE, Pike AC, Brzozowski AM, Walton J, Bonn T, Gustafsson JA, Carlquist M. **2000**. Structural insights into the mechanisms of agonism and antagonism in oestrogen receptor isoforms. *Eur J Cancer*; 36 Suppl 4:S17-8.
204. Hutchison JB. **1991**. Hormonal control of behaviour: steroid action in the brain. *Curr Opin Neurobiol*; 1(4):562-70.
205. Hutchison JB, Beyer C, Green S, Wozniak A. **1994**. Brain formation of oestrogen in the mouse: sex dimorphism in aromatasedevelopment. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 49(4-6):407-15.

206. Huynh HT, Pollak M. **1993**. Insulin-like growth factor I gene expression in the uterus is stimulated by tamoxifen and inhibited by the pure antiestrogen ICI 182780. *Cancer Res*; 53(23):5585-8.
207. Hyder SM, Stancel GM, Chiappetta C, Murthy L, Boettger-Tong HL, Makela S. **1996**. Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res*; 56(17):3954-60.
208. Innocenti GM, Clarke S, and Koppel H. **1983**. Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. II. Development and relations with axonal pathways. *Brain Res* 313:55-66.
209. Inoue K. **2002**. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia*; 40(2):156-63.
210. Irwin RW, Yao J, To J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD. **2012**. Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *J Neuroendocrinol*; 24(1):236-48.
211. Iseda T, Nishio T, Kawaguchi S, Yamamoto M, Kawasaki T, Wakisaka S. **2004**. Spontaneous regeneration of the corticospinal tract after transection in young rats: a key role of reactive astrocytes in making favorable and unfavorable conditions for regeneration. *Neuroscience*; 126(2):365-74.
212. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. **2003**. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem*; 278(38):36373-9.
213. Janeczko K. **1993**. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci*; 11(2):139-47.
214. Jeng SR, Pasquier J, Yueh WS, Chen GR, Lee YH, Dufour S, Chang CF. **2012**. Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain-pituitary-ovarian axis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) reveals steroid dependent and independent mechanisms. *Gen Comp Endocrinol*; 175(1):163-72.
215. Jensen MB, Finsen B, Zimmer J. **1997**. Morphological and immunophenotypic microglial changes in the denervated fascia dentata of adult rats: correlation with blood-brain barrier damage and astroglial reactions. *Exp Neurol*; 143(1):103-16.
216. Jobin C, Larochelle C, Parpal H, Coyle PK, Duquette P. **2010**. Gender issues in multiple sclerosis: an update. *Womens Health (Lond Engl)*; 6(6):797-820.
217. Johnson RT, Breedlove SM, Jordan CL. **2008**. Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. *J Comp Neurol*; 511(5):599-609.
218. Jones EA, Sun D, Kobierski L, Symes AJ. **2003**. NFAT4 is expressed in primary astrocytes and activated by glutamate. *J Neurosci Res*; 72(2):191-7.
219. Jordan VC. **1976**. Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata. *Eur J Cancer*; 12(6):419-24.
220. Juliet PA, Mao X, Del Bigio MR. **2008**. Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products. *Brain Res*; 1210:230-9.
221. Kadenbach B, Stroh A, Becker A, Eckerskorn C, Lottspeich F. **1990**. Tissue- and species-specific expression of cytochrome c oxidase isozymes in vertebrates. *Biochim Biophys Acta*; 1015(2):368-72.
222. Kadenbach B, Stroh A, Hüther FJ, Reimann A, Steverding D. **1991**. Evolutionary aspects of cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr*; 23(2):321-34.

Bibliografía

223. Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM. **2000**. Principios de neurociencia. Cuarta Edición. *McGraw-Hill-Interamericana*.
224. Karbowski M, Youle RJ. **2003**. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ*; 10(8):870-80.
225. Kassiou M, Meikle SR, Banati RB. **2005**. Ligands for peripheral benzodiazepine binding sites in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev*; 48(2):207-10.
226. Kaye W. **2008**. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiol Behav*; 94(1):121-35.
227. Kelly MJ, Rønnekleiv OK. **2008**. Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol*; 290(1-2):14-23.
228. Khanna R, Roy L, Zhu X, Schlichter LC. **2001**. K⁺ channels and the microglial respiratory burst. *Am J Physiol Cell Physiol*; 280(4):C796-806.
229. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. **1992**. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and pr. *J Exp Med*; 176(5):1355-64.
230. Kielian T. **2008**. Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J Neurochem* 106(3):1000-16.
231. Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, Ogawa M, Ishizaki Y, Kitamura T, Shozawa Y, Hayasaka K. **2005**. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Toothneuropathy type 2A. *Hum Genet*; 116(1-2):23-7.
232. Kulkarni J, Garland KA, Scaffidi A, Headey B, Anderson R, de Castella A, Fitzgerald P, Davis SR. **2006**. A pilot study of hormone modulation as a new treatment for mania in women with bipolar affective disorder. *Psychoneuroendocrinology*; 31(4):543-7.
233. Kilpatrick LA, Zald DH, Pardo JV, Cahill LF. **2006**. Sex-related differences in amygdala functional connectivity during resting conditions. *Neuroimage*; 30(2):452-61.
234. Kim SU, and de Vellis J. **2005**. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81:302-313.
235. Kim S, Steelman AJ, Koito H, Li J. **2011**. Astrocytes promote TNF-mediated toxicity to oligodendrocyte precursors. *J Neurochem*; 116(1):53-66.
236. Kimelberg HK. **1988**. Glial cell receptors. *Raven, New York*.
237. Kimelberg HK, Feustel PJ, Jin Y, Paquette J, Boulos A, Keller RW Jr, Tranmer BI. **2000**. Acute treatment with tamoxifen reduces ischemic damage following middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport*; 11(12):2675-9.
238. Kimelberg HK, Jin Y, Charniga C, Feustel PJ. **2003**. Neuroprotective activity of tamoxifen in permanent focal ischemia. *J Neurosurg*;99(1):138-42.
239. Kirchhoff F, Dringen R, and Giaume C. **2001**. Pathways of neuron-astrocyte interactions and their role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:159-169.
240. Klein MA, Möller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G. **1997**. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*; 19(3):227-33.

241. Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. **1986**. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*; 46(7):1053-61.
242. Kleinman D, Karas M, Danilenko M, Arbell A, Roberts CT, LeRoith D, Levy J, Sharoni Y. **1996**. Stimulation of endometrial cancer cell growth by tamoxifen is associated with increased insulin-like growth factor (IGF)-I induced tyrosine phosphorylation and reduction in IGF binding proteins. *Endocrinology*; 137(3):1089-95.
243. Knerlich F, Schilling L, Görlach C, Wahl M, Ehrenreich H, Sirén AL. **1999**. Temporal profile of expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1beta and interleukin converting enzyme after cryogenic lesion of the rat parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res*; 68(1-2):73-87.
244. Konat GW, Krasowska-Zoladek A, Kraszpulski M. **2008**. Statins enhance toll-like receptor 4-mediated cytokine gene expression in astrocytes: implication of Rho proteins in negative feedback regulation. *J Neurosci Res*; 86(3):603-9.
245. Krasowska-Zoladek A, Banaszewska M, Kraszpulski M, Konat GW. **2007**. Kinetics of inflammatory response of astrocytes induced by TLR 3 and TLR4 ligation. *J Neurosci Res*; 85(1):205-12.
246. Kreutzberg GW. **1996**. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
247. Kuhlmann AC, Guilarte TR. **1997**. The peripheral benzodiazepine receptor is a sensitive indicator of domoic acid neurotoxicity. *Brain Res*; 751(2):281-8.
248. Kuhlmann AC, Guilarte TR. **1999**. Regional and temporal expression of the peripheral benzodiazepine receptor in MPTP neurotoxicity. *Toxicol Sci*; 48(1):107-16.
249. Kuhlmann AC, Guilarte TR. **2000**. Cellular and subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors after trimethyltin neurotoxicity. *J Neurochem*; 74(4):1694-704.
250. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. **1996**. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 93(12):5925-30.
251. Küppers E, Beyer C. **1999**. Expression of estrogen receptor-alpha and beta mRNA in the developing and adult mouse striatum. *Neurosci Lett*; 276(2):95-8.
252. Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Bliek AM. **1999**. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell*; 4(5):815-26.
253. Lacor P, Gandolfo P, Tonon MC, Brault E, Dalibert I, Schumacher M, Benavides J, Ferzaz B. **1999**. Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res*; 815(1):70-80.
254. Lai AY, Todd KG. **2008**. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia*; 56(3):259-70.
255. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. **2004**. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev*; 15(1):33-48.
256. Lauber ME, Sarasin A, Lichtensteiger W. **1997**. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 61(3-6):359-64.

Bibliografía

257. Lavaque E, Mayen A, Azcoitia I, Tena-Sempere M, Garcia-Segura LM. **2006b**. Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450scc, and aromatase in the olivocerebellar system. *J Neurobiol*; 66(3):308-18.
258. Lavaque E, Sierra A, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. **2006a**. Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience*; 138(3):741-7.
259. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, and Gordon S. **1990**. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
260. Layé S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. **1994**. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res*; 27(1):157-62.
261. Le Fur G, Vaucher N, Perrier ML, Flamier A, Benavides J, Renault C, Dubroeuq MC, Guérémy C, Uzan A. **1983**. Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [3H]RO5-4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies. *Life Sci*; 33(5):449-57.
262. Le Roux PD, Reh TA. **1996**. Reactive astroglia support primary dendritic but not axonal outgrowth from mouse cortical neurons in vitro. *Exp Neurol*; 137(1):49-65.
263. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. **2004**. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*; 15(11):5001-11.
264. Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. **2010**. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*; 33(10):1539-56.
265. Lee SJ, McEwen BS. **2001**. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 41:569-91.
266. Lei DL, Long JM, Hengemihle J, O'Neill J, Manaye KF, Ingram DK, Mouton PR. **2003**. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. *Neuroscience*; 121(3):659-66.
267. Leonelli E, Yague JG, Ballabio M, Azcoitia I, Magnaghi V, Schumacher M, Garcia-Segura LM, Melcangi RC. **2005**. Ro5-4864, a synthetic ligand of peripheral benzodiazepine receptor, reduces aging-associated myelin degeneration in the sciatic nerve of male rats. *Mech Ageing Dev*; 126(11):1159-63.
268. Lephart ED, Ojeda SR. **1990**. Hypothalamic aromatase activity in male and female rats during juvenile peripubertal development. *Neuroendocrinology*; 51(4):385-93.
269. Lewis DK, Johnson AB, Stohlgren S, Harms A, Sohrabji F. **2008**. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *J Neuroimmunol*; 195(1-2):47-59.
270. Li F, Zhu S, Wu C, Yan C, Liu Y, Shugan L. **2011**. Neuroinflammation and cell therapy for Parkinson's disease. *Front Biosci (Schol Ed)*; 3:1407-20.
271. Li L, Haynes MP, Bender JR. **2003**. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100(8):4807-12.
272. Liao CK, Wang SM, Chen YL, Wang HS, Wu JC. **2010**. Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3. *Int J Biochem Cell Biol*; 42(5):762-70.

273. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, and Levison SW. **2004**. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092-1100.
274. Lieberman BA. **1997**. The estrogen receptor activity cycle: dependence on multiple protein-protein interactions. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*; 7(1-2):43-59.
275. Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C. **2003**. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol*; 17(2):203-8.
276. Lindsay RM. **1986**. Reactive gliosis. *En Fedoroff S and Vernadakis A. (eds) Astrocytes. Vol. 3. Academic Press, Orlando, pp. 231-262.*
277. Liu M, Hurn PD, Roselli CE, Alkayed NJ. **2007**. Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb Blood Flow Metab*; 27(1):135-41.
278. Liu F, Day M, Muñiz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. **2008**. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci*; 11(3):334-43.
279. Liu L, Benten WP, Wang L, Hao X, Li Q, Zhang H, Guo D, Wang Y, Wunderlich F, Qiao Z. **2005**. Modulation of *Leishmania donovani* infection and cell viability by testosterone in bone marrow-derived macrophages: signaling via surface binding sites. *Steroids*; 70(9):604-14.
280. Liu B, Hong JS. **2003**. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*; 304(1):1-7.
281. MacLusky NJ, Walters MJ, Clark AS, Toran-Allerand CD. **1994**. Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Mol Cell Neurosci*; 5(6):691-8.
282. Maggi A, Ciana P, Belcredito S, Vegeto E. **2004**. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu Rev Physiol*; 66:291-313.
283. Magistretti PJ. **2006**. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209(Pt 12):2304-11.
284. Magnus T, Coksaygan T, Korn T, Xue H, Arumugam TV, Mughal MR, Eckley DM, Tang SC, Detolla L, Rao MS, Cassiani-Ingoni R, and Mattson MP. **2007**. Evidence that nucleocytoplasmic Olig2 translocation mediates brain-injury-induced differentiation of glial precursors to astrocytes. *J Neurosci Res* 85(10):2126-37.
285. Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. **2001**. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci*; 21(18):7046-52.
286. Matsumoto Y, Hanawa H, Tsuchida M, Abo T. **1993**. In situ inactivation of infiltrating T cells in the central nervous system with autoimmune encephalomyelitis. The role of astrocytes. *Immunology*; 79(3):381-90.
287. Matsumoto A, Arai Y. **1979**. Synaptogenic effect of estrogen on the hypothalamic arcuate nucleus of the adult female rat. *Cell Tissue Res*; 198(3):427-33.
288. Matsumoto A, Arai Y. **1981**. Neuronal plasticity in the deafferented hypothalamic arcuate nucleus of adult female rats and its enhancement by treatment with estrogen. *J Comp Neurol*; 197(2):197-205.

