

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



**EFFECTO DEL ESTEROIDE SINTÉTICO  
TIBOLONA SOBRE LA GLIOSIS REACTIVA**

Andrea Crespo Castrillo

Madrid, 2019



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



**EFFECTO DEL ESTEROIDE SINTÉTICO TIBOLONA  
SOBRE LA GLIOSIS REACTIVA**

Memoria presentada por Andrea Crespo Castrillo (Licenciada en Biología) para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) en el Programa de Doctorado en Farmacología y Fisiología RD 99/2011, de acuerdo al trabajo realizado bajo la dirección del Profesor Luis Miguel García Segura y la Doctora M<sup>a</sup> Ángeles Arévalo Arévalo en el Dpto. de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal (CSIC).

Madrid, 2019







**A los que me apoyaron sin entender del todo lo que hacía.**

**A los que aun entendiéndolo, tuvieron paciencia.**

*Ahora es el momento de entender más,  
de modo que podamos temer menos.*

**- Marie Curie -**



## AGRADECIMIENTOS

Quizás esta sea una de las partes más difíciles de la tesis. Hay demasiada gente, demasiados momentos, demasiadas horas, demasiado esfuerzo... Tanto que es complicado plasmar todo en un par de hojas. Hay gente que pasa por tu vida para quedarse y gente que pasa dejando una pequeña parte de ellas para luego irse. Y todos son importantes.

Toda mi vida, la educación recibida, el cariño incondicional de mis padres, las tardes enteras jugando al fútbol en el parque, el colegio, la universidad, la gente dispar que he ido conociendo en todas las etapas, todo ello, han dado como resultado que en el día de hoy esté culminando el trabajo de varios años en esta tesis doctoral. No lo considero un punto final, sino un punto a parte gracias al cual me he conocido mejor y me ha hecho darme cuenta del gran valor que tengo y de que con esfuerzo, todo es posible. Por ello, primero quiero agradecer a esta tesis, que va más allá del trabajo, todo lo que me ha dado.

Como he dicho antes, son muchas las personas que han sido protagonistas de esta historia, y en el primer acto no podrían faltar mis directores de tesis, Luis Miguel y Ángeles, sin los cuales nunca hubiera tenido la oportunidad de estar aquí. Me siento afortunada de haber tenido como director a Luis Miguel, y me da pena que después de mi no vayan a haber más afortunados. Su predisposición a ayudar y la libertad que me ha brindado estos años para llevar a cabo mis locuras han sido muy importantes y bastante determinantes para convertirme en la clase de científica que soy hoy en día. Como me ha dicho alguna vez, *él está para decirme lo que tengo que hacer y yo estoy para desobedecerle, porque así es como avanza la ciencia*. Y en mi caso, él sabe que no hace falta decírmelo dos veces. Luis Miguel representa la sabiduría y la humildad, y el mundo de la ciencia es algo más bonito gracias a él. Ángeles representa la parte más humana del laboratorio a la par que su trayectoria científica me ha brindado conocimientos que han sido indispensables para elaborar esta tesis. Su alegría y paciencia han hecho que siempre me sienta arropada y apoyada al explorar nuevos temas de investigación y también a sentirme a gusto en el C-01. Se atreve con todo, y

junto a su cercanía han hecho esta tesis más llevadera y entretenida, y la voy a echar mucho de menos.

A parte de los jefes, el laboratorio no sería lo que es sin los compañeros que han pasado por aquí como Guillermo, Ana Belén, Isa, Estefanía, Eli, Franco, Lucas, Paula, Danniell (no le gusta Danny), Ana... y muchos estudiantes de grado y máster que nos recuerdan siempre la ilusión que se siente al empezar algo nuevo. Ana ha estado durante todos los años de mi tesis y hemos compartido congresos y dudas existenciales sobre nuestro futuro vital, las cuales siguen estando ahí. Pero sea cual sea el camino que siga sé que tendrá mucho éxito.

Parece que me iba a olvidar pero no sería posible, y es que como persona que ha pasado por el laboratorio C-01 me quedo y siempre me quedaré con Natalia, mi mamá pato. Su alegría y optimismo son contagiosos y me ha enseñado a seguir siempre adelante, a que no hay ni ideas ni preguntas tontas y que lo más importante que podemos tener es creatividad. Sé que ella siempre estará ahí sin importar la distancia o los compromisos que surjan y siempre agradeceré que haya entrado en mi vida.

Con Natalia y sin esperarlo llegó la Asociación Con/Ciencia, la cual me ha dado la oportunidad de coger el gusto por contar historias en público, de aprender sobre temas totalmente diferentes a mi tesis, lo que creo que la han enriquecido, y de conocer a mucha gente. Pero lo más importante son los miembros de la asociación: Lauri, Mecha y Anita (sin olvidar a la presi). Aunque hay más miembros, para mí somos NOSOTRAS. Habéis sido un gran descubrimiento, un regalo y me siento muy feliz de haberos conocido y de llamaros amigas. Sois tan diferentes las tres que necesitaría hacer una tesis entera sobre vosotras. Sois, sin quererlo ni pretenderlo, un gran ejemplo para mí, tanto en lo personal como en lo profesional y juntas somos imparables y crearemos todos los gabinetes que queramos. 🙌

También quiero agradecer esta tesis a todas las personas del Instituto Cajal, a mis amigos de toda la vida y de la universidad, en especial a Albus (A.k.a, Alba) que siempre ha estado ahí y ha sido un gran apoyo. También a Alv y a Dani, y a mi putis del IFTH.

Y bueno, ya para finalizar, esta tesis no habría posible sin el apoyo de mis padres durante todos estos años, o más bien, durante toda mi vida. La niña quería ser científica y a pesar de los años en los que habéis visto que estaba horas y horas fuera de casa cada día (haciendo prácticas de laboratorio eh), nunca habéis, ni por asomo, puesto en duda que fuera a conseguirlo. Aún no estoy segura del todo de que sepáis lo mucho que me habéis ayudado pero sé que os va a hacer mucha ilusión ver cómo presento la tesis, y que para vosotros será la mejor tesis del mundo. Os quiero. A ti también, Edu.

Ahora sí que sí finalizo, y es que me quería dejar para el final a Miguel (tú ya le puedes dar la entonación que más te guste a tu nombre). Has sido mi remanso de paz, mi buñu, y me has ayudado diariamente a estar tranquila y hacerme saber que estás ahí, pase lo que pase. Has sido y eres un gran apoyo, y gracias a ti puedo ser quien soy y sé que siempre me vas a acompañar en mis aventuras, que convertimos en nuestras cada día. Tampoco quería olvidar a tus papis, Eva y Miguel, que siempre me están preguntando qué hago en el laboratorio aunque no se lo sepa explicar bien del todo.

Aunque seguro que me olvido a gente, a cualquiera se haya echado en falta en estas líneas, gracias a ti también.



**- ¿Alguna vez sueñas en quién quieres ser?  
- ¿Quién voy a ser? ¿No se supone que  
debería seguir siendo yo?  
- Forrest Gump (1994) -**





## RESUMEN

Cuando se produce un daño en el sistema nervioso central (SNC), las células gliales, como los astrocitos y la microglía, sufren una transformación adaptativa, denominada gliosis reactiva, que se caracteriza por un aumento en la liberación de factores pro- y antiinflamatorios. Además, los astrocitos y la microglía aumentan su actividad fagocítica tras la lesión, lo que facilita la reparación del tejido dañado. Aunque en principio la gliosis favorece el retorno a la homeostasis del tejido nervioso dañado, en ciertas condiciones puede producirse una respuesta glial incontrolada, por ejemplo en situaciones de neuroinflamación crónica, lo que llega a producir un aumento en el daño tisular. Y por este motivo en ocasiones es necesario controlarla.

Los estrógenos son sustancias producidas por nuestro organismo tanto en la periferia como en el SNC. Aunque estas hormonas tienen efectos neuroprotectores, su utilización en clínica está limitada debido al aumento del riesgo de padecer cáncer de mama, endometrio y ovarios. Una alternativa al uso de estrógenos como agentes neuroprotectores son algunos esteroides sintéticos, utilizados actualmente para el tratamiento de los síntomas de la menopausia, como la tibolona. Este esteroide sufre una metabolización específica en cada tejido y sus metabolitos tienen afinidad por los receptores de estrógeno, de progesterona y de andrógenos.

Estudios previos *in vitro* sugieren que la tibolona tiene acciones protectoras en células neurales. En este estudio se ha analizado su acción protectora en un modelo murino de lesión cerebral, con particular énfasis en su acción sobre la gliosis reactiva. Nuestros estudios se han complementado con un análisis *in vitro* sobre los mecanismos de acción de la tibolona en astrocitos y microglía. Nuestros resultados indican que la tibolona modula la respuesta de astrocitos y microglía y aumenta la supervivencia neuronal en la corteza cerebral lesionada. El análisis de las acciones de la tibolona *in vitro* sugiere acciones directas sobre las células gliales mediadas por receptores de estrógeno y andrógenos. Además, nuestros resultados indican que este esteroide regula la actividad fagocítica de astrocitos y microglía, lo cual podría contribuir a su acción neuroprotectora *in vivo*.



## ABSTRACT

When damage occurs in the central nervous system (CNS), glial cells, such as astrocytes and microglia, undergo an adaptive transformation, characterized by increased release of pro- and anti-inflammatory factors, referred to as reactive gliosis. In addition, astrocytes and microglia increase their phagocytic activity after injury, facilitating the repair of damaged tissue and the return to homeostasis. However, certain conditions, such as chronic neuroinflammation, lead to uncontrolled glial responses and tissue damage. For this reason, regulation of glial responses in these circumstances is key.

Estrogens are naturally produced hormones, both in the periphery and in the CNS. Although they have been reported to have neuroprotective effects, their clinical use is limited due to the increased risk of breast, endometrial and ovarian cancer. An alternative to the use of estrogens as neuroprotective agents are some synthetic steroids, such as tibolone, currently used for the treatment of menopausal symptoms. Tibolone is a tissue-specific steroid and its metabolites have affinity for estrogen, progesterone and androgen receptors.

Previous *in vitro* studies suggest that tibolone has protective actions in neural cells. In this study, its protective action was analyzed in a mouse model of brain injury, with particular emphasis on its action on reactive gliosis. Our studies have been complemented with an *in vitro* analysis on the mechanisms of action of tibolone in astrocytes and microglia. Our results indicate that tibolone reduces the response of astrocytes and microglia and increases neuron survival in the injured cerebral cortex. Analysis of the actions of tibolone *in vitro* suggests direct actions on glial cells mediated by estrogen and androgen receptors. In addition, our results indicate that this steroid regulates the phagocytic activity of astrocytes and microglia, which could contribute to its neuroprotective action *in vivo*.



---

# ÍNDICE

---



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>17</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>19</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>37</b>
<b>1. GLIOSIS REACTIVA</b>	<b>39</b>
<i>1.1 Microglía</i>	<b>41</b>
<i>1.2. Astrocitos</i>	<b>44</b>
<b>2. CICATRIZ GLIAL</b>	<b>45</b>
<b>3. EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LOS ESTRÓGENOS</b>	<b>48</b>
<i>3.1 Efectos del estradiol en las células gliales</i>	<b>51</b>
<i>3.1.1 Efecto del estradiol sobre los astrocitos</i>	<b>51</b>
<i>3.1.2 Efecto del estradiol sobre la microglía</i>	<b>51</b>
<b>4. TIBOLONA</b>	<b>52</b>
<b>5. LA IMPORTANCIA DE REALIZAR LOS ESTUDIOS EN AMBOS SEXOS</b>	<b>54</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>61</b>
<b>I. MATERIALES PARA LOS EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i></b>	<b>63</b>
1. Animales	<b>63</b>
2. Reactivos	<b>63</b>
3. Material y equipos	<b>63</b>
<b>II. MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LA TIBOLONA EN UNA LESIÓN PENETRANTE CORTICAL</b>	<b>64</b>
1. Protocolo general utilizado <i>in vivo</i>	<b>64</b>
2. Tratamientos	<b>64</b>
3. Ovariectomías	<b>65</b>
4. Lesión penetrante cortical	<b>66</b>



5. Perfusión cardiaca	67
6. Inmunohistoquímica (IHQ)	67
6.1 IHQ simple (revelada con DAB)	67
6.2 IHQ de fluorescencia	68
7. Análisis morfométrico	69
8. Análisis estadístico	71
<b>III. MATERIALES PARA LOS EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i></b>	<b>71</b>
1. Animales	71
2. Reactivos	71
3. Equipos	72
<b>IV. MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LA TIBOLONA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MICROGLÍA Y ASTROCITOS</b>	<b>73</b>
<b>1. MICROGLÍA</b>	<b>73</b>
1.1 Cultivo primario	73
1.2 Estudio de la fagocitosis	74
1.3 Estudio de la migración	75
1.4 Tratamientos usados en la fagocitosis/migración	76
1.5 Análisis de imagen	76
1.5.1 Análisis de la fagocitosis en microglía	76
1.5.2 Análisis de la migración en microglía	77
<b>2. ASTROCITOS</b>	<b>77</b>
2.1 Cultivo	77
2.2 Estudio de la fagocitosis	78
2.3 Tratamientos usados en la fagocitosis de astrocitos	79
2.4 Inmunocitoquímica de astrocitos	79
2.5 Análisis de la fagocitosis en astrocitos	80
<b>V. MÉTODOS COMUNES PARA MICROGLÍA Y ASTROCITOS</b>	<b>80</b>
1. Ensayo de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	80
2. Cuantificación de nitritos	80
3. PCRs cuantitativas a tiempo real (RT-qPCR)	82
4. Ensayo multiplex con tecnología Luminex	83

5. Análisis estadístico	84
<b>RESULTADOS</b>	<b>87</b>
<b>I. EFECTOS DE LA TIBOLONA EN UNA LESIÓN PENETRANTE CORTICAL</b>	<b>89</b>
1. Astrocitos inmunoreactivos para GFAP	89
2. Células inmunoreactivas para Iba1	91
2.1 Número total de células Iba1+	92
2.2 Células Iba1+ con fenotipo reactivo	94
2.3 Células Iba1+ con fenotipo no reactivo	96
3. Efecto de la tibolona sobre el número de neuronas en la corteza cerebral lesionada	97
<b>II. EFECTOS DE LA TIBOLONA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE MICROGLÍA Y ASTROCITOS</b>	<b>100</b>
1. Las células primarias de microglía expresan enzimas que metabolizan la tibolona	100
2. Efecto de la tibolona sobre la viabilidad celular y la producción de nitritos en la microglía	101
3. Efecto de la tibolona sobre los niveles de citoquinas en condiciones inflamatorias en cultivos de microglía	102
4. Efecto de la tibolona sobre la fagocitosis de <i>E.coli</i> por la microglía	103
4.1 Diferencias sexuales basales en la fagocitosis de <i>E. coli</i> por la microglía	104
4.2 Efectos de la tibolona y el estradiol sobre la fagocitosis de <i>E. coli</i> por la microglía	105
4.3 Efectos de la tibolona y los antagonistas de los receptores de estrógenos sobre la fagocitosis de <i>E. coli</i> por la microglía	105
4.4 Efecto del antagonista del receptor de andrógenos flutamida sobre la fagocitosis de <i>E. coli</i> por la microglía	107
5. Efecto de la tibolona sobre la migración de la microglía	108
6. Efecto de la tibolona sobre la expresión de genes de fagocitosis y migración en microglía	109
7. Los astrocitos primarios expresan enzimas que metabolizan la tibolona	111
8. Efecto de la tibolona sobre la viabilidad celular y la producción de nitritos por los astrocitos	112

9. Efecto de la tibolona sobre los niveles de citoquinas en condiciones inflamatorias en cultivos de astrocitos	<b>112</b>
10. Efecto de la tibolona sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos	<b>114</b>
10.1 <i>Estudio de la fagocitosis basal</i>	<b>115</b>
10.2 <i>Efectos de la tibolona sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos</i>	<b>116</b>
10.3 <i>Efectos de los antagonistas de los receptores de estrógeno sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos</i>	<b>117</b>
10.4 <i>Efecto del antagonista del receptor de andrógenos flutamida sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos</i>	<b>118</b>
10.5 <i>Efecto del estradiol endógeno sobre la capacidad fagocítica de los astrocitos</i>	<b>119</b>
10.6 <i>Efecto del estradiol sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos tras la inhibición de la enzima aromatasa</i>	<b>120</b>
10.7 <i>Efectos de la tibolona sobre la respuesta fagocítica de los astrocitos frente al LPS</i>	<b>121</b>
11. Efecto de la tibolona sobre la expresión de genes de fagocitosis en los astrocitos	<b>123</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>125</b>
1. Efectos de la tibolona sobre la gliosis reactiva en una lesión cortical	<b>127</b>
2. Efecto de la tibolona sobre la gliosis reactiva en cultivos celulares	<b>132</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>145</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>147</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>149</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>171</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>191</b>





---

# **ABREVIATURAS**

---



## ABREVIATURAS

<b>3<math>\alpha</math>-HSD</b>	3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>ABCA1</b>	Transportador A1 en cinta unido a ATP (del inglés, <i>ATP-binding cassette transporter A1</i> )
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>Akt</b>	PKB, proteína kinasa B (del inglés, <i>Protein Kinase B</i> )
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza (del inglés, <i>ANalysis Of VAriance</i> )
<b>ApoE</b>	APOlipoproteína E
<b>AR</b>	Receptor de andrógenos (del inglés, <i>Androgen Receptor</i> )
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato (del inglés, <i>Adenosin TriPhosphate</i> )
<b>A<math>\beta</math></b>	Proteína beta-amiloide
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefálica
<b>BSA</b>	Albúmina del suero bovino (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CCL2</b>	Ligando de quimioquina 2 o MCP-1 (del inglés, <i>chemokine c-c motif ligand 2</i> )
<b>CCL3</b>	Ligando de quimioquina 3 o MIP-1 $\alpha$ (del inglés, <i>chemokine c-c motif ligand 3</i> )
<b>CCL5</b>	Ligando de quimioquina 5 o RANTES (del inglés, <i>chemokine c-c motif ligand 5</i> )
<b>CCR2</b>	Receptor 2 de quimioquinas con motivo C-C (del inglés, <i>C-C chemokine receptor type 2</i> )
<b>CD14</b>	Cúmulo de diferenciación 14 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 14</i> )
<b>CD200</b>	Cúmulo de diferenciación 200 ( del inglés, <i>Cluster of Differentiation 200</i> )
<b>CD200R1</b>	Receptor 1 del cúmulo de diferenciación 200 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 200 Receptor 1</i> )



<b>CD204</b>	Cúmulo de diferenciación 204 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 204</i> )
<b>CD36</b>	Cúmulo de diferenciación 36 (del inglés, <i>Cluster of Differentiation 36</i> )
<b>Complejo ABC</b>	Complejo de avidina-biotina-peroxidasa
<b>CX3CL1</b>	Fractalquina o ligando de quimioquina 1 con motivos C-X3-C (del inglés, <i>Chemokine (C-X3-C motif) Ligand 1</i> )
<b>CX3CR1</b>	Receptor de quimioquina 1 con motivos C-X-C (del inglés, <i>chemokine (C-X3-C motif) receptor 1</i> )
<b>CXCL10</b>	Ligando quimioquina 10 con motivos C-X-C o IP-10 (del inglés, <i>C-X-C motif chemokine 10</i> )
<b>Cy3</b>	Marcador de cianina 3
<b>d.p.l.</b>	Días PosLesión
<b>DAB</b>	Diaminobencidina tetrahidroclorada
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido (Del inglés, <i>Dimethyl Sulfoxide</i> )
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés, <i>Ethylene Diamine Tetra Acetate</i> )
<b>EEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>Epidermic Growth Factor</i> )
<b>ERK</b>	Kinasa reguladora de la señal extracelular ( <i>del inglés, Extracellular signal-Regulated Kinase</i> )
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrógenos $\alpha$ (del inglés, <i>Estrogen Receptor <math>\alpha</math></i> )
<b>ER<math>\beta</math></b>	Receptor de estrógenos $\beta$ (del inglés, <i>Estrogen Receptor <math>\beta</math></i> )
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal (del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
<b>Flut</b>	Flutamida
<b>Fractalquina</b>	CX3CL1 (del inglés, <i>Chemokine (C-X3-C motif) Ligand 1</i> )

<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de la glía (del inglés, <i>Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial (del inglés, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
<b>GPER1</b>	Receptor 1 de estrógeno acoplado a proteína G (del inglés, <i>G Protein-coupled Estrogen Receptor 1</i> )
<b>GULP1</b>	Dominio 1 adaptador de envoltura PTB (del inglés, <i>engulfment adapter PTB domain containing 1</i> )
<b>HS</b>	Suero de caballo (del inglés, <i>Horse Serum</i> )
<b>Iba1</b>	Proteína adaptadora de unión a iones de calcio (del inglés, <i>Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1</i> )
<b>IfngR1</b>	Receptor 1 de interferón gamma (del inglés, <i>Interferon gamma Receptor 1</i> )
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (del inglés, <i>Insuline-like Growth Factor-1</i> )
<b>IHQ</b>	InmunoHistoQuímica
<b>IL-10</b>	Interleuquina 10 (del inglés <i>InterLeukin, 10</i> )
<b>IL-10R1</b>	Receptor tipo 1 de interleuquina 10 (del inglés, <i>InterLeukin 10 Receptor 1</i> )
<b>IL-12</b>	Interleuquina 12 (del inglés, <i>InterLeukin 12</i> )
<b>IL-12R</b>	Receptor de interleuquina 12 (del inglés, <i>InterLeukin 12 Receptor</i> )
<b>IL-13</b>	Interleuquina 13 (del inglés <i>InterLeukin, 13</i> )
<b>IL-13R</b>	Receptor de interleuquina 13 (del inglés, <i>InterLeukin 13 Receptor</i> )
<b>IL-15R</b>	Receptor de interleuquina 15 (del inglés, <i>InterLeukin 15 Receptor</i> )
<b>IL-18</b>	Interleuquina 18 (del inglés <i>InterLeukin, 18</i> )
<b>IL-1R1</b>	Receptor tipo 1 de interleuquina 1 (del inglés, <i>InterLeukin 1 Receptor 1</i> )
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 $\beta$ (del inglés, <i>InterLeukin 1 <math>\beta</math></i> )
<b>IL-23</b>	Interleuquina 23 (del inglés, <i>InterLeukin 23</i> )
<b>IL-2R</b>	Receptor de interleuquina 2 (del inglés, <i>InterLeukin 2 Receptor</i> )

<b>IL-4</b>	Interleuquina 4 (del inglés, <i>InterLeukin 4</i> )
<b>IL-5R</b>	Receptor de interleuquina 5 (del inglés, <i>InterLeukin 5 Receptor</i> )
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6 (del inglés <i>InterLeukin 6</i> )
<b>IL-6R</b>	Receptor de interleuquina 6 (del inglés <i>InterLeukin 6 Receptor</i> )
<b>IL-8R</b>	Receptor de interleuquina 8 (del inglés, <i>Interleukin 8 Receptor</i> )
<b>IL-9R</b>	Receptor de interleuquina 9 (del inglés, <i>Interleukin 9 Receptor</i> )
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés, <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
<b>IRAK4</b>	Interleuquina asociada al receptor de kinasa 4 (del inglés, <i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4</i> )
<b>Jak</b>	Kinasa Janus (del inglés, <i>JAnus Kinase</i> )
<b>Let</b>	Letrozol
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 o CCL2 (del inglés, <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> )
<b>MEGF10</b>	Múltiples dominios similares al factor de crecimiento epidérmico 10 (del inglés, <i>Multiple Epidermal Growth Factor-like-domains 10</i> )
<b>MerTK</b>	Receptor de la tirosina kinasa Mer (del inglés, <i>Mer Receptor Tyrosine Kinase</i> )
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatoria de monocitos 1 $\alpha$ (del inglés, <i>Macrophage Inflammatory Protein 1-alpha</i> )
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (del inglés, <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> )
<b>MyD88</b>	Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (del inglés, <i>MYeloid Differentiation primary response 88</i> )
<b>NeuN</b>	Antígeno del núcleo neuronal (del inglés, <i>NEUronal Nuclear antigen</i> )
<b>NFG</b>	Factor de crecimiento nervioso (del inglés, <i>Nerve Growth Factor</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas (del inglés, <i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
<b>NG2</b>	Antígeno neural/glial 2 (del inglés, <i>Neural/Glial antigen 2</i> )

<b>NIH</b>	Instituto Nacional de la Salud (del inglés, <i>National Institute of Health</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico (del inglés, <i>Nitric Oxide</i> )
<b>P2Y12</b>	Receptor plaquetario purinérgico 12
<b>P2Y6</b>	Receptor plaquetario purinérgico 6
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
<b>PB</b>	Tampón fosfato (del inglés, <i>Phosphate Buffer</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3-kinasa
<b>PR</b>	Receptor de progesterona (del inglés, <i>Progesterone Receptor</i> )
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés, <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RANTES</b>	CCL5 (del inglés, <i>Regulated on Activation, normal T cell Expressed and Secreted</i> )
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RPMI 1640</b>	Medio de cultivo del Instituto Roswell Park Memorial 1640 (del inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i> )
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
<b>SERM</b>	Modulador selectivo de los receptores de estrógenos (del inglés, <i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i> )
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>Sphk1</b>	Kinasa 1 de esfingosina (del inglés, <i>SPHINGOSINE Kinase 1</i> )
<b>STAT</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción (del inglés, <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> )
<b>STEAR</b>	Modulador de la actividad estrogénica dependiente del tejido (del inglés, <i>Selective Tissue Estrogen Activity Modulator</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformador $\beta$ (del inglés, <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> )
<b>Tib</b>	Tibolona
<b>TLR</b>	Receptor de tipo Toll (del inglés, <i>Toll-Like Receptor</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> )

**TREM2**

Receptor desencadenador expresado en célula mieloides 2 (del inglés, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*)





---

# **INTRODUCCIÓN**

---





## 1. GLIOSIS REACTIVA

El sistema más sensible y preciso de defensa frente a traumatismos, bacterias y virus es el sistema inmune, el cual se extiende por todo el cuerpo. Aunque hasta hace unas décadas se pensaba que el cerebro, al tener la barrera hematoencefálica (BHE), era un órgano privilegiado que no necesitaba al sistema inmune, y por eso se pensaba que carecía de él [1], actualmente este concepto ha cambiado, y se sabe que el cerebro responde a los ataques externos e internos activando células especializadas como la glía, produciendo así una gliosis reactiva que va a desencadenar lo que conocemos como neuroinflamación. La neuroinflamación reestablece la homeostasis en el SNC frente a las distintas agresiones, como pueden ser una lesión, un traumatismo, hipoxia o infecciones bacterianas y víricas. En la respuesta neuroinflamatoria participan numerosas células, entre las que cabe destacar las células gliales, las endoteliales y las neuronas. Debido a que la barrera hematoencefálica aumenta su permeabilidad cuando hay algún daño, las células del sistema inmune periférico, principalmente monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, también pueden entrar en el cerebro en estas circunstancias [2, 3].

Muchas enfermedades del sistema nervioso, como la depresión, la enfermedad de Alzheimer, el autismo, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis múltiple, cursan con inflamación exacerbada o una incorrecta respuesta del sistema inmune en el SNC, y se considera que la progresión más o menos grave de estas enfermedades podría estar estrechamente relacionada con los procesos inflamatorios [4]. Así, un incorrecto control de la neuroinflamación, como sucede cuando aparece sin ningún motivo aparente, como en enfermedades autoinmunes, o cuando se prolonga mucho en el tiempo, hace que la respuesta inflamatoria sea demasiado agresiva, produciendo numerosos factores proinflamatorios como la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), contribuyendo así a la aparición de las enfermedades previamente descritas [5].

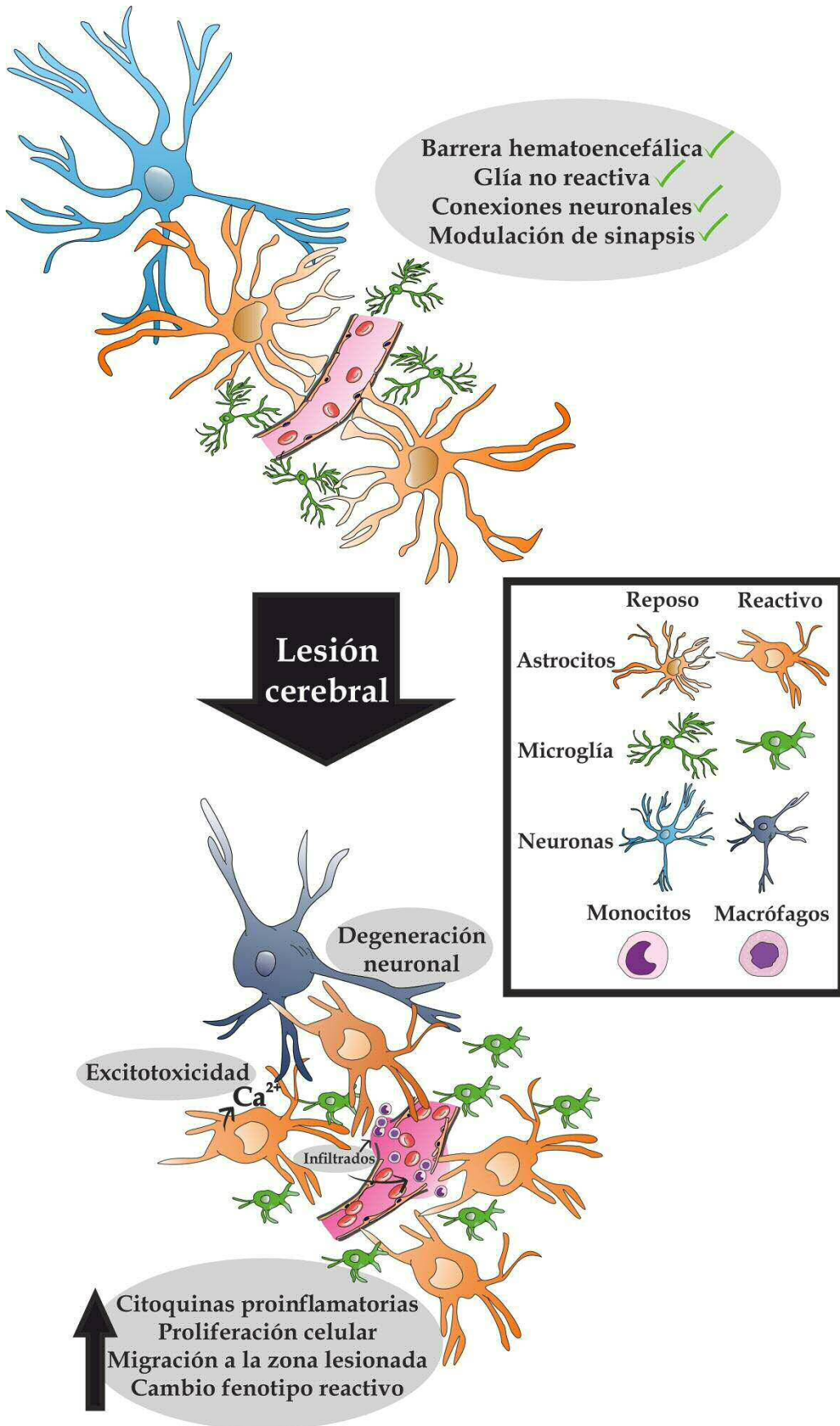


Figura 1. Resumen de los procesos celulares activados tras una lesión cerebral.

Por este motivo, la neuroinflamación es un proceso altamente regulado por numerosos factores y células, entre las que se encuentran la microglía y los astrocitos.

### **1.1 Microglía**

La microglía es considerada la célula inmune específica del cerebro. El origen de estas células es mesodérmico y se infiltran en el SNC durante la gestación del embrión. En ratones ya hay un conjunto de macrófagos en el saco embrionario en E8.5 y se han detectado precursores de microglía en la base del cuarto ventrículo en E13. En humanos se han encontrado células parecidas a las de microglía en la semana 13 de gestación, pero hasta la semana 21 no se encuentran células ramificadas.

Las células de microglía son muy importantes durante el desarrollo neural. Una de las funciones que tienen durante el desarrollo es la de hacer la poda sináptica, que consiste en eliminar botones sinápticos defectuosos, inmaduros o redundantes. Se ha demostrado que la alteración de esta función de la microglía durante el desarrollo puede contribuir a la aparición de patologías en el adulto, como son el autismo, la depresión o las dificultades en el aprendizaje, debido a la falta de eliminación de conexiones neuronales inapropiadas entre la corteza y el hipocampo [6-9].

Además de su papel en las etapas de desarrollo, la microglía tiene también funciones importantes a lo largo de toda la vida del organismo. Cuando no hay ningún daño en el SNC, la microglía tiene un fenotipo no reactivo, que se caracteriza por un soma reducido y largas prolongaciones que detectan cualquier daño o alteración que se produce en el tejido nervioso. Aunque a este fenotipo también se le llama inactivo o en reposo, aquí la microglía cumple varias funciones fisiológicas que son necesarias para el buen funcionamiento cerebral. Sus prolongaciones celulares con forma de filopodio, se están creando y retirando continuamente escaneando todo el ambiente que les rodea [10]. En estas prolongaciones se expresa el receptor de quimioquina 1 con motivo C-X-C (CX3CR1), un receptor de quimioquinas expresado en el cerebro únicamente por la microglía y que es activado por la fractalquina o ligando de quimioquina 1 con motivos C-X3-C (CX3CL1), la cual es expresada por las neuronas. Mediante este receptor la microglía vigila el estado de las conexiones neuronales,

siendo capaz no solo de actuar en caso de un daño, sino también de modular y mantener una vigilancia dinámica y constante de todos los circuitos [11].

Cuando detecta cualquier problema en el cerebro, ya sea la entrada de alguna bacteria, un daño tisular, o la rotura de un vaso, la microglía cambia su fenotipo a uno que llamaremos fenotipo activado o reactivo, caracterizado por unas prolongaciones citoplasmáticas más cortas y un aumento del tamaño del soma. La microglía reactiva puede incluso llegar a tener un fenotipo ameboide cuya función principal será la de migrar a la zona dañada y fagocitar las moléculas, restos celulares o bacterias que haya detectado. Esta activación es un proceso complejo y muy bien regulado [10, 12]. Por lo tanto, las funciones principales que adquiere la microglía cuando se vuelve reactiva, son la de migración y fagocitosis.

Cuando se produce un daño en alguna parte del parénquima cerebral la microglía se va a desplazar rápidamente hasta ese punto, detectándose en torno a la zona dañada a partir de las 24h después de la lesión y produciéndose un pico de migración a los 3 días. Se ha determinado que el adenosina trifosfato (ATP) es capaz de atraer a la microglía y que es posible inhibir esta migración usando inhibidores de receptores purinérgicos siendo el receptor plaquetario purinérgico 12 (P2Y<sub>12</sub>) el responsable de esta migración. Curiosamente, las primeras células en detectar el ATP son los astrocitos, y estos a su vez van a liberar más ATP que será el detectado por la microglía [13].

Otro estímulo que va a hacer que la microglía se active y migre es la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), también conocida como ligando de quimioquina 2 (CCL2) producido por las neuronas. A su vez la microglía va a liberar más MCP-1, la cual atrae más células a la zona dañada. Además, otros factores contribuyen a la regulación de los estímulos migratorios, como es el caso de la proteína inflamatoria de monocitos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), también conocido como ligando de quimioquina 3 (CCL3) y la proteína regulada en la activación, expresión y secreción de células T normales (RANTES), también conocido como ligando de quimioquina 5 (CCL5). Estos ligandos al unirse al receptor van a facilitar la liberación de citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  [10, 12].

La microglía también tiene receptores específicos que controlan la fagocitosis. Por ejemplo, el receptor plaquetario purinérgico 6 (P2Y6) va a regularla y se activará cuando haya daño neuronal. La fractalquina, de la que ya hemos hablado anteriormente, además de activar la migración, es un estímulo profagocítico. Cuando hay un daño en las neuronas, éstas van a expresar fractalquina y así atraerán a la zona dañada a la microglía, la cual fagocitará los restos neuronales o las conexiones neuronales alteradas, permitiendo que la circuitería neuronal funcione con normalidad. La fractalquina también puede ser expresada por los astrocitos, aunque no expresen su receptor CX3CR1 [14]. La microglía también presenta el receptor desencadenador expresado en célula mieloides 2 (TREM2) en la membrana celular. Este receptor está estrechamente relacionado con la fagocitosis en microglía, habiéndose observado que en ratones KO de TREM2 se inhibe la capacidad fagocítica de la microglía [15]. Los ligandos que se unen a TREM2 son carbohidratos aniónicos, lipopolisacáridos (LPS) y la apolipoprotein E (ApoE). Este receptor también tiene gran importancia en la enfermedad de Alzheimer, tanto que se ha barajado como un marcador temprano de la enfermedad [16].

La microglía también tiene receptores para  $TNF\alpha$  (1 y 2), otro factor que activa la fagocitosis y que se libera como señal de que hay algún problema en el SNC [12]. Por último, es necesario mencionar a una de las familias más importantes de receptores presentes en la microglía. Estos son los receptores de la familia Toll-Like (TLRs), que están relacionados con el receptor de IL-1 debido a su homología y que también se localizan en la superficie de la membrana. La activación de estos receptores hará que la microglía pase al estado reactivo. Los TLRs se asocian con co-receptores como el cúmulo de diferenciación 14 (CD14) y con componentes de señalización como la respuesta primaria de diferenciación mieloides 88 (MyD88) y son esenciales para llevar a cabo la respuesta inmune ya que reconocen estructuras fúngicas, virales y bacterianas, como por ejemplo el LPS que es la endotoxina presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas [10]. Además, la microglía también tiene receptores para otras interleuquinas como son el receptor tipo 1 de interleuquina 1 (IL-1R1), el receptor tipo 1 de interleuquina 10 (IL-10R1), el receptor de interleuquina 2 (IL-2R), el receptor de interleuquina 5 (IL-5R), el receptor de interleuquina 6 (IL-6R), el

receptor de interleuquina 8 (IL-8R), receptor de interleuquina 9 (IL-9R), el receptor de interleuquina 12 (IL-12R), el receptor de interleuquina 13 (IL-13R) y el receptor de interleuquina 15 (IL-15R).