Bibliografía

289. Matsumoto A, Arai Y. **1980**. Sexual dimorphism in 'wiring pattern' in the hypothalamic arcuate nucleus and its modification by neonatal hormonal environment. *Brain Res*; 190(1):238-42.
290. Matsumoto A, Arai Y. **1986**. Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Neuroendocrinology*; 42(3):232-6.
291. Mayeux PR. **1997**. Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Toxicol Environ Health*; 51(5):415-35.
292. McGeer EG, Singh EA, McGeer PL. **1988**. Peripheral-type benzodiazepine binding in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*; 2(4):331-6.
293. McGeer PL, McGeer EG. **2001**. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*; 22(6):799-809.
294. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. **1999**. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*; 20(3):321-44.
295. McKenna NJ, O'Malley BW. **2002**. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*; 108(4):465-74.
296. Meczekalski B, Czyzyk A. **2009**. Selective estrogen receptor modulators in treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ginekol Pol*; 80(3):213-7.
297. Mehta SH, Dhandapani KM, De Sevilla LM, Webb RC, Mahesh VB, Brann DW. **2003**. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, reduces ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the ovariectomized female rat. *Neuroendocrinology*; 77(1):44-50.
298. Meisel RL, Sachs BD. **1994**. The physiology of male sexual behavior. *Physiology of Reproduction*, edited by Knobil E, Neill JD. New York: Raven, 1994, p. 3–106.
299. Mela V, Díaz F, Gertler A, Solomon G, Argente J, Viveros MP, Chowen JA. **2012**. Neonatal treatment with a pegylated leptin antagonist has a sexually dimorphic effect on hypothalamic trophic factors and neuropeptide levels. *J Neuroendocrinol*. *En prensa*.
300. Mendez P, Wandosell F, Garcia-Segura LM. **2006**. Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms. *Front Neuroendocrinol*; 27(4):391-403.
301. Mendez P, Garcia-Segura LM. **2006**. Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells. *Endocrinology*; 147(6):3027-39.
302. Merry DE, Korsmeyer SJ. **1997**. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*; 20:245-67.
303. Mhyre AJ, Dorsa DM. **2006**. Estrogen activates rapid signaling in the brain: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in neurons and glia. *Neuroscience*; 138(3):851-8.
304. Miettinen H, Kononen J, Haapasalo H, Helén P, Sallinen P, Harjuntausta T, Helin H, Alho H. **1995**. Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. *Cancer Res*; 55(12):2691-5.
305. Mills CD, Bitler JL, Woolf CJ. **2005**. Role of the peripheral benzodiazepine receptor in sensory neuron regeneration. *Mol Cell Neurosci*; 30(2):228-37.

306. Mills C, Makwana M, Wallace A, Benn S, Schmidt H, Tegeder I, Costigan M, Brown RH Jr, Raivich G, Woolf CJ. **2008**. Ro5-4864 promotes neonatal motor neuron survival and nerve regeneration in adult rats. *Eur J Neurosci*; 27(4):937-46.
307. Minghetti L, Levi G. **1998**. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol*; 54(1):99-125.
308. Mirzaton A, Spence RD, Naranjo KC, Saldanha CJ, Schlinger BA. **2010**. Injury-induced regulation of steroidogenic gene expression in the cerebellum. *J Neurotrauma*; 27(10):1875-82.
309. Misiak M, Singh S, Drewlo S, Beyer C, Arnold S. **2010**. Brain region-specific vulnerability of astrocytes in response to 3-nitropropionic acid is mediated by cytochrome c oxidase isoform expression. *Cell Tissue Res*; 341(1):83-93.
310. Mission JP, Takahashi T, and Caviness VS Jr. **1991**. Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 4:138-148.
311. Möller T. **2010**. Neuroinflammation in Huntington's disease. *J Neural Transm*; 117(8):1001-8.
312. Möller T, Nolte C, Burger R, Verkhratsky A, Kettenmann H. **1997**. Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced $[Ca^{2+}]_i$ signaling in mouse microglia. *J Neurosci*; 17(2):615-24.
313. Möller T, Hanisch UK, Ransom BR. **2000**. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem*; 75(4):1539-47.
314. Mong JA, Glaser E, McCarthy MM. **1999**. Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner. *J Neurosci*; 19(4):1464-72.
315. Moore S, Thanos S. **1996**. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol*; 48(4-5):441-60.
316. Moosmann B, Behl C. **1999**. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96(16):8867-72.
317. Mor G, Nilssen J, Horvath T, Bechmann I, Brown S, Garcia-Segura LM, Naftolin F. **1999**. Estrogen and microglia: A regulatory system that affects the brain. *J Neurobiol*; 40(4):484-96.
318. Morest DK, and Silver J. **2003**. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* 43:6-18.
319. Moroz IA, Rajabi H, Rodaros D, Stewart J. **2003**. Effects of sex and hormonal status on astrocytic basic fibroblast growth factor-2 and tyrosine hydroxylase immunoreactivity after medial forebrain bundle 6-hydroxydopamine lesions of the midbrain dopamine neurons. *Neuroscience*; 118(2):463-76.
320. Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM. **2008**. Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J Comp Neurol*; 506(5):851-9.
321. Morse JK, Scheff SW, DeKosky ST. **1986**. Gonadal steroids influence axon sprouting in the hippocampal dentate gyrus: a sexually dimorphic response. *Exp Neurol*; 94(3):649-58.
322. Morse JK, DeKosky ST, Scheff SW. **1992**. Neurotrophic effects of steroids on lesion-induced growth in the hippocampus. II. Hormone replacement. *Exp Neurol*; 118(1):47-52.

Bibliografía

323. Motelica-Heino I, Castanier M, Corbier P, Edwards DA, Roffi J. **1988**. Testosterone levels in plasma and testes of neonatal mice. *J Steroid Biochem*; 31(3):283-6.
324. Mourlevat S, Troadec JD, Ruberg M, and Michel PP. **2003**. Prevention of dopaminergic neuronal death by cyclic AMP in mixed neuronal/glia mesencephalic cultures requires the repression of presumptive astrocytes. *Mol Pharmacol* 64:578-586.
325. Mucke L, Oldstone MB, Morris JC, and Nerenberg MI. **1991**. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol* 3(5):465-74.
326. Myer DJ, Gurkoff G, Lee SM, Hovda DA, and Sofroniew MV. **2006**. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129:2761-2772.
327. Myers RR, Shubayev VI. **2011**. The ology of neuropathy: an integrative review of the role of neuroinflammation and TNF- α axonal transport in neuropathic pain. *J Peripher Nerv Syst*; 16(4):277-86.
328. Nadeau S, Rivest S. **1999**. Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge. *J Neuropathol Exp Neurol*; 58(1):61-77.
329. Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. **1971a**. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab*; 33(2):368-70.
330. Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. **1971b**. Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human fetuses. *J Endocrinol*; 51(4):795-6.
331. Naftolin F, Brown-Grant K, Corker CS. **1972**. Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrous cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle. *J Endocrinol*; 53(1):17-30.
332. Nakajima K, Tohyama Y, Maeda S, Kohsaka S, Kurihara T. **2007**. Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. *Neurochem Int*; 50(6):807-20.
333. Nave KA, and Trapp BD. **2008**. Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* 31:535-61.
334. Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H. **1997a**. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med*; 185(2):305-16.
335. Neumann H, Schmidt H, Wilharm E, Behrens L, Wekerle H. **1997b**. Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J Exp Med*; 186(12):2023-31.
336. Neumann H, Boucraut J, Hahnel C, Misgeld T, Wekerle H. **1996**. Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur J Neurosci*; 8(12):2582-90.
337. Newman EA. **2003**. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-542.
338. Ng YK, Ling EA. **1997**. Induction of major histocompatibility class II antigen on microglial cells in postnatal and adult rats following intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. *Neurosci Res*; 28(2):111-8.
339. Nguyen A, Rosner A, Milovanovic T, Hope C, Planutis K, Saha B, Chaiwun B, Lin F, Imam SA, Marsh JL, Holcombe RF. **2005**. Wnt pathway component LEF1 mediates tumor cell

invasion and is expressed in human and murine breast cancers lacking ErbB2 (her-2/neu) overexpression. *Int J Oncol*; 27(4):949-56.

340. Niemeier JP, Marwitz JH, Leshner K, Walker WC, Bushnik T. **2007**. Gender differences in executive functions following traumatic brain injury. *Neuropsychol Rehabil*; 17(3):293-313.

341. Noctor SC, Martinez-Cerdeño V, and Kriegstein AR. **2007**. Neural stem and progenitor cells in cortical development. *Novartis Found Symp* 288:59-73.

342. Noonan CW, Kathman SJ, White MC. **2002**. Prevalence estimates for MS in the United States and evidence of an increasing trend for women. *Neurology*; 58(1):136-8.

343. Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, and Brosnan CF. **1992**. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 17:877-885.

344. Oh U, Fujita M, Ikonomidou VN, Evangelou IE, Matsuura E, Harberts E, Fujimura Y, Richert ND, Ohayon J, Pike VW, Zhang Y, Zoghbi SS, Innis RB, Jacobson S. **2011**. Translocator protein PET imaging for glial activation in multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*; 6(3):354-61.

345. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G. **2003**. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*; 278(10):7743-6.

346. Olsson T, Kelic S, Edlund C, Bakhiet M, Höjeberg B, van der Meide PH, Ljungdahl A, Kristensson K. **1994**. Neuronal interferon-gamma immunoreactive molecule: bioactivities and purification. *Eur J Immunol*; 24(2):308-14.

347. Oñate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. **1995**. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*; 270(5240):1354-7.

348. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T. **2010**. Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathog*; 6(7):e1001012.

349. Orikasa C, Sakuma Y. **2010**. Estrogen configures sexual dimorphism in the preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice. *J Comp Neurol*; 518(17):3618-29.

350. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC. **2006**. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*; 5(11):932-6.

351. Owen F, Poulter M, Waddington JL, Mashal RD, Crow TJ. **1983**. [3H]R05-4864 and [3H]flunitrazepam binding in kainate-lesioned rat striatum and in temporal cortex of brains from patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res*; 278(1-2):373-5.

352. Pang SF, Caggiula AR, Gay VL, Goodman RL, Pang CS. **1979**. Serum concentrations of testosterone, oestrogens, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male and female rats during the critical period of neural sexual differentiation. *J Endocrinol*; 80(1):103-10.

353. Pang SF, Tang F. **1984**. Sex differences in the serum concentrations of testosterone in mice and hamsters during their critical periods of neural sexual differentiation. *J Endocrinol*; 100(1):7-11.

354. Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro RF Jr, Stanley WC, Walsh K. **2011**. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 302(1):H167-79.

355. Park KM, Bowers WJ. **2010**. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal*; 22(7):977-83.

Bibliografía

356. Patrone C, Andersson S, Korhonen L, Lindholm D. **1999**. Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 96(19):10905-10.
357. Pawlak J, Brito V, Küppers E, Beyer C. **2005**. Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res*; 138(1):1-7.
358. Pecina P, Houstková H, Hansíková H, Zeman J, Houstek J. **2004**. Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res*; 53 Suppl 1:S213-23.
359. Pekmezovic T, Svetel M, Maric J, Dujmovic-Basuroski I, Dragasevic N, Keckarevic M, Romac S, Kostic VS. **2007**. Survival of Huntington's disease patients in Serbia: longer survival in female patients. *Eur J Epidemiol*; 22(8):523-6.
360. Pekny M, and Nilsson M. **2005**. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434.
361. Penkowa M, Giralto M, Lago N, Camats J, Carrasco J, Hernández J, Molinero A, Campbell IL, Hidalgo J. **2003**. Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury. *Exp Neurol*; 181(2):130-48.
362. Perea G, and Araque A. **2005**. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25(9):2192-203.
363. Perea G, and Araque A. **2006**. Synaptic information processing by astrocytes. *J Physiol Paris* 99(2-3):92-7.
364. Perea G, and Araque A. **2007**. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317(5841):1083-6.
365. Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin PJ. **2003**. Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? *Intensive Care Med*; 29(8):1245-52.
366. Pesaresi M, Maschi O, Giatti S, Garcia-Segura LM, Caruso D, Melcangi RC. **2010**. Sex differences in neuroactive steroid levels in the nervous system of diabetic and non-diabetic rats. *Horm Behav*; 57(1):46-55.
367. Peterson RS, Saldanha CJ, Schlinger BA. **2001**. Rapid upregulation of aromatase mRNA and protein following neural injury in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neuroendocrinol*; 13(4):317-23.
368. Peterson RS, Lee DW, Fernando G, Schlinger BA. **2004**. Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. *J Comp Neurol*; 475(2):261-9.
369. Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. **1959**. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*; 65:369-82.
370. Picazo O, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. **2003**. Neuroprotective and neurotoxic effects of estrogens. *Brain Res*; 990(1-2):20-7.
371. Pierman S, Douhard Q, Bakker J. **2008**. Evidence for a role of early oestrogens in the central processing of sexually relevant olfactory cues in female mice. *Eur J Neurosci*; 27(2):423-31.
372. Pike CJ. **1999**. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem*; 72(4):1552-63.

373. Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE. **2000a**. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 74(5):261-8.
374. Pike AC, Brzozowski AM, Walton J, Hubbard RE, Bonn T, Gustafsson JA, Carlquist M. **2000b**. Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Biochem Soc Trans*; 28(4):396-400.
375. Pistrutto G, Mancuso C, Tringali G, Perretti M, Preziosi P, Navarra P. **1998**. The relative contribution of constitutive and inducible cyclooxygenase activity to lipopolysaccharide-induced prostaglandin production by primary cultures of rat hypothalamic astrocytes. *Neurosci Lett*; 246(1):45-8.
376. Pistrutto G, Franzese O, Pozzoli G, Mancuso C, Tringali G, Preziosi P, Navarra P. **1999**. Bacterial lipopolysaccharide increases prostaglandin production by rat astrocytes via inducible cyclo-oxygenase: evidence for the involvement of nuclear factor kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*; 263(2):570-4.
377. Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H. **1997**. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res*; 48(4):287-98.
378. Pointis G, Latreille MT, Mignot TM, Janssens Y, Cedard L. **1980**. Regulation of testosterone synthesis in the fetal mouse testis. *J Steroid Biochem*; 11(5-6):1609-12.
379. Polazzi E, Gianni T, Contestabile A. **2001**. Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. *Glia*; 36(3):271-80.
380. Polazzi E, Contestabile A. **2002**. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci*; 13(3):221-42.
381. Popovich PG, Wei P, Stokes BT. **1997**. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*; 377(3):443-64.
382. Pozzo Miller LD, Aoki A. **1991**. Stereological analysis of the hypothalamic ventromedial nucleus. II. Hormone-induced changes in the synaptogenic pattern. *Brain Res Dev Brain Res*; 61(2):189-96.
383. Prewitt CM, Niesman IR, Kane CJ, Houlié JD. **1997**. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp Neurol*; 148(2):433-43.
384. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. **2007**. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*; 55(5):453-62.
385. Qu Q, Zheng H, Dahllund J, Laine A, Cockcroft N, Peng Z, Koskinen M, Hemminki K, Kangas L, Väänänen K, Härkönen P. **2000**. Selective estrogenic effects of a novel triphenylethylene compound, FC1271a, on bone, cholesterol level, and reproductive tissues in intact and ovariectomized rats. *Endocrinology*; 141(2):809-20.
386. Quesada A, Lee BY, Micevych PE. **2008**. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol*; 68(5):632-44.
387. Quintana A, Molinero A, Borup R, Nielsen FC, Campbell IL, Penkowa M, Hidalgo J. **2008**. Effect of astrocyte-targeted production of IL-6 on traumatic brain injury and its impact on the cortical transcriptome. *Dev Neurobiol*; 68(2):195-208.
388. Raber J, Sorg O, Horn TF, Yu N, Koob GF, Campbell IL, Bloom FE. **1998**. Inflammatory cytokines: putative regulators of neuronal and neuro-endocrine function. *Brain Res Brain Res Rev*; 26(2-3):320-6.

Bibliografía

389. Raetz CR. **1990**. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem*; 59:129-70.
390. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, and Kreutzberg GW. **1999**. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
391. Ramirez MC, Luque GM, Ornstein AM, Becu-Villalobos D. **2010**. Differential neonatal testosterone imprinting of GH-dependent liver proteins and genes in female mice. *J Endocrinol*; 207(3):301-8.
392. Ramírez-Expósito MJ y Martínez-Martos JM. **1998**. Estructura y funciones de la microglía en el sistema nervioso central. Respuesta a procesos degenerativos. *Rev Neurol* 26:600-611.
393. Rao ML, Kölsch H. **2003**. Effects of estrogen on brain development and neuroprotection--implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*; 28 Suppl 2:83-96.
394. Rasia-Filho AA, Xavier LL, dos Santos P, Gehlen G, Achaval M. **2002**. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res Bull*; 58(1):67-75.
395. Ratcliff JJ, Greenspan AI, Goldstein FC, Stringer AY, Bushnik T, Hammond FM, Novack TA, Whyte J, Wright DW. **2007**. Gender and traumatic brain injury: do the sexes fare differently? *Brain Inj*; 21(10):1023-30.
396. Rau SW, Dubal DB, Böttner M, Gerhold LM, Wise PM. **2003**. Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. *J Neurosci*; 23(36):11420-6.
397. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. **1999**. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*; 13(2):307-19.
398. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. **2002**. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol*; 16(1):100-15.
399. Reeves MJ, Bushnell CD, Howard G, Gargano JW, Duncan PW, Lynch G, Khatiwoda A, Lisabeth L. **2008**. Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. *Lancet Neurol*; 7(10):915-26.
400. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, and Gage FH. **1997**. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.
401. Riecher-Rössler A, Häfner H. **2000**. Gender aspects in schizophrenia: bridging the border between social and biological psychiatry. *Acta Psychiatr Scand Suppl*; (407):58-62.
402. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, Zähringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Lopnow H, Schönbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR. **1996**. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol*; 216:39-81.
403. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. **2010**. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*; 28:321-42.
404. Roemgens A, Singh S, Beyer C, Arnold S. **2011**. Inducers of chemical hypoxia act in a gender- and brain region-specific manner on primary astrocyte viability and cytochrome C oxidase. *Neurotox Res*; 20(1):1-14.

405. Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombès A. **2002**. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*; *115(Pt 8)*:1663-74.
406. Rone MB, Liu J, Blonder J, Ye X, Veenstra TD, Young JC, Papadopoulos V. **2009**. Targeting and insertion of the cholesterol-binding translocator protein into the outer mitochondrial membrane. *Biochemistry*; *48(29)*:6909-20.
407. Roos RA, Vegter-van der Vlis M, Hermans J, Elshove HM, Moll AC, van de Kamp JJ, Bruyn GW. **1991**. Age at onset in Huntington's disease: effect of line of inheritance and patient's sex. *J Med Genet*; *28(8)*:515-9.
408. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong. **2007**. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*; *115(5)*:e69-171.
409. Rothwell N. **2003**. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain Behav Immun*; *17(3)*:152-7.
410. Rothwell NJ, Strijbos PJ. **1995**. Cytokines in neurodegeneration and repair. *Int J Dev Neurosci*; *13(3-4)*:179-85.
411. Rubinow MJ, Juraska JM. **2009**. Neuron and glia numbers in the basolateral nucleus of the amygdala from preweaning through old age in male and female rats: a stereological study. *J Comp Neurol*; *512(6)*:717-25.
412. Rutanen EM, Heikkinen J, Halonen K, Komi J, Lammintausta R, Ylikorkala O. **2003**. Effects of ospemifene, a novel SERM, on hormones, genital tract, climacteric symptoms, and quality of life in postmenopausal women: a double-blind, randomized trial. *Menopause*; *10(5)*:433-9.
413. Sáez, GT. **2005**. Biopatología de los radicales libres. *Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías*. (Ana María Pascual Leone ed.) Real Academia de Farmacia de Madrid 201-224.
414. Saijo K, Collier JG, Li AC, Katzenellenbogen JA, Glass CK. **2011**. An ADIOL-ER β -CtBP transrepression pathway negatively regulates microglia-mediated inflammation. *Cell*; *145(4)*:584-95.
415. Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K. **2003**. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology*; *144(10)*:4466-77.
416. Saldanha CJ, Schlinger BA. **1997**. Estrogen synthesis and secretion in the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). *Gen Comp Endocrinol*; *105(3)*:390-401.
417. Sánchez FJ, Vilain E. **2010**. Genes and brain sex differences. *Prog Brain Res*; *186*:65-76.
418. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. **2004**. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*; *46(3)*:225-51.
419. Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED. **1991**. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology*; *129(6)*:2834-44.

Bibliografía

420. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. **2003**. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci*; 116(Pt 13):2763-74.
421. Santel A, Fuller MT. **2001**. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*; 114(Pt 5):867-74.
422. Sasaki T, Hirabayashi J, Manya H, Kasai K, and Endo T. **2004**. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology* 14(4):357-63.
423. Sastry PS, Rao KS. **2000**. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem*; 74(1):1-20.
424. Savolainen-Peltonen H, Luoto NM, Kangas L, Häyry P. **2004**. Selective estrogen receptor modulators prevent neointima formation after vascular injury. *Mol Cell Endocrinol*; 227(1-2):9-20.
425. Sawada M, Alkayed NJ, Goto S, Crain BJ, Traystman RJ, Shaivitz A, Nelson RJ, Hurn PD. **2000**. Estrogen receptor antagonist ICI182,780 exacerbates ischemic injury in female mouse. *J Cereb Blood Flow Metab*; 20(1):112-8.
426. Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T. **1995**. Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int J Dev Neurosci*; 13(3-4):253-64.
427. Schwendimann RN, Alekseeva N. **2007**. Gender issues in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*; 79:377-92.
428. Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. **2005**. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat*; 30(2-3):144-57.
429. Shelly W, Draper MW, Krishnan V, Wong M, Jaffe RB. **2008**. Selective estrogen receptor modulators: an update on recent clinical findings. *Obstet Gynecol Surv*; 63(3):163-81.
430. Sherwin BB. **2002**. Estrogen and cognitive functioning in men with mild cognitive impairment. *J Mol Neurosci*; 19(1-2):219-23.
431. Shubayev VI, Kato K, Myers RR. **2010**. Cytokines in Pain. *Kruger L, Light AR, editors. Translational Pain Research: From Mouse to Man. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010. Chapter 8. Frontiers in Neuroscience.*
432. Sierra A. **2004**. Neurosteroids: the StAR protein in the brain. *J Neuroendocrinol*; 16(9):787-93.
433. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. **2010**. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 7(4):483-95.
434. Sierra A, Lavaque E, Perez-Martin M, Azcoitia I, Hales DB, Garcia-Segura LM. **2003**. Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur J Neurosci*; 18(6):1458-67.
435. Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K. **2007**. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia*; 55(4):412-24.
436. Sierra A, Gottfried-Blackmore A, Milner TA, McEwen BS, Bulloch K. **2008**. Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia*; 56(6):659-74.

437. Siffrin V, Vogt J, Radbruch H, Nitsch R, Zipp F. **2010**. Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy. *Trends Neurosci*; 33(4):202-10.
438. Silver J, and Miller JH. **2004**. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
439. Simerly RB, Carr AM, Zee MC, Lorang D. **1997**. Ovarian steroid regulation of estrogen and progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *J Neuroendocrinol*; 8(1):45-56.
440. Simpkins JW, Wen Y, Perez E, Yang S, Wang X. **2005**. Role of nonfeminizing estrogens in brain protection from cerebral ischemia: an animal model of Alzheimer's disease neuropathology. *Ann N Y Acad Sci*; 1052:233-42.
441. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarnah B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD. **1994**. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*; 15(3):342-55.
442. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. **1999**. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci*; 19(7):2455-63.
443. Singh S, Misiak M, Beyer C, Arnold S. **2009**. Cytochrome c oxidase isoform IV-2 is involved in 3-nitropropionic acid-induced toxicity in striatal astrocytes. *Glia*; 57(14):1480-91.
444. Skoff AM, Zhao C, Adler JE. **2009**. Interleukin-1alpha regulates substance P expression and release in adult sensory neurons. *Exp Neurol*; 217(2):395-400.
445. Slewa-Younan S, Green AM, Baguley IJ, Gurka JA, Marosszeky JE. **2004**. Sex differences in injury severity and outcome measures after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*; 85(3):376-9.
446. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. **2001**. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*; 12(8):2245-56.
447. Smith JA, Das A, Butler JT, Ray SK, Banik NL. **2011**. Estrogen or estrogen receptor agonist inhibits lipopolysaccharide induced microglial activation and death. *Neurochem Res*; 36(9):1587-93.
448. Sortino MA, Chisari M, Merlo S, Vancheri C, Caruso M, Nicoletti F, Canonico PL, Copani A. **2004**. Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on beta-amyloid-induced neuronal death. *Endocrinology*; 145(11):5080-6.
449. Soustiel JF, Zaaroor M, Vlodaysky E, Veenman L, Weizman A, Gavish M. **2008**. Neuroprotective effect of Ro5-4864 following brain injury. *Exp Neurol*; 214(2):201-8.
450. Stavru F, Archambaud C, Cossart P. **2011**. Cell biology and immunology of Listeria monocytogenes infections: novel insights. *Immunol Rev*; 240(1):160-84.
451. Steindler DA, and Laywell ED. **2003**. Astrocytes as stem cells: nomenclature, phenotype, and translation. *Glia* 43:62-69.
452. Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT. **2004**. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci*; 117(Pt 7):1201-10.
453. Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Finch CE. **1998**. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci*; 18(9):3180-5.