## **1.2. Astrocitos**

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del cerebro [17]. A diferencia de la microglía, cuyo origen embrionario es mesodérmico, los astrocitos son ectodérmicos, al igual que las neuronas. Los astrocitos derivan en su mayoría de la glía radial, que es necesaria para la migración neuronal en estadios embrionarios y además parece que en estadios adultos ayudan a migrar a las neuronas del bulbo olfatorio [18, 19].

Además, numerosos resultados han demostrado que los astrocitos participan en la función sináptica glutamatérgica, formando lo que se ha llamado la sinapsis tripartita. En ella, las neuronas y los astrocitos trabajan de manera conjunta llevando a cabo el ciclo de glutamato-glutamina para controlar de manera precisa la cantidad de neurotransmisor que se emite a la neurona postsináptica. Esto también ha sido muy debatido ya que hay estudios que sugieren que solo ocurre en el cerebro en desarrollo y no en el adulto [20].

Al igual que la microglía, los astrocitos tienen una función muy importante eliminando conexiones sinápticas mediante la fagocitosis, tanto en procesos fisiológicos como en condiciones patológicas. Las rutas más estudiadas mediante las cuales los astrocitos llevan a cabo la fagocitosis son la mediada por el receptor de la tirosina kinasa Mer (MERTK) y la llevada a cabo por múltiples dominios similares al factor de crecimiento epidérmico 10 (MEGF10). Ambas rutas se inician con señales clásicas de reconocimiento de muerte celular como puede ser la fosfatidilserina en la membrana aunque también son capaces de fagocitar conexiones activas modulando así la circuitería neuronal [21, 22].

Además de interactuar estrechamente con las neuronas, los astrocitos son importantes para el mantenimiento de la barrera hematoencefálica, en el control del flujo sanguíneo y en la captación de nutrientes como oxígeno y glucosa de la corriente sanguínea según las necesidades que tenga el cerebro en cada momento [23]. Como

se puede observar, tanto los astrocitos como la microglía son células esenciales para el buen funcionamiento del sistema nervioso central en procesos fisiológicos normales.

Al igual que ocurre con la microglía, sería un error considerar a los astrocitos que se encuentran en un ambiente fisiológico como células inactivas, ya que, como se ha indicado anteriormente, tanto los astrocitos como la microglía son células esenciales para el buen funcionamiento del sistema nervioso central en condiciones normales. Aun así, en momentos en los que ocurren eventos fisiopatológicos, la función y morfología de los astrocitos va a cambiar, produciéndose la activación astrocitaria o astrogliosis [24].

Los astrocitos van a dar lugar a distintos tipos de astrogliosis, que podrá ser más moderada o más severa dependiendo del nivel de daño que haya. Las principales diferencias entre una y otra son que en la astrogliosis moderada hay sobreexpresión de genes proinflamatorios y de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), pero no hay proliferación y solapamiento entre astrocitos. Y en cambio, en la astrogliosis severa, donde también se van a activar genes proinflamatorios y a aumentar la expresión de GFAP, va a haber una activación de la proliferación celular llegando incluso a solaparse unas células sobre otras eliminando así su inhibición por contacto [24].

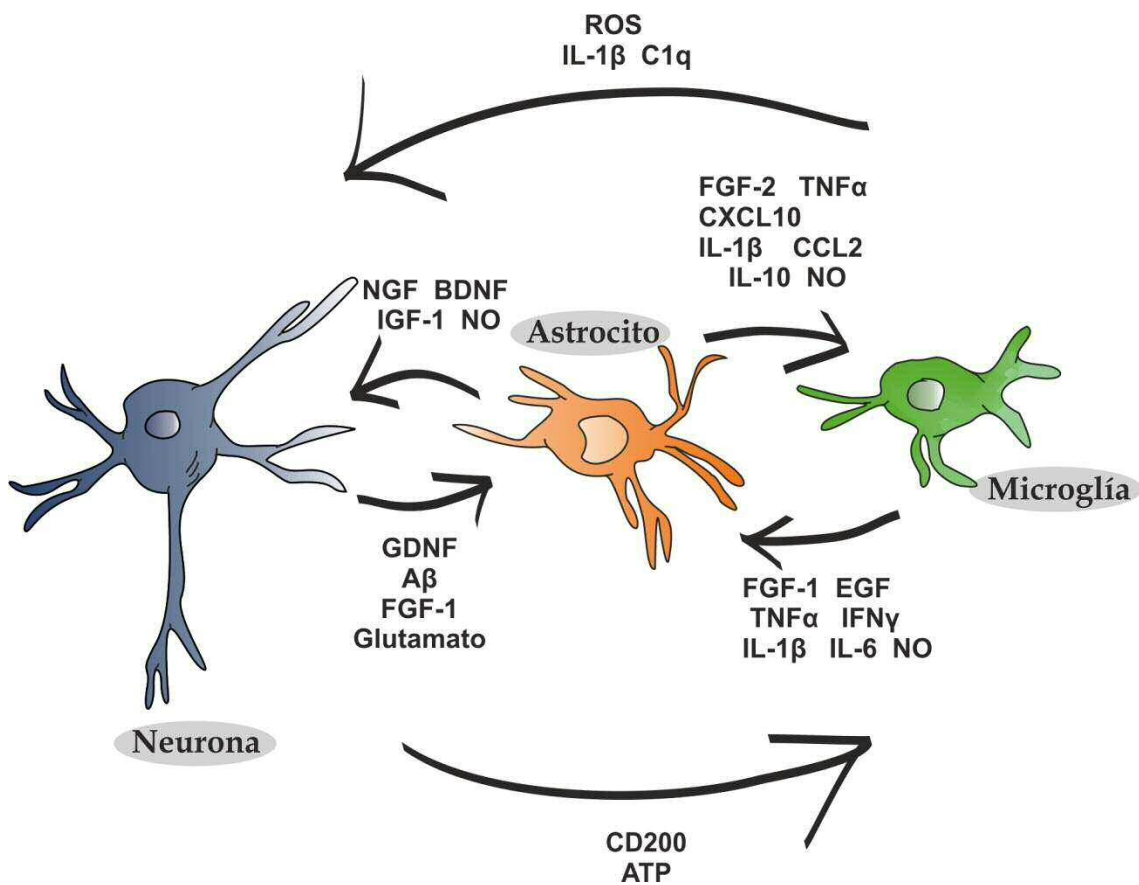
En la astrogliosis, los astrocitos no van a actuar solos, sino siempre junto con la microglía y las células con el antígeno neural/glial 2 (NG2). La activación astrocitaria se puede producir debido a enfermedades neurodegenerativas, infecciones virales o bacterianas, traumas, lesiones...etc. En el caso de la lesión cerebral, que es la que se estudia en esta tesis, además de este aumento de la reactividad se va a formar una cicatriz glial [24].

## 2. CICATRIZ GLIAL

Una de las primeras consecuencias de una lesión en el parénquima cerebral va a ser la rotura de las conexiones neuronales, lo que va a producir desmielinización y degeneración axonal [25]. Posteriormente, en una segunda fase, se producirá una oleada de muerte neuronal que coincidirá en el tiempo con la cascada vascular



(aumento del flujo y apertura de la BHE) y la liberación de moléculas que activarán a la glía (astrocitos, microglía y oligodendrocitos), a los pericitos y a los fibroblastos. En esta segunda fase tras una lesión, las células gliales van a liberar citoquinas y quimioquinas que atraerán a células externas al SNC, sobre todo del sistema inmune periférico. Estas respuestas celulares tras la lesión son necesarias para hacer frente al daño producido, pero si no se realizan de manera controlada y la reacción dura demasiado, las propias células gliales pueden contribuir a aumentar el daño neuronal, lo que hace que se agrave el problema [25].



**Figura 2. Comunicación entre astrocitos, neuronas y microglía cuando se produce una lesión cerebral.**

La comunicación se realiza a través de distintos mediadores moleculares, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), IL-1 $\beta$ , el factor del complemento C1q, cúmulo de diferenciación 200 (CD200) y ATP entre microglía y neuronas; el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el óxido nítrico (NO), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), la proteína beta-amiloide (A $\beta$ ), el factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), y el Glutamato entre los astrocitos y neuronas; el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), TNF $\alpha$ , la proteína inducida por interferón gamma 10 (CXCL10), IL-1 $\beta$ , MCP-1, la

interleuquina 10 (IL-10), NO, FGF-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF), TNF $\alpha$ , el interferon gamma (IFN $\gamma$ ), IL1- $\beta$ , IL-6 y NO entre astrocitos y microglía. Basado en [12, 24, 26].

Como ya se ha indicado, cuando se produce una lesión, van a proliferar y migrar a la zona dañada las células microgliales, los astrocitos y también la glía NG2. Para que los astrocitos sean capaces de proliferar necesitan numerosos estímulos, entre ellos se conocen el EGF, FGF, Endotelina-1 y ATP [27]. Clásicamente se ha considerado que esta proliferación en la zona lesionada va a dar lugar a lo que se conoce como cicatriz glial. Pero a pesar del nombre, varios resultados han puesto de manifiesto que el porcentaje de células gliales, sobre todo en el núcleo de esta cicatriz, es realmente bajo, en contraste con la cantidad de células procedentes de la matriz extracelular (como pericitos, fibroblastos y células endimarias) que se van a asociar con la fibronectina, laminina y colágeno [28].

En cambio, sí se observan numerosos astrocitos en la periferia de la lesión (área de penumbra). Además, durante mucho tiempo se ha considerado que la cicatriz glial va a inhibir la regeneración neuronal, pero cada vez más estudios sugieren que esta cicatriz ayuda a la regeneración. Así, la cicatriz aumenta la disponibilidad del factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el cual no solo aumentará la liberación de neurocam, que inhibe el crecimiento neuronal, sino que también producirá la desactivación microglial haciendo que pase a un fenotipo más reparador que hará que finalmente se produzca una regeneración neuronal [29-32].

La cicatriz glial además es importante para la producción de factores tróficos neuronales, la eliminación de los desechos celulares, la reparación de la barrera hematoencefálica y la reducción de factores tóxicos de la zona de la lesión [25].

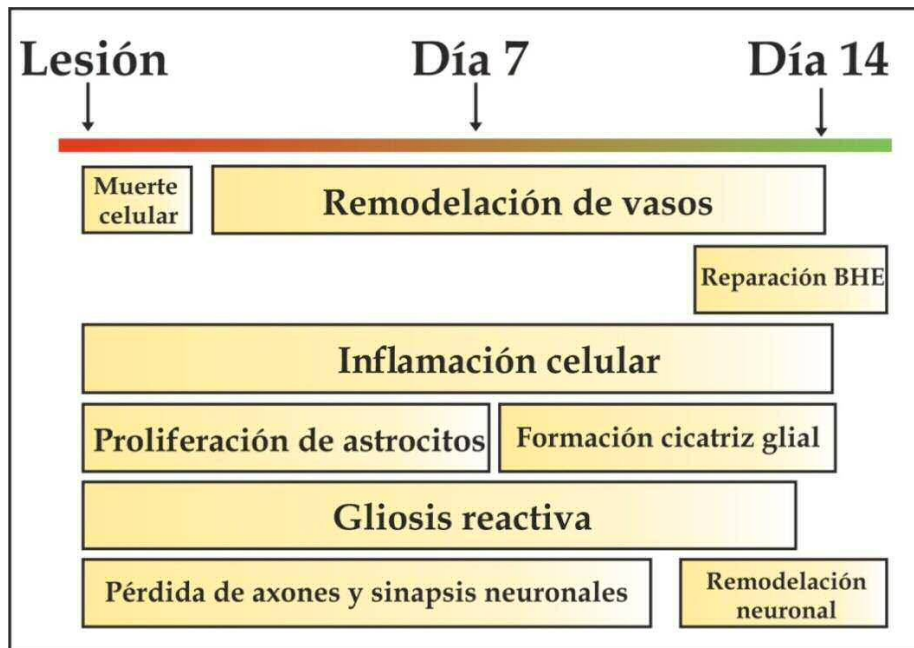


Figura 3. Esquema de los procesos temporales tras una lesión cerebral. Basado en [26].

En el caso de la microglía, cuando se produce una lesión, se va a activar adquiriendo un fenotipo proinflamatorio (parecido al fenotipo M1 de los macrófagos) que superará en número a la microglía con fenotipo antiinflamatorio (parecido al fenotipo M2 de los macrófagos). En el fenotipo proinflamatorio, la microglía liberará, óxido nítrico, superóxido, quimioquinas y numerosas citoquinas proinflamatorias. Tras la primera fase proinflamatoria, la microglía adquirirá un fenotipo antiinflamatorio y liberará citoquinas antiinflamatorias como la interleuquina 4 (IL-4), IL-10, interleuquina 13 (IL-13) o interleuquina 18 (IL-18) que promoverán la angiogénesis, la reparación tisular y la regeneración neuronal [33].

### 3. EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LOS ESTRÓGENOS

Aunque el proceso inflamatorio es beneficioso para la reparación del tejido, es necesario que no se prolongue mucho en el tiempo ya que de lo contrario se acabaría dañando aún más el parénquima. Por ese motivo hay un gran campo de estudio sobre compuestos que sean capaces de controlar esta inflamación y resulten beneficiosos para el retorno de la homeostasis en el SNC. Entre estas moléculas se encuentran las hormonas sexuales, en concreto el estrógeno estradiol, ya que es una de las hormonas

cuyos efectos han sido más estudiados en el cerebro. Así, por ejemplo, se ha observado que el estradiol ejerce acciones protectoras en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y es capaz de incrementar el número de neuronas vivas tras un episodio isquémico [34].

El estradiol es una hormona sexual que se produce en su mayoría en los ovarios, aunque también se sintetiza en menor medida en el hueso, tejido adiposo y en el SNC tanto de machos como de hembras. Por lo tanto, al cerebro también se considera un órgano esteroideogénico ya que tiene todas las enzimas necesarias para producir la hormona y otros esteroides de manera local. Para ello, el colesterol es transportado a la mitocondria en donde se convierte en pregnenolona, la cual pasa al retículo endoplasmático, en el que tras varias conversiones enzimáticas acaba produciéndose la testosterona, que gracias a la enzima aromatasa se transforma finalmente en estradiol [35].

El papel de la aromatasa sobre la función cognitiva está recibiendo cada vez mayor importancia debido a los estudios que relacionan la disminución de los niveles de estradiol en mujeres tratadas con inhibidores de la enzima o tras la menopausia, con un aumento del riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer [36].

En el caso concreto del traumatismo cerebral, se ha descrito que se produce un incremento de la expresión de la enzima aromatasa en las zonas dañadas del SNC y como consecuencia un aumento en los niveles de estradiol, el cual contribuye a hacer frente al daño cerebral y activar procesos que ayuden a la reparación [37].

Para que el estradiol tenga efecto tiene que actuar sobre sus receptores específicos. Clásicamente se han identificado dos tipos de receptores, el receptor de estrógenos alfa y el receptor de estrógenos beta ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ). Estos receptores son factores de transcripción que se activan cuando el ligando (estradiol) se une a ellos. Una vez activados reclutan cofactores activadores o represores de la transcripción y se unen a elementos de respuesta a estrógeno en la región promotora del ADN de determinados genes. Los receptores  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  también pueden estar asociados transitoriamente a la membrana plasmática, en donde, una vez que se une a ellos el

estradiol regulan varias vías de señalización como las de la fosfoinositol-3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt), las quinasas extracelulares reguladas por señal (ERK) o la de la quinasa Janus /transductor de señal y activador de transcripción (Jak/STAT). Además, existen receptores de estrógenos que están específicamente asociados a la membrana plasmática o del retículo endoplasmático, siendo el más conocido el receptor 1 de estrógeno acoplado a proteína G (GPR30/GPER1), que es un receptor asociado a proteínas G $\alpha_q$  y que activa las rutas de ERK y PI3K [38-42].

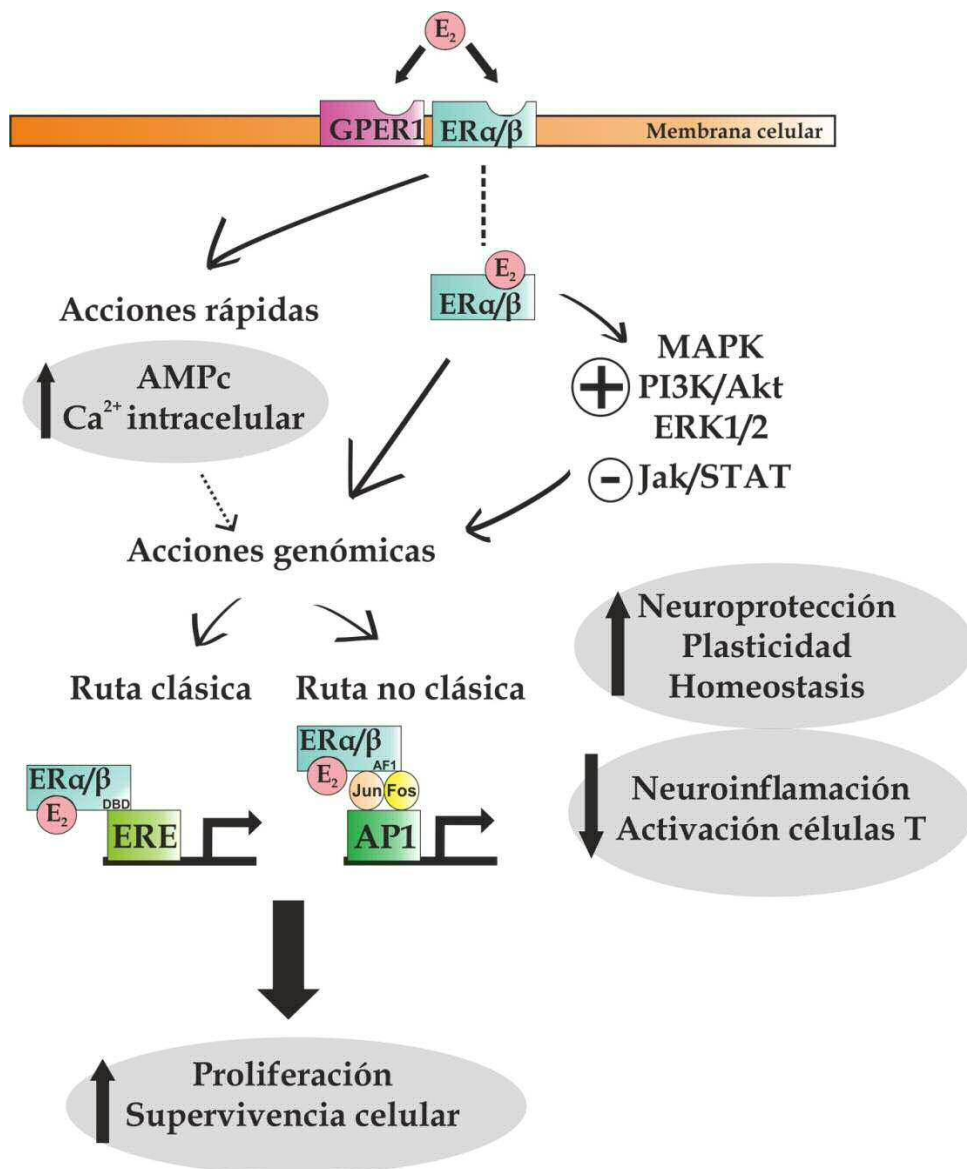


Figura 4. Mecanismos de acción del estradiol y sus efectos celulares.

Lo efectos celulares que tienen estos receptores dependerán del tipo celular en el que se encuentren y de su proporción. En el cerebro, los receptores de estrógenos se localizan en neuronas y células de glía y además de otras funciones, ejercen efectos

neuroprotectores y aumentan la supervivencia celular [35]. A continuación, nos vamos a centrar en los efectos que tiene el estradiol en los astrocitos y la microglía.

### **3.1. Efectos del estradiol en las células gliales**

#### **3.1.1 Efecto del estradiol sobre los astrocitos**

El estradiol actúa directamente sobre los astrocitos a través de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPR30/GPER1 [43]. Dependiendo del modelo experimental y del tipo de patología, el estradiol ejerce acciones antiinflamatorias en los astrocitos a través de distintos receptores de estrógenos. Por ejemplo, en un modelo de esclerosis múltiple experimental, el estradiol ejerce efectos neuroprotectores y antiinflamatorios a través del receptor ER $\alpha$ . En cambio, en modelos *in vitro* los ejerce principalmente a través del ER $\beta$  [44]. La acción antiinflamatoria del estradiol sobre los astrocitos está mediada principalmente por la regulación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), ya que el estradiol es capaz de inhibir la translocación de p65/NF- $\kappa$ B al núcleo a través de la activación de PI3K [45].

Asimismo, el estradiol también ejerce acciones antiinflamatorias aumentando la liberación de factores de crecimiento como el IGF-1 [46] y además también aumenta la expresión de los transportadores de glutamato GLT1 en los astrocitos a través de receptores GPR30/GPER1, incrementando la recaptura de glutamato de la hendidura sináptica e inhibiendo así la excitotoxicidad [47].

#### **3.1.2 Efecto del estradiol sobre la microglía**

En el caso de la microglía, también se sabe que el estradiol es capaz de regular la respuesta inmune en el cerebro y tiene propiedades antiinflamatorias [48]. El estradiol se va a unir tanto al receptor ER $\alpha$ , como al receptor ER $\beta$  y al GPER1/GPR30 de la microglía [49, 50].

Al igual que en los astrocitos, el estradiol al unirse al ER $\alpha$  de la microglía, va a inhibir al factor de transcripción NF- $\kappa$ B a través de la activación de PI3K [51]. Esta inhibición dará lugar a un descenso en la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y por lo tanto en la liberación de NO. También reducirá la producción de ROS. Tanto el NO como las ROS se encargan de ampliar la respuesta inflamatoria cuando se produce un daño, y por lo tanto su inhibición tiene un efecto antiinflamatorio. El

estradiol también se unirá a receptores microgliales ER $\beta$  y GPER1/GPR30 modulando así la liberación de mediadores inflamatorios y reduciendo la activación microglial [52, 53].

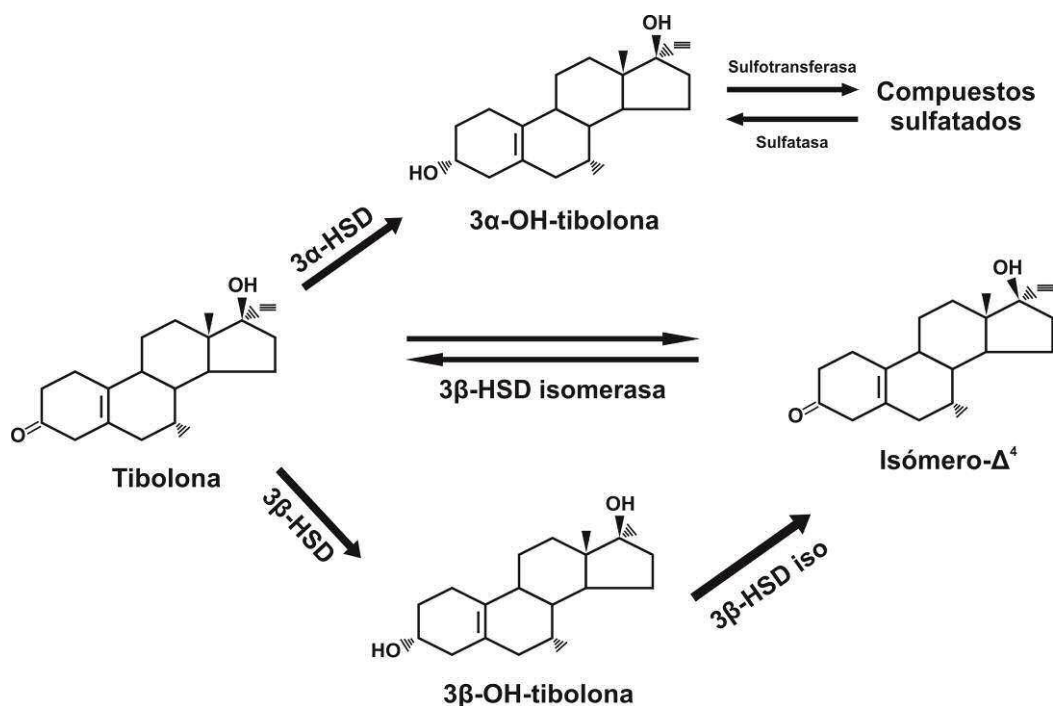
Además del aspecto antiinflamatorio del estradiol sobre la microglía, también se ha descrito que la hormona es capaz de modular la capacidad fagocítica de la microglía en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer [54].

## 4. TIBOLONA

La terapia estrogénica, sola o en combinación con progestágenos, es un tratamiento efectivo para aliviar los sofocos y evitar la osteoporosis en mujeres con menopausia. Sin embargo, el uso terapéutico del estradiol se ve limitado por sus acciones hormonales periféricas. Así, el aumento del riesgo de padecer cáncer de mama y endometriosis asociado a la terapia hormonal ha promovido la investigación de nuevas alternativas para el tratamiento de los síntomas de la menopausia. Esto dio lugar a la introducción del uso terapéutico de compuestos estrogénicos que imitan los efectos del estradiol sobre los síntomas de la menopausia, pero que no ejercen sus indeseables efectos periféricos, como son el aumento del riesgo de padecer cáncer de mama, endometriosis y cáncer de ovario [55]. A estos compuestos se les ha llamado moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs), los cuales tienen efectos agonistas, antagonistas o neutrales sobre estos receptores, dependiendo del tejido sobre el que actúen [56]. Estudios previos han mostrado que algunos de estos compuestos ejercen acciones neuroprotectoras y regulan la gliosis y la neuroinflamación. [34, 57-62]. Una característica interesante de estos compuestos, como el tamoxifeno o el raloxifeno, es que además de tener efectos neuroprotectores, son antagonistas de los receptores de estrógenos en cánceres de mama positivos para estos receptores [63]. A pesar de las ventajas de los SERMs, estas moléculas no están exentas de efectos secundarios no deseados.

Más recientemente se ha introducido la tibolona para el tratamiento de los síntomas de la menopausia. La tibolona es un esteroide sintético clasificado como modulador de la actividad estrogénica dependiente del tejido (STEAR) [64-66]. La

tibolona es estructuralmente diferente al estradiol y a los SERMs. Por ejemplo carece del anillo aromático A del estradiol y del resto de anillos aromáticos de los SERMs. En particular, el grupo hidroxilo en la posición C3 del anillo A, que confiere propiedades antioxidantes a la molécula del estradiol, no está presente en la tibolona [67].



**Figura 5.** Esquema del metabolismo de la tibolona. Basado en [66].

Al igual que los SERMs, la tibolona tiene efectos específicos dependiendo del tejido, pero a través de distintos mecanismos. De hecho, la selectividad de la tibolona depende de la actividad enzimática específica local que haya en el tejido. Así, la tibolona tiene efectos estrogénicos a través de sus metabolitos 3α y 3β-hidroxitibolona (formadas por las enzimas 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3α-HSD y 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3β-HSD). También, mediante la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa, la tibolona se convierte en un Δ<sup>4</sup>-isómero, que activa receptores de progesterona (PR) y andrógenos (AR) [66-68]. Además, la tibolona no tiene acciones estrogénicas en cánceres de mama positivos para ER, alivia los sofocos y previene la osteoporosis [69].

Aunque la tibolona es muy utilizada para el tratamiento de los síntomas de la menopausia, hay muy poca información sobre sus efectos en el cerebro. Se sabe que



tiene efectos en el sistema nervioso ya que revierte la pérdida de espinas dendríticas en células piramidales en CA1 del hipocampo de rata producidas por la ovariectomía [70]. También tiene efectos rápidos en la actividad de las neuronas hipotalámicas proopiomenalocortina [71] y aumenta los niveles de  $\beta$ -endorfinas en diferentes regiones del cerebro de ratas ovariectomizadas [72]. Además, la tibolona reduce la actividad acetilcolinesterasa y colinacetyltransferasa en el septum medial en monos ovariectomizados [73], sugiriendo una modulación de las neuronas colinérgicas. También se ha descrito que disminuye la hiperfosforilación de Tau en el hipocampo y cerebelo [74] y que tiene efectos ansiolíticos en ratas jóvenes [75], que atenúa el estrés oxidativo y los déficits colinérgicos en el hipocampo de ratas macho expuestas a ozono [76] y que reduce el volumen de infarto al administrarse de manera subcutánea en ratas hembra ovariectomizadas con una isquemia cerebral focalizada [77]. Además, estudios en células gliales *in vitro* han revelado que la tibolona reduce el daño oxidativo [78] y ejerce acciones antiinflamatorias debido a la reducción en la activación de NF- $\kappa$ B [79, 80].

## 5. LA IMPORTANCIA DE REALIZAR LOS ESTUDIOS EN AMBOS SEXOS

A lo largo de los años los estudios en mujeres se han sesgado a favor de los hombres, habiéndose realizado más ensayos clínicos en hombres que en mujeres. Uno de los motivos es que se consideraba que los resultados en mujeres eran más variables debido a las variaciones del ciclo hormonal, aunque ya se ha demostrado que no es así, a pesar de que se hagan los estudios en diferentes ciclos hormonales [81]. No fue hasta 1993 cuando el NIH (National Institutes of Health) declaró que tanto hombres como mujeres debían participar en ensayos clínicos [82]. A pesar de eso, en estudios preclínicos, con animales, se ha seguido con esa tendencia de excluir a animales hembra.

En los últimos años esto ha ido cambiando y en 2014 el NIH hizo un llamamiento a la comunidad científica [83] para que se incluyan estudios en ambos sexos debido a las diferencias presentadas a la hora de administrar dosis de fármacos o

de estudiar sus efectos secundarios, ya que se ha observado que en general los efectos adversos en mujeres son mayores que en hombres [84]. También se han encontrado diferencias sexuales en estudios de dolor, de adicción o de enfermedades neurológicas como la esclerosis múltiple [85-87]. Además, se han encontrado numerosas diferencias sexuales en modelos celulares *in vitro*, ya sean diferencias en el desarrollo o en la respuesta a estímulos nocivos [88-91]. Por este motivo y siguiendo la recomendaciones del NIH, los resultados de esta tesis se han separado entre machos y hembras, con independencia de que se detectasen o no diferencias sexuales.



---

# **OBJETIVOS**

---



# OBJETIVOS

## Objetivo general

Estudiar el efecto de la tibolona sobre la gliosis reactiva.

## Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de la tibolona sobre la gliosis reactiva en un modelo murino de lesión cortical.
2. Evaluar el efecto de la tibolona sobre la supervivencia neuronal en una lesión cortical.
3. Estudiar el efecto antiinflamatorio de la tibolona en células primarias de microglía.
4. Caracterizar el efecto de la tibolona sobre funciones básicas de la microglía como son la fagocitosis y la migración.
5. Evaluar el efecto antiinflamatorio de la tibolona en astrocitos primarios.
6. Estudiar el efecto de la tibolona sobre la capacidad fagocítica de los astrocitos.



---

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---





# I. MATERIALES PARA LOS EXPERIMENTOS *IN VIVO*

## 1. Animales

Los animales utilizados en el experimento fueron ratones hembra C57BL/6 de 3 meses de edad adquiridos en Harlam, España. Fueron estabulados en el animalario del Instituto Cajal y todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comunidad de Madrid (PROEX 134/17), y se adaptan a la normativa establecida por el parlamento Europeo (2010/63/EU) y la regulación de España (Ley 6/2013, 11 de Junio). Además, los animales fueron criados y mantenidos en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y recibieron agua y comida *ad libitum*.

## 2. Reactivos

**Tabla 1.** Tabla resumen de los reactivos usados en los experimentos *in vivo*.

USO	Producto	Casa comercial	Referencia
Para inmunohistoquímica	Complejo ABC	Pierce TM	32020
	DAPI	Calbiochem	268298
	Depex	Sigma-Aldrich	100579
	Diaminobencidina	Sigma-Aldrich	D5905
	Metanol	Thermo-Fisher Scientific	M/4058/17
	Vectalshield	VECTOR Laboratories	H-1000
	Xileno	Sigma-Aldrich	1330-20-7
Para cirugía	Isoflurano	Zoetis	571329
	Paraformaldehído	Sigma-Aldrich	30525-89-4
	Pentobarbital sódico	PROYMA	07400060
	Hidrocloruro de bupremorfina (Buprecare)	DFV group	-
	Meloxicam (Metacam)	Boehringer Ingelheim	-

## 3. Material y equipos

- Aguja para lesionar de 0.5 x 16 mm, BD microlance TM.
- Bisturí del 13, BRAUN.
- Estereotáxico digital, Stoelting Co.
- Microscopio confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Alemania).

- Microscopio óptico Leica DMRB-E (Leica Microsystems, Alemania).
- Sutura 5/0, LORCA MARIN S.L.
- Taladro (DREMEL) con brocas de 0,9mm.

## II. MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LA TIBOLONA EN UNA LESIÓN PENETRANTE CORTICAL

### 1. Protocolo general utilizado *in vivo*

Las ratonas hembra de 3 meses de edad fueron primero ovariectomizadas y se esperaron 4 días para hacer la lesión penetrante cortical. Ese mismo día y a las 24 y 48 horas, se trataron a los animales con tibolona o vehículo. A los 3, 7 y 14 días poslesión se perfundieron los animales para fijar el cerebro.

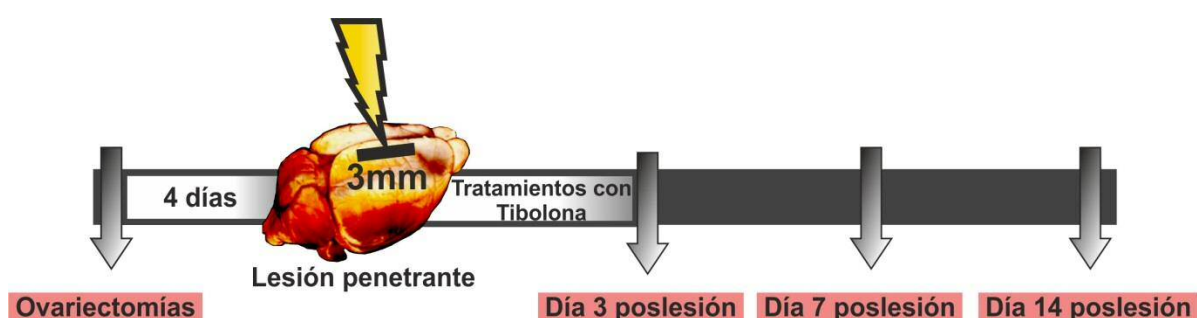


Figura 6. Esquema general del protocolo utilizado en el modelo de lesión cortical penetrante.

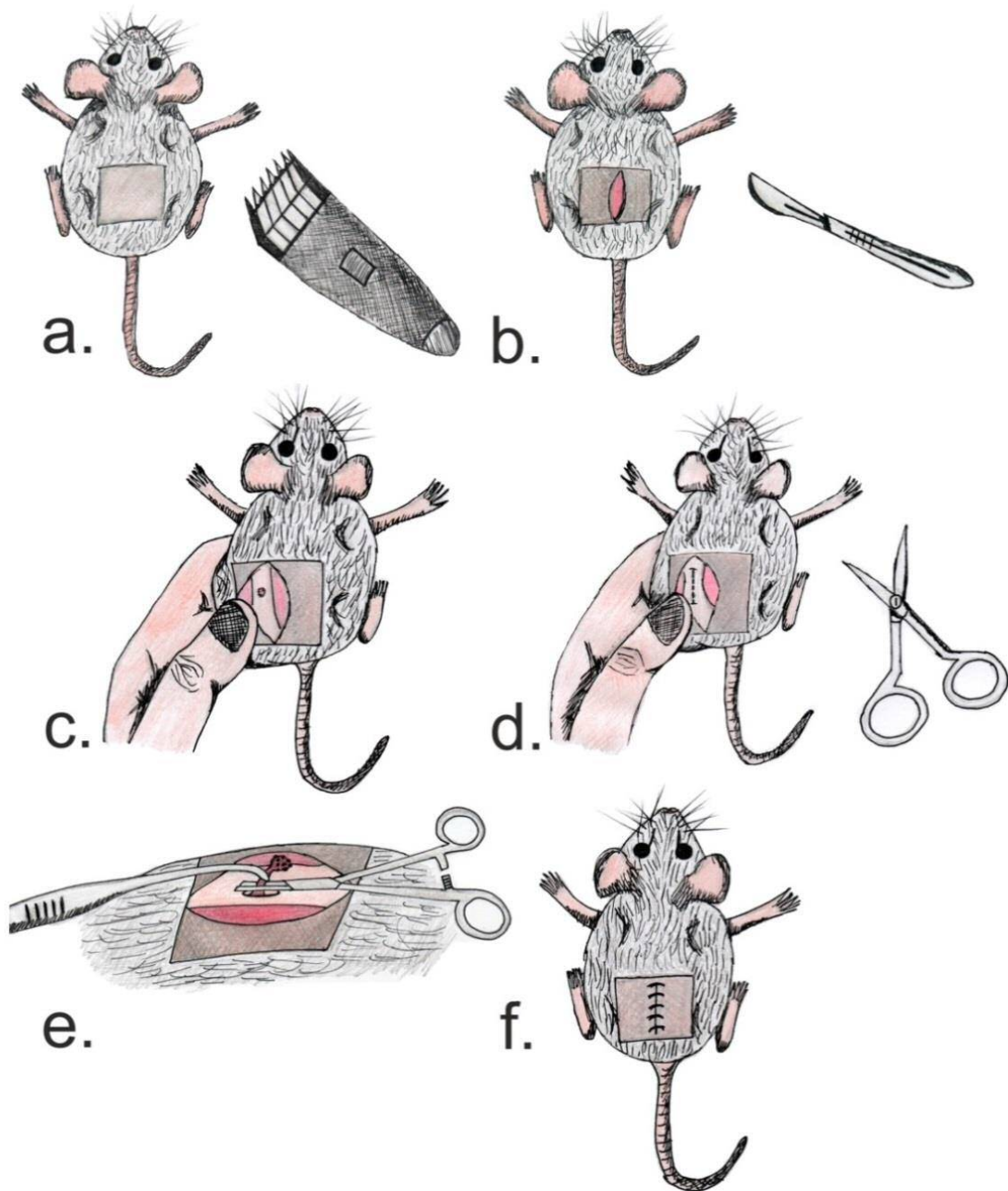
### 2. Tratamientos

Antes de llevar a cabo las ovariectomías, los animales fueron tratados con el analgésico hidrocloreuro de bupremorfina (0,05 mg/ Kg) y el antiinflamatorio meloxicam (1 mg/Kg). En el caso de las lesiones cerebrales solo se le inyectó el analgésico para que el antiinflamatorio no interfiriera en el análisis posterior de la neuroinflamación. En ambos casos los animales fueron anestesiados usando isoflurano.

Tabla 2. Tratamientos usados *in vivo*.

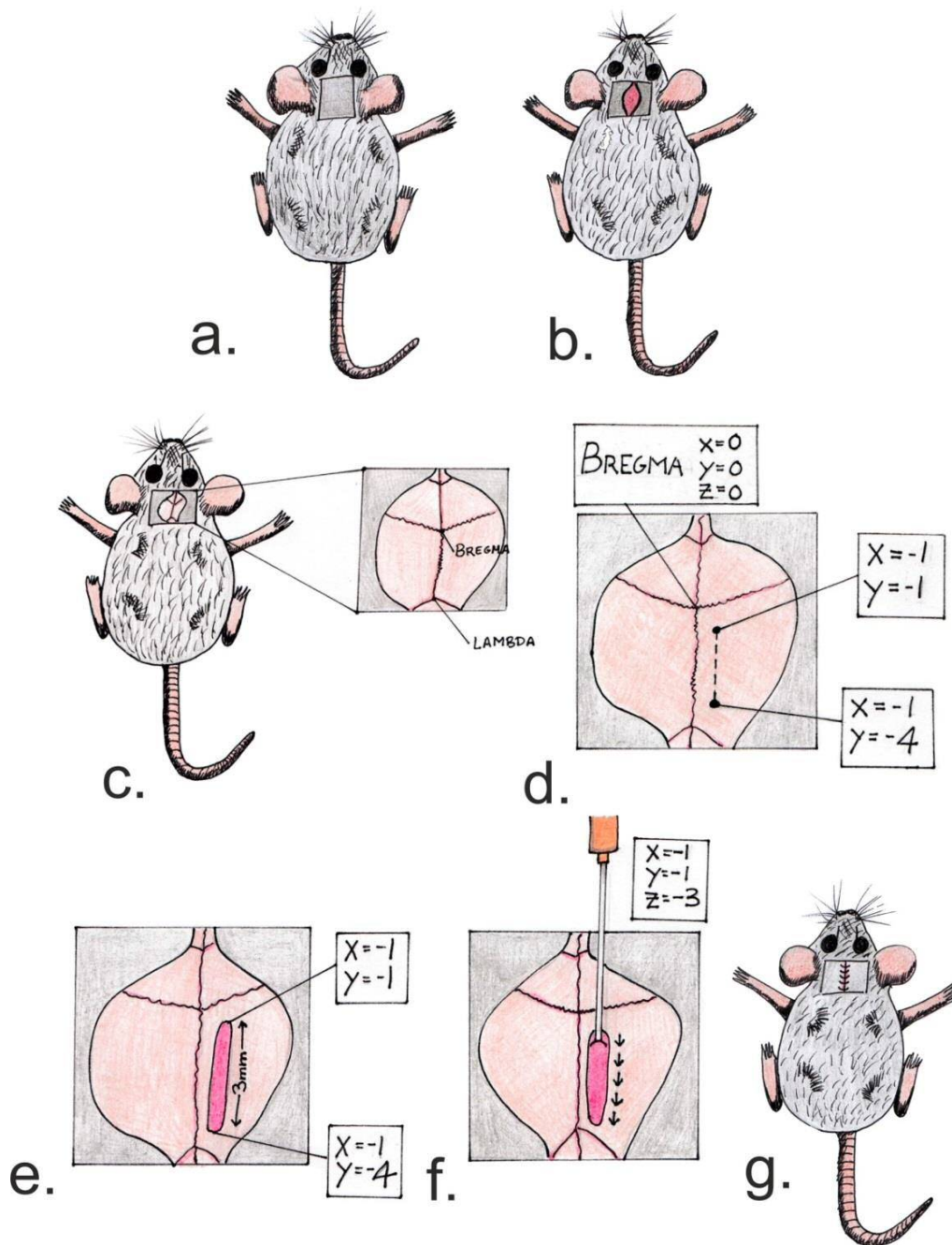
Compuesto	Dosis	Referencia/Casa comercial	Inyección
Tibolona	0,04 mg/Kg	T0827 / Sigma-Aldrich	Subcutánea
Aceite de maíz	X	ASUA	Subcutánea

### 3. Ovariectomías



**Figura 7. Esquema de las ovariectomías.** a) Se rasura la parte dorsal del ratón. b) Tras aplicar povidona yodada se realiza una incisión en la piel usando un bisturí del número 13. c) Se buscan los ovarios, tanto del lado derecho como del izquierdo, que se ven a simple vista. d) Se abre el peritoneo con tijeras de punta fina. e) Con pinzas curvas redondeadas se busca el ovario y se extrae del abdomen. Con unas pinzas hemostáticas rectas se corta el flujo sanguíneo. Se corta el ovario. Se hace lo mismo con el ovario contralateral. f) Se cierra la piel del animal con sutura 5/0 y se aplica povidona yodada.

#### 4. Lesión penetrante cortical



**Figura 8. Esquema de la lesión penetrante cortical.** a) Se rasura la parte dorsal de la cabeza. b) Tras aplicar en la piel povidona yodada se realiza una incisión usando un bisturí del número 13. c) Se expone el cráneo y se buscan las fisuras craneales. Se pueden identificar claramente Bregma y Lambda. d) Una vez identificadas las fisuras se fijan a 0 todas las coordenadas del estereotáxico sobre Bregma, y se buscan y marcan las coordenadas X=-1/Y=-1; X=-1/ Y=-4. e) Con el taladro y una broca fina de 0,9 mm se abre el cráneo entre los dos puntos antes señalados, lo que formará un hueco de 3mm de largo. f) Una vez bien abierto este canal en el cráneo se introduce en su extremo anterior una aguja de 0,5 mm a una profundidad de 3mm y se arrastra hasta el extremo posterior del canal. Posteriormente se saca la aguja. g) Una vez hecha la lesión se cierra la piel con hilo y se limpia con povidona yodada.

## 5. Perfusión cardiaca

A los 3, 7 y 14 días después de la lesión los animales fueron perfundidos usando una bomba peristáltica. Para ello los ratones se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/kg). Cuando ya no respondían a ningún estímulo se pasó a descubrirles el corazón. Se pinchó con una aguja el ventrículo izquierdo y se pasaron a través del sistema circulatorio del animal las soluciones. Además, se seccionó la aurícula derecha para abrir el circuito. Primero se perfundió una solución salina (NaCl 0,9%) para limpiar todos los vasos de sangre y posteriormente se perfundió una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% para fijar todos los tejidos, incluido el cerebro. Una vez fijado el animal, se extrajo el cerebro y se pasó a un tubo que contenía PFA al 4% para realizar una posfijación corta de 4 horas, seguida de 3 lavados con tampón fosfato 0,1M cada 12 horas. Una vez lavados los cerebros fueron embebidos en crioprotector.

Tras la fijación y lavado de los cerebros estos fueron cortados en un Vibratomo (VT 1000S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) en secciones coronales de 50  $\mu$ m de grosor para poder realizar las pruebas inmunohistoquímicas posteriores.

## 6. Inmunohistoquímica (IHQ)

Todas las inmunohistoquímicas se realizaron con cortes en flotación de 50  $\mu$ m y los lavados fueron hechos con tampón fosfato (PB)-BSA (albúmina del suero bovino) 0,1M con 0,3% tritón x-100. Todos los cortes debían mostrar la lesión completa para disminuir la variabilidad.

### 6.1 IHQ simple (revelada con DAB)

La peroxidasa endógena fue bloqueada durante 15 min con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PB más metanol al 50%. Posteriormente se incubaron los cortes durante toda la noche en agitación a 4°C, con los anticuerpos primarios contra GFAP o NeuN (antígeno del núcleo neuronal). Tras la noche se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios biotinilados. Después se amplificó la señal usando un complejo de avidina-biotina-peroxidasa (ABC, 1:500), que se unirá a la biotina del anticuerpo secundario, durante 1 hora y media.

Posteriormente se llevó a cabo la reacción enzimática con los sustratos de DAB (diaminobencidina tetrahidroclorada, 0,6 mg/ml PB 0,1M) y peróxido de hidrógeno (0,8  $\mu$ l/ml), dando lugar a un precipitado oscuro en el tejido. El tejido fue montado sobre un portaobjetos y deshidratado en crecientes concentraciones de etanol hasta llegar al xileno puro. Después los cortes fueron cubiertos con un cubreobjetos del tamaño adecuado usando el medio de montaje depex. El conteo de las células se llevó a cabo en el microscopio óptico (Leica DMRB-E).

## 6.2 IHQ de fluorescencia

Antes de incubar con el anticuerpo primario los cortes fueron lavados con tampón fosfato-BSA 0,1M con 0,5% tritón x-100 para incrementar la permeabilidad del corte. Después se incubó el anticuerpo primario durante toda la noche, en agitación y a 4°C. Tras la incubación los cortes se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas. A partir de este punto todo el proceso se hizo en oscuridad debido a que el fluorocromo asociado al anticuerpo secundario es fotosensible. Antes de montar los cortes se procedió a incubarlos con DAPI (1:5000; Calbiochem) durante 30 minutos. Posteriormente se cubrieron los cortes con un cubreobjetos del tamaño adecuado usando Vectalshield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) y se sellaron con esmalte de uñas transparente. Los cortes de observaron y fotografiaron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP5).

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios utilizados.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Casa comercial	Referencia
Iba1	Conejo	1:2000	WAKO	019-19741
GFAP	Conejo	1:1000	DAKO	Z0334
NeuN	Ratón	1:1000	Millipore	MAB377

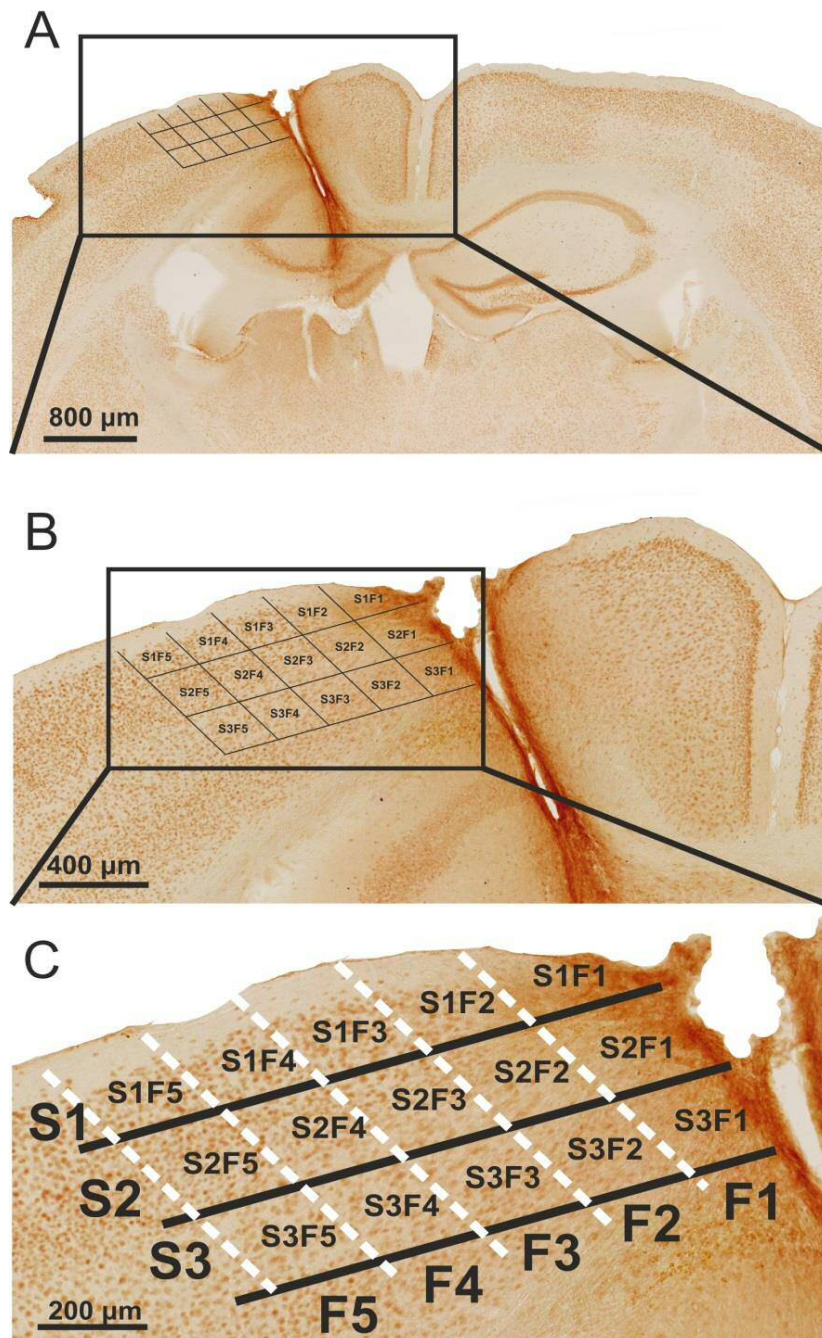
**Tabla 4.** Anticuerpos secundarios utilizados.

Antígenos (IgG)	Especie hospedadora	Dilución	Casa comercial
Conejo Alexa 568	Cabra	1:1000	Invitrogen
Conejo biotinilado	Cabra	1:300	Thermo scientific
Ratón biotinilado	Cabra	1:300	Thermo scientific



## 7. Análisis morfométrico

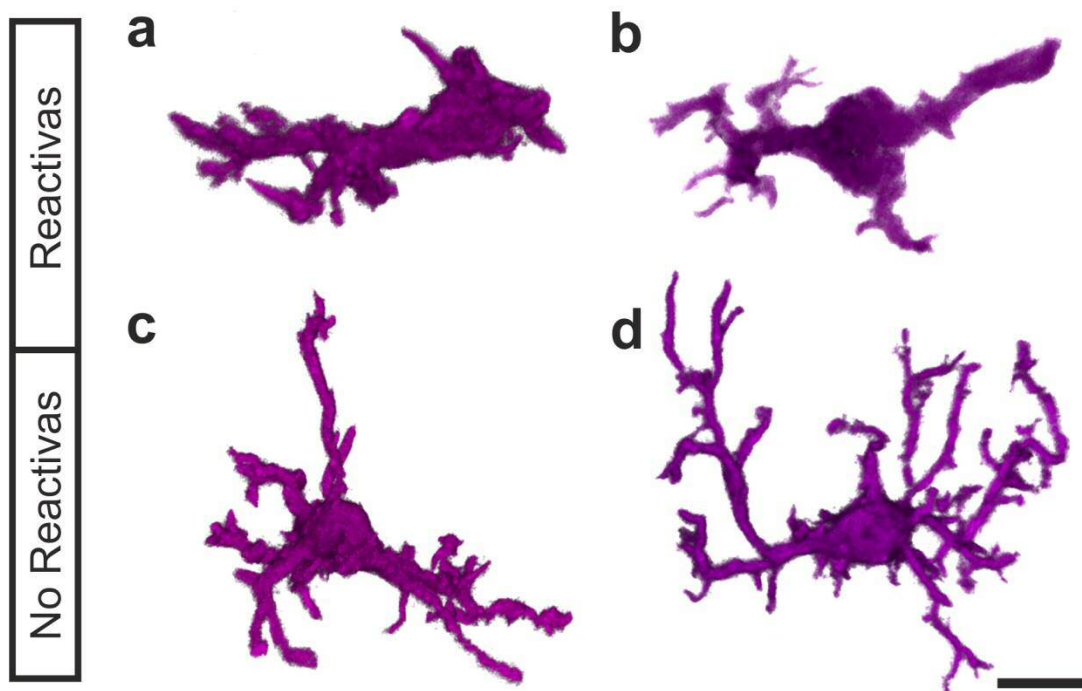
El recuento celular se hizo sin conocer el grupo experimental al que pertenecían las secciones histológicas. El número de células GFAP, NeuN y Iba1 (proteína adaptadora de unión a iones de calcio) positivas se contaron usando 5 franjas verticales consecutivas (F1-F5) desde la lesión de 600 x 200  $\mu\text{m}$ . Además, en el caso de la GFAP y el Iba1, estas franjas se subdividieron en 3 secciones horizontales de 200  $\mu\text{m}$  desde la parte dorsal de la corteza a la ventral. Corresponden a S1-S3.





**Figura 9. Representación de un corte histológico con NeuN 14 días después de la lesión. a) y b) Zona de la corteza que se estudió. c) Esquema de las divisiones usadas para definir las regiones de recuento celular. En el caso de NeuN no se usaron secciones horizontales (S1-S3), solo franjas verticales (F1-F5).**

El número de células GFAP, NeuN e Iba1 positivas se contó mediante la técnica del disertor óptico usando todo el grosor del corte con un objetivo de 40X y dividiendo cada sección en las regiones de recuento como se ha explicado anteriormente. En el caso de Iba1, se hicieron fotografías en el microscopio confocal de todo el grosor del corte. Además, en el caso de Iba1, se diferenciaron dos tipos de fenotipos celulares: las células con un soma grande y poco diferenciado con prolongaciones cortas fueron clasificadas como microglía reactiva; en el caso de que el soma fuera pequeño y compacto con prolongaciones largas y numerosas, fueron clasificadas como microglía no reactiva.



**Figura 10. Reconstrucción tridimensional de microglía reactiva y en reposo.** La barra de escala corresponde a 7,5  $\mu\text{m}$ . **a) y b)** Ejemplos de células con fenotipo reactivo. **c) y d)** Ejemplo de células con fenotipo no reactivo.

## 8. Análisis estadístico

Los datos de las gráficas están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Se usó el paquete informático IBM SPSS versión 24 para el análisis estadístico. Primero se estudió la normalidad de las variables mediante un test de normalidad *Kolmogórov-Smirnov*. Si alguna variable no era normal se transformó a su logaritmo neperiano. Después se estudiaron las varianzas de los datos usando el test de *Levene* para saber si eran homocedásticos o no, y posteriormente para la comparación de las varianzas se usó el test de análisis de la varianza (ANOVA). Primero se analizaron los datos usando un análisis ANOVA de tres factores, para ver las relaciones entre todos los grupos y estudiar las posibles diferencias, efectos e interacciones entre el tiempo, los tratamientos y la distancia desde la lesión. Después se fueron analizando los datos por separado para ver las diferencias concretas dentro de cada tiempo (a 3 o a 7 días por separado), usando una ANOVA de 2 factores. Para ver el nivel de significación entre los distintos grupos se hizo el post-hoc *Bonferroni* (para datos homocedásticos) o el post-hoc *Games-Howell* (para datos no homocedásticos). En el caso de que los datos no siguieran una distribución normal se usó el test de *Kruskal-Wallis*. Para la comparación de la media de dos grupos usamos el test *t-student* (si los datos seguían una distribución normal) o el test de *Mann Whitney* (si la distribución no era normal).

## III. MATERIALES PARA LOS EXPERIMENTOS *IN VITRO*

### 1. Animales

Ratas Wistar posnatales de 0 a 2 días de edad criadas en el animalario del Instituto Cajal.

### 2. Reactivos

**Tabla 5.** Tabla resumen de los reactivos usados en los experimentos *in vitro*.

Producto	Casa comercial	Referencia
Ácido fosfórico	Thermo-Fisher Scientific	AC201145000
Biopartículas <i>E.coli</i> -pHrodo	Thermo-Fisher Scientific	P35366
Cy3 (marcador de cianina 3)	GE Healthcare	PA23001

DAPI	Calbiochem	268298
Frascos de cultivo 75 cm <sup>2</sup>	Corning Brand (FALCON)	353135
Insertos (8 µm)	Corning	3422
L-Glutamina	GIBCO	25030-081
Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, con rojo fenol)	GIBCO	11995065
Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, sin rojo fenol)	GIBCO	31053-028
Medio de cultivo del Instituto Roswell Park Memorial 1640 (RPMI 1640) (sin rojo fenol)	GIBCO	11835063
Medio Neurobasal (sin rojo fenol)	GIBCO	12348017
Mowiol	Merck	803456
N-(1-naftil) etilendiamino diclorhidrato	Santa Cruz Biotechnology	Sc-203148A
Penicilina/Estreptomicina (P/S)	GIBCO	15240-062
Piruvato sódico	GIBCO	11360-070
Poli-L-Lisina	Sigma-Aldrich	P2636
Suero bovino fetal (FBS)	GIBCO	10500-064
Suero de caballo (HS)	GIBCO	26050-088
Sulfanilamida	Sigma-Aldrich	S9251
<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
Tripsina	Sigma-Aldrich	T4674
Tripsina EDTA	Sigma-Aldrich	T4174
Vectalshield	VECTOR Laboratories	H-1000

### 3. Equipos

- Agitador orbital (Infors Minitron Botminger, Suiza).
- Campana de flujo laminar (Staril, Mazzo di Rho, Italia).
- Centrífuga 5415R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- Incubador (RS Biotech Galaxy S, Escocia, Reino Unido).

- Microscopio confocal Leica TCS SP5 directo (Leica Microsystems, Alemania).
- Microscopio de fluorescencia óptico Leica DMI6000 acoplado a una cámara Leica DFC350 FX.
- Multiskan Ascent (thermo Electron Co., Shangau, China).
- Placas de cultivo estériles (FALCON, Corning, San Dimas, CA).
- Sistema 7500 Real Time PCR System de PCR cuantitativa (Applied Biosystems, Madrid, España).
- Sonicador (sonics & Materials Ins, Vibra Cell, Danbury, CT, EE.UU.).

## IV. MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LA TIBOLONA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MICROGLÍA Y ASTROCITOS

### 1. MICROGLÍA

#### 1.1 Cultivo primario

Las células de microglía se obtuvieron de ratas posnatales entre 0 y 2 días tras su nacimiento. Se extrajeron las células de la corteza y el hipocampo y se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (FALCON), uno para cada hemisferio. Se usó medio DMEM 10:10:1, que está formado por DMEM con rojo fenol al 10% de FBS, 10% de HS y 1% de P/S. Tanto los frascos como las placas con cubres fueron pretratados con poli-L-lisina 10 µg/ml. Se dejó crecer la mezcla de células gliales durante 2 semanas en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, haciendo un cambio de medio al final de la primera semana. Tras las dos semanas se agitaron los frascos en un agitador orbital durante 3 horas a 230 rpm [92].

Tras la agitación se retiró el sobrenadante, en el que se encuentran las células de microglía, y se incubaron las células remanentes con medio DMEM 10:10:1 para obtener posteriormente los astrocitos. El sobrenadante se centrifugó durante 10 min a 1050 rpm, luego se descartó el nuevo sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio RPMI al 1% de FBS. El número de células se midió usando una cámara de

Neubauer. A continuación, se sembraron las células a una densidad diferente dependiendo del tipo de placa que se usara para cada experimento:

- 25.000 células por  $\text{cm}^2$  de pocillo en las placas de 24 pocillos (FALCON) para el **estudio de fagocitosis** y la misma densidad en los insertos (tamaño de poro de 8- $\mu\text{m}$ ) para el **estudio de migración**. Las células se sembraron con medio RPMI sin rojo fenol al 1% de FBS. Además se usó esta densidad para los estudios con la **tecnología Luminex**.
- 60.000 células por  $\text{cm}^2$  de pocillo en las placas de 96 pocillos para los **ensayos de MTT y nitritos**. Las células se sembraron con medio RPMI sin rojo fenol al 1% de FBS.
- 100.000 células por  $\text{cm}^2$  de pocillo en las placas de 6 pocillos para los estudios de **expresión de ARN mensajero (ARNm)**. Las células se sembraron con medio RPMI sin rojo fenol al 1% de FBS.

### 1.2 Estudio de la fagocitosis

Tras sembrar las células de microglía a la densidad indicada se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  hasta el día siguiente. Treinta y dos horas antes de hacer el estudio de fagocitosis, las células se trataron con tibolona o estradiol. En algunos casos, las células se incubaron con los antagonistas de los receptores de estrógeno (MPP para el  $\text{ER}\alpha$ , PHTPP para el  $\text{ER}\beta$  y G15 para el GPER1) o el antagonista del receptor de andrógenos, flutamida, 1 hora antes de añadir tibolona.

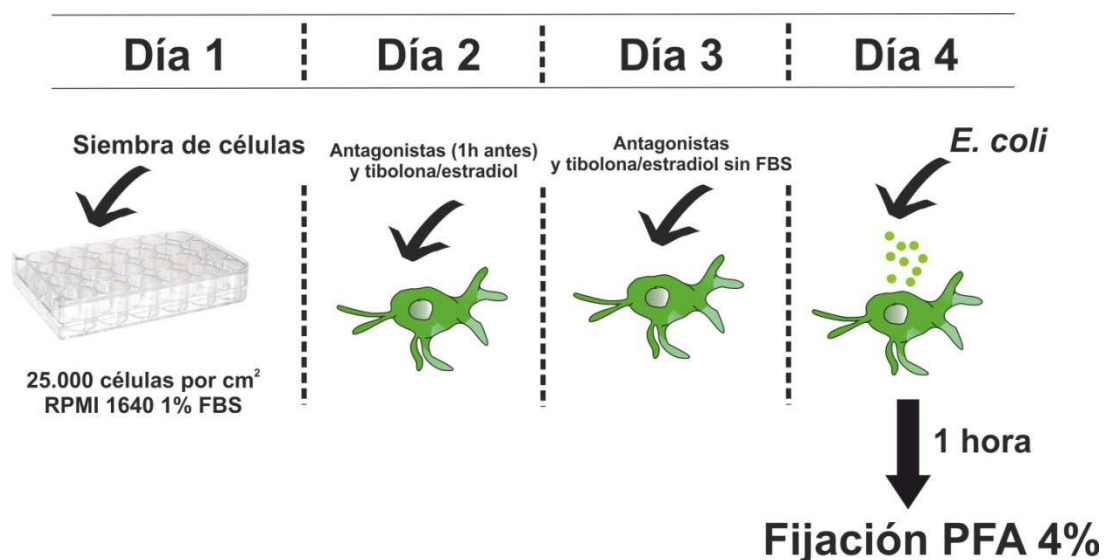
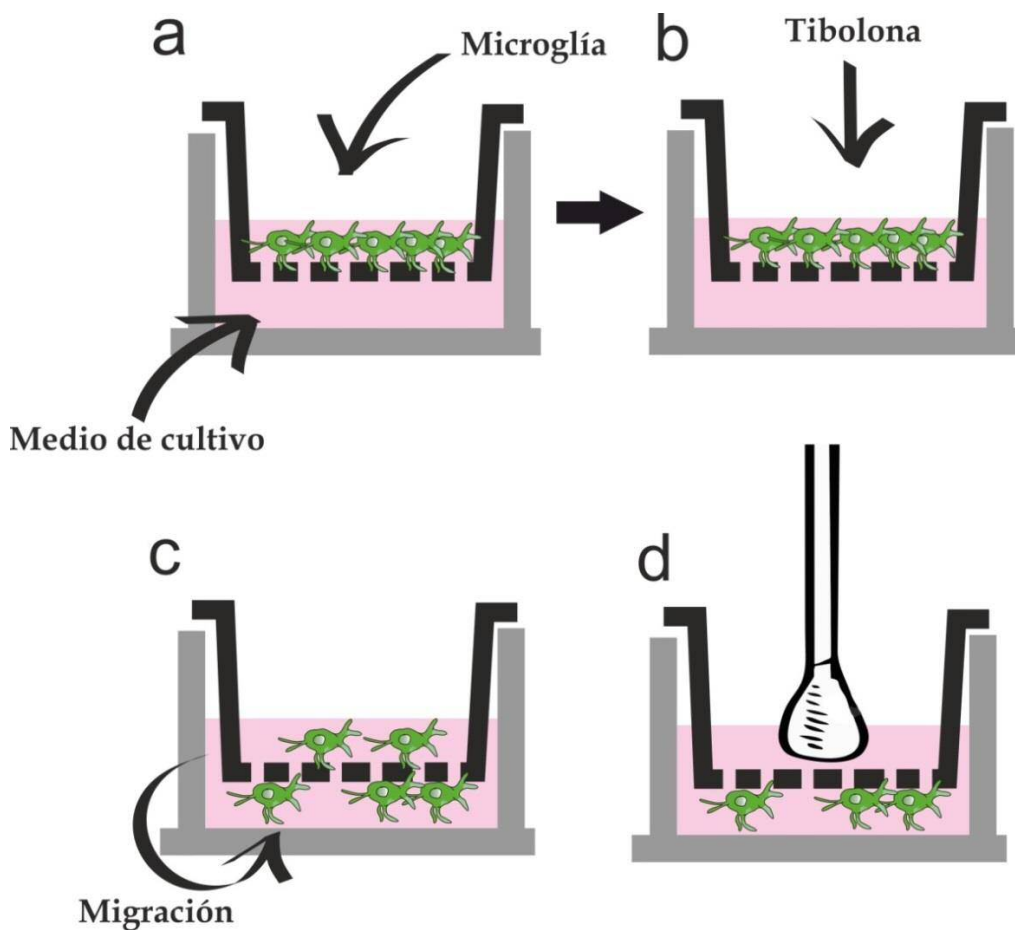


Figura 11. Esquema del protocolo usado para estudiar la fagocitosis en células de microglía.

Los tratamientos se hicieron en RPMI con 0,1% de FBS. Veinticuatro horas antes del ensayo se sustituyó el medio de nuevo con los tratamientos (tibolona/ estradiol/ antagonistas), pero en este caso con medio RPMI sin FBS (ayuno). Tras las 24 horas de ayuno se realizó el estudio de la fagocitosis usando biopartículas de *Escherichia coli* (*E. coli*) conjugadas con pH-rodo verde a una concentración de 2  $\mu$ l/ml. Los cultivos se incubaron durante una hora con las biopartículas y después se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron los pocillos con tampón fosfato 0,1 M.

### 1.3 Estudio de la migración



**Figura 12.** Esquema del protocolo usado para estudiar la migración en células de microglía. **a)** La microglía se sembró en la parte superior del inserto a la concentración correspondiente y se añadió medio al pocillo. **b)** Las células se trataron con tibolona. **c)** Al cabo de 24 horas algunas células han migrado al otro lado del inserto. **d)** Se limpió la parte superior del inserto para eliminar las células que no habían migrado y los cultivos se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 4%.

Tras sembrar las células de microglía a la densidad indicada en los insertos se hizo el mismo tratamiento con la tibolona que el utilizado en el estudio de la fagocitosis. Las células se incubaron con tibolona durante 32 horas antes de la fijación, primero con 0,1% FBS y 24h antes de la fijación sin FBS. Tras esto se sumergieron los insertos en una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos para fijar las células y posteriormente se lavaron con PBS. A continuación, se eliminaron las células de la parte superior del inserto usando un bastoncillo con medio RPMI, se desmontaron los insertos con un bisturí y las rejillas con las células que habían migrado se montaron en portaobjetos usando como medio de montaje Vectalshield con DAPI.

#### 1.4 Tratamientos usados en la fagocitosis/migración

**Tabla 6.** Tratamientos usados para estudiar la fagocitosis o la migración en células de microglía.

Compuesto	Función	Tiempo total	Concentración	Casa comercial	Nº de referencia
<b>Flutamida</b>	Antagonista receptor andrógenos	40h	100 nM	Tocris	Cod 4094
<b>G15</b>	Antagonista receptor GPER1	40h	100 nM	Tocris	Cod 3678
<b>17β-Estradiol</b>	Esteroides sexuales	40h	10 nM	Sigma-Aldrich	E2758
<b>MPP</b>	Antagonista receptor ERα	40h	100 nM	Sigma-Aldrich	M7068
<b>PHTPP</b>	Antagonista receptor ERβ	40h	100 nM	Tocris	Cod 2662
<b>Tibolona</b>	Esteroides sintéticos	39h	100 nM	Sigma-Aldrich	T0827

#### 1.5 Análisis de imagen

##### 1.5.1 Análisis de la fagocitosis en microglía

Tras el sellado de los cubres se hicieron fotos en el microscopio de fluorescencia (Leica DMI 6000) con el objetivo 20X. En todo caso se mantuvieron las mismas condiciones del microscopio y de la exposición al hacer las fotos. Posteriormente, usando el programa FIJI (ImageJ 1.52n National Institutes of Health, USA) se midió la intensidad en el canal verde, ya que es directamente proporcional a la cantidad de *E. coli* fagocitado por parte de las células de microglía.

### 1.5.2 Análisis de la migración en microglía

Se hicieron fotos en el microscopio de fluorescencia (Leica DMI 6000) con el objetivo 20X. Posteriormente usando el programa FIJI se hizo un recuento del número de núcleos.

## 2. ASTROCITOS

### 2.1 Cultivo

Los astrocitos se obtuvieron de los mismos frascos en los que fue sembrada la microglía. Para ello se agitaron estos frascos durante toda una noche (16 h aproximadamente) a 280 rpm a 37°C. Tras la agitación se descartó el sobrenadante y las células remanentes se despegaron usando tripsina-EDTA al 10% durante 20 min a 37°C y luego se paró la reacción con medio DMEM sin rojo fenol con 1% de FBS. Se recogió este medio con los astrocitos y se centrifugó durante 10 minutos a 1050 rpm, tras los cuales se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con medio DMEM sin rojo fenol enriquecido con piruvato (1 mM) y L-Glutamina (2 mM) y se contaron las células usando una cámara de Neubauer.

Se sembraron las células a una densidad diferente dependiendo del tipo de placa que se usara por cada experimento:

- 10.000 células por  $\text{cm}^2$  de pocillo las placas de 24 pocillos (FALCON) para el **estudio de la fagocitosis**. Las células sembraron con medio DMEM sin rojo fenol al 1% de FBS.
- 50.000 células por  $\text{cm}^2$  de pocillo las placas de 24 pocillos (FALCON) para el estudio del **LUMINEX**. Las células se sembraron con medio DMEM sin rojo fenol al 1% de FBS.
- 60.000 células por  $\text{cm}^2$  de pocillo en las placas de 96 pocillos para los **ensayos de MTT y nitritos**. Las células se sembraron con medio DMEM sin rojo fenol al 1% de FBS.
- 25.000 células por  $\text{cm}^2$  de pocillo en las placas de 6 pocillos para los estudios de **expresión de ARNm**. Las células se sembraron con medio DMEM sin rojo fenol al 1% de FBS.



## 2.2 Estudio de la fagocitosis

Tras sembrar las células de astrocitos a la densidad indicada se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 horas. Treinta y dos horas antes de hacer el estudio de fagocitosis, se trataron las células con tibolona y los antagonistas (estos 1 hora antes que la tibolona). Los tratamientos se hicieron en DMEM al 0,1% de FBS y 24 horas antes del ensayo se sustituyó el medio de nuevo con tibolona y los antagonistas pero en este caso con medio DMEM sin FBS (ayuno). Tras las 24 horas de ayuno se realizó el estudio de la fagocitosis usando detritos celulares conjugados con Cy3 a una concentración de 10 µl/ml. Los astrocitos se incubaron con los detritos celulares durante 1 hora y después se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron los pocillos con PB 0,1 M.

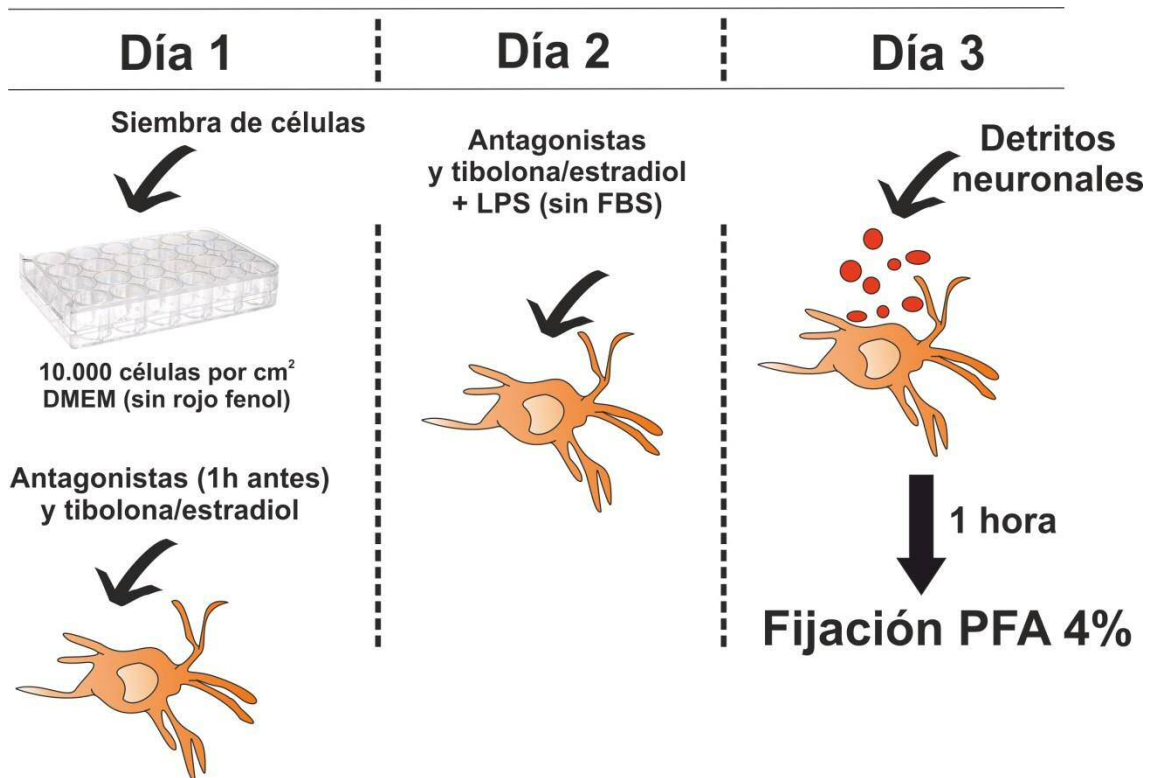


Figura 13. Esquema del protocolo usado para estudiar la fagocitosis en células astrocitarias.