Bibliografía

454. Streit WJ. **2002**. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*; 40(2):133-9.
455. Streit WJ, Walter SA, and Pennell NA. **1999**. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563–581.
456. Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. **2004**. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*; 45(2):208-12.
457. Strickler R, Stovall DW, Merritt D, Shen W, Wong M, Silfen SL. **2000**. Raloxifene and estrogen effects on quality of life in healthy postmenopausal women: a placebo-controlled randomized trial. *Obstet Gynecol*; 96(3):359-65.
458. Su Z, Yuan Y, Chen J, Zhu Y, Qiu Y, Zhu F, Huang A, He C. **2011**. Reactive astrocytes inhibit the survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells by secreted TNF- α . *J Neurotrauma*; 28(6):1089-100.
459. Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y. **2004**. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem*; 279(50):52726-34.
460. Sugiyama N, Sasayama D, Amano N. **2007**. Remarkable antidepressant augmentation effect of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, in a partial responder to fluvoxamine: a case report. *J Clin Psychiatry*; 68(4):636-7.
461. Sundar Boyalla S, Barbara Victor M, Roemgens A, Beyer C, Arnold S. **2011**. Sex- and brain region-specific role of cytochrome c oxidase in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated astrocyte vulnerability. *J Neurosci Res*; 89(12):2068-82.
462. Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW. **1983**. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol*; 19(5):615-21.
463. Suuronen T, Nuutinen T, Huuskonen J, Ojala J, Thornell A, Salminen A. **2005**. Anti-inflammatory effect of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in microglial cells. *Inflamm Res*; 54(5):194-203.
464. Suzuki S, Gerhold LM, Böttner M, Rau SW, Dela Cruz C, Yang E, Zhu H, Yu J, Cashion AB, Kindy MS, Merchenthaler I, Gage FH, Wise PM. **2007**. Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. *J Comp Neurol*; 500(6):1064-75.
465. Swartz KR, Liu F, Sewell D, Schochet T, Campbell I, Sandor M, Fabry Z. **2001**. Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Res*; 896(1-2):86-95.
466. Syed MM, Phulwani NK, Kielian T. **2007**. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) regulates Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in microglia. *J Neurochem*; 103(4):1461-71.
467. Taanman JW. **1997**. Human cytochrome c oxidase: structure, function, and deficiency. *J Bioenerg Biomembr*; 29(2):151-63.
468. Takahashi N, Tonchev AB, Koike K, Murakami K, Yamada K, Yamashima T, Inoue M. **2004**. Expression of estrogen receptor-beta in the postischemic monkey hippocampus. *Neurosci Lett*; 369(1):9-13.
469. Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada Y. **1988**. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res*; 466(2):201-10.
470. Takuma K, Baba A, Matsuda T. **2004**. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*; 72(2):111-27.

471. Tapia-Gonzalez S, Carrero P, Pernia O, Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y. **2008**. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *J Endocrinol*; 198(1):219-30.
472. Taras TL, Wurz GT, DeGregorio MW. **2001**. In vitro and in vivo biologic effects of Ospemifene (FC-1271a) in breastcancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 77(4-5):271-9.
473. Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavala F. **1993**. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol*; 42(2):177-85.
474. Teter B, Harris-White ME, Frautschy SA, Cole GM. **1999**. Role of apolipoprotein E and estrogen in mossy fiber sprouting in hippocampal slice cultures. *Neuroscience*; 91(3):1009-16.
475. Theodosis DT, Poulain DA, and Oliet SH. **2008**. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 88(3):983-1008.
476. Thomas WE. **1992**. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* 17:61-74.
477. Todd BJ, Schwarz JM, McCarthy MM. **2005**. Prostaglandin-E2: a point of divergence in estradiol-mediated sexual differentiation. *Horm Behav*; 48(5):512-21.
478. Tomás-Camardiel M, Venero JL, Herrera AJ, De Pablos RM, Pintor-Toro JA, Machado A, Cano J. **2005**. Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. *J Neurosci Res*; 80(2):235-46.
479. Toran-Allerand CD. **1976**. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res*; 106(2):407-12.
480. Toran-Allerand CD. **1980**. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro. II. Morphological correlates and hormonal specificity. *Brain Res*; 189(2):413-27.
481. Toran-Allerand CD, Hashimoto K, Greenough WT, Saltarelli M. **1983**. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: III. Effects of estrogen on dendritic differentiation. *Brain Res*; 283(1):97-101.
482. Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Finkelstein DI. **2006**. Estrogen down-regulates glial activation in male mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication. *Brain Res*; 1084(1):28-37.
483. Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Duce JA, Finkelstein DI. **2007**. 17Beta-estradiol reduces nitrotyrosine immunoreactivity and increases SOD1 and SOD2 immunoreactivity in nigral neurons in male mice following MPTP insult. *Brain Res*; 1164:24-31.
484. Tsui KH, Wang PH, Chen CK, Chen YJ, Chiou SH, Sung YJ, Li HY. **2011**. Non-classical estrogen receptors action on human dermal fibroblasts. *Taiwan J Obstet Gynecol*; 50(4):474-8.
485. Turgeon JL, McDonnell DP, Martin KA, Wise PM. **2004**. Hormone therapy: physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science*; 304(5675):1269-73.
486. Turtzo LC, McCullough LD. **2008**. Sex differences in stroke. *Cerebrovasc Dis*; 26(5):462-74.

Bibliografía

487. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. **2003**. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol*; 157(11):1015-22.
488. Veenman L, Papadopoulos V, Gavish M. **2007**. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. *Curr Pharm Des*; 13(23):2385-405.
489. Veenman L, Shandalov Y, Gavish M. **2008**. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*; 40(3):199-205.
490. Vegeto E, Benedusi V, Maggi A. **2008**. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol*; 29(4):507-19.
491. Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A. **2001**. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci*; 21(6):1809-18.
492. Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Ciana P, Chambon P, Maggi A. **2003**. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 100(16):9614-9.
493. Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Etteri S, Maggi A. **2006**. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology*; 147(5):2263-72.
494. Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. **2005**. Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, reduces reactive gliosis and protects hippocampal hilar neurons from kainic acid excitotoxicity. *J Neurosci Res*; 80(1):129-37.
495. Veiga S, Carrero P, Pernia O, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. **2007**. Translocator protein 18 kDa is involved in the regulation of reactive gliosis. *Glia*; 55(14):1426-36.
496. Vilain E. **2000**. Genetics of sexual development. *Annu Rev Sex Res*; 11:1-25.
497. Volkmar FR, Szatmari P, Sparrow SS. **1993**. Sex differences in pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*; 23(4):579-91.
498. Vom Saal FS, Bronson FH. **1980**. Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their bloodtestosterone levels during prenatal development. *Science*; 208(4444):597-9.
499. Von Bartheld CS. **1999**. Systematic bias in an "unbiased" neuronal counting technique. *Anat Rec*; 257(4):119-20.
500. Wade CB, Robinson S, Shapiro RA, Dorsa DM. **2001**. Estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*; 142(6):2336-42.
501. Wakade C, Khan MM, De Sevilla LM, Zhang QG, Mahesh VB, Brann DW. **2008**. Tamoxifen neuroprotection in cerebral ischemia involves attenuation of kinase activation and superoxide production and potentiation of mitochondrial superoxide dismutase. *Endocrinology*; 149(1):367-79.
502. Wallace DC. **1992**. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science*; 256(5057):628-32.

503. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, et al. **1985**. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 82(23):7889-93.
504. Wang JM, Irwin RW, Brinton RD. **2006**. Activation of estrogen receptor alpha increases and estrogen receptor beta decreases apolipoprotein E expression in hippocampus in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 103(45):16983-8.
505. Wang P, Rothwell NJ, Pinteaux E, Brough D. **2008**. Neuronal injury induces the release of pro-interleukin-1beta from activated microglia in vitro. *Brain Res*; 1236:1-7.
506. Wasserman JK, Yang H, Schlichter LC. **2008**. Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. *Eur J Neurosci*; 28(7):1316-28.
507. Watson CS, Gametchu B. **1999**. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med*; 220(1):9-19.
508. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM. **1997**. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*; 138(9):4030-3.
509. Watts CK, Sweeney KJ, Warlters A, Musgrove EA, Sutherland RL. **1994**. Antiestrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*; 31(1):95-105.
510. Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM. **2001**. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem*; 76(6):1879-86.
511. Weibel ER. **1979**. Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir*; 15(5):999-1013.
512. Wekerle H, Sun D, Oropeza-Wekerle RL, Meyermann R. **1987**. Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol*; 132:43-57.
513. Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, and Ransom BR. **2000**. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *Horm Behav*; 15(2):107-22.
514. Whalen RE, Olsen KL. **1981**. Role of aromatization in sexual differentiation: effects of prenatal ATD treatment and neonatal castration. *Horm Behav*; 15(2):107-22.
515. Wilms H, Claasen J, Röhl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. **2003**. Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis*; 14(3):417-24.
516. Wilson JD. **1999**. The role of androgens in male gender role behavior. *Endocr Rev*; 20(5):726-37.
517. Woodroffe MN. **1995**. Cytokine production in the central nervous system. *Neurology*; 45(6 Suppl 6):S6-10.
518. Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. **2004**. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 75(4):637-9.
519. Worrall NK, Chang K, LeJeune WS, Misko TP, Sullivan PM, Ferguson TB Jr, Williamson JR. **1997**. TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol*; 273(6 Pt 2):H2565-74.

Bibliografía

520. Yaffe MP. **1999**. Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol*; 1(6):E149-50.
521. Yaffe K, Krueger K, Cummings SR, Blackwell T, Henderson VW, Sarkar S, Ensrud K, Grady D. **2005**. Effect of raloxifene on prevention of dementia and cognitive impairment in older women: the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) randomized trial. *Am J Psychiatry*; 162(4):683-90.
522. Yague JG, Azcoitia I, DeFelipe J, Garcia-Segura LM, Muñoz A. **2010**. Aromatase expression in the normal and epileptic human hippocampus. *Brain Res*; 1315:41-52.
523. Yague JG, Muñoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. **2006**. Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience*; 138(2):389-401.
524. Yague JG, Wang AC, Janssen WG, Hof PR, Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Morrison JH. **2008**. Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain Res*; 1209:115-27.
525. Yanamoto K, Zhang MR, Kumata K, Hatori A, Okada M, Suzuki K. **2007**. In vitro and ex vivo autoradiography studies on peripheral-type benzodiazepine receptor binding using [¹¹C]AC-5216 in normal and kainic acid-lesioned rats. *Neurosci Lett*; 428(2-3):59-63.
526. Yang SL, Chen YY, Hsieh YL, Jin SH, Hsu HK, Hsu C. **2004**. Perinatal androgenization prevents age-related neuron loss in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in female rats. *Dev Neurosci*; 26(1):54-60.
527. Yawata I, Takeuchi H, Doi Y, Liang J, Mizuno T, Suzumura A. **2008**. Macrophage-induced neurotoxicity is mediated by glutamate and attenuated by glutaminase inhibitors and gap junction inhibitors. *Life Sci*; 82(21-22):1111-6.
528. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. **2003**. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol*; 23(15):5409-20.
529. Zaldivar V, Magri ML, Zárate S, Jaita G, Eijo G, Radl D, Ferraris J, Pisera D, Seilicovich A. **2011**. Estradiol increases the expression of TNF- α and TNF receptor 1 in lactotropes. *Neuroendocrinology*; 93(2):106-13.
530. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Quiroz J, Jolkovsky L, Luckenbaugh DA, Manji HK. **2007**. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar Disord*; 9(6):561-70.
531. Zhang Z, Cerghet M, Mullins C, Williamson M, Bessert D, Skoff R. **2004**. Comparison of in vivo and in vitro subcellular localization of estrogen receptors alpha and beta in oligodendrocytes. *J Neurochem*; 89(3):674-84.
532. Zhang Y, Jin Y, Behr MJ, Feustel PJ, Morrison JP, Kimelberg HK. **2005**. Behavioral and histological neuroprotection by tamoxifen after reversible focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*; 196(1):41-6.
533. Zhang Y, Bhavnani BR. **2005**. Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release. *BMC Neurosci*; 6:13.
534. Zhao L, O'Neill K, Diaz Brinton R. **2005**. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res Brain Res Rev*; 49(3):472-93.
535. Zhao L, Brinton RD. **2007**. Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca²⁺ dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res*; 1172:48-59.

536. Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, Appel SH. **2006**. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J Neurochem*; 99(4):1176-87.
537. Zhu W, Umegaki H, Shinkai T, Kurotani S, Suzuki Y, Endo H, Iguchi A. **2003**. Different glial reactions to hippocampal stab wounds in young adult and aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*; 58(2):117-22.
538. Zhu TS, Glaser M. **2008**. Neuroprotection and enhancement of remyelination by estradiol and dexamethasone in cocultures of rat DRG neurons and Schwann cells. *Brain Res*; 1206:20-32.
539. Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, and Carmignoto G. **2003**. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.
540. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröde. **2004**. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*; 36(5):449-51.
541. Zuurman MW, Heeroma J, Brouwer N, Boddeke HW, Biber K. **2003**. LPS-induced expression of a novel chemokine receptor (L-CCR) in mouse glial cells in vitro and in vivo. *Glia*; 41(4):327-36.