**Preparación del detrito celular conjugado con Cy3.** El detrito celular se obtuvo de hipocampos de ratones machos y hembras por separado a E17. Tras ser extraídos se disgregaron y se tripsinizaron (tripsina al 0,5%) durante 15 min. Posteriormente los hipocampos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 ml de medio Neurobasal y este

se mantuvo a -20°C hasta ser conjugado con el marcador Cy3. Antes de la conjugación con el marcador se sonicó la suspensión celular para romper las estructuras celulares. El marcador Cy3 se conjuga con 1000 neuronas por mililitro, completando el volumen usando una mezcla de 2ml de 0,1M NaCO<sub>3</sub> y 8ml 0,1M NaHCO<sub>3</sub>. Una vez mezclado todo, el Cy3 sobrante se eliminó por centrifugación.

### 2.3 Tratamientos usados en la fagocitosis de astrocitos

**Tabla 7.** Tratamientos usados para estudiar la fagocitosis en células astrocitarias.

Compuesto	Función	Tiempo total	Concentración	Casa comercial	Nº de referencia
<b>Tibolona</b>	Esteroides sintético	39h	100 nM	Sigma-Aldrich	T0827
<b>LPS (O26:B6)</b>	Agonista receptor TLR4	24 h	1 µg/ml	Sigma-Aldrich	L2654
<b>Letrozol</b>	Inhibidor aromatasa	40h	100 nM	Tocris	Cat N°4382
<b>PHTPP</b>	Antagonista receptor ERβ	40h	100 nM	Tocris	Cod 2662
<b>MPP</b>	Antagonista receptor ERα	40h	100 nM	Sigma-Aldrich	M7068
<b>G15</b>	Antagonista GPER1	40h	100 nM	Tocris	Cod 3678
<b>17β-Estradiol</b>	Esteroides sexuales	39h	10 nM	Sigma-Aldrich	E2758
<b>Flutamida</b>	Antagonista receptor andrógenos	40h	100 nM	Tocris	Cod 4094

### 2.4 Inmunocitoquímica de astrocitos

Primero se permeabilizaron las células con Tritón X-100 (0,12% en PB/gelatina 0,12%) durante 4 minutos y se lavaron tres veces con PB/gelatina 0,12%. Después se incubaron las células con el anticuerpo primario de conejo anti-GFAP (DAKO) a una concentración 1:1000 durante 1h a temperatura ambiente. Tras la incubación se hicieron varios lavados con PBS/gelatina y después se puso el anticuerpo secundario cabra anti conejo Alexa 488 (Thermo Fisher) a una concentración 1:1000 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras el tiempo de incubación se lavaron las células con PB 0,1M. Después se incubaron las células con DAPI a una concentración de

1:5000 durante 30 minutos y después se lavaron los cubres con PB 0,1M. Para acabar se sellaron los cubres usando mowiol.

## 2.5 Análisis de la fagocitosis en astrocitos

Tras el sellado de los cubres se hicieron fotos en el microscopio de fluorescencia con el objetivo 20X usando las mismas condiciones para todas las fotos. Posteriormente usando el programa FIJI (ImageJ 1.52n National Institutes of Health, USA) se midió la intensidad que había en el canal rojo.

# V. MÉTODOS COMUNES PARA MICROGLÍA Y ASTROCITOS

## 1. Ensayo de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*)

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico que mide de manera indirecta la actividad metabólica celular. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo que al entrar en una célula viva la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa la reduce haciendo que pierda el grupo bromuro. Al reducirse, se forma un precipitado llamado formazan que tiene color violeta que es soluble en Dimetilsulfóxido (DMSO) y es proporcional al número de células vivas. La absorbancia a una longitud de onda de 595 nm se midió en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent).

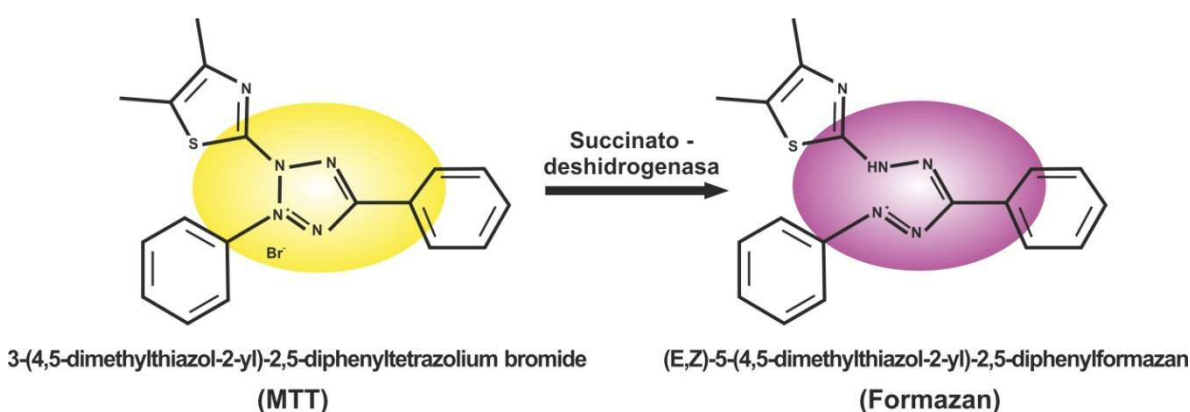


Figura 14. Mecanismo de acción del MTT para medir la viabilidad celular.

## 2. Cuantificación de nitritos

La cuantificación de nitritos mide de manera indirecta el nivel de inflamación celular. Al activarse la ruta de NF- $\kappa$ B, que es una ruta clásica de inflamación que

comienza con la activación de receptores TLR4, TLR2 o IFN $\gamma$ , aumenta la activación de iNOS, lo que causa una mayor liberación de nitritos al medio.

Para cuantificar los nitritos del medio se usa la solución de Griess:

- Sulfanilamida (10 mg/ml).
- N-(1-naftil)etilendiamina diclorhidrato (1 mg/ml).
- Ácido fosfórico (1,5%).

Todo disuelto en agua destilada. La sulfamida va a reaccionar con los nitritos, formando una sal de diazonio. El N-(1-naftil)etilendiamina diclorhidrato hará que esta sal se vuelva rosada. Posteriormente se hace un análisis colorimétrico usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm. Cuanta mayor absorbancia mayor cantidad de nitritos en el medio y por lo tanto mayores niveles de inflamación celular.

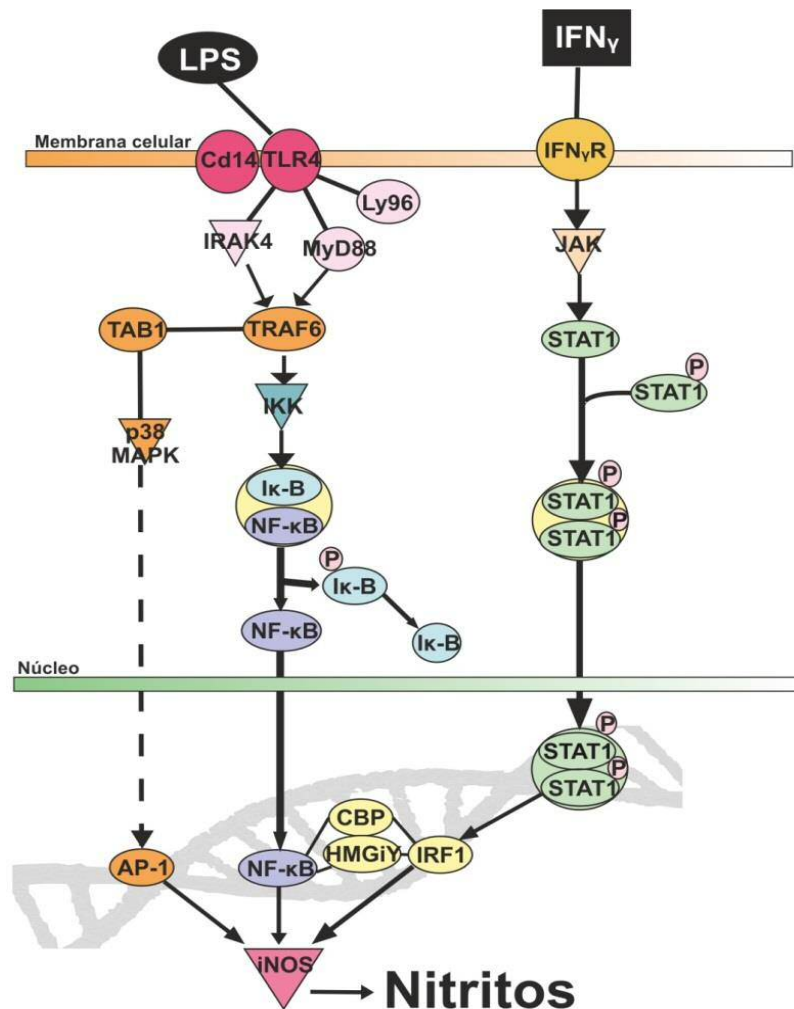


Figura 16. Resumen de la ruta de señalización por la que se forman los nitritos. Modificado de [93].

### 3. PCRs cuantitativas a tiempo real (RT-qPCR)

Para analizar los cambios en la expresión de los genes de interés se extrajo el ARNm total de las células en cultivo utilizando el kit Illustra RNAspin Mini RNA isolation de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). A continuación se preparó el ADN complementario (ADNc) a partir de 0,75 µg de ARN de microglía y 0,5 µg de ARN de astrocitos, usando la enzima transcriptasa inversa M-MLV (Promega, EEUU) según las indicaciones del fabricante. Finalmente se llevó a cabo la amplificación del ADNc mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) (ABI Prism 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems) con el programa de ciclos recomendados por el fabricante (40 ciclos: 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C). La enzima polimerasa empleada fue la presente en el *SYBR Green Master Mix* para todos los genes, cuyos cebadores (Tabla 8.) fueron diseñados mediante el programa PrimerBlast de NCBI (National Center for Biothecnology Information, USA) y sintetizados por Thermo Fisher.

El análisis de los datos de la PCR cuantitativa se llevó a cabo por el método del  $\Delta\Delta Ct$  (User Bulletin 2 P/N 4303859B, Applied Biosystems); los cebadores diseñados se validaron mediante curvas estándar, de tal modo que se demostrara que la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores fuera la misma que la del control endógeno (ARNm 36B4 y GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) para microglía; y GADPH y 18S para los astrocitos). Además, se empleó el *Best Keeper Index* para determinar la estabilidad de los genes de control endógeno y estimar la cantidad de ARNm en cada muestra (<http://gene-quantification.com/bestkeeper.html>) [94].

**Tabla 8.** Cebadores utilizados en el estudio del ARNm.

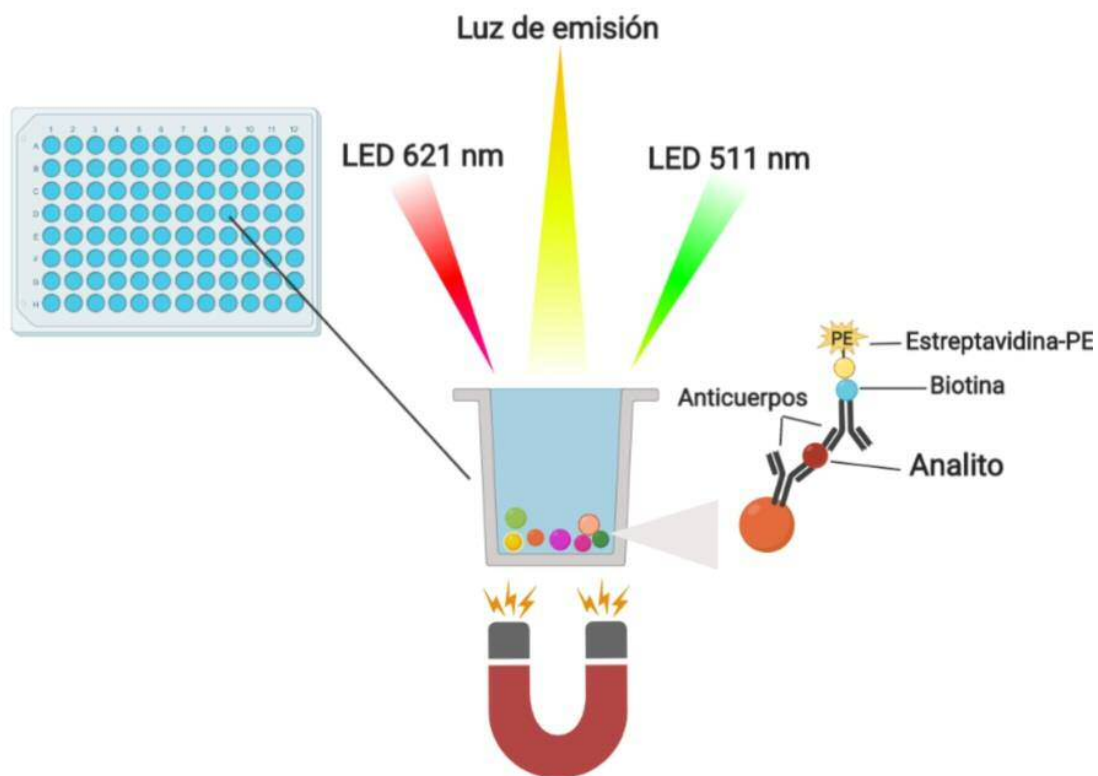
NOMBRE	NÚMERO DE ACCESO	FORWARD 5' - 3'	REVERSE 5' - 3'
<b>IRAK4</b>	NM_001106791.2	GGCAATCTGAAGTCCCC TCGT	TCTGACGTTCTCGCTTCCT
<b>P2RY6</b>	NM_057124.2	GGTGAAAGCAGGCAAC GACT	TCTCAGCCTCAAGCTACCCT A
<b>CCR2</b>	NM_021866	CTCTGCAAACAATGCCCA GTT	AACTGAGACTTCTTGCTCCC C
<b>Receptor de manosas</b>	NM_001106123.2	GGTTGGATTGAGGCCTG AAA	AACGTCCCTTTGTTTTGAAC ATC

<b>P2Y12</b>	NM_022800.1	CCCAGCAATCTTTGGGT GC	TGCCAGACCAGACCAAATC
<b>Ifngr1</b>	NM_053783	CACGGGTGATACCCAGG AAC	TCGGCTAACGTGCAAAGTCT
<b>CD36</b>	NM_001109218.1	CATTGGCGATGAGAAAG TGG	GCCACAAACATCAGTACTCC A
<b>TREM2</b>	NM_001106884.1	CCACGTGTTTGTCTGTT GC	CAGTGCCTCAAGGCGTCATA
<b>Sphk1</b>	NM_001270811.1	ACGTGCGGGGGTGTCAA	CATATGCTTGCCCTTCTGCA
<b>CD200R1</b>	NM_023953.1	CATAGGATGCATTTGTCT TTGAAA	GCTGCATTTTCATCCTCCTCAA TA
<b>MEGF10</b>	NM_001100657.1	AAGTCGAGACGTGTGTG TCC	CCCAGTGATCACCGTCACAA
<b>MerTK</b>	NM_022943.1	GGCTCAGTTTCTGTCCA AA	GGGTTGATGAGGGTGCCTA A
<b>36B4</b>	NM_022402.2	TTCCCACTGGCTGAAAA GGT	CGCAGCCGCAATGC
<b>GAPDH</b>	NM_017008.4	GGCATTGCTCTCAATGAC AA	ATGTAGGGCCATGAGGTCC AC
<b>18S</b>	NR_046237.1	AGACGAACCAGAGCGAA AGC	TGGTCGGAACACTACGACGGT AT
<b>ABCA1</b>	NM_178095.2	AACAGTTTGTGGCCCTTT TG	AGTTCCAGGCTGGGGTACTT
<b>GULP1</b>	NM_001013171.2	GGAGCTCCTGTGCTTTAC CC	TGCTCAGCTCAGTAATGCC

#### 4. Ensayo multiplex con tecnología Luminex

Se usó este ensayo para la cuantificación de citoquinas pro- y antiinflamatorias secretadas al medio de cultivo por parte de los astrocitos y la microglía. Las citoquinas/quimioquinas que se estudiaron fueron: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 (interleuquina 12), MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 y TNF $\alpha$ .

El método consiste en poner en una placa de 96 pocillos partículas magnéticas que tienen asociado el anticuerpo específico para la proteína de interés. Esta técnica permite poner varios tipos de partículas magnéticas en cada pocillo y así hacer un estudio multiensayo por pocillo, por lo que en una sola placa se pudieron medir todas las citoquinas/quimioquinas seleccionadas.



**Figura 17. Esquema de la técnica usada en el ensayo multiplex con tecnología Luminex.** En un pocillo de la placa con la muestra de interés se introducen los analitos que se quieran estudiar al mismo tiempo. Estos están conjugados con partículas magnéticas que permiten que la unión sea más específica y la pérdida de muestra tras los lavados sea menor. Tras una serie de marcajes específicos el equipo es capaz de detectar por separado la concentración de cada analito. Al ser una técnica cuantitativa se debe realizar una curva de calibrado por cada proteína que se quiera estudiar.

## 5. Análisis estadístico

Los datos de las gráficas están expresados como media  $\pm$  EEM si son datos que pasan el test de normalidad *Kolmogórov-Smirnov*; o la mediana con los rangos en el caso de que los datos no pasen el test de normalidad. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 5. En los datos *in vitro* como máximo se tuvieron que comparar dos factores (tratamientos y sexo). En el caso de que los datos fueran normales se realizó el análisis de ANOVA de 1 o 2 factores cuando se quisieron comparar 3 o más grupos experimentales. En el caso de que los datos no fueran normales se usó el test de *Kruskal-Wallis*. Para la comparación de la media de dos grupos usamos el *t-Student* (si los datos pasan el test de normalidad) o el test de *Mann Whitney* (si no pasan el test de normalidad).







---

# RESULTADOS

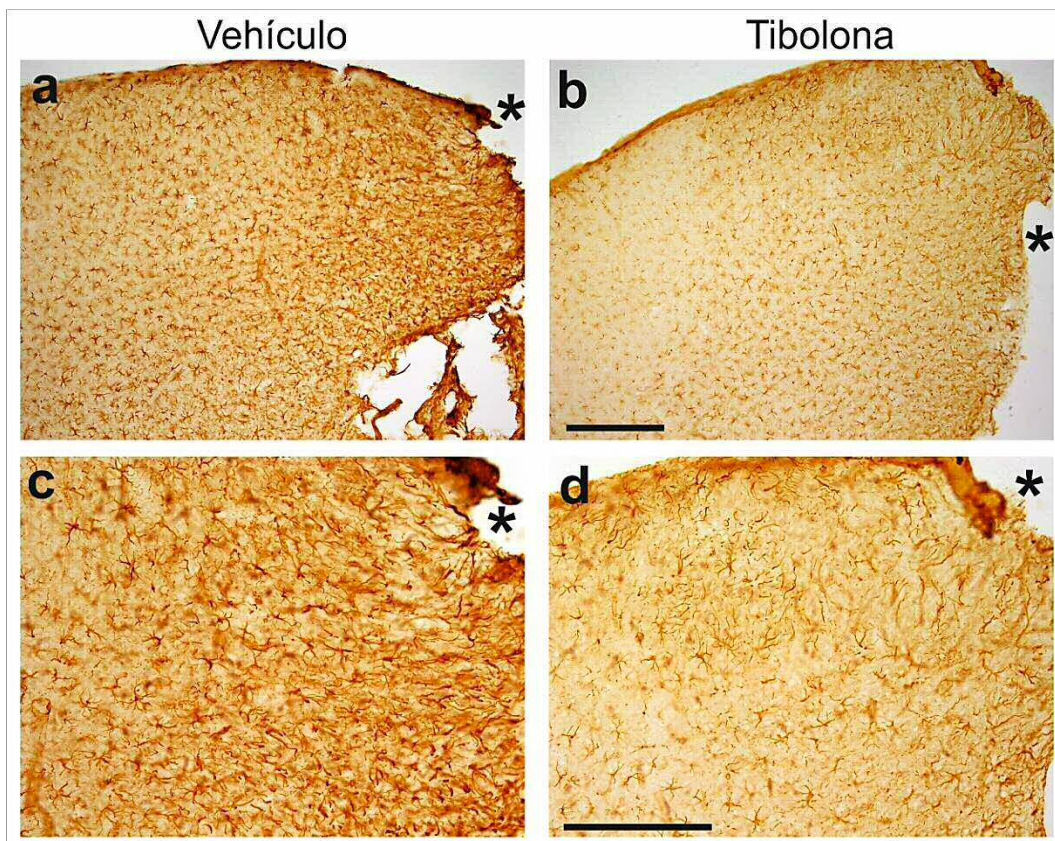
---



# I. EFECTOS DE LA TIBOLONA EN UNA LESIÓN PENETRANTE CORTICAL

## 1. Astrocitos inmunoreactivos para GFAP

Se hizo un recuento del número de células GFAP positivas a los 3 y 7 días después de la lesión penetrante cerebral, tal y como se ha explicado en los métodos, delimitando la región de interés a 5 franjas verticales (F1-F5), ordenadas lateralmente a partir del borde de la lesión; y en 3 secciones horizontales (S1-S3) dispuestas verticalmente desde la superficie dorsal de la corteza. En la Figura 18 se muestran ejemplos representativos de la inmunotinción para GFAP en la corteza de animales tratados con vehículo o tibolona y sacrificados 7 días después de la lesión.



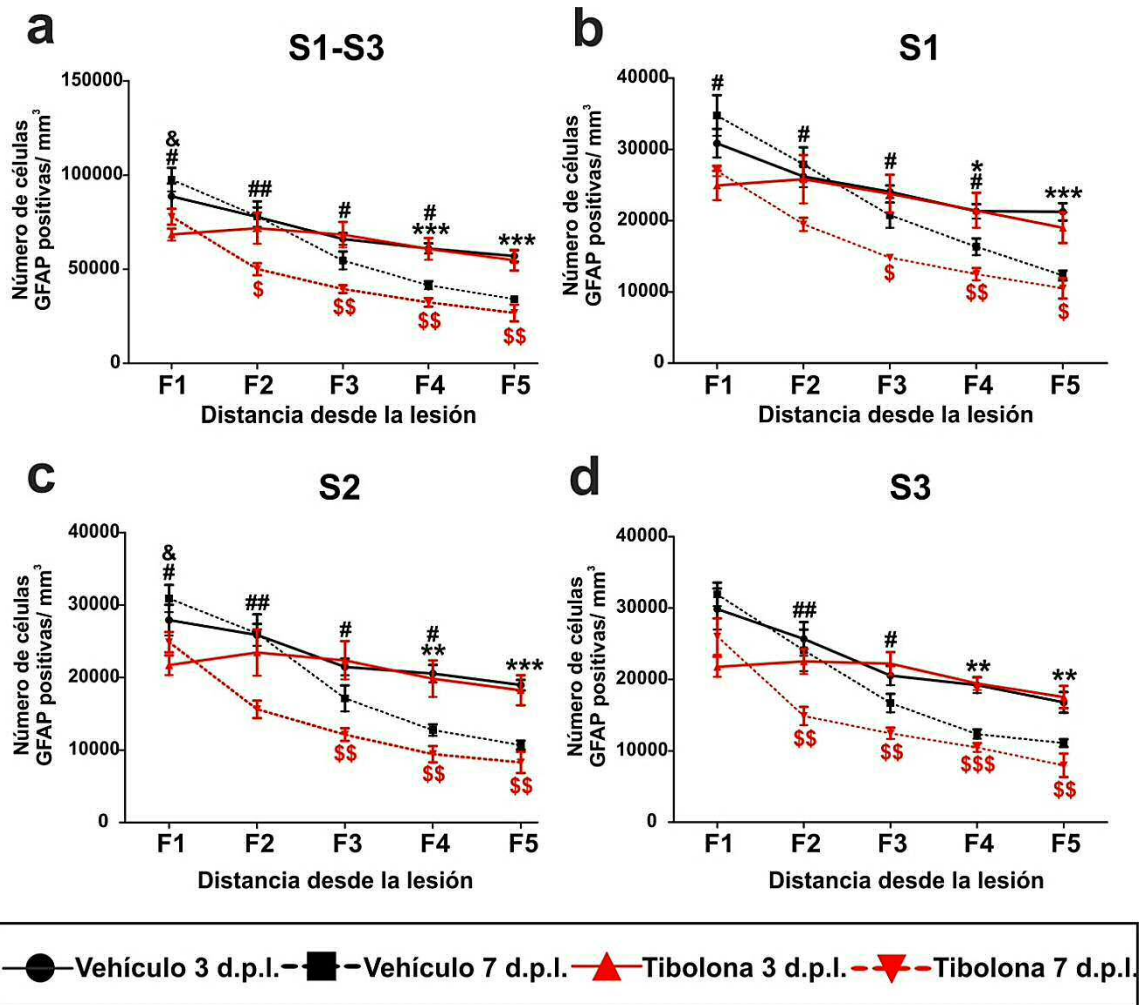
**Figura 18.** Ejemplo representativo de la tinción con el anticuerpo anti GFAP en secciones de la corteza cerebral 7 días después de la lesión. **a)** Imagen de animal inyectado con vehículo utilizando un objetivo 10X. **b)** Imagen de animal inyectado con tibolona observado con un objetivo 10X. **c)** Imagen de animal inyectado con vehículo observado con un objetivo 20X. **d)** Imagen de animal inyectado con tibolona utilizando un objetivo 20X. Los asteriscos indican el borde de la lesión. La escala de la barra de calibración corresponde a 200  $\mu$ m.

En la Figura 19 se representa el número de células GFAP positivas por  $\text{mm}^3$  a los 3 y 7 días después de la lesión, en animales tratados con vehículo o tibolona. En la gráfica 19a se sumaron los datos de los 3 sectores horizontales (S1-S3) para únicamente estudiar cómo variaba el número de células en función de la distancia a la lesión, sin tener en cuenta la profundidad de la corteza. En las gráficas 19b, c y d separamos los datos dorsoventralmente (S1-S3). El análisis estadístico con ANOVA de tres factores de los datos representados en la Figura 19a mostró efectos significativos del tratamiento (vehículo o tibolona), la distancia a la lesión y el tiempo transcurrido tras la misma. Además hubo interacciones significativas entre el tratamiento y la distancia con el tiempo transcurrido tras la lesión.

Como se puede observar en la Figura 19a, en los animales tratados con vehículo se produjo una disminución significativa del número de células GFAP positivas en las franjas F4 y F5 entre los días 3 y 7 tras la lesión cerebral. En las gráficas 19b-d se observa como esta disminución en el número de células GFAP positivas entre los días 3 y 7 en las franjas F4 y F5 ocurrió en los tres sectores horizontales (S1-S3).

En los animales tratados con tibolona, el número de células GFAP positivas disminuyó significativamente en las franjas F2-F5 entre los 3 y 7 días tras la lesión (Figura 19a). El descenso en F3-F5 se detectó en los tres sectores horizontales, mientras que el descenso en F2 fue debido exclusivamente a S3, que es la región cortical analizada de mayor profundidad.

En comparación con el vehículo, la tibolona causó a los 3 días después de la lesión una disminución en el número de células GFAP+ en la franja de corteza más próxima a la herida (F1). Ese descenso fue debido exclusivamente a la región S2. Además, el tratamiento con la tibolona redujo el número de células GFAP+ en F1-F4, 7 días después de la lesión, comparado con los animales tratados con vehículo. El efecto de la tibolona en F2 y F3 se detectó en S1, S2 y S3, mientras que el efecto en F1 y F4 solo se detectó en los dos sectores más dorsales de la corteza (S1 y S2).

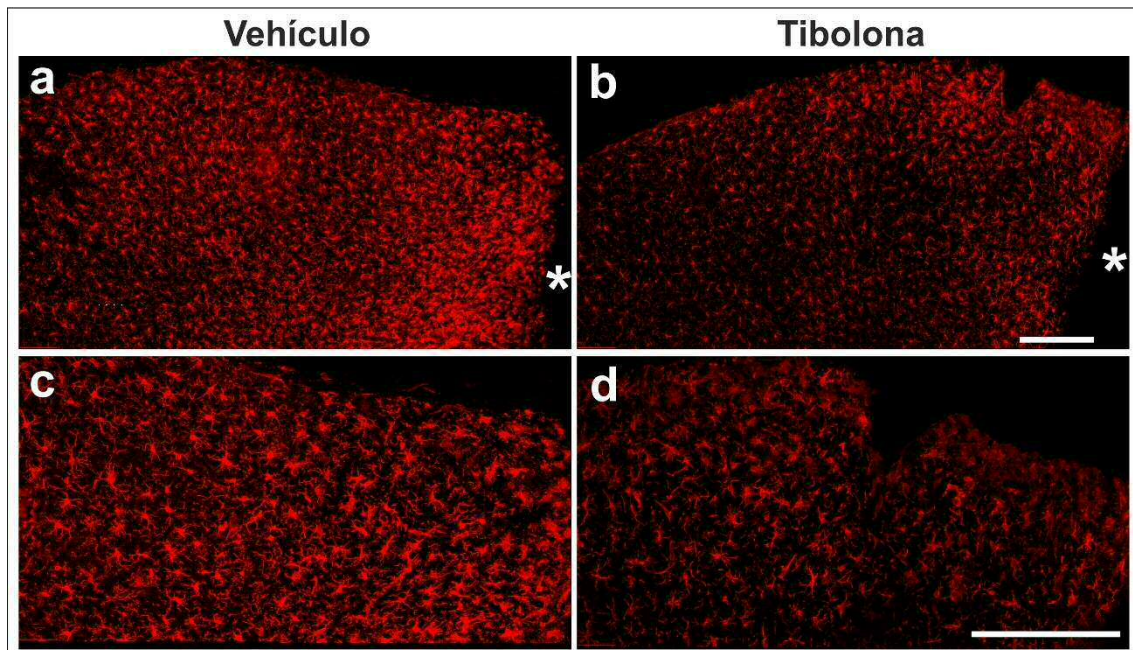


**Figura 19. Efecto de la tibolona sobre el número de astrocitos GFAP+ en la corteza cerebral a 3 y 7 días después de la lesión penetrante.** a) Número de astrocitos GFAP+ en las cinco franjas verticales (F1-F5) en los que se sumaron los datos de los sectores horizontales S1-S3. b) Número de astrocitos GFAP+ en el sector 1 (S1). c) Número de astrocitos GFAP+ en el sector 2 (S2). d) Número de astrocitos GFAP+ en el sector 3 (S3). d.p.l., días poslesión. Diferencias significativas encontradas en los test post-hoc: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  entre vehículo a los 3 días y vehículo a los 7 días; \$  $p < 0,05$ ; \$\$  $p < 0,01$ ; \$\$\$  $p < 0,001$  entre tibolona a los 3 días y tibolona a los 7 días; &  $p < 0,05$  entre vehículo y tibolona a los 3 días; #  $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  entre el vehículo y tibolona a los 7 días.

## 2. Células inmunoreactivas para Iba1

Analizamos el número de células Iba1 positivas a los 3 y 7 días después de la lesión penetrante cerebral. El recuento se hizo igual que para los astrocitos. En la Figura 20 se muestran ejemplos representativos de la inmunotinción para Iba1 en la corteza cerebral de animales tratados con vehículo o tibolona y sacrificados 7 días después de la lesión.



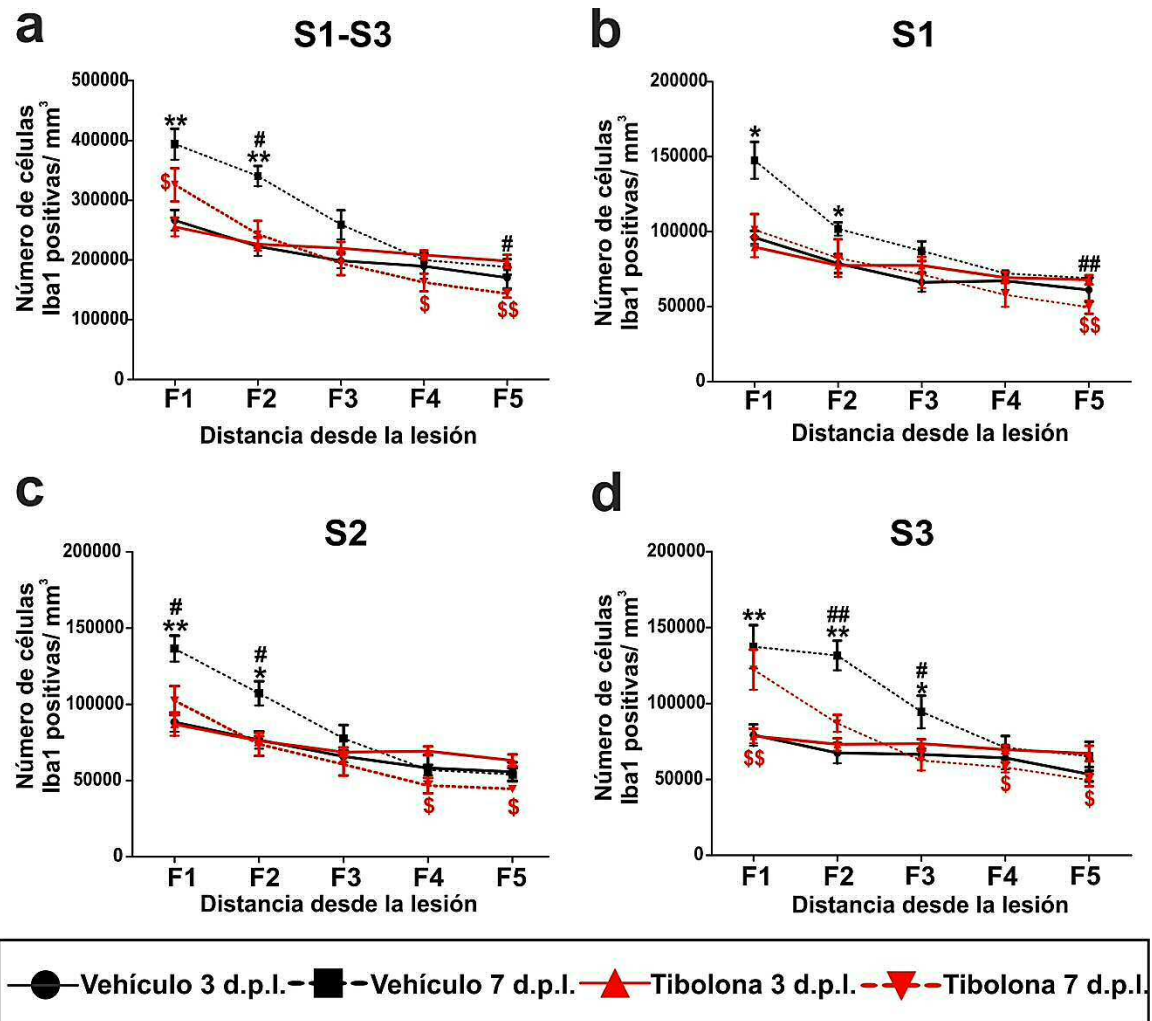


**Figura 20.** Imagen representativa de la tinción con el anticuerpo anti Iba1 en secciones de corteza cerebral 7 días después de la lesión. **a)** Imagen de un animal inyectado con vehículo. Objetivo 20X. **b)** Imagen de un animal inyectado con tibolona. Objetivo 20X. **c)** Imagen de un animal inyectado con vehículo con objetivo 40X. **d)** Imagen de un animal inyectado con tibolona. Objetivo 40X. Los asteriscos indican el borde de la lesión. La barra de calibración es de 200 µm.

### **2.1 Número total de células Iba1+**

El análisis estadístico con el ANOVA de tres factores de los datos del número de células Iba1+ total reveló efectos significativos del tratamiento, la distancia a la lesión y el tiempo transcurrido tras la lesión. Además, aparecieron interacciones significativas entre el tiempo tras la lesión y el tratamiento y también con la distancia a la lesión (Figura 21a). Obtuvimos resultados similares, pero no idénticos, cuando el número de células Iba1+ en los tres sectores horizontales (S1-S3) se analizó en conjunto (Figura 21a) o por separado (Figura 21b-d). Como se puede observar en la primera gráfica (Figura 21a), en los animales tratados con vehículo se produjo una reducción significativa en el número de células Iba1+ en las franjas F1 y F2 entre los 3 y los 7 días tras la lesión. Este descenso se observa sobre todo en el sector S3 de F1 y F2. Además, se produjo un incremento significativo del número de células Iba1+ en el sector S3 de la franja F3.

La figura 21a muestra que en los animales tratados con tibolona se produjo un descenso significativo en el número de células Iba1 en las franjas F4 y F5 entre los días 3 y 7 después de la lesión. Por el contrario, el número de células Iba1+ aumentó en F1 en estos animales. Este incremento se debió a un aumento del número de células en el sector horizontal más profundo (S3) en la franja F1 (Figura 21d).



**Figura 21. Efecto de la tibolona sobre el número de células Iba1+ en la corteza cerebral a los 3 y 7 días después de la lesión penetrante. a)** Número de células Iba1+ en las cinco franjas verticales (F1-F5) en las que se sumaron los datos de los tres sectores horizontales (S1-S3). **b)** Número de células Iba1+ en el sector 1 (S1). **c)** Número de células Iba1+ en el sector 2 (S2). **d)** Número de células Iba1+ en el sector 3 (S3). d.p.l., días posesión. Diferencias significativas encontradas en los test post-hoc: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  entre vehículo a los 3 días y vehículo a los 7 días; \$  $p < 0,05$ ; \$\$  $p < 0,01$  entre tibolona a los 3 días y tibolona a los 7 días; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  entre vehículo y tibolona a los 7 días.



En comparación con los animales tratados con vehículo, el tratamiento con tibolona produjo a los 7 días tras la lesión un descenso significativo en el número de células Iba1+ en las franjas F2 y F5 (Figura 21a). La disminución producida por la tibolona en F2 fue debida a su efecto en S2 y S3 (Figura 21c), mientras que la reducción observada en F5 fue debida a su efecto en el sector superior (S1) (Figura 21b). Además, también se observaron diferencias entre los valores de tibolona y vehículo el día 7 tras la lesión en la franja F1 del sector S2 (Figura 21c) y en la franja F3 del sector S3 (Figura 21d).

## **2.2 Células Iba1+ con fenotipo reactivo**

Clasificamos las células Iba1 positivas en reactivas y no reactivas de acuerdo a su morfología. Se realizó un ANOVA de tres vías con las células Iba1+ con fenotipo reactivo teniendo en cuenta todos los sectores horizontales y las cinco franjas verticales. El análisis reveló efectos significativos del tratamiento y la distancia a la lesión, pero no del tiempo transcurrido tras la lesión. Además, se detectaron interacciones significativas del tiempo trascurrido tras la lesión con los tratamientos y la distancia a la lesión. Los resultados obtenidos al juntar los tres sectores horizontales (S1-S3) (Figura 22a) fueron similares, aunque no iguales, que cuando se analizaron por separado (Figura 22b-d).

En los animales tratados con vehículo se produjo un incremento significativo del número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en las franjas verticales F1 y F2 entre los días 3 y 7 tras la lesión (Figura 22a). El aumento en F1 se observó en los tres sectores horizontales analizados (Figura 22b-d). En cambio, el aumento en F2 fue debido solamente a un incremento en el sector más ventral (S3) (Figura 22d).

En los animales tratados con tibolona (Figura 22a) se observó en las franjas F4 y F5 una reducción significativa en el número de células Iba1+ con fenotipo reactivo entre los días 3 y 7 después de la lesión. La disminución en F4 se detectó tanto en S2 como en S3 (Figura 22c-d), mientras que la disminución en F5 solo se detectó en el sector horizontal S2 (Figura 22c). Además, el tratamiento con tibolona disminuyó

también el número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en la franja F3 del sector S2 (Figura 5c).

En comparación con el vehículo, la tibolona causó una reducción significativa del número de células Iba1+ con fenotipo reactivo a los 3 (en F5) y 7 días (en F2, F3 y F5) después de la lesión (Figura 22a). Esta diferencia entre los grupos tibolona y vehículo a los 7 días después de la lesión fue debida a los sectores S2 y S3 de F2, el sector S3 de F3 y el sector S1 de F5. Además, en los sectores horizontales S1 y S2 se observó una disminución del número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en la franja F1 (Figura 22b-c).

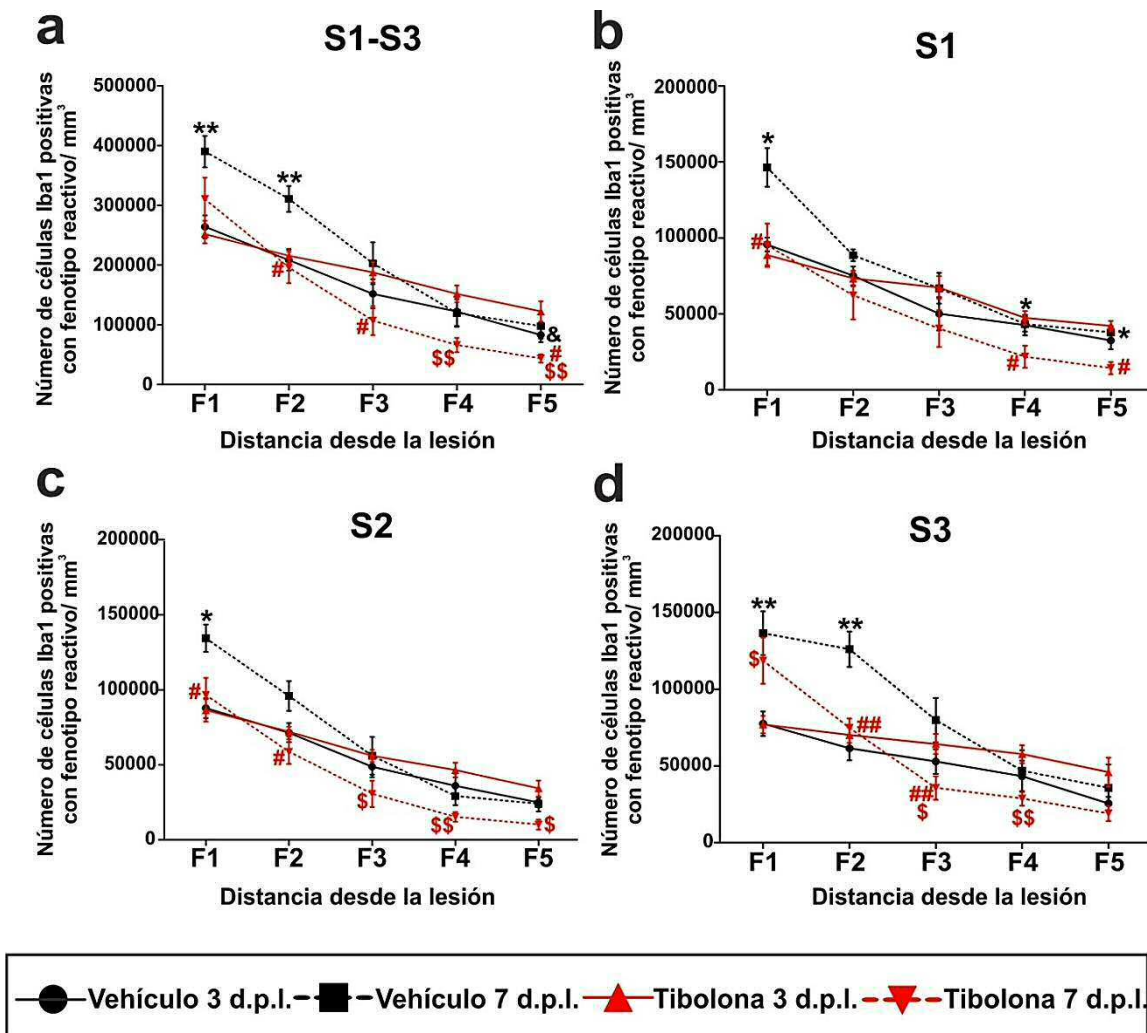


Figura 22. Efecto de la tibolona sobre el número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en la corteza cerebral a los 3 y 7 días después de la lesión penetrante. a) Número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en las cinco franjas verticales (F1-F5) en las que se sumaron los datos de los tres sectores horizontales (S1-S3). b) Número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en el sector 1 (S1). c) Número de

células Iba1+ con fenotipo reactivo en el sector 2 (S2). **d)** Número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en el sector 3 (S3). d.p.l., días poslesión. Diferencias significativas encontradas en los test post-hoc: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 entre vehículo a los 3 días y vehículo a los 7 días; \$ p < 0,05; \$\$ p < 0,01 entre tibolona a los 3 días y tibolona a los 7 días; & p < 0,05 entre vehículo y tibolona a los 3 días; # p < 0,05; ##p < 0,01 entre el vehículo y tibolona a los 7 días.

### **2.3 Células Iba1+ con fenotipo no reactivo**

El ANOVA de tres factores realizado para analizar el número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo mostró que había efectos significativos a causa de la distancia a la lesión y del tiempo transcurrido tras su realización. Además se encontraron interacciones significativas entre el tratamiento y el tiempo transcurrido tras la lesión. El número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo se incrementó progresivamente en función de la distancia a la lesión en todos los grupos experimentales y en los animales tratados con tibolona el número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo aumentó significativamente en las franjas F2, F3 y F4 entre los días 3 y 7 después de la lesión (Figura 23).

El incremento en el número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo entre los días 3 y 7 después de la lesión en los animales tratados con tibolona se observó en los sectores S1 y S2 de F2 (Figura 23b-c); en los sectores S1-S3 de F3 (Figura 23b-d) y en el sector S1 de F4 y F5 (Figura 23b). Además, en los animales inyectados con el vehículo se observó un aumento del número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo entre los días 3 y 7 después de la lesión en la franja F2 del sector S1. No se detectaron diferencias significativas ni a 3 ni a 7 días tras la lesión en el número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo al comparar los animales tratados con tibolona y los animales inyectados con el vehículo.

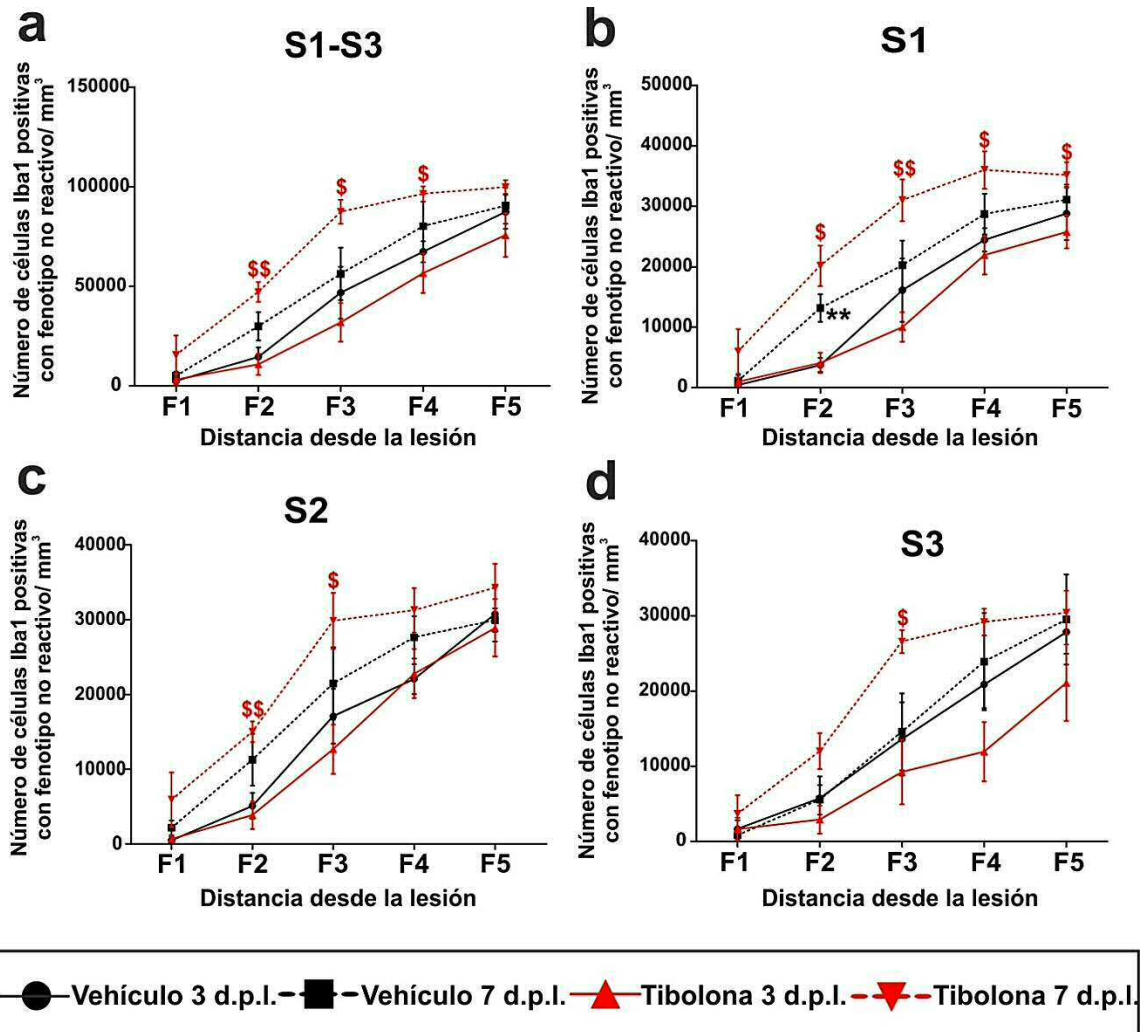


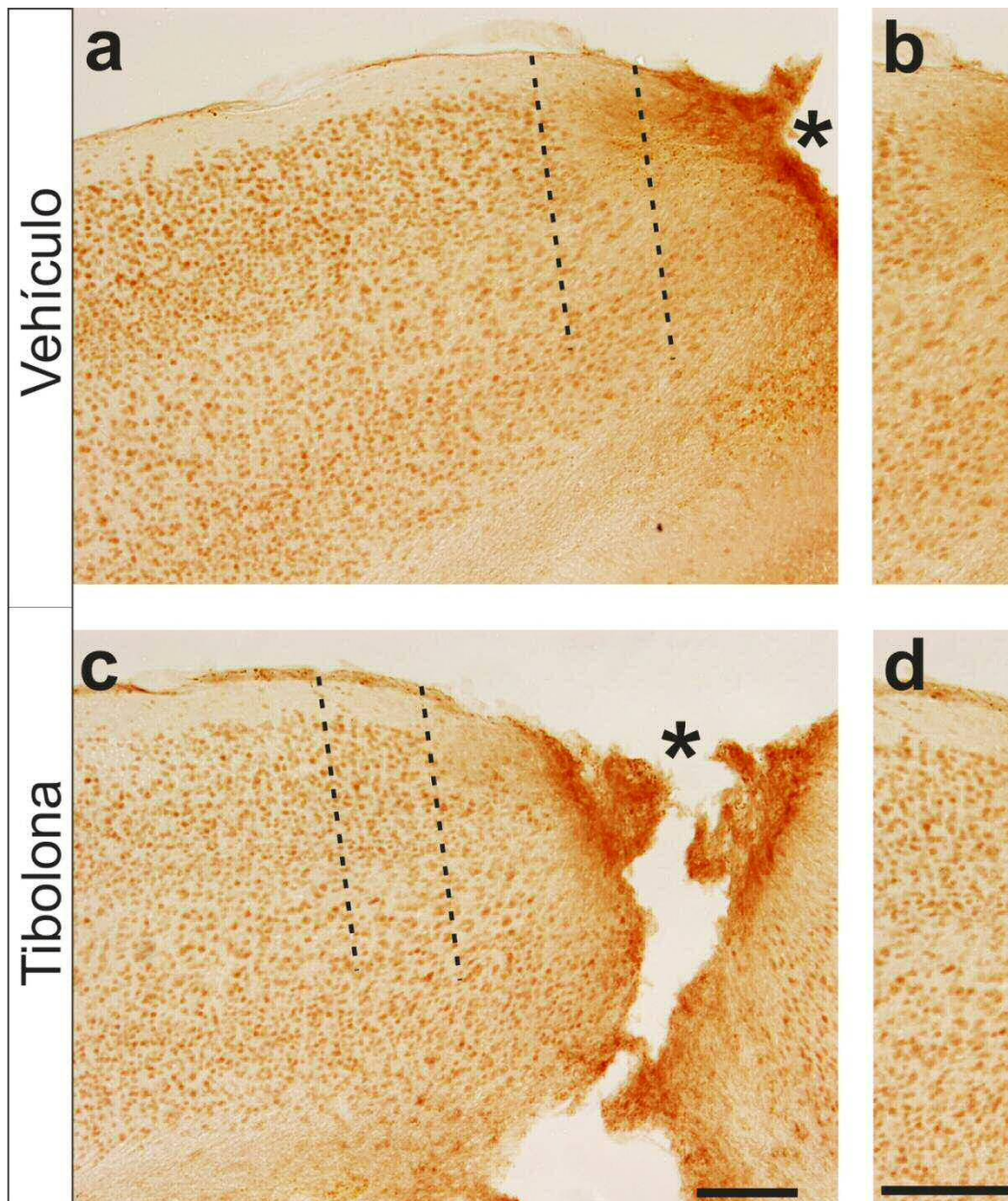
Figura 23. Efecto de la tibolona sobre el número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo en la corteza cerebral a los 3 y 7 días después de la lesión penetrante. **a)** Número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo en las cinco franjas verticales (F1-F5) en las que se sumaron los datos de los tres sectores horizontales (S1-S3). **b)** Número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en el sector 1 (S1). **c)** Número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en el sector 2 (S2). **d)** Número de células Iba1+ con fenotipo reactivo en el sector 3 (S3). d.p.l., días poslesión. Diferencias significativas encontradas en los test post-hoc: \*\*p < 0,01 entre vehículo de 3 días y vehículo de 7 días; \$ p < 0,05; \$\$ p < 0,01 entre tibolona de 3 días y tibolona de 7 días.

### 3. Efecto de la tibolona sobre el número de neuronas en la corteza cerebral lesionada

Se realizó un recuento del número de células NeuN positivas en la proximidad al borde de la lesión y en una región equivalente del hemisferio contralateral. El recuento se realizó en cerebros de animales sacrificados 14 días después de la lesión



para así tener una estimación del número de neuronas que sobrevivieron tanto a la primera como a la segunda oleada de muerte neuronal que se producen tras una lesión cerebral. En la Figura 24 se muestra una imagen representativa de la corteza lesionada, inmunoteñida para NeuN, donde está marcada la zona F2, que es en donde encontramos las mayores diferencias entre los animales tratados con vehículo y tibolona.



**Figura 24. Ejemplo representativo de la tinción anti NeuN en secciones de la corteza cerebral 14 días después de la lesión. a) Imagen de animal inyectado con vehículo con objetivo 20X. b) Detalle de la franja F2 de la imagen a. c) Imagen de animal inyectado con tibolona con objetivo 20X. d) Detalle de la**

franja F2 de la imagen c. Los asteriscos indican el borde de la lesión. La barra de calibración corresponde a 200  $\mu\text{m}$ . El asterisco indica el borde de la lesión.

Al comparar el número de neuronas de la corteza del hemisferio contralateral (no lesionada) con la ipsilateral (lesionada) (Figura 25), se observa que en torno a la lesión (franjas F1 y F2) se produce una disminución en el número de neuronas NeuN+.

La reducción en el número de neuronas NeuN+ al borde de la lesión (F1) fue similar en los animales tratados con vehículo y en los animales inyectados con tibolona. Sin embargo, la tibolona redujo la pérdida neuronal observada en F2 en los animales inyectados con el vehículo.

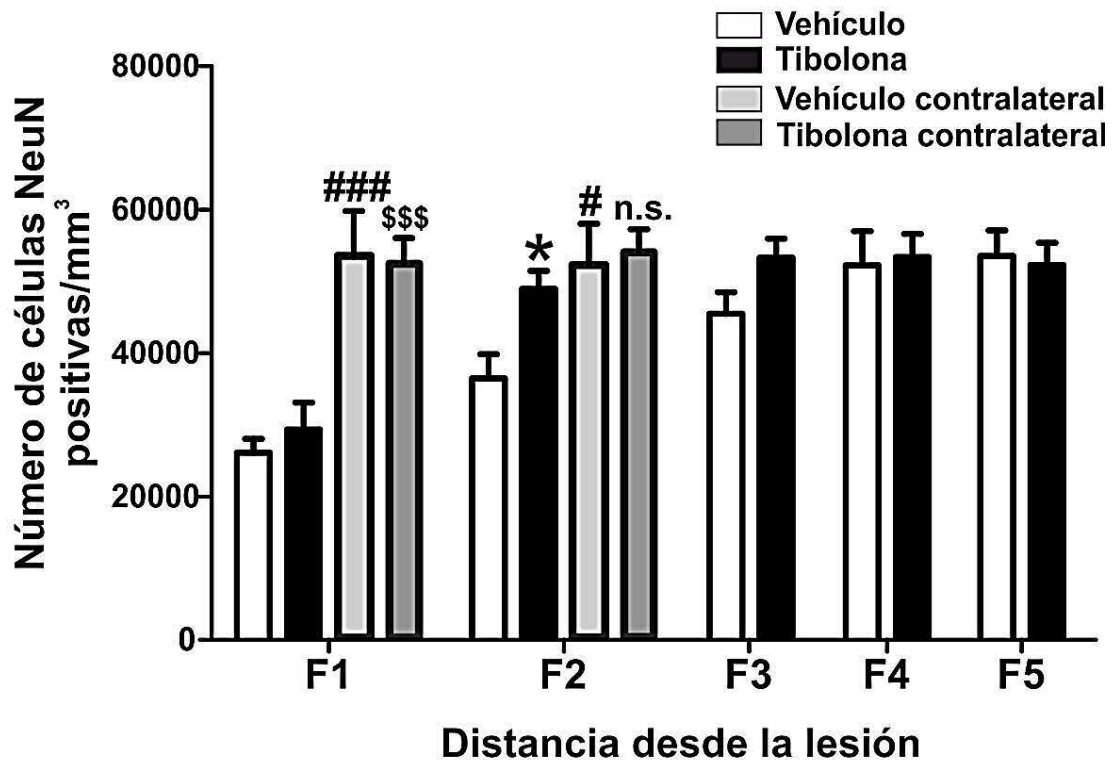


Figura 25. Efecto de la tibolona sobre el número de neuronas NeuN+ en la corteza cerebral 14 días después de la lesión penetrante. Se representa el número de células NeuN+ en las cinco franjas verticales (F1-F5) consecutivas desde el borde de la lesión en el hemisferio lesionado y el número de células NeuN+ de la corteza contralateral en las regiones correspondientes a F1 y F2. Diferencias significativas: \* $p < 0,05$  entre el grupo de los animales tratados con tibolona y los animales tratados con vehículo en la zona F2 del hemisferio ipsilateral a la lesión; ### $p < 0,01$ ; #### $p < 0,001$  entre el hemisferio

ipsilateral y contralateral en los animales tratados con vehículo; \$\$\$p < 0, 001 entre el hemisferio ipsilateral y contralateral en los animales tratados con tibolona.

## II. EFECTOS DE LA TIBOLONA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE MICROGLÍA Y ASTROCITOS

### 1. Las células primarias de microglía expresan enzimas que metabolizan la tibolona

Los siguientes experimentos estuvieron encaminados a evaluar el efecto de la tibolona en cultivos primarios de microglía de rata. Con el objetivo de conocer si las células de microglía expresan las enzimas necesarias para metabolizar la tibolona, analizamos la expresión de las enzimas  $3\beta$ -HSD y  $3\alpha$ -HSD mediante PCR cuantitativa a tiempo real utilizando distintas concentración de ADNc.

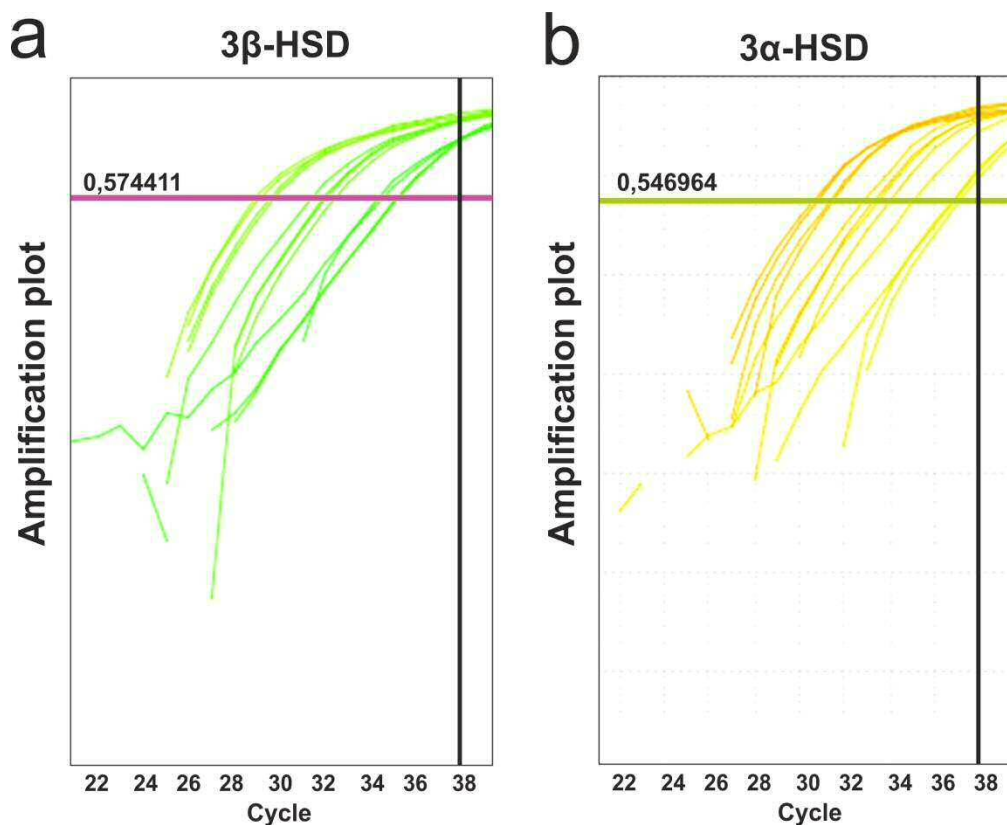


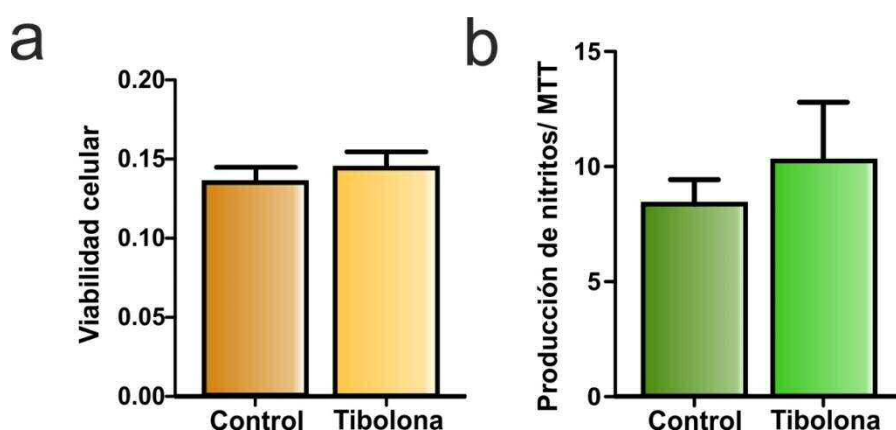
Figura 26. Gráficas de amplificación de ADNc en los distintos ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). a) ADNc de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Se muestra el umbral de amplificación con una línea rosa horizontal. b) ADNc de la  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Se muestra el umbral de amplificación con una línea verde horizontal. La línea negra vertical en ambas gráficas indica el ciclo a partir del cual consideramos que la amplificación ya no es

específica, puesto que los controles negativos presentan amplificación del mismo nivel a partir del ciclo 38.

En la Figura 26 se muestran los ciclos en los que se amplificaron las regiones específicas de ADN de los genes de interés. Como muestra la Figura 26, tanto para la  $3\beta$ -HSD como para la  $3\alpha$ -HSD hay amplificación específica, ya que en ambos el ADNc llegó a amplificarse por debajo del ciclo 38, a partir del cual ya no es posible asegurar que la amplificación sea específica. En el caso de la  $3\beta$ -HSD (Fig. 26a), se observó que todos los ciclos estaban por debajo de 38, así que las células presentan altos niveles de expresión de esta enzima. Por otro lado, en el caso de la  $3\alpha$ -HSD (Fig. 26b), solo las concentraciones más altas de ADNc amplificaron de manera específica el gen, por lo tanto su expresión es más baja.

## 2. Efecto de la tibolona sobre la viabilidad celular y la producción de nitritos en la microglía

Para estudiar el efecto que tiene la tibolona en un cultivo primario de microglía de rata evaluamos la respiración mitocondrial, como medida de la viabilidad celular, y la cantidad de nitritos liberados al medio. Como ya se ha explicado en el apartado de *métodos*, para ello usamos las técnicas colorimétricas de MTT y Griess, respectivamente. Se puede observar en la Figura 27a-b que la tibolona no tiene un efecto significativo ni sobre la viabilidad celular ni sobre la producción de nitritos.



**Figura 27. Efecto de la tibolona sobre la viabilidad celular y la producción de nitritos.** a) Medición de la respiración mitocondrial mediante la técnica de MTT. Muestra que la tibolona no modifica la viabilidad celular en comparación con las células control. b) Cantidad de nitritos liberados al medio con respecto a



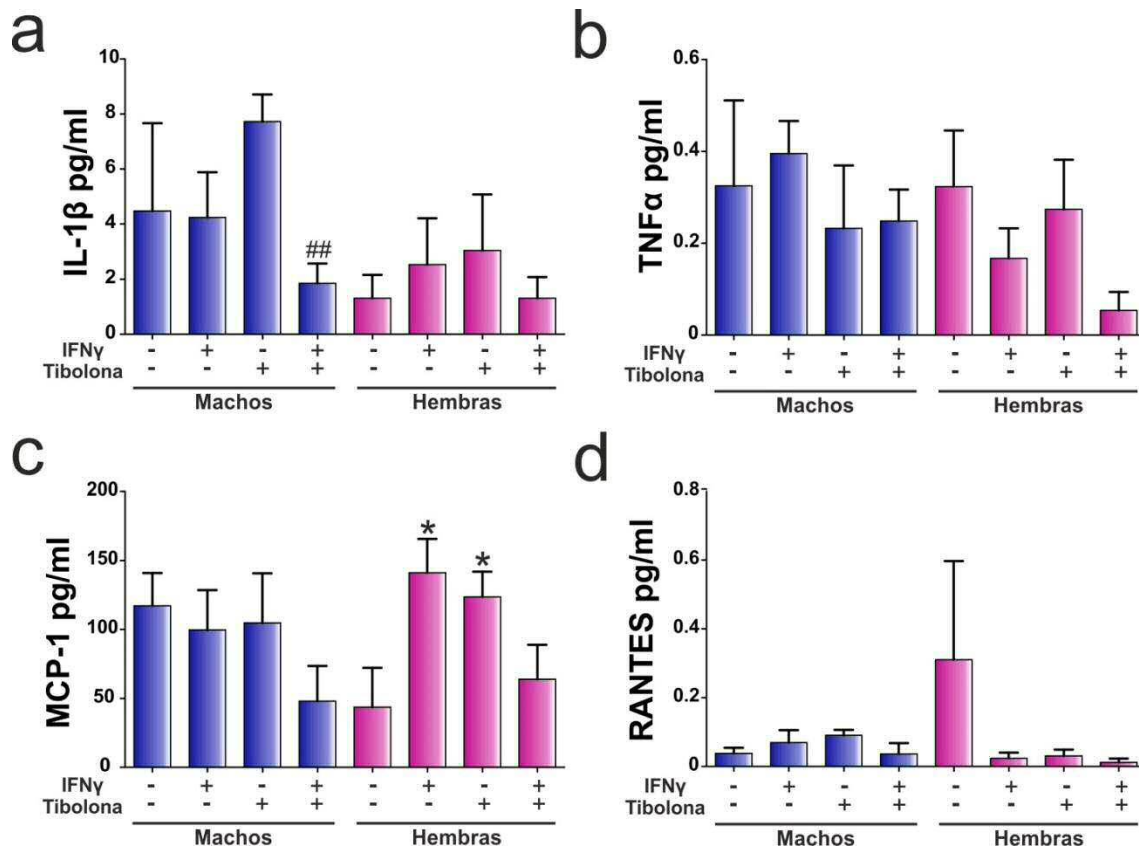
la viabilidad celular. La tibolona no aumenta los niveles de nitritos si los comparamos con las células control.

### **3. Efecto de la tibolona sobre los niveles de citoquinas en condiciones inflamatorias en cultivos de microglía.**

Para estudiar el posible efecto antiinflamatorio de la tibolona en las células de microglía, se pretrataron los cultivos con el esteroide durante 16 horas antes de someterlas a un estímulo proinflamatorio, en este caso el IFN $\gamma$ . Tras 24 horas de incubación con IFN $\gamma$  se recogió el medio de cultivo y se midieron los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP-1 y RANTES. En la Figura 28 se representan los resultados de este experimento.

En la Figura 28a se observa que las incubaciones con tibolona o con interferón no tuvieron por sí mismas un efecto significativo sobre los niveles de IL-1 $\beta$  en el medio de cultivo ni de las células machos ni las de hembras. Sin embargo, en las células macho incubadas con tibolona e interferón, los niveles de IL-1 $\beta$  en el medio se vieron significativamente reducidos con respecto a los cultivos tratados con tibolona en solitario. No obstante, este efecto combinado del interferón y la tibolona no se detectó en las células hembra.

En las figuras 28b y 28d se observa que los tratamientos no tuvieron ningún efecto significativo ni sobre los niveles de TNF $\alpha$  ni sobre los de RANTES en ningún sexo. Por el contrario, tanto la tibolona como el interferón aumentaron por separado los niveles de MCP-1 en el medio de cultivo de las células hembra, efecto que desapareció al combinar ambos tratamientos (Figura 28c).



**Figura 28. Concentración de citoquinas en el medio de cultivo de microglía primaria de rata. a)** Concentración de IL-1 $\beta$  **b)** Concentración de TNF $\alpha$ . **c)** Concentración de MCP-1. **d)** Concentración de RANTES. **##**p <0,01 respecto al grupo con tibolona del mismo sexo. **\***p <0,05 respecto al grupo control del mismo sexo.

#### 4. Efecto de la tibolona sobre la fagocitosis de *E.coli* por la microglía

Para medir la actividad fagocítica de las células de microglía primaria de rata se utilizaron biopartículas de *Escherichia coli* que son sensibles a los cambios de pH, y solo son fluorescentes cuando éstas han sido fagocitadas y han llegado a un fagosoma o lisosoma, ya que en su interior el pH es ácido. La fagocitosis se evaluó separando la microglía procedente de animales macho y hembra. En la Figura 29 se muestran ejemplos representativos de la fagocitosis de *E.Coli* por parte de los cultivos microglía provenientes de animales macho (Fig. 29a) y animales hembra (Fig. 29b).

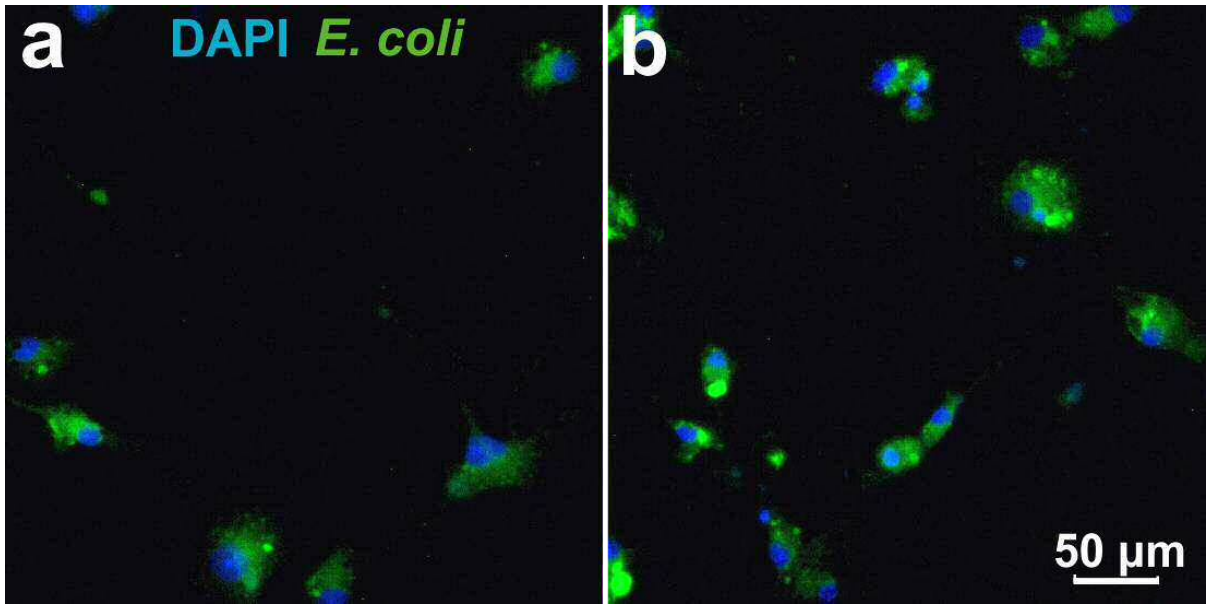


Figura 29. Imágenes representativas de la fagocitosis de *E.coli* (verde) por células de microglía (núcleo en azul, DAPI). a) Cultivo de microglía de animales macho. b) Cultivo de microglía de animales hembra. Ambas imágenes fueron tomadas con un objetivo 20X.

#### 4.1 Diferencias sexuales basales en la fagocitosis de *E. coli* por la microglía

Se midió la cantidad de *E. coli* fagocitada por las células de microglía a partir de fotografías tomadas con un microscopio de fluorescencia. El análisis se hizo sin conocer a qué grupo experimental correspondía cada imagen. En la Figura 30 se puede observar que las células macho y hembra fagocitan cantidades diferente de *E. coli* de manera basal, siendo las hembras las que tienen mayor capacidad fagocítica.

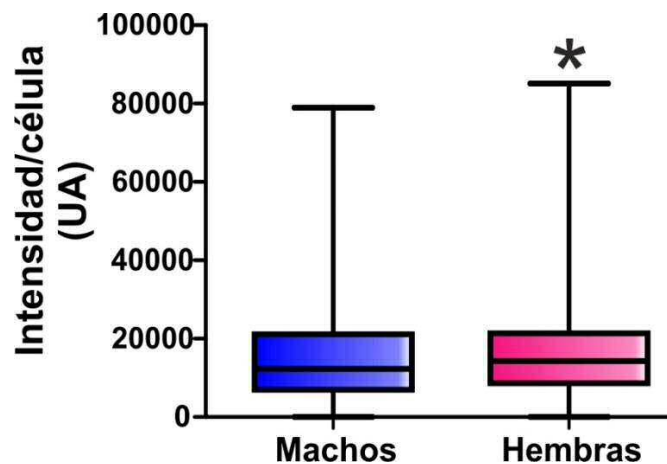


Figura 30. Fagocitosis basal de *E. coli* por la microglía de machos y de hembras. \*p < 0,05 respecto a machos.

#### 4.2 Efectos de la tibolona y el estradiol sobre la fagocitosis de *E. coli* por la microglía

En la Figura 31 se muestra el efecto que tienen la tibolona y el estradiol sobre la fagocitosis de *E. coli* por parte de la microglía macho y hembra. La tibolona redujo de manera significativa la fagocitosis de *E. coli* por la microglía de ambos sexos. Por el contrario, el estradiol tuvo un efecto diferente en los cultivos de machos y hembras. Así, el estradiol no tuvo ningún efecto en la microglía de animales macho en comparación con la fagocitosis basal, mientras que en la microglía hembra el estradiol disminuyó la fagocitosis de manera significativa en comparación al control, aunque no llegó a disminuirla tanto como la tibolona, siendo mayor la fagocitosis en las células tratadas con estradiol que en las tratadas con el esteroide sintético.

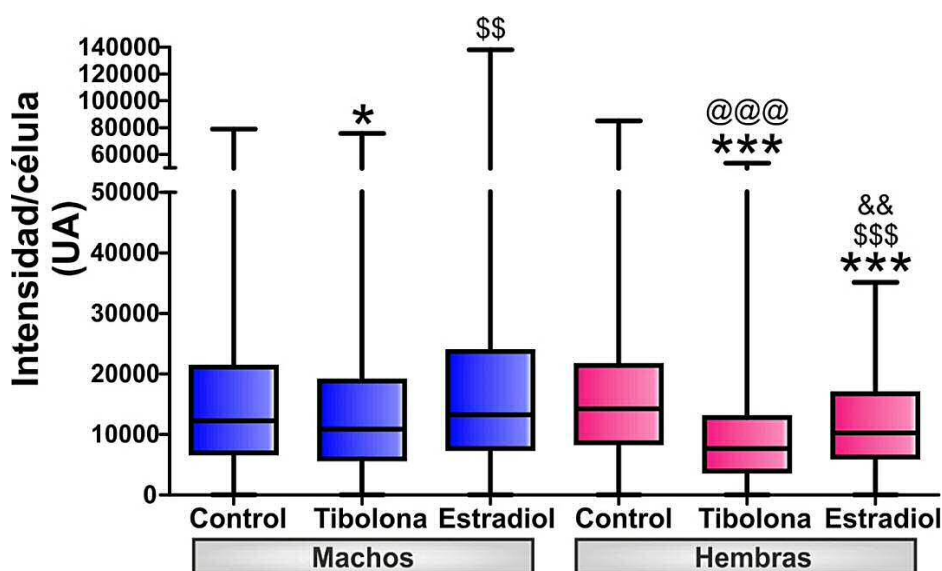


Figura 31. Efecto de la tibolona y el estradiol sobre la fagocitosis de *E. coli* por la microglía. \*\*\*p <0,001; \*p <0,05, respecto al grupo control de cada sexo. \$\$\$p <0,001; \$\$p <0,01 entre el estradiol y el grupo de tibolona de cada sexo. @@@p <0,001 entre el grupo de tibolona de hembras y el de machos. &&p <0,01 entre el grupo de estradiol de hembras con respecto al de machos.

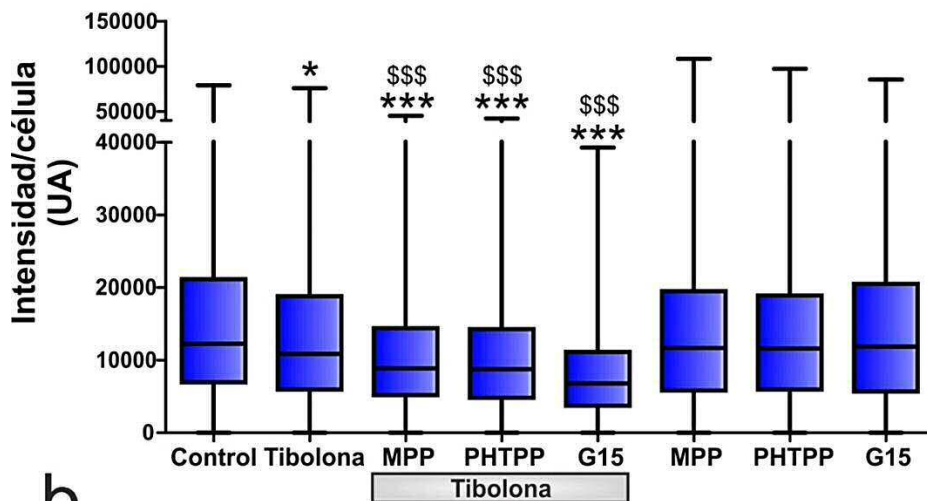
#### 4.3 Efectos de la tibolona y los antagonistas de los receptores de estrógenos sobre la fagocitosis de *E. coli* por la microglía

En la Figura 32 se muestran los resultados del efecto de los antagonistas de los receptores de estrógeno sobre la fagocitosis de *E. coli* por la microglía. En la Figura 32a se representan los datos de la microglía macho. De nuevo se detectó una disminución de la fagocitosis al tratar a las células con tibolona. Ningún antagonista bloqueó el

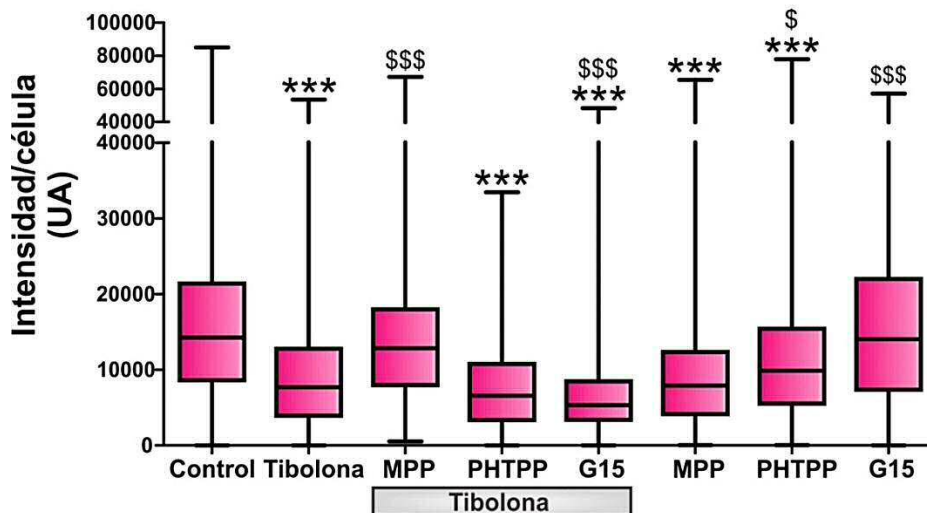
efecto de la tibolona, sino que, por el contrario, la combinación de la tibolona con cada uno de los antagonistas resulto en una disminución de la fagocitosis aún más acusada. En el caso de las células macho, ninguno de los antagonistas tuvo un efecto por sí solo (Figura 32a).

En las células hembra (Figura 32b), también se ve de nuevo que la tibolona disminuye la fagocitosis de manera significativa y en este caso el MPP, antagonista del receptor de estrógeno  $\alpha$ , previno la disminución de la fagocitosis causada por la tibolona. Además, los antagonistas MPP y PHTPP tuvieron un efecto por sí solos sobre la fagocitosis, disminuyéndola respecto a las condiciones basales. En cambio, el G15 no tuvo ningún efecto significativo por sí solo, pero igual que en las células macho disminuyó aún más la fagocitosis en presencia de tibolona.

a



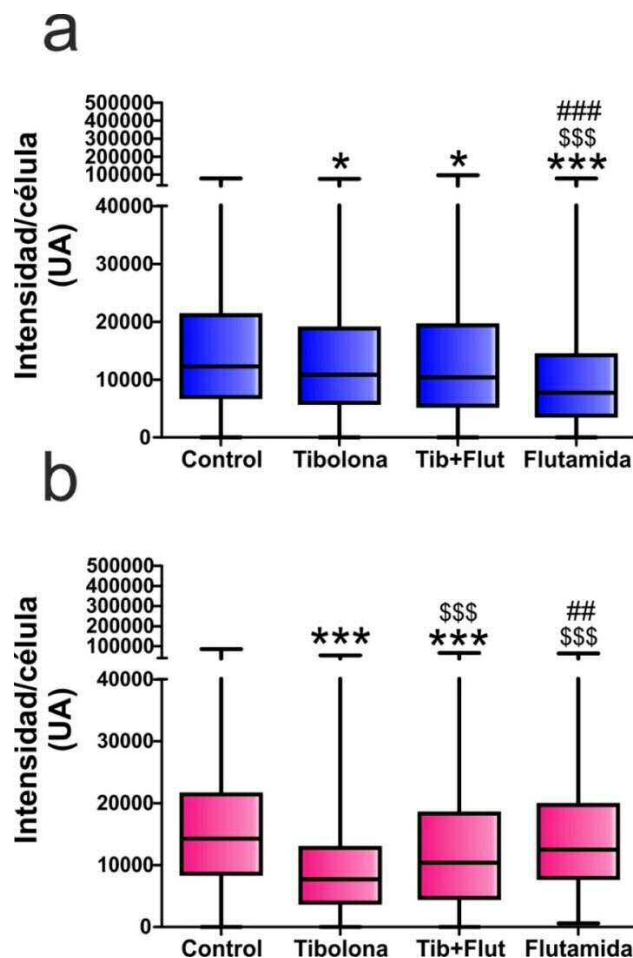
b



**Figura 32. Efecto de los antagonistas de los receptores de estrógenos sobre la fagocitosis de *E. coli* por la microglía. a) Microglía macho. b) Microglía hembra.** Diferencias significativas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  con relación al respectivo grupo control de cada sexo. \$\$\$ $p < 0,001$ ; \$ $p < 0,05$  con relación al respectivo grupo de tibolona de cada sexo. MPP, antagonista del receptor de estrógeno  $\alpha$ . PHTPP, antagonista del receptor de estrógeno  $\beta$ . G15, antagonista del receptor de estrógeno GPER1.

#### 4.4 Efecto del antagonista del receptor de andrógenos flutamida sobre la fagocitosis de *E. coli* por la microglía

Para estudiar si los receptores de andrógenos están involucrados en la regulación de la fagocitosis microglial usamos la flutamida (Figura 33). En la Figura 33a se puede observar que la flutamida no modificó de manera significativa el efecto de la tibolona en las células macho. No obstante, la flutamida por sí sola redujo la actividad fagocítica de estas células.

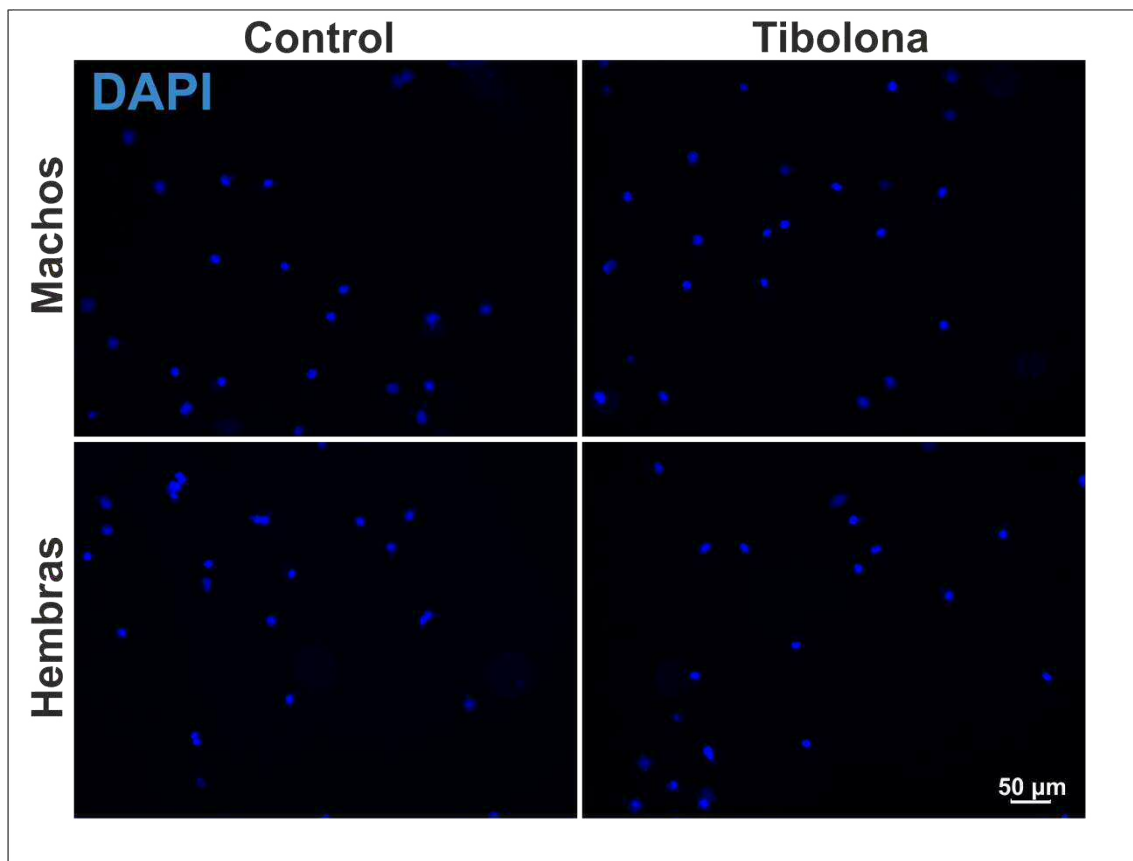


**Figura 33. Efecto del antagonista flutamida sobre la fagocitosis de *E. coli* por la microglía. a) Células macho. b) Células hembra. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  con relación al respectivo control de cada sexo. \$\$\$ $p < 0,001$  con relación al respectivo grupo de tibolona de cada sexo; ### $p < 0,001$ ; ## $p < 0,01$  con relación al respectivo grupo de tibolona y flutamida (Tib+Flut) de cada sexo.**

Al contrario de lo observado en las células macho, la flutamida por sí sola no tuvo ningún efecto en la fagocitosis de las células hembra con respecto a las células control (Figura 33b). En cambio, la flutamida bloqueó parcialmente el efecto inhibitorio de la tibolona sobre la fagocitosis de las células hembra.

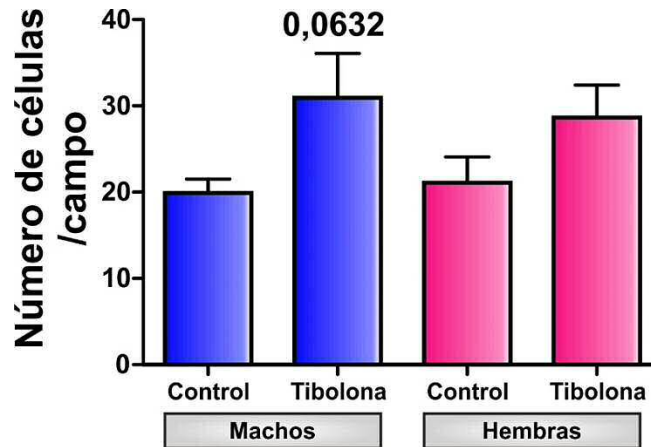
### 5. Efecto de la tibolona sobre la migración de la microglía

Además de la actividad fagocítica de la microglía también se estudió su actividad migratoria, tanto de manera basal como con el tratamiento con tibolona. Para ello se utilizaron placas con insertos sobre los que se sembraron las células en la parte superior. Tras el tratamiento, las células migraron al otro lado del inserto. En la Figura 34 se muestra una imagen representativa de la migración microglial en el otro lado del inserto.



**Figura 34. Imagen representativa de la migración de la microglía.** Los núcleos de las células están marcados con DAPI.

En la Figura 35 se muestra que la migración celular no presentó diferencias sexuales basales y además la tibolona no fue capaz de modificarla.



**Figura 35. Efecto de la tibolona sobre la migración de la microglía.** No se observa ninguna diferencia significativa entre los grupos. 0,0632 se corresponde con el valor de p entre el grupo control y la tibolona en microglía de machos.

## 6. Efecto de la tibolona sobre la expresión de genes de fagocitosis y migración en microglía

Como se ha mostrado en el apartado de resultados del efecto de la tibolona sobre la fagocitosis de *E. coli* por células de microglía, el fármaco es capaz de modificar esta función tanto en células macho como en hembras (Fig. 31). Además de la función fagocítica quisimos estudiar si la tibolona era capaz de modificar los niveles del ARNm de genes de fagocitosis y migración. Para ello se analizó la expresión de los siguientes genes: TREM2, el receptor 1 del cúmulo de diferenciación 200 (CD200R), P2RY6, la interleuquina asociada al receptor de kinasa 4 (IRAK4), el cúmulo de diferenciación 36 (CD36), el receptor de manosas, la kinasa 1 de esfingosina (Sphk1), P2Y12, el receptor 2 de quimioquinas con motivo C-C (CCR2) y el receptor 1 de interferón gamma (IfngR1). Como se puede observar en la Figura 36, la tibolona no fue capaz de



modificar la expresión de ninguno de estos genes. En el caso del gen IRAK4, se detectó una diferencia sexual, siendo mayor la expresión en hembras

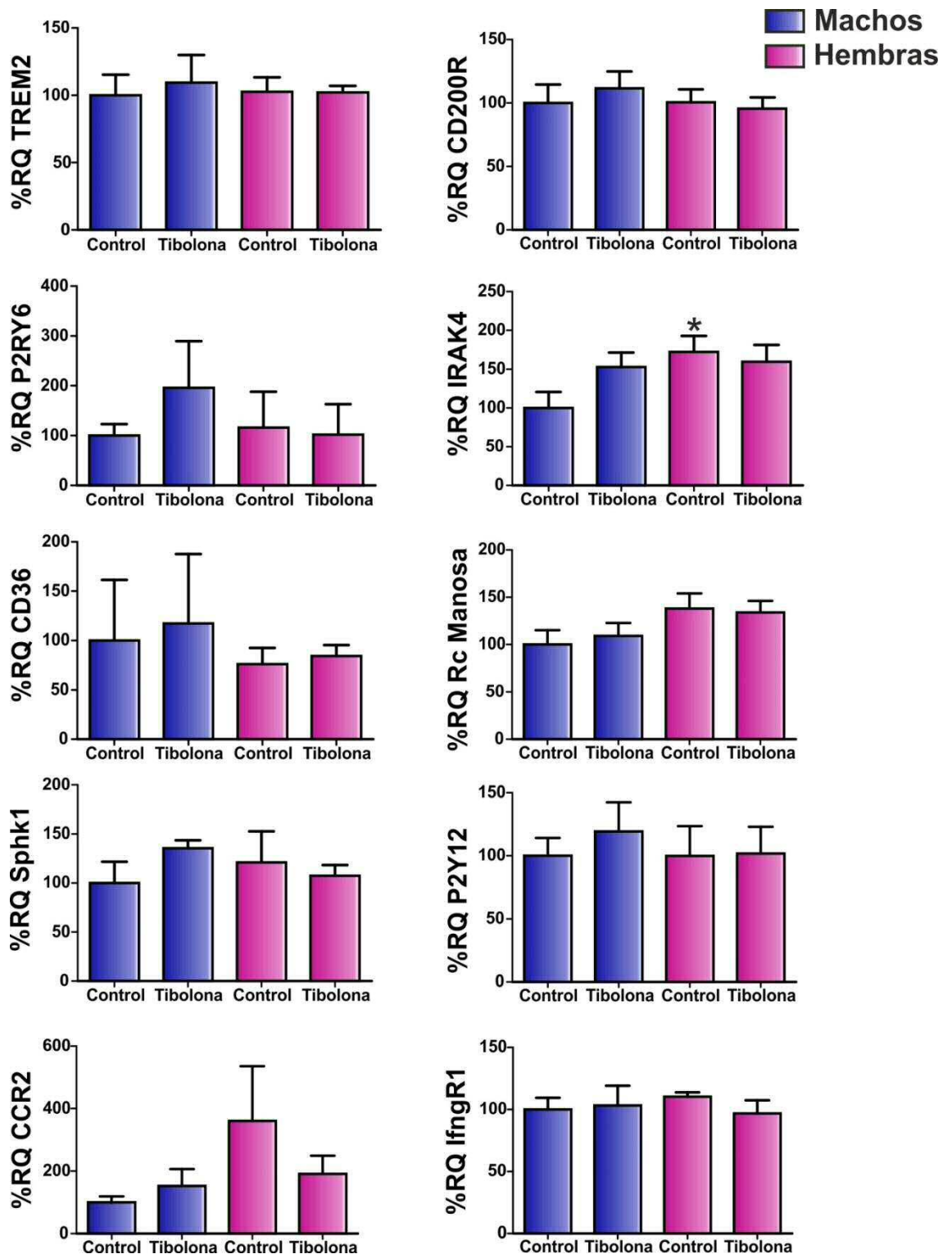


Figura 36. Expresión por las células de microglía de genes relacionados con la fagocitosis y la migración celular en condiciones basales y tras el tratamiento con tibolona. \*p <0,05 entre el grupo control de machos y el grupo control de hembras.

## 7. Los astrocitos primarios expresan enzimas que metabolizan la tibolona

Al igual que para las células de microglía, antes de iniciar los experimentos con los cultivos de astrocitos se quiso comprobar que estas células expresan las enzimas necesarias para metabolizar la tibolona. En este caso también se analizó la expresión de las enzimas  $3\beta$ -HSD y  $3\alpha$ -HSD por qPCR en distintas concentraciones de ADNc. En la Figura 20 se pueden observar los ciclos en los que se amplificaron las regiones específicas de ADN de los genes de interés. Como muestra la Figura 37, tanto para la  $3\beta$ -HSD como para la  $3\alpha$ -HSD hubo amplificación específica, ya que en ambos casos el ADNc llegó a amplificarse por debajo del ciclo 38, a partir del cual ya no es posible asegurar que la amplificación sea específica.

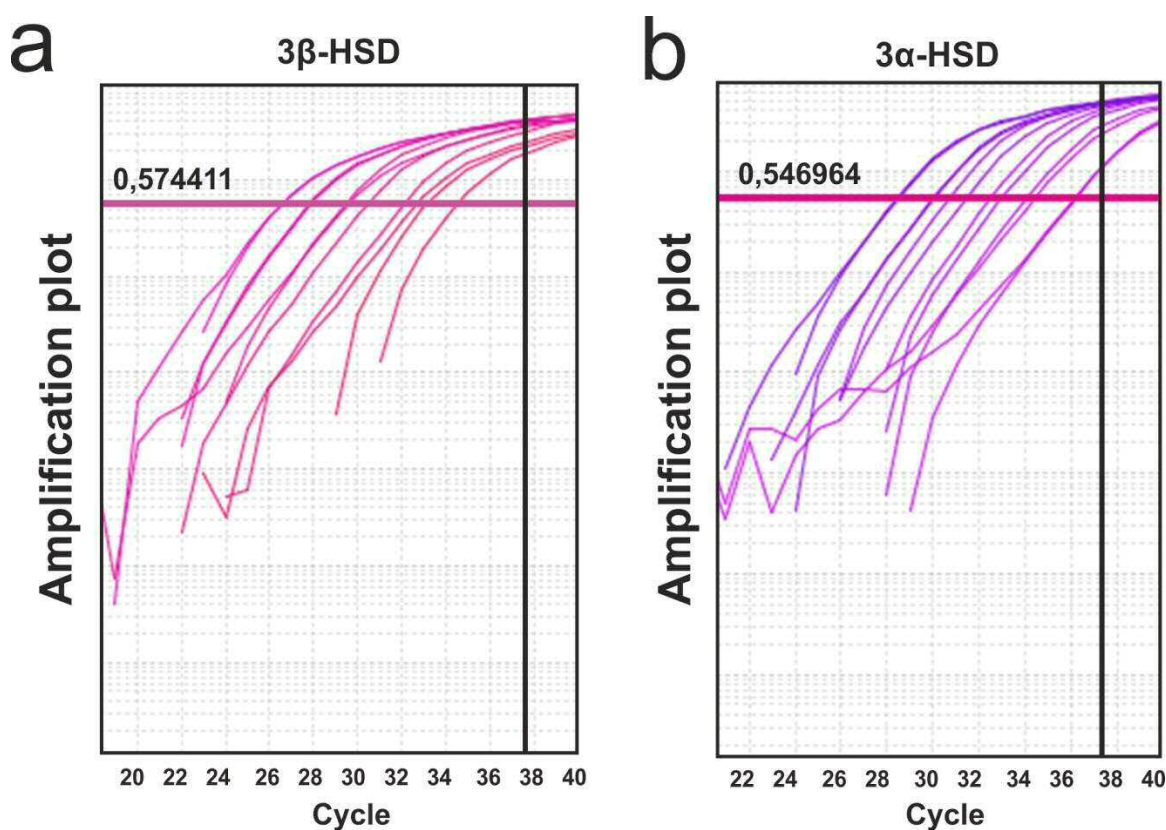
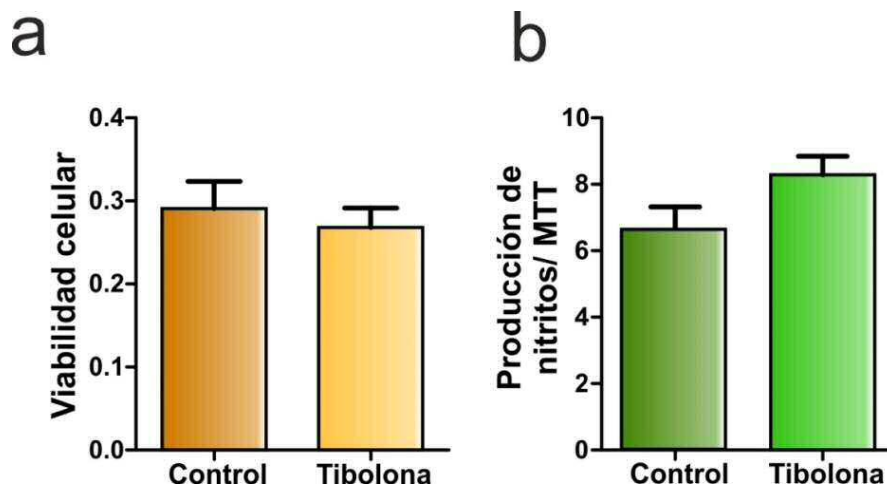


Figura 37. Gráficas de amplificación de ADNc en los distintos ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). a) Enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Se muestra el umbral de amplificación en una línea rosa horizontal. La línea negra vertical indica el ciclo a partir del cual se considera que la amplificación ya no es específica. En este caso el ciclo 38. b)  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Se muestra el umbral de amplificación en una línea rosa horizontal. La línea negra

vertical indica el ciclo a partir del cual se considera que la amplificación ya no es específica, en este caso el ciclo 38.

## 8. Efecto de la tibolona sobre la viabilidad celular y la producción de nitritos por los astrocitos

Para estudiar el efecto que tiene la tibolona en un cultivo de astrocitos primarios de rata se midió, igual que en el caso de la microglía, la respiración mitocondrial y la cantidad de nitritos liberados al medio, con las técnicas colorimétricas de MTT y Griess, respectivamente. Como se muestra en la Figura 38a, la tibolona no modificó la viabilidad celular. Tampoco modificó la producción de nitritos (Figura 38b).



**Figura 38. Efecto de la tibolona sobre la viabilidad celular y la producción de nitritos.** a) Medición de la respiración mitocondrial mediante la técnica de MTT. Muestra que la tibolona no modifica la viabilidad celular en comparación con las células control. b) Cantidad de nitritos liberados al medio con respecto a la viabilidad celular. La tibolona no aumenta los niveles de nitritos si los comparamos con las células control.

## 9. Efecto de la tibolona sobre los niveles de citoquinas en condiciones inflamatorias en cultivos de astrocitos

Para estudiar el posible efecto antiinflamatorio de la tibolona en astrocitos, se pretrataron las células con el esteroide durante 16 horas antes de someterlas a un estímulo proinflamatorio, en este caso el LPS. Tras 24 horas de tratamiento con LPS se recogió el medio de cultivo y se midieron los niveles de varias citoquinas utilizando la técnica de Luminex. En concreto, se midieron los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-6,

MCP-1 y RANTES. En la Figura 39 se pueden observar los resultados de este experimento.

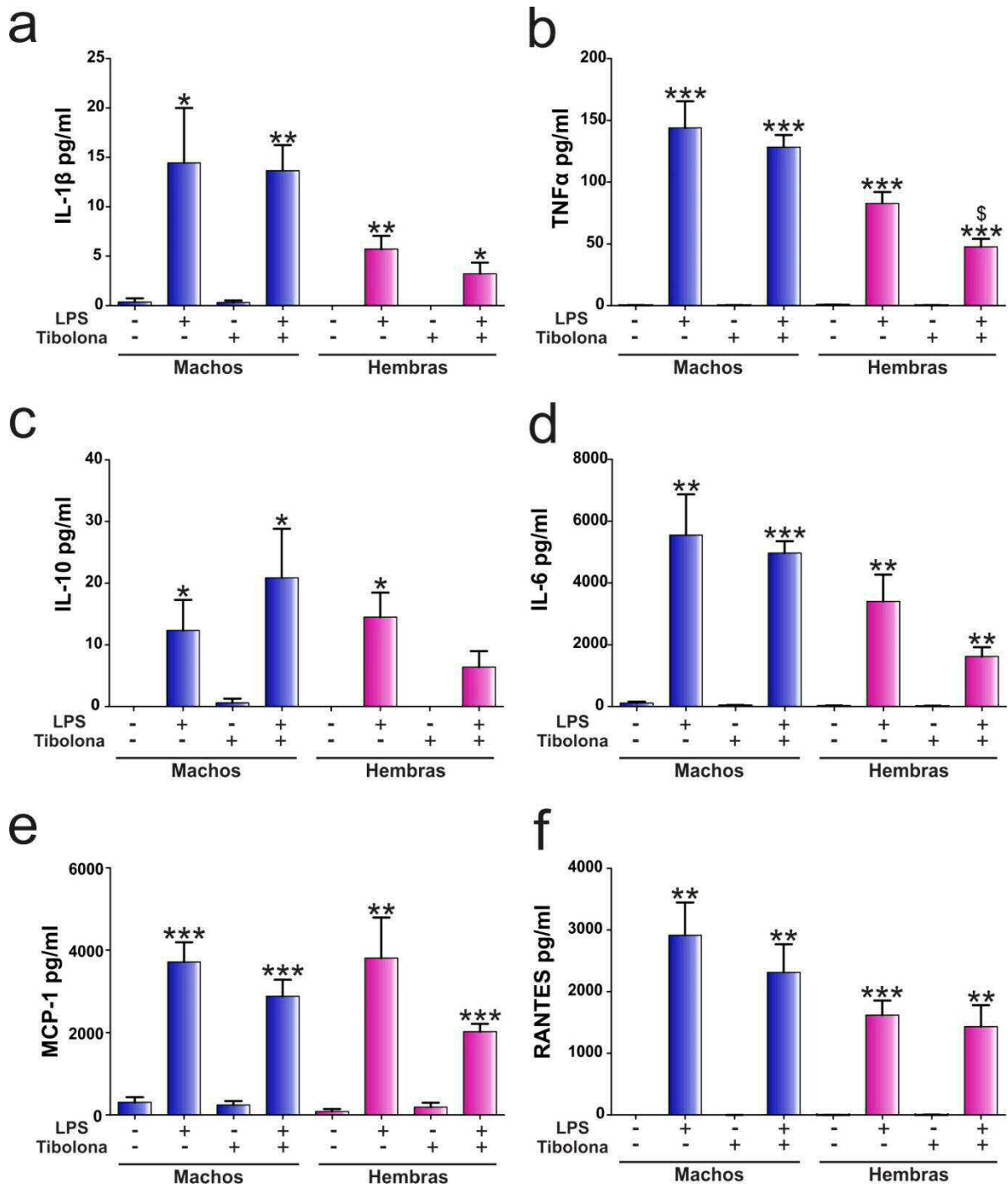


Figura 39. Concentración de citoquinas en el medio de cultivo de astrocitos primarios de rata. a) Concentración de IL-1 $\beta$ . b) Concentración de TNF $\alpha$ . c) Concentración de IL-10. d) Concentración de IL-6. e) Concentración de MCP-1. f) Concentración de RANTES. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre el

grupo experimental con el grupo control de su respectivo sexo.  $\$p < 0,05$  respecto al grupo de LPS del mismo sexo.

El LPS aumentó de manera significativa en ambos sexos los niveles de todas las citoquinas estudiadas (Figura 39). La tibolona por sí sola no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de citoquinas en el medio de cultivo. Además, la tibolona no modificó de manera significativa el efecto del LPS sobre los niveles de citoquinas en los astrocitos macho. Sin embargo, en los astrocitos hembra, la tibolona redujo el efecto del LPS sobre los niveles de TNF $\alpha$  (Figura 39b) e IL-10 (Figura 39c).

## 10. Efecto de la tibolona sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos

En el caso de los astrocitos, se analizó la actividad fagocítica usando detritos celulares conjugados con Cy3. En la Figura 40a se puede observar una imagen representativa de un astrocito en la que se muestra la marca de Cy3. Para comprobar que la marca de Cy3 es intracelular se realizaron secciones ópticas en el interior de la célula (Figura 40b). En la Figura 41 se pueden observar imágenes representativas de la fagocitosis de detritos celulares (rojo) en astrocitos de los dos sexos, en condiciones basales y tras el tratamiento con tibolona.

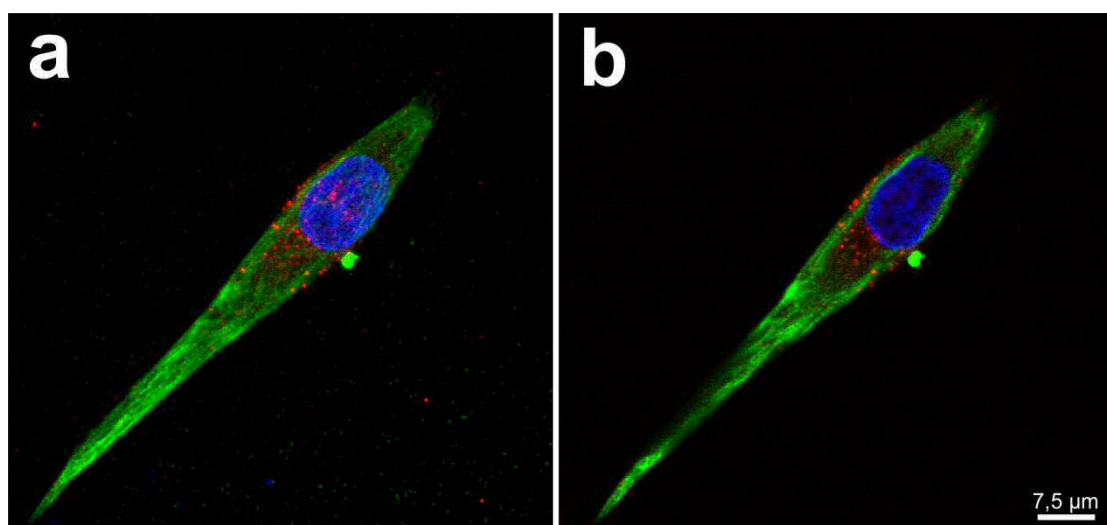


Figura 40. Imágenes representativas de la fagocitosis de detritos celulares por un astrocito. a) Proyección de un astrocito donde se observan las marcas de Cy3 (rojo), conjugado a los detritos

celulares, GFAP (verde) y DAPI (azul). **b)** Sección óptica intracelular en la que se observa que la marca de Cy3 está en el interior de la célula.

### 10.1 Estudio de la fagocitosis basal

La actividad fagocítica basal de los astrocitos se midió tanto en células macho como en hembras. Midiendo la intensidad de la marca de Cy3 se puede inferir que los astrocitos hembra tienen la misma actividad fagocítica que los astrocitos macho (Figura 42).

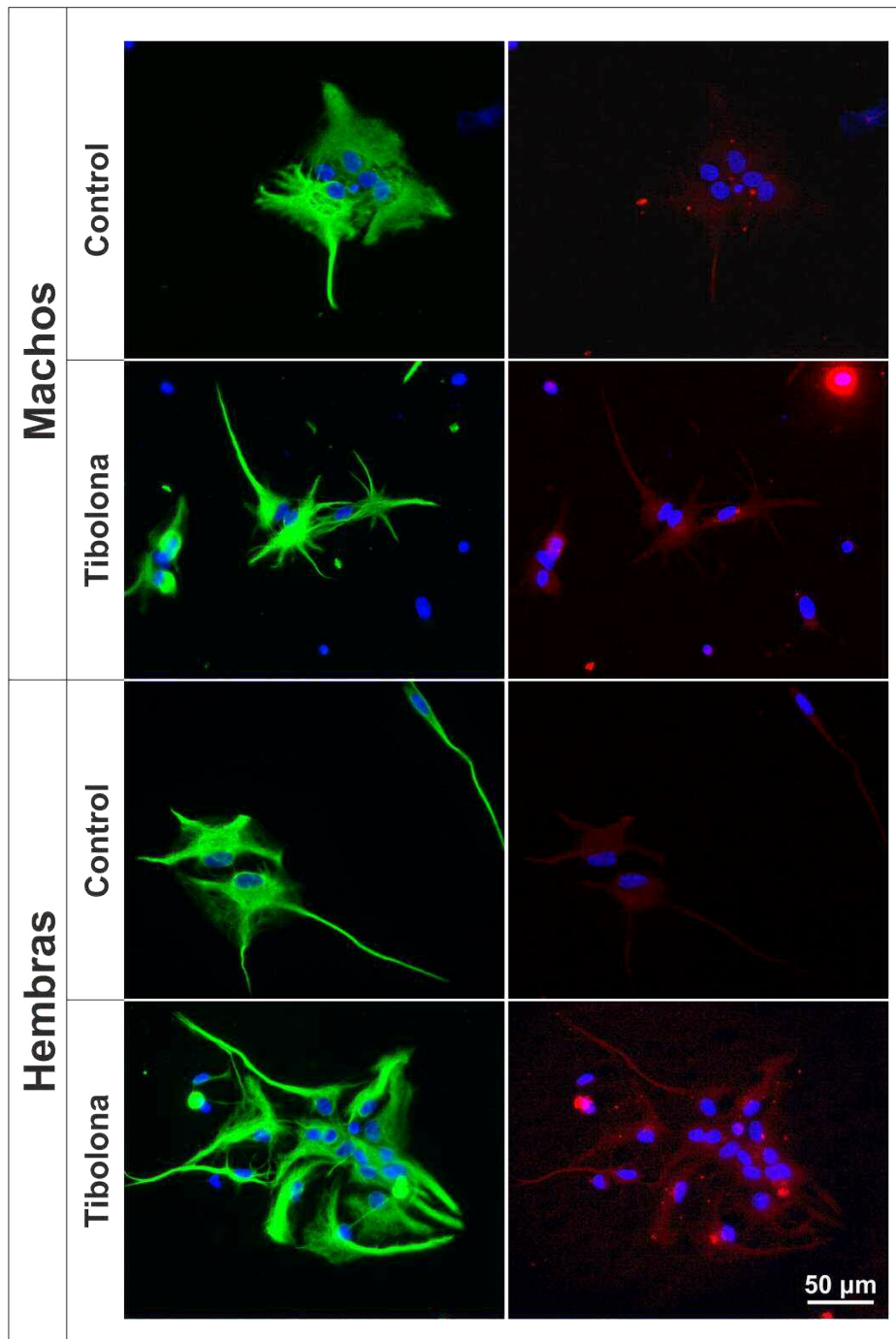




Figura 41. Imágenes representativas de la fagocitosis de detritos celulares por astrocitos macho y hembra tanto en situación control como tratados con tibolona.

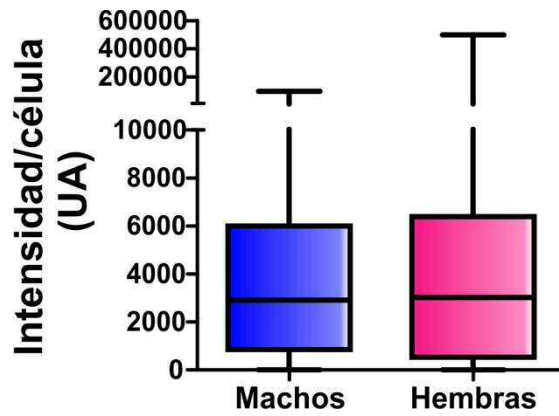


Figura 42. Fagocitosis basal de detritos celulares por los astrocitos machos y hembra. No existen diferencias basales.

### 10.2 Efectos de la tibolona sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos

En la Figura 43 se muestra el efecto que tiene la tibolona sobre la actividad fagocítica de los astrocitos. Se puede observar que tanto en machos como en hembras la tibolona aumenta de manera significativa la fagocitosis, siendo este aumento mayor en hembras en comparación con los machos.

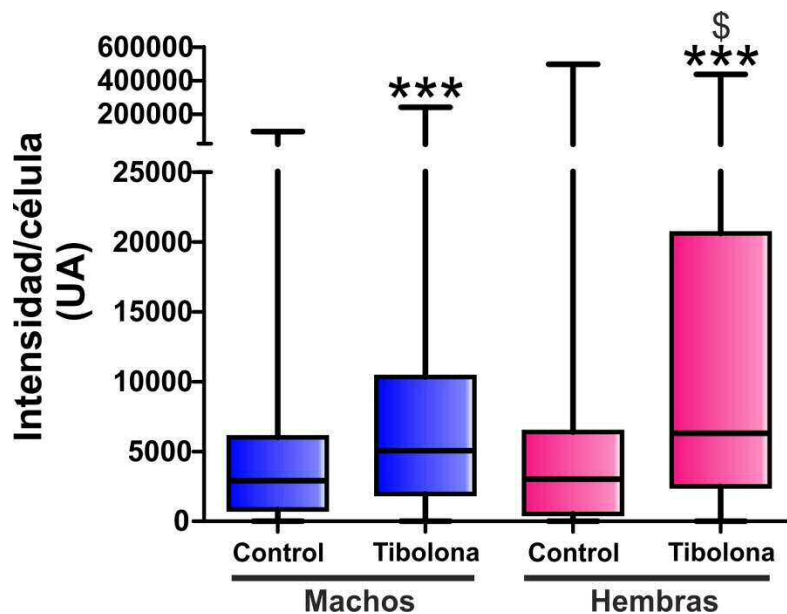
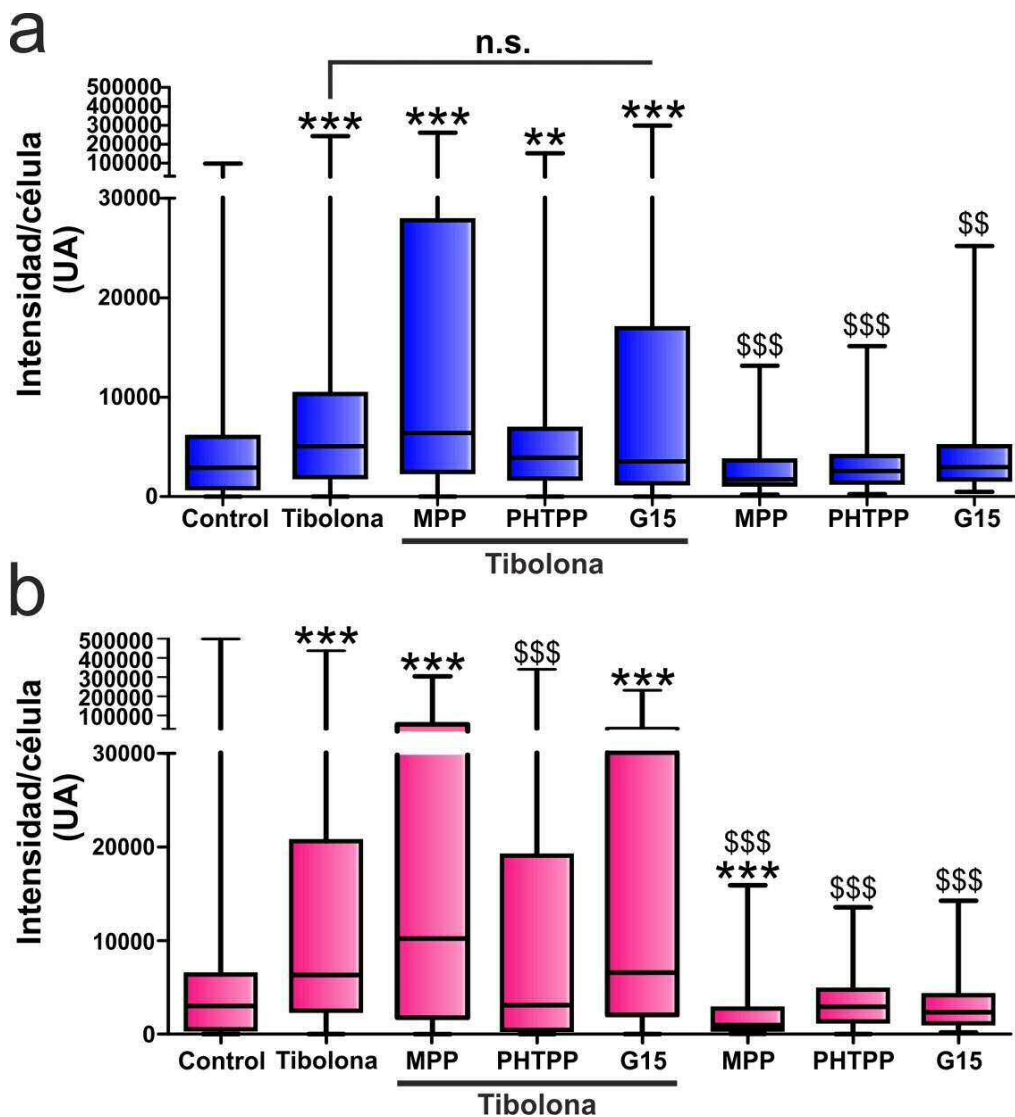


Figura 43. Efecto de la tibolona sobre la fagocitosis de detritos celulares por astrocitos primarios de machos y hembras. \*\*\*p <0,001 en relación al grupo control respectivo de cada sexo. \$p <0,05 respecto al grupo con tibolona de machos.

### 10.3 Efectos de los antagonistas de los receptores de estrógeno sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos

En la Figura 44 se muestra el efecto de los antagonistas de los receptores de estrógeno sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos. Los antagonistas estudiados fueron el MPP, PHTPP y G15. En la Figura 44a se muestran los efectos en células macho. Aquí, los antagonistas no modificaron el efecto de la tibolona, ni tuvieron un efecto por sí mismos. En cambio, en los astrocitos hembra (Figura 44b), el PHTPP revirtió el efecto de la tibolona a niveles de las células control. Excepto el MPP, ningún antagonista tuvo efecto por sí solo en las células hembra.

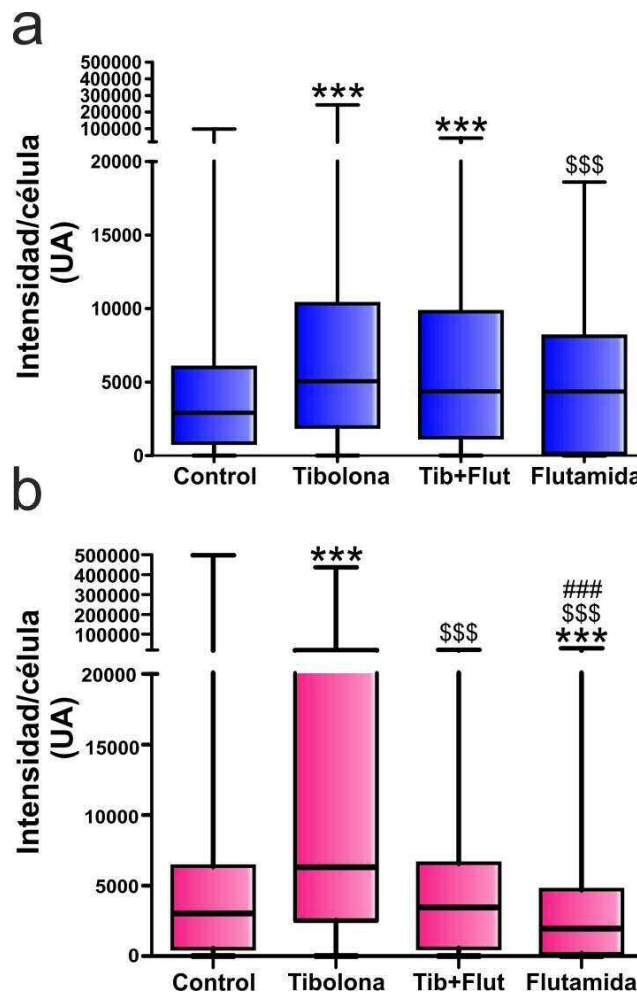




**Figura 44. Efecto de los antagonistas de los receptores de estrógeno sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos. a) Astrocitos macho. b) Astrocitos hembra.** Diferencias significativas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  en relación al respectivo grupo control de cada sexo; \$\$\$ $p < 0,001$ ; \$\$ $p < 0,01$  en relación al respectivo grupo de tibolona de cada sexo. MPP, antagonista del receptor de estrógeno  $\alpha$ . PHTPP, antagonista del receptor de estrógeno  $\beta$ . G15, antagonista del receptor de estrógeno GPER1.

**10.4 Efecto del antagonista del receptor de andrógenos flutamida sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos**

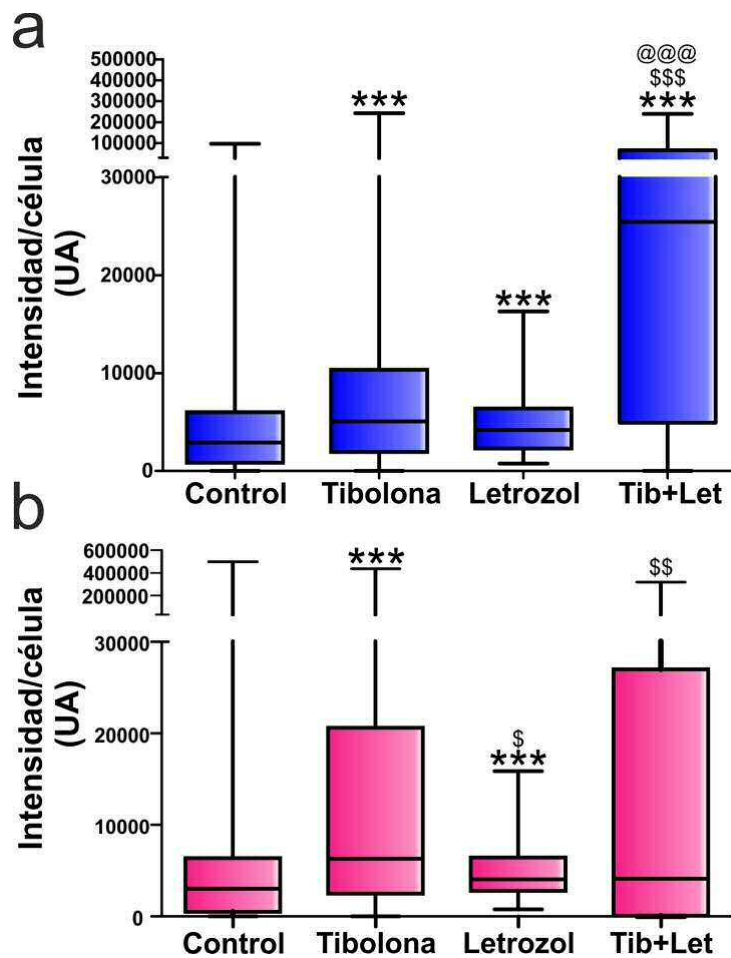
Al igual que con la microglía, se estudió el papel del receptor de andrógenos en la fagocitosis, en este caso de los astrocitos. Como se observa en la Figura 45a, la flutamida no modificó el efecto de la tibolona sobre la fagocitosis por los astrocitos macho, ni tuvo ningún efecto por sí sola respecto al grupo control. En cambio, en los astrocitos hembra (Figura 45b), la flutamida revirtió a niveles control el efecto de la tibolona. Además, la flutamida redujo por sí sola de manera significativa la actividad fagocítica, incluso por debajo de los niveles del grupo control.



**Figura 45. Efecto de la flutamida sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos. a)** Astrocitos macho. **b)** Astrocitos hembra. Diferencias significativas: \*\*\* $p < 0,001$  en relación al respectivo grupo control de cada sexo; \$\$\$ $p < 0,001$  en relación al respectivo grupo de tibolona de cada sexo; ### $p < 0,001$  en relación al respectivo grupo de Tib+Flut de cada sexo. Tib+Flut, tibolona más flutamida.

**10.5 Efecto del estradiol endógeno sobre la capacidad fagocítica de los astrocitos**

Como se ha mostrado en las Figura 43, 44 y 45, la modificación de las rutas de activación de los estrógenos, ya sea usando tibolona o antagonistas de receptores de estrógeno, hace que la actividad fagocítica de los astrocitos varíe, y además de manera diferente en células macho y hembra.



**Figura 46. Efecto del letrozol sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos. a)** Astrocitos macho. **b)** Astrocitos hembra. Diferencias significativas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  en relación al respectivo grupo control de cada sexo; \$\$\$ $p < 0,001$ ; \$\$ $p < 0,01$  en relación al respectivo grupo de tibolona de cada sexo; @@@  $p < 0,001$  en relación al respectivo grupo letrozol de cada sexo. Tib+Let, tibolona más letrozol.

En la Figura 46 se muestra el efecto de inhibir la producción endógena de estradiol por los astrocitos mediante la utilización de letrozol, un inhibidor de la enzima aromatasa. Como se observa en la Figura 46a, en astrocitos macho el letrozol por sí solo aumentó la fagocitosis de manera significativa en comparación al grupo control, alcanzando casi los mismos niveles que la tibolona. Además, el tratamiento conjunto con tibolona y letrozol resultó en un incremento de la fagocitosis por encima de los valores control y de los de los otros dos grupos experimentales. Por el contrario, aunque el letrozol por sí solo también aumentó la fagocitosis en los astrocitos hembra, el tratamiento conjunto con tibolona y letrozol no modificó de manera significativa la fagocitosis respecto a los valores control (Figura 46b).

#### ***10.6 Efecto del estradiol sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos tras la inhibición de la enzima aromatasa***

Después de averiguar que la administración de estradiol exógeno tiene efectos sobre la fagocitosis de los astrocitos macho (Figura 47) y que la inhibición de la síntesis de estradiol endógeno tiene efectos en astrocitos macho y hembra (Figura 46), se quiso determinar cuál era el efecto del estradiol exógeno cuando se inhibía la síntesis del estradiol endógeno. En la Figura 47 se muestran los resultados de este experimento.

Como se observa en la Figura 47a, la administración conjunta de letrozol y estradiol tuvo el mismo efecto que el observado con el tratamiento con solo estradiol. En el caso de la células hembra (Figura 47b), esta administración conjunta no tuvo ningún efecto, al igual que al administrar el estradiol solo.

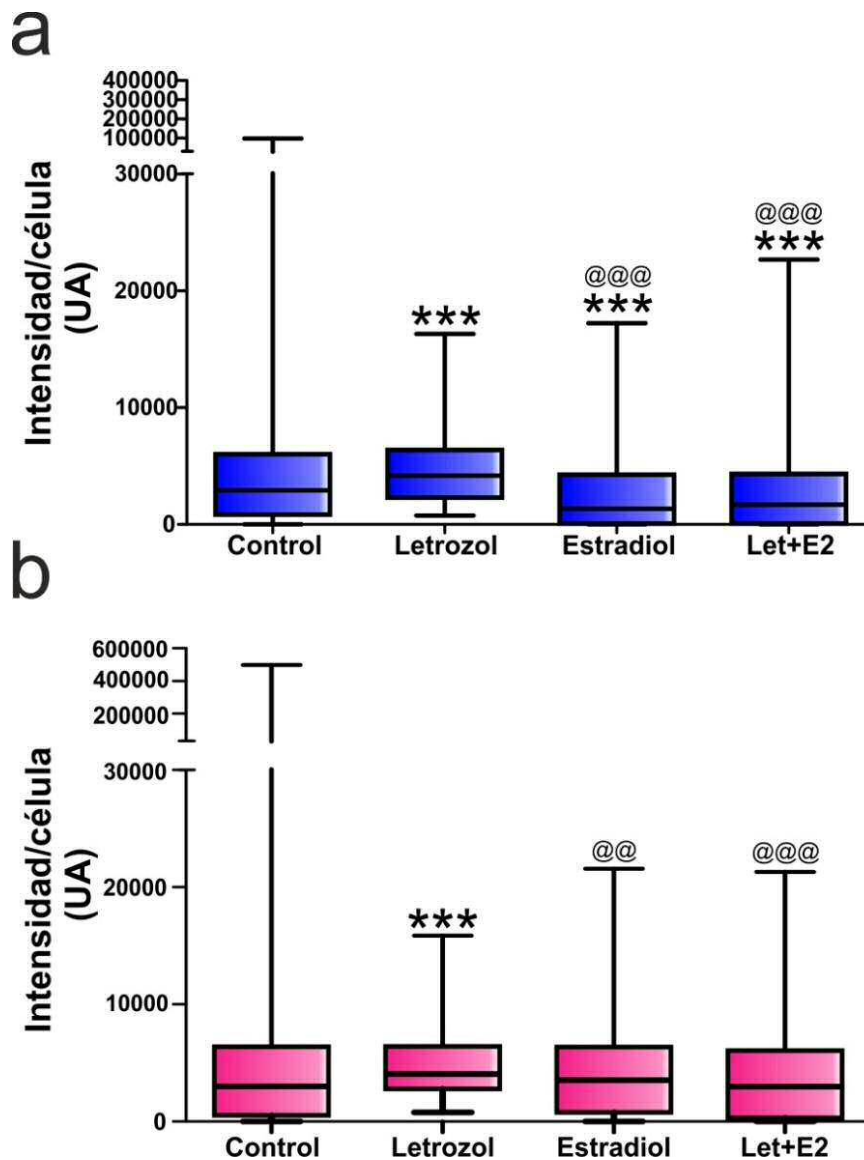


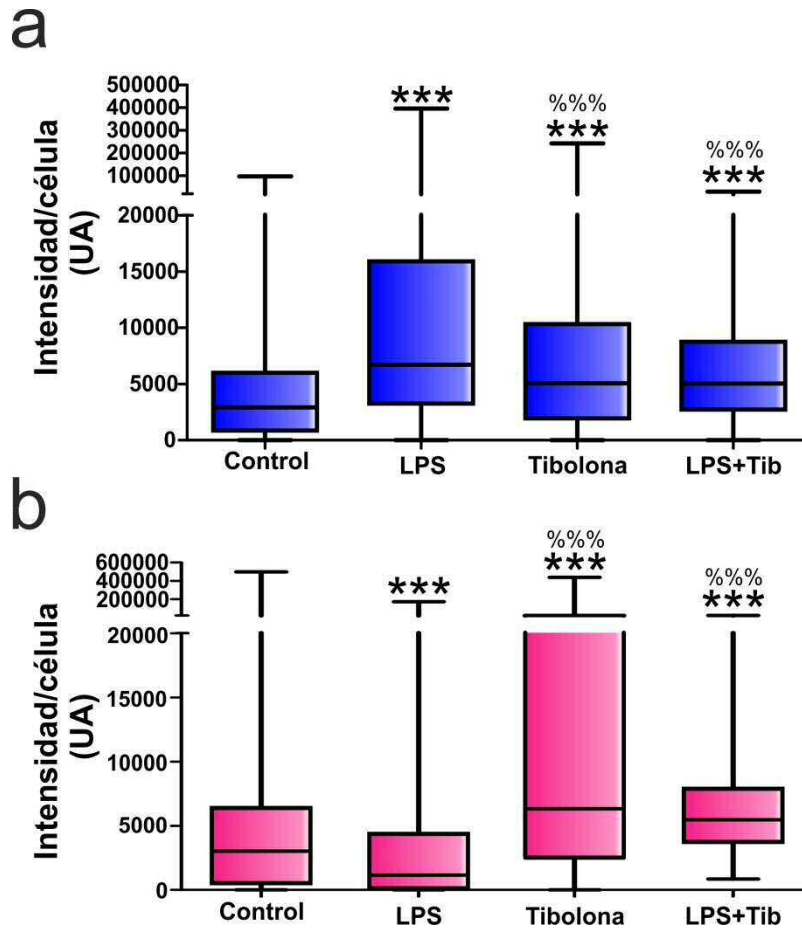
Figura 47. Efecto del letrozol y el estradiol sobre la fagocitosis de detritos celulares por los astrocitos a) Astrocitos macho. b) Astrocitos hembra. Diferencias significativas: \*\*\* $p < 0,001$  respecto al grupo control; @@@ $p < 0,001$ ; @@ $p < 0,01$  respecto al grupo letrozol. Let, letrozol. E2, estradiol.

### 10.7 Efectos de la tibolona sobre la respuesta fagocítica de los astrocitos frente al LPS

A continuación, decidimos estudiar el efecto de la tibolona sobre la actividad fagocítica de los astrocitos en condiciones inflamatorias. Para ello, los cultivos se trataron con LPS en presencia o en ausencia de tibolona. En la Figura 48 se muestran los resultados de este experimento.

En la Figura 48a se muestra el efecto del LPS en la actividad fagocítica de astrocitos macho. Se puede observar que el tratamiento con LPS aumentó de manera significativa la fagocitosis en comparación al grupo control. La tibolona también incrementó la fagocitosis, pero no tanto como con LPS. Además, la tibolona redujo de manera significativa el efecto del LPS sobre la fagocitosis, aunque sin llegar a los valores control.

Al contrario que en los astrocitos macho, el LPS produjo una disminución significativa de la fagocitosis en las células hembra (Figura 48b). La tibolona tuvo el efecto contrario al LPS en las hembras e inhibió la caída de la fagocitosis inducida por el LPS a niveles por encima del valor control.



**Figura 48. Efecto del LPS y la tibolona sobre la capacidad fagocítica de detritos celulares por astrocitos primarios. a)** Efecto del LPS y la tibolona en astrocitos macho. **b)** Efecto del LPS y la tibolona en astrocitos hembra. \*\*\* $p < 0,001$  entre el grupo experimental y el grupo control. %% $p < 0,001$  entre el grupo experimental y el grupo con LPS.

## 11. Efecto de la tibolona sobre la expresión de genes de fagocitosis en los astrocitos

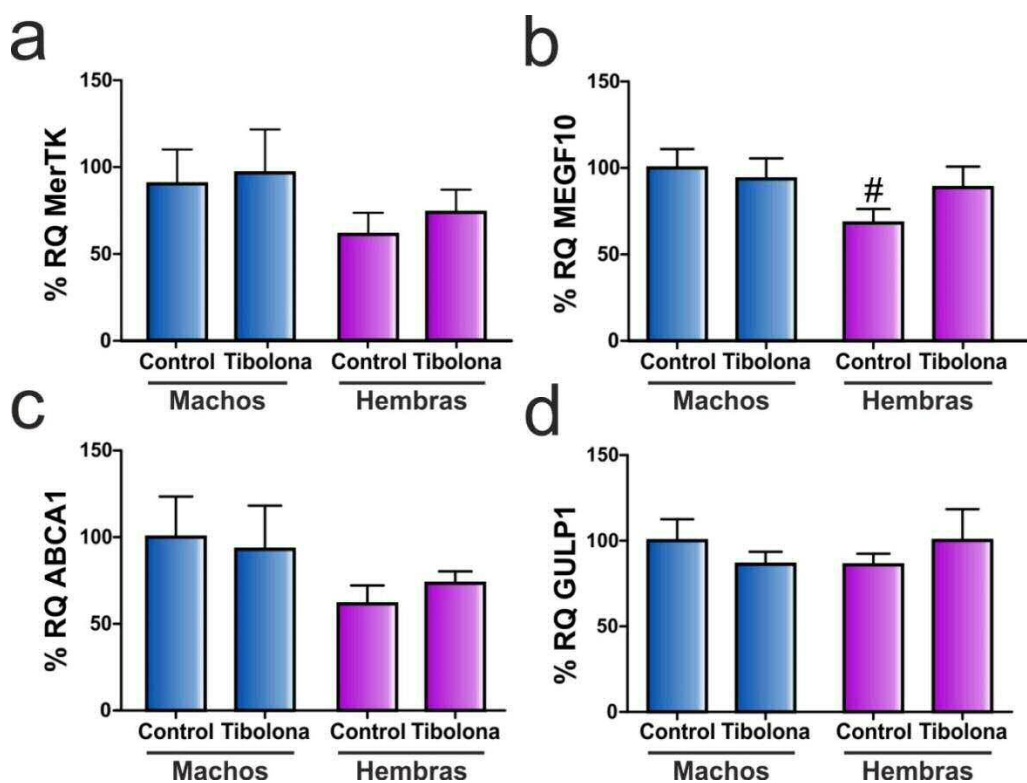


Figura 49. Estudio de los efectos que tiene la tibolona sobre la expresión de genes relacionados con la fagocitosis en los astrocitos. a) Expresión del gen MerTK. b) Expresión del gen MEGF10. c) Expresión del gen ABCA1 (Transportador A1 en cinta unido a ATP). d) Expresión del gen GULP1 (Dominio 1 adaptador de envoltura PTB). #p <0,05 respecto al control de machos.

Ya que la tibolona modifica la actividad fagocítica de detritos celulares por los astrocitos macho y hembra, se quiso estudiar si este efecto estaba asociado a la modificación de la expresión de genes relacionados con la fagocitosis astrocitaria. Para ello se analizaron los siguientes genes: MerTK, MEGF10, ABCA1 y GULP1. Como se puede observar en la Figura 49, la tibolona no modificó de manera significativa la expresión de ninguno de estos genes, ni en machos ni en hembras. Pero se detectó una diferencias sexual en la expresión del gen MEGF10 (Figura 49b), que fue menor en células hembra.



---

# DISCUSIÓN

---





# 1. Efectos de la tibolona sobre la gliosis reactiva en una lesión cortical

La gliosis reactiva después de una lesión cerebral aguda sigue un patrón temporal y regional preciso. En este estudio, hemos observado que el número de células GFAP+ y el número de células Iba1+ en la corteza cerebral cambian según la distancia a la herida (F1-F5) y el tiempo después de la lesión. Además, la gliosis reactiva mostró diferencias en función de la distancia a la superficie cortical dorsal (S1-S3). Los cambios en la gliosis reactiva después de una lesión penetrante, de acuerdo con el tiempo después de la lesión y la distancia al borde de la lesión se han descrito previamente [95-102]. Sin embargo, los cambios en el número de astrocitos reactivos y microglía reactiva en función de la profundidad cortical han sido menos explorados. Por ejemplo, Miyake et al. [97] observaron diferencias en el número de células GFAP+ entre la capa I y las capas II-VI en la corteza cerebral del ratón después de una herida penetrante. Nuestros hallazgos indican que las diferencias espaciales en el número de células GFAP+ e Iba1+ en la corteza cerebral después de la lesión cerebral no solo dependen de la distancia a la lesión, sino también de la profundidad cortical.

Nuestros resultados indican que el tratamiento con tibolona provoca una reducción en el número de astrocitos GFAP+ y en el número de células de microglía Iba1+ después de una lesión cortical aguda. El efecto de la tibolona en las células GFAP+ e Iba1+ también mostró diferencias según el tiempo después de la lesión, la distancia a la lesión y la posición dentro del eje cortical dorsoventral, lo que sugiere que la acción de la tibolona sobre la gliosis reactiva está regulada en un contexto específico. El efecto de la tibolona se observó en las regiones corticales ubicadas en la proximidad (0-600  $\mu\text{m}$ ) de la herida, donde, de acuerdo con estudios anteriores [96, 100, 101], detectamos el mayor número de astrocitos y microglía con un fenotipo reactivo tras la lesión cerebral. En contraste, la tibolona no afectó el número de células gliales en el hemisferio contralateral, lo que sugiere que su acción sobre la supervivencia de las células gliales está restringida al tejido dañado. Cabe señalar, sin embargo, que la tibolona tiene efectos sobre el tejido cerebral sano. Por ejemplo, la tibolona aumenta la expresión de la superóxido dismutasa-2 en el hipocampo de rata

[76] y regula la eficacia sináptica en las neuronas POMC hipotalámicas [71]. Aunque la tibolona no redujo el número de células gliales en el hemisferio contralateral, el esteroide podría regular otros parámetros en los astrocitos y la microglía en el tejido sano. Por ejemplo, se ha demostrado que otro esteroide, el estradiol, reduce la gliosis reactiva en el cerebro lesionado, pero promueve el crecimiento de los procesos astrocíticos y la expresión de GFAP en tejido cerebral sano [43]. Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar los efectos de la tibolona sobre los astrocitos y la microglía en condiciones fisiológicas. Para ello hemos hecho varios estudios *in vitro* que serán discutidos posteriormente.

Con la excepción de una reducción por el tratamiento con tibolona en el número de células GFAP+ a 0-200  $\mu\text{m}$  de la herida (F1) y entre las 200 y 400  $\mu\text{m}$  desde la superficie cortical (S2), no se encontraron diferencias a los 3 días después de la lesión en el número de células GFAP+ o Iba1+ entre los animales control y los inyectados con tibolona. Sin embargo, la tibolona indujo cambios significativos en el número de astrocitos y microglía a los 7 días después de la lesión en comparación con los animales del grupo control. Así, a los 7 días después de la lesión, los animales inyectados con tibolona mostraron una disminución en el número de células GFAP+, en el número de células Iba1+ totales y en el número de células Iba1+ con fenotipo reactivo. Por el contrario, la tibolona no afectó el número de células Iba1+ con fenotipo no reactivo en comparación con los animales inyectados con vehículo. Estos hallazgos indican que a los 7 días después de la lesión, la tibolona redujo la gliosis reactiva.

La gliosis reactiva es una respuesta adaptativa dirigida a restaurar la homeostasis del tejido neural [7, 24, 103, 104]. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, los astrocitos reactivos y la microglía reactiva pueden ejercer acciones perjudiciales [24, 105-107]. En nuestro estudio, la regulación de la gliosis reactiva por tibolona se asoció con un aumento de la supervivencia neuronal en la corteza cerebral lesionada, evaluada a los 14 días después de la lesión. En la lesión traumática cerebral, la gliosis y la neuroinflamación se asocian con una muerte neuronal tardía que se produce varios días después de la pérdida neuronal primaria inducida por la lesión [108]. Por ello, en nuestro estudio, la supervivencia neuronal se evaluó 14 días tras la

lesión cerebral, después de las dos oleadas de muerte neuronal. Al mantener un estado metabólico y funcional saludable en los astrocitos y microglía [78-80, 109] y al reducir la neuroinflamación [109] y la gliosis, la tibolona podría mejorar la función homeostática de estas células y aumentar sus acciones neuroprotectoras.

La acción protectora de la tibolona sobre las neuronas se limitó a la región F2. La región F1 probablemente estaba demasiado cerca del sitio de la lesión y sufriría un proceso de muerte neuronal primaria rápida, como ocurre en el foco de las lesiones isquémicas y por lo tanto no pudo protegerse con la tibolona. Sin embargo, la región F2 puede representar un sitio de muerte neuronal secundaria (penumbra), donde la tibolona podría ejercer un efecto protector. En las regiones F3-F5, no se observó un efecto significativo de la tibolona en comparación con el vehículo, probablemente debido a que estas regiones están demasiado alejadas del sitio de la herida y las neuronas pueden gestionar mejor la situación de estrés.

Para facilitar la comparación de los resultados del presente estudio con los obtenidos previamente con estradiol y los SERMs sobre la gliosis reactiva, la tibolona se inyectó a las 0, 24 y 48 horas después de la lesión cerebral como se describe en los protocolos anteriores [59, 110]. Este período de tiempo corresponde a la fase de inicio de la gliosis reactiva. Los astrocitos reaccionan en cuestión de horas después de una herida cerebral [111, 112], mientras que la respuesta de las células microgliales ocurre entre 3 y 7 días después de la lesión [113]. En las mujeres, la tibolona tiene una vida media plasmática de 7 horas y los niveles de sus metabolitos alcanzan su punto máximo entre 60 y 90 minutos después de la administración [114]. Aunque estos valores pueden ser diferentes en nuestro modelo animal, sugieren que los efectos de la tibolona sobre la gliosis a los 7 días después de la lesión y el número de neuronas a los 14 días después de la lesión son la consecuencia de la acción del esteroide durante los primeros días del daño cerebral.

La activación del inflamosoma en las neuronas perilesionales y la microglía es uno de los primeros eventos iniciados después de una lesión cerebral [115] y desempeña un papel en los mecanismos de lesión secundaria [116]. Por lo tanto, la actividad antiinflamatoria de la tibolona, que ha sido detectada en la línea celular de

microglía BV-2 [80], podría ser uno de los mecanismos por los cuales el esteroide reduce la gliosis y la muerte neuronal secundaria. No obstante, nuestros resultados en cultivos primarios de astrocitos y microglía, que se discuten abajo, sugieren que la tibolona tiene acción antiinflamatoria moderada en estas células. Otras causas de la ola secundaria de daño tisular incluyen el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial [117, 118], que también disminuyen con la tibolona en las células gliales *in vitro* [78-80, 109]. Además, la tibolona también puede disminuir el daño tisular al proteger la función de las células endoteliales [119, 120]. Nuestros resultados en cultivos de astrocitos y microglía apuntan a otro posible mecanismo involucrado en la acción protectora de la tibolona: la regulación de la fagocitosis, un proceso involucrado en la eliminación de restos celulares en torno a la lesión y en la reparación del tejido dañado.

Los efectos de la tibolona en los astrocitos primarios, las células T98G y la microglía BV-2 están mediados por los receptores de estrógeno ER $\alpha$  o ER $\beta$  [79, 80, 121]. Se sabe que la lesión cerebral induce la expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$  en los astrocitos reactivos [122, 123] y que estos receptores también son expresados por la microglía [49, 53, 57, 124]. Además, el receptor 1 de estrógenos acoplado a la proteína G (GEPER1), también se expresa en la microglía [53] y los astrocitos [125]. Por lo tanto, es posible que la tibolona pueda ejercer acciones directas sobre los astrocitos reactivos y la microglía reactiva actuando sobre los ERs expresados por estas células. Además, dependiendo del metabolismo específico del tejido, la tibolona también puede activar los receptores de andrógenos y progesterona [65], que igualmente se expresan en las células gliales y participan en la regulación de la gliosis [43, 123, 124, 126-129]. Por ejemplo, en la corteza cerebral de monos hembra ovariectomizadas, la tibolona se metaboliza principalmente a 3 $\alpha$  y 3 $\beta$  hidroxitibolona [29, 89], dos metabolitos con actividad estrogénica [121, 130] y al  $\Delta^4$ -isómero, que ejerce acciones androgénicas y progestogénicas [130]. Nuestros resultados en cultivo indican que tanto los astrocitos como la microglía expresan las enzimas necesarias para el metabolismo de la tibolona y que los ERs y el receptor de andrógenos participan en la acción directa de la tibolona sobre estas células.

El efecto de la tibolona sobre la gliosis después de la lesión cerebral, observado en el presente estudio, es similar al reportado después de la administración de estradiol o de los SERMs a roedores ovariectomizados [59, 110]. Esto sugiere que el mecanismo de acción de la tibolona en la gliosis estaría por lo menos en parte, mediado por los receptores de estrógeno. Actuando sobre los receptores de estrógeno, la tibolona no solo podría reducir la neuroinflamación y la activación de los astrocitos y la microglía, sino también la activación de la apoptosis mediada por caspasa-3 [131-133], promover la integridad de la barrera hematoencefálica y la angiogénesis [134, 135] y regular la fagocitosis (presente estudio). La tibolona también podría reducir potencialmente la microglía reactiva actuando sobre los receptores de andrógenos, ya que se sabe que estos receptores disminuyen la activación de la microglía después de una lesión cerebral penetrante, al menos en ratas macho [136]. Además, nuestros resultados *in vitro* indican que la tibolona puede actuar a través de los receptores de andrógenos en la microglía y los astrocitos. Finalmente, la activación de los receptores de progesterona también podría contribuir al efecto de la tibolona en la gliosis, ya que la progesterona reduce la inflamación y el estrés oxidativo después de una lesión cerebral traumática [137, 138] y aumenta la función respiratoria de las mitocondrias [139].

Una limitación del presente estudio es que hemos utilizado un modelo de lesión cerebral que es conveniente para la cuantificación de las células gliales en el borde de la lesión, pero que induce un daño neural muy pequeño, lo que dificulta la determinación de la recuperación funcional mediante ensayos de comportamiento. Por lo tanto, son necesarios más estudios que utilicen otros modelos de lesión cerebral más severa, como la traumática. Esto también permitirá evaluar si las acciones antiglióticas y neuroprotectoras de la tibolona mostradas en el presente estudio son extensibles a otros tipos de trauma cerebral, como contusión o lesión por conmoción cerebral. Dado que se han descrito diferencias sexuales en la respuesta a la lesión traumática cerebral [98], también sería importante evaluar el efecto de la tibolona en animales machos. Además, sería interesante estudiar el efecto de la tibolona en hembras gonadalmente intactas, para determinar si el estradiol endógeno puede potenciar las acciones homeostáticas beneficiosas de la tibolona.

## 2. Efecto de la tibolona sobre la gliosis reactiva en cultivos celulares

Para intentar dilucidar el posible mecanismo de acción de la tibolona en células gliales y su implicación en procesos que disminuyan la gliosis reactiva, como hemos visto *in vivo*, decidimos hacer un estudio *in vitro* utilizando células primarias de microglía y astrocitos. En este caso usamos células primarias procedentes de cerebros de rata Wistar ya que el rendimiento de obtención celular es mayor y por lo tanto se reduce el número de animales que debemos usar siguiendo el principio de las 3Rs [140].

Lo primero que estudiamos es si las células microgliales y los astrocitos de rata expresan las enzimas necesarias para metabolizar la tibolona. Para ello analizamos la expresión de ADNc de las enzimas 3 $\alpha$  y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\alpha$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD), ya que ambas se encargan de la transformación de la tibolona en sus metabolitos (3 $\alpha$  y 3 $\beta$ -hidroxitibolona y un  $\Delta^4$ -isomero) [141]. Nuestros resultados indican que, tal y como se había descrito anteriormente para los astrocitos [142], ambos tipos celulares expresan las enzimas, por lo menos en nuestras condiciones de cultivo. En cambio, nuestros resultados difieren de los de estudios previos según los cuales las células microgliales BV-2 y la microglía primaria extraída de cerebros de ratón no expresan las enzimas [143-145]. En nuestro caso, la microglía fue extraída de cerebros postnatales de ratas, por lo que la expresión enzimática podría ser diferente entre ambas especies, debido a las diferencias que presentan la microglía y los astrocitos de ratón y rata [146-148].

Una vez determinado que los astrocitos y la microglía expresan las enzimas de metabolización de tibolona en nuestras condiciones experimentales, procedimos a analizar los efectos de la tibolona sobre la muerte celular y la producción de nitritos, siendo esta última una medida indirecta de la activación de la ruta proinflamatoria NF- $\kappa$ B, ya que al aumentar la producción de iNOS se va a incrementar la liberación de nitritos al medio [149]. La concentración de tibolona usada tanto para medir estos factores como para los siguientes experimentos fue de 100 nM, ya que en estudios

previos se había observado que esta concentración tiene efectos protectores *in vitro* [80]. Así, determinamos que la tibolona por sí sola no aumenta ni la muerte celular en astrocitos y microglía ni la producción de nitritos por parte de estas células. Por otra parte, la tibolona no modificó la liberación basal de citoquinas al medio ni en los astrocitos ni en la microglía, estudiada con la tecnología Luminex, salvo la inducción de un aumento significativo en la liberación de MCP-1 en la microglía hembra, que se discutirá posteriormente. Esto también sugiere que la tibolona no induce una activación inflamatoria basal de los astrocitos y la microglía.

Para estudiar los efectos de la tibolona sobre la respuesta de la microglía a un estímulo proinflamatorio, se midió la concentración de las citoquinas IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP-1 y RANTES en el medio de cultivos expuestos a IFN $\gamma$ , que es una citoquina que va a aumentar la expresión de IL-12 e IL-23 (interleuquina 23) en células gliales y linfocitos Th1 [150]. Además, el IFN $\gamma$  induce la expresión de MHC-II por la microglía, lo que permite que estas células se conviertan en las células presentadoras de antígenos del SNC por excelencia, junto con algunas poblaciones de astrocitos y células endoteliales [151]. En cuanto a la relación de IFN $\gamma$  con las citoquinas estudiadas, se ha descrito que en células humanas el interferón aumenta la liberación de la citoquina IL-1 $\beta$ . En cambio, en modelos murinos, se ha observado todo lo contrario ya que actúa como un estímulo antiinflamatorio inhibiendo la liberación de IL-1 $\beta$  de macrófagos a través de la vía de STAT1 [152, 153]. También se ha encontrado que el IFN $\gamma$  induce la expresión de TNF $\alpha$ , de MCP-1 y de RANTES en macrófagos, que son citoquinas cruciales para reclutar monocitos y linfocitos T y así hacer frente a cualquier daño que haya en el SNC, ya sea por partículas bacterianas o víricas o por un traumatismo o lesión [154-159].

A pesar de estos antecedentes, en nuestros experimentos el tratamiento con IFN $\gamma$  no tuvo un efecto significativo sobre la liberación de ninguna de las citoquinas estudiadas al medio, excepto la de MCP-1 en la microglía hembra. La tibolona también aumentó por sí sola la liberación de esta citoquina en los cultivos hembra. Sin embargo, el tratamiento combinado con IFN $\gamma$  y tibolona redujo la liberación de MCP-1 a niveles similares a la situación basal. Esto sugiere que la tibolona podría estar ejerciendo un efecto homeostático sobre la liberación de MCP-1 por la microglía



hembra, aumentándola en condiciones basales y disminuyéndola en situaciones inflamatorias. La tibolona tuvo un efecto similar en la liberación de IL-1 $\beta$  en la microglía macho, aunque en este caso solamente se observó un efecto significativo cuando se combinaron los tratamientos de IFN $\gamma$  y tibolona.

Sin embargo, el resultado más relevante de los experimentos con IFN $\gamma$  fue la poca activación que tuvo este factor sobre la liberación de citoquinas, lo que sugiere que las células de microglía en cultivo ya se encontraban con un cierto nivel de activación basal. Esto podría deberse al tiempo que estas células se mantuvieron sin el suplemento FBS para eliminar el efecto de las hormonas presentes en el suero. La eliminación del FBS podría aumentar la reactividad basal de la microglía ya que el suero proporciona a las células factores de crecimiento, hormonas, proteínas transportadoras, ácidos grasos, lípidos, aminoácidos, vitaminas e inhibidores de proteasas [160]. Además, se observa que la microglía *in vitro* presenta una morfología más ameboide que la que se encuentra en el tejido, lo que sugiere que podría estar basalmente más reactiva. Esta consideración es importante para interpretar los resultados sobre la regulación de la fagocitosis en la microglía por la tibolona.

Estudiamos la capacidad fagocítica de la microglía usando biopartículas de *E. coli* que son sensibles a los cambios de pH, emitiendo fluorescencia únicamente cuando se encuentran en un pH ácido, como ocurre cuando alcanzan un lisosoma o un fagosoma. La actividad fagocítica de la microglía es una de sus funciones más importantes, ya que está implicada en el neurodesarrollo, participando en la poda sináptica, en procesos homeostáticos, eliminando sinapsis fallidas o redundante a lo largo de la vida del organismo, e incluso defendiendo al SNC de la entrada de patógenos y traumatismos, limpiando el tejido de los restos celulares que se producen tras un evento donde ha habido muerte celular [7-9, 161]. Además, la microglía reactiva incrementa su capacidad fagocítica para poder hacer frente al daño tisular y una alteración en esta respuesta podría ser un factor importante en las alteraciones patológicas asociadas a los trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson o la esclerosis múltiple [162-165]. También se ha descrito que la fagocitosis de células apoptóticas en una lesión aguda es necesaria para restablecer la homeostasis y minimizar la activación crónica microglial que suele dar lugar a una

muerte neuronal secundaria debido al aumento de las citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno (ROS) [166, 167]. Por lo tanto, determinar si la tibolona es capaz de regular esta función básica de la microglía es crucial para entender sus efectos cuando hay una gliosis reactiva.

En nuestro caso, observamos que la fagocitosis basal de la microglía obtenida de hembras es mayor que la de machos, lo que confirma los anteriores resultados obtenidos tanto en cultivos de microglía [90, 168], como en células del sistema inmune periférico [169]. Además, el tratamiento con la tibolona redujo la fagocitosis, tanto en machos como en hembras. Sin embargo, el estradiol no la modificó en el caso de los machos y en el de las hembras se produjo una reducción de la fagocitosis, aunque no tan acusada como con la tibolona. Esta reducción de la fagocitosis con la tibolona y el estradiol, puede ser debida a la activación de receptores de estrógenos, ya que se ha descrito que son capaces de disminuir la fagocitosis cuando las células están en un estado reactivo o proinflamatorio, como se ha visto en modelos *in vitro* de hipoxia [170] o en microglía activada con LPS [48]. Aun así, hay que tener en cuenta que la fagocitosis de restos celulares, que sería lo más similar a lo que ocurre en un modelo de lesión debido a la muerte neuronal, y la fagocitosis de partículas bacterianas como la *E. coli*, tienen mecanismos diferentes. En el caso de la fagocitosis de restos celulares, las células apoptóticas envían señales específicas que promueven que la microglía las encuentre y las fagocite, como ocurre con la fractalquina, el ATP, las lisofosfatidilcolinas y la esfingosina-1-fosfato [167]. En cambio en el caso de partículas bacterianas, éstas expresan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que van a ser reconocidos en su mayoría por los receptores Toll-like o por el receptor de manosas, Dectina-1 y el cúmulo de diferenciación 204 (CD204) [171]. Por lo tanto aunque la activación de receptores de estrógenos mejora la recaptura de, por ejemplo, proteínas A $\beta$  [172, 173], en el caso de la fagocitosis bacteriana entrarían en juego las propiedades antiinflamatorias que tienen los estrógenos, pudiendo así reducir la respuesta fagocítica al hacer que las células de microglía pasen de un estado reactivo a uno en reposo [174-176]. En este sentido y teniendo en cuenta que, tal y como hemos mencionado anteriormente, la microglía en cultivo podría tener un estado de activación basal más elevado que la microglía *in vivo* en estado de reposo, la acción de

la tibolona y el estradiol sobre la fagocitosis de estas células podría estar relacionada con la disminución que ejercen estos esteroides sobre la gliosis reactiva tras una lesión cerebral, demostrada para el estradiol en estudios previos y para la tibolona en el presente trabajo [95, 96, 128].

Para explorar a través de qué tipo de receptor podría la tibolona disminuir la fagocitosis en la microglía, usamos diferentes antagonistas de receptores de estrógenos a la concentración en la que estudios previos han demostrado sus efectos [177]. Observamos que solamente el MPP, antagonista del ER $\alpha$ , fue capaz de bloquear el efecto de la tibolona sobre la fagocitosis y únicamente en la microglía hembra. En modelos *in vitro* de células BV-2, se ha descrito que la función antiinflamatoria de la tibolona y el estradiol se ejerce a través del receptor  $\beta$  [52, 80]. En nuestro caso utilizamos células primarias, las cuales quizás reflejen mejor la situación *in vivo*, en donde se ha observado que la función antiinflamatoria del estradiol se ejerce principalmente a través del receptor ER $\alpha$  [178]. Pero además, observamos que los antagonistas de los ERs en las células macho y el antagonista del GPER en las células hembra potencian el efecto de la tibolona. Por otra parte, los antagonistas del ER $\alpha$  y del ER $\beta$  disminuyeron por sí solos la fagocitosis en la microglía de las hembras, pero no en la microglía de los machos. Estos resultados sugieren que los ERs ejercen una compleja regulación basal de la fagocitosis en la microglía y que su acción basal y su interacción con la tibolona es diferente en machos y en hembras.

También el receptor de andrógenos parece implicado en la regulación de la fagocitosis en la microglía, ya que su inhibición con la flutamida disminuyó por sí misma la fagocitosis basal en las células de los machos e inhibió el efecto de la tibolona en las células hembra. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el receptor de andrógenos no interviene en la reducción de la fagocitosis por la tibolona en las células macho, aunque posiblemente sí en las células hembras. Además, nuestros resultados también sugieren que en los machos el receptor de andrógenos estaría implicado en el mantenimiento de la actividad basal de fagocitosis por la microglía. Está descrito que las células de microglía, en situaciones de gliosis, expresan receptores de andrógenos [123], pero no hay estudios previos que relacionen a los andrógenos y la capacidad

fagocítica microglial, aunque se ha descrito que la testosterona puede disminuir la capacidad fagocítica de macrófagos en las doradas [179].

Otra función básica de la microglía que quisimos estudiar es la migración, ya que es conocido que ante un evento inflamatorio se produce una migración de las células microgliales hacia el foco de la lesión [180]. En nuestro modelo, observamos que no existen diferencias sexuales en la capacidad de migración y que la tibolona no modifica esta función. Aunque no se ha descrito si el estradiol es capaz de modificar la capacidad migratoria de la microglía, sí se ha visto que el estradiol reduce la expresión del receptor transmembrana CD36 en células humanas de cáncer de mama [181] por lo que podría también estar afectando a la proteína CD36 de la microglía, siendo ésta una proteína importante para que se produzca la migración [182]. Aun así, no hemos detectado que la tibolona sea capaz de modificar la expresión de ARNm de CD36, como tampoco la de ningún gen relacionado con migración y fagocitosis, ni en machos ni hembras. Solo encontramos una diferencia sexual en IRAK4, siendo mayor la expresión en hembras, como ocurre con IRAK1 en neonatos [183] o en la expresión de receptores Toll-like (TLR)-7 cuya expresión es mayor en hembras y que está relacionado con la expresión de IRAK4 [184-186]. IRAK4 es un mediador esencial en la transducción de la señal inflamatoria procedente de los TLR, por lo que sus niveles de expresión pueden indicar el nivel inflamatorio celular [187]. En este caso, las hembras están más reactivas que los machos y podría ser una explicación de por qué fagocitan más basalmente y por qué la disminución de la fagocitosis usando tibolona o estradiol es más acusada en las hembras en comparación con los machos.

Al igual que la microglía, los astrocitos juegan un papel muy importante en el inicio de la neuroinflamación, aumentando y extendiendo la reactividad glial a otras zonas del cerebro a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias [188]. Además, los astrocitos van a ser esenciales en la lesión cerebral ya que van a crear la cicatriz glial. Cuanto más dure esta reactividad en el SNC mayor será la cicatriz que formen, en la cual, la alta concentración de proteoglicanos liberados por los astrocitos, va a hacer que se inhiba la regeneración axonal [24, 189]. Por lo tanto, aunque esta reactividad es necesaria para mantener la homeostasis del tejido cerebral, en ocasiones es preciso controlarla para que no se vuelva perjudicial. Por este motivo, es

importante que estudiemos el posible efecto antiinflamatorio de la tibolona sobre los astrocitos ya que este efecto podría estar relacionado con la acción del esteroide disminuyendo el número de astrocitos y aumentando la supervivencia neuronal en torno a la zona dañada en el modelo de lesión cerebral [95].

Como se ha discutido anteriormente, la tibolona no aumenta de manera basal la concentración de citoquinas proinflamatorias en el medio de astrocitos. Además, en el caso de estas células gliales, aparte de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP-1 y RANTES, estudiamos IL-10 e IL-6 mediante la técnica de Luminex. Podemos observar que al contrario de lo que ocurría con la microglía, los cultivos de astrocitos respondieron a un estímulo proinflamatorio aumentando la liberación de citoquinas al medio, sugiriendo que no estaban activadas en condiciones basales, lo cual es beneficioso para poder estudiar las propiedades antiinflamatorias de la tibolona. El estímulo proinflamatorio usado en este caso fue el LPS, que es un lipopolisacárido extraído de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Es un estímulo proinflamatorio clásico y ha sido descrito en numerosas ocasiones que activa receptores TLR-4 favoreciendo así la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo [190-193]. Además, también se ha descrito que el LPS aumenta la reactividad astrocitaria haciendo que se liberen citoquinas pro- y antiinflamatorias al medio [194-196]. Así, de acuerdo con estos antecedentes, en nuestro estudio los astrocitos de ambos sexos aumentaron de manera significativa la liberación de citoquinas al medio de cultivo tras el tratamiento con LPS.

En contra de lo esperado, observamos que la tibolona tuvo un efecto limitado sobre la liberación de citoquinas al medio en los astrocitos tratados con LPS. Así, la tibolona solamente tuvo efecto significativo sobre los niveles de TNF $\alpha$  y de IL-10 en hembras. Además, la citoquina IL-10 tiene efectos antiinflamatorios, aunque su liberación está condicionada por los niveles inflamatorios de la célula ya que su función es contrarrestar la inflamación excesiva, por lo que una bajada de la concentración también podría considerarse como que el estado inflamatorio celular general es menor [197]. En todo caso, podemos concluir que la tibolona tiene efectos antiinflamatorios muy limitados en los astrocitos expuestos a LPS y restringidos a las células hembra.

Además de modular la inflamación, los astrocitos reclutan células de microglía hacia la zona dañada para que puedan fagocitar restos de mielina, lo que ayuda a la remielinización neuronal, poniendo de manifiesto su importancia en enfermedades como la esclerosis múltiple [198]. Además, mediante la liberación de TGF- $\beta$ , los astrocitos son capaces de aumentar la expresión de C1q en las neuronas para que la microglía lleve a cabo la remodelación neuronal a través de su receptor CR3 [22, 199]. Pero de manera más directa, se sabe que, tanto en desarrollo como en la edad adulta, los astrocitos están continuamente remodelando las sinapsis neuronales con su propia actividad fagocítica, ya que se encuentran en una posición privilegiada junto a las neuronas, controlando continuamente la actividad neuronal [21, 22, 200, 201]. Aunque siempre se ha considerado a los astrocitos como células fagocíticas no profesionales, se ha descrito en numerosas ocasiones su importancia llevando a cabo esa función en el SNC. Por ejemplo, se ha visto una relación entre la fagocitosis de astrocitos y la apolipoproteína E, por lo que esta función podría ser relevante en la enfermedad de Alzheimer [202]. También se ha descrito que pueden fagocitar mielina en modelos *in vitro* y que esta fagocitosis está incrementada en modelos de privación de sueño aguda [203, 204]. Por lo tanto, la función fagocítica de los astrocitos resulta esencial tanto en procesos fisiológicos como en procesos patológicos, como podría ser una lesión cerebral donde se produce un aumento de la muerte celular, y su modulación puede ser clave en la resolución del daño. Por este motivo decidimos estudiar si la tibolona es capaz de modular la fagocitosis astrocitaria.

El análisis de genes relacionados con fagocitosis, tales como MEGF10, MerTK, ABCA1 y GULP1 [21, 205], demostró que los astrocitos en cultivo expresan la maquinaria molecular necesaria para esta función, con una diferencia sexual en la expresión del gen MEGF10 que es menor en las células hembra. Para comprobar que era posible estudiar la fagocitosis en los cultivos de astrocitos primarios, usamos detritos celulares conjugados con Cy3, marcador que puede observarse en el microscopio de fluorescencia sin necesidad de realizar técnicas inmunocitoquímicas. Se realizaron microfotografías usando un microscopio confocal y se observó que efectivamente la marca de Cy3 se encontraba en el interior celular. Una vez comprobado esto, realizamos el análisis cuantitativo en imágenes obtenidas en un

microscopio de fluorescencia, midiendo la intensidad de la marca de Cy3 en los astrocitos. Los resultados muestran que a pesar de la diferencia sexual en la expresión del gen MEGF10, los astrocitos de ambos sexos tienen una actividad fagocítica basal similar, al contrario de lo que ocurre en la microglía o en el sistema inmune periférico, donde las hembras presentan mayores niveles de fagocitosis en comparación con los machos [90, 168, 169]. Además, la tibolona aumentó la fagocitosis tanto en machos como en hembras, aunque el aumento fue mayor en hembras en comparación a los machos. Por lo tanto se puede deducir que la tibolona tiene efectos profagocíticos en los astrocitos de ambos sexos, aunque más en hembras. Ya ha sido descrito que los estrógenos son capaces de aumentar la capacidad fagocítica tanto de microglía como de macrófagos por lo que la tibolona podría estar ejerciendo este mismo efecto en astrocitos a través de los receptores de estrógeno [206-208].

Aunque la tibolona incrementó la fagocitosis en los astrocitos de ambos sexos, este efecto fue mayor en los astrocitos de hembras. A la edad en la que hemos llevado a cabo los experimentos los niveles de estradiol y testosterona entre machos y hembras son similares [209], sin embargo la distribución y la expresión de receptores de estrógenos es diferente entre ambos sexos, lo que podría ser la causa de esta diferencia que observamos en la actividad fagocítica al aplicar un esteroide exógeno con actividad estrogénica, como es la tibolona [210-214].

Teniendo en cuenta que la tibolona tiene efectos profagocíticos en los astrocitos que podrían deberse a la activación de ERs, decidimos estudiar si el efecto del fármaco estaba mediado por algún receptor de estrógenos específico, y para ello usamos antagonistas de estos receptores. En los astrocitos macho ninguno de los antagonistas por separado tuvo un efecto significativo sobre la actividad fagocítica de la tibolona, lo que sugiere que la acción del esteroide o bien requiere la activación combinada de varios receptores o no está mediada por los ERs. En cambio, en los astrocitos hembra el PHTPP, antagonista del receptor ER $\beta$ , bloqueó la acción de la tibolona sobre la fagocitosis de los astrocitos. Por lo tanto, la tibolona podría estar ejerciendo su acción sobre la fagocitosis de los astrocitos hembra a través de este receptor.

Nuestros resultados por otro lado indican que los ERs, por sí solos, no son capaces de explicar la acción de la tibolona. En primer lugar, mientras que la tibolona aumentó la fagocitosis en los astrocitos de ambos sexos, el estradiol exógeno disminuyó la fagocitosis en los astrocitos macho. Esto indica que otros receptores intervienen en la acción de la tibolona. Por ello estudiamos el efecto de la flutamida, un antagonista del receptor de andrógenos. En los astrocitos macho la flutamida no tuvo ningún efecto significativo sobre la fagocitosis, pero en los astrocitos hembra, la flutamida bloqueó el efecto de la tibolona, indicando que en los astrocitos de este sexo la tibolona requiere tanto del ER $\beta$  como del receptor de andrógenos para regular la fagocitosis. Tampoco hay que olvidar que además de actuar sobre los ERs y el receptor de andrógenos, los metabolitos de la tibolona pueden activar los receptores de progesterona, los cuales también se expresan en los astrocitos. Estos receptores no han sido estudiados en esta tesis debido a la complejidad que conlleva su inhibición al ser muy numerosos y con diferentes estructuras moleculares y a su compleja interacción con los ERs [215, 216], pero sin duda los receptores de progesterona podrían contribuir a las acciones de la tibolona sobre los astrocitos.

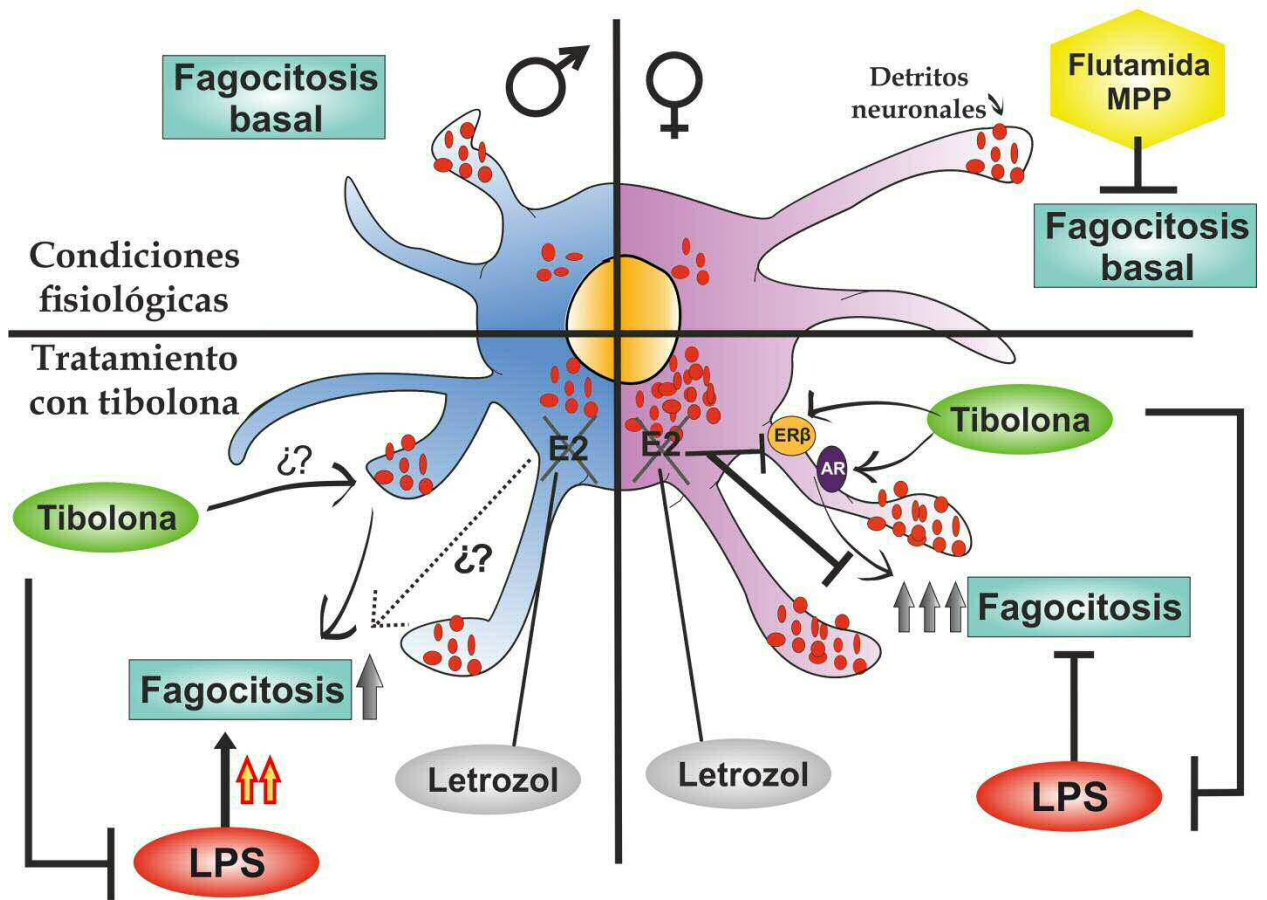
Es interesante señalar además que el MPP y la flutamida, por sí solos, redujeron la fagocitosis en los astrocitos hembra, sugiriendo la implicación del ER $\alpha$  y el receptor de andrógenos en la actividad fagocítica basal. Este efecto del MPP y la flutamida sobre la fagocitosis basal en los astrocitos hembra sugiere que los niveles endógenos de estradiol y testosterona producidos por los astrocitos en cultivo podrían estar regulando la fagocitosis. Hay que tener en cuenta que los astrocitos disponen de la maquinaria para sintetizar esteroides, incluida la testosterona, a partir del colesterol [217, 218]. La producción de estradiol a partir de testosterona está mediada por la enzima aromatasa, cuya actividad es mayor en los astrocitos hembra [219]. Para explorar el posible papel de la testosterona y el estradiol endógenos en la regulación de la fagocitosis, los astrocitos fueron incubados con letrozol, un inhibidor de la aromatasa. El letrozol por sí solo aumentó la fagocitosis en los astrocitos de ambos sexos, sugiriendo que el estradiol endógeno podría inhibir la fagocitosis. No obstante, hay que tener en cuenta que al inhibir la aromatasa no solo se disminuye la formación de estradiol, sino que se produce una acumulación de testosterona [220], por lo que



los resultados también podrían sugerir que la testosterona endógena aumenta la fagocitosis. Sin embargo, el letrozol no modificó la acción del estradiol exógeno sobre la fagocitosis en ninguno de los dos sexos, lo cual sugiere que la acción del letrozol sobre la fagocitosis podría estar en su mayor parte mediada por la disminución de los niveles endógenos de estradiol y no por el aumento de los niveles de testosterona. En todo caso, es evidente que la acción de la testosterona o el estradiol endógenos en la regulación de la fagocitosis basal puede interferir con el efecto de la tibolona. De hecho, el letrozol potenció la acción profagocítica de la tibolona en los astrocitos macho y la inhibió en los astrocitos hembra. Esto indica que la interacción de la tibolona con los niveles endógenos de esteroides en los astrocitos para regular la fagocitosis es diferente en cada sexo.

Por último, quisimos estudiar qué efecto tenía la tibolona sobre la fagocitosis de los astrocitos activados por LPS, lo que sería una situación similar a lo ocurre en un modelo de lesión cerebral debido al aumento en la reactividad astrocitaria. Sorprendentemente, el LPS tuvo un efecto opuesto sobre la fagocitosis en los astrocitos de cada sexo, aumentándola en los astrocitos macho y disminuyéndola en los astrocitos hembra. Estudios previos han mostrado la existencia de respuestas diferentes en la expresión génica de los astrocitos macho y hembra expuestos al LPS [221]. Nuestros resultados extienden estas diferencias en la respuesta al LPS a una actividad funcional de estas células, como es la fagocitosis, que puede estar implicada en la respuesta al daño cerebral y puede contribuir a las diferencias sexuales observadas en la manifestación patológica de las enfermedades neurodegenerativas, incluida la lesión traumática cerebral [222-227]. Por otra parte, la tibolona inhibió el efecto del LPS en los astrocitos de ambos sexos, disminuyendo la fagocitosis en las células macho expuestas a LPS y aumentándola en las células hembra. Esto sugiere que la tibolona ejerce un efecto homeostático sobre la fagocitosis, aumentándola o disminuyéndola para contrarrestar el efecto del estímulo proinflamatorio, en función de cada sexo.

# ASTROCITOS



**Figura 50. Diferencias sexuales en la actividad fagocítica de los astrocitos y su regulación por tibolona.**

En condiciones fisiológicas los astrocitos macho y hembra tienen un nivel de actividad fagocítica similar. En el caso de las hembras, además, los antagonistas MPP y flutamida son capaces de inhibir la fagocitosis. Tras el tratamiento con tibolona, los astrocitos de ambos sexos aumentan su fagocitosis siendo ésta mayor en hembras. En los astrocitos hembra la tibolona va a activar tanto receptores ERβ como de AR, ejerciendo así efectos profagocíticos. En hembras, al bloquear la síntesis endógena de estradiol con letrozol se va a inhibir el efecto profagocítico de la tibolona. En los astrocitos macho no se ha identificado el receptor a través del cual es capaz de aumentar la capacidad fagocítica y además al administrar letrozol la tibolona es capaz de seguir ejerciendo sus efectos. Tras la administración de LPS, los astrocitos macho aumentan su capacidad fagocítica, mientras que los astrocitos hembra la disminuyen. En ambos sexos la tibolona es capaz de anular el efecto del LPS.



## CONCLUSIONES

1. La tibolona reduce el número de células GFAP+ y de células Iba1+ con fenotipo reactivo a los 7 días después de una lesión penetrante cortical en ratones.
2. La tibolona disminuye la muerte neuronal en la proximidad de la herida.
3. La microglía y los astrocitos primarios expresan las enzimas que convierten la tibolona en sus metabolitos activos.
4. La tibolona modula la fagocitosis de la microglía sin afectar su capacidad migratoria.
5. La tibolona ejerce efectos antiinflamatorios en astrocitos hembra activados con LPS.
6. La tibolona aumenta la fagocitosis en los astrocitos de ambos sexos.
7. La tibolona modula la fagocitosis en los astrocitos hembra a través del receptor de andrógenos y el receptor  $\beta$  de estrógenos.
8. El LPS tiene un efecto opuesto sobre la actividad fagocítica de los astrocitos macho y hembra y su efecto es inhibido por la tibolona.

Por todo ello podemos concluir que la tibolona presenta un posible potencial terapéutico para reducir la gliosis en procesos inflamatorios, actuando directamente sobre la microglía y los astrocitos. Además, modula funciones básicas, como la fagocitosis, que pueden participar en la protección neuronal.



## CONCLUSIONS

1. Tibolone reduces GFAP+ and reactive Iba1+ cell number by 7 days after a stab wound cortical injury in mice.
2. Tibolone decreases neuronal death on the edge of the wound.
3. Primary rat microglia and astrocytes express the enzymes that convert tibolone into its active metabolites.
4. Tibolone modulates microglia phagocytosis without affecting its migratory activity.
5. Tibolone exerts anti-inflammatory effects on LPS-activated female astrocytes.
6. Tibolone increases phagocytosis in astrocytes of both sexes.
7. Tibolone modulates phagocytosis in female astrocytes through androgen receptor and estrogen receptor  $\beta$ .
8. LPS exerts opposite effects on the phagocytic activity in male and female astrocytes and tibolone is able to avoid its effect.

Hence, we can conclude that tibolone has therapeutic potential to reduce reactive gliosis in inflammatory processes, acting directly on astrocytes and microglia. In addition, it modulates basic glial cell functions, such as phagocytosis, that could participate in neuronal protection.



---

# REFERENCIAS

---





## REFERENCIAS

1. Louveau, A., T.H. Harris, and J. Kipnis, *Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege*. Trends Immunol, 2015. 36(10): p. 569-577.
2. Price, L., C. Wilson, and G. Grant, *Blood-Brain Barrier Pathophysiology following Traumatic Brain Injury*, in *Translational Research in Traumatic Brain Injury*, D. Laskowitz and G. Grant, Editors. 2016: Boca Raton (FL).
3. Zhang, C., et al., *Invasion of Peripheral Immune Cells into Brain Parenchyma after Cardiac Arrest and Resuscitation*. Aging Dis, 2018. 9(3): p. 412-425.
4. Hong, H., B.S. Kim, and H.I. Im, *Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders*. Int Neurourol J, 2016. 20(Suppl 1): p. S2-7.
5. Lyman, M., et al., *Neuroinflammation: the role and consequences*. Neurosci Res, 2014. 79: p. 1-12.
6. Lenz, K.M. and M.M. McCarthy, *A starring role for microglia in brain sex differences*. Neuroscientist, 2015. 21(3): p. 306-21.
7. Wolf, S.A., H.W. Boddeke, and H. Kettenmann, *Microglia in Physiology and Disease*. Annu Rev Physiol, 2017. 79: p. 619-643.
8. Paolicelli, R.C., et al., *Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development*. Science, 2011. 333(6048): p. 1456-8.
9. Neniskyte, U. and C.T. Gross, *Errant gardeners: glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders*. Nat Rev Neurosci, 2017. 18(11): p. 658-670.
10. Hanisch, U.K. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci, 2007. 10(11): p. 1387-94.
11. Paolicelli, R.C., K. Bisht, and M.E. Tremblay, *Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior*. Front Cell Neurosci, 2014. 8: p. 129.
12. Kettenmann, H., et al., *Physiology of microglia*. Physiol Rev, 2011. 91(2): p. 461-553.

13. Davalos, D., et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. *Nat Neurosci*, 2005. 8(6): p. 752-8.
14. Hatori, K., et al., *Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells*. *J Neurosci Res*, 2002. 69(3): p. 418-26.
15. Yeh, F.L., D.V. Hansen, and M. Sheng, *TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases*. *Trends Mol Med*, 2017. 23(6): p. 512-533.
16. Suarez-Calvet, M., et al., *sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers*. *EMBO Mol Med*, 2016. 8(5): p. 466-76.
17. Bass, N.H., et al., *Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex*. *J Comp Neurol*, 1971. 143(4): p. 481-90.
18. Gengatharan, A., R.R. Bammann, and A. Saghatelyan, *The Role of Astrocytes in the Generation, Migration, and Integration of New Neurons in the Adult Olfactory Bulb*. *Front Neurosci*, 2016. 10: p. 149.
19. Alvarez-Buylla, A., J.M. Garcia-Verdugo, and A.D. Tramontin, *A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. 2(4): p. 287-93.
20. Sun, W., et al., *Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain*. *Science*, 2013. 339(6116): p. 197-200.
21. Chung, W.S., et al., *Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways*. *Nature*, 2013. 504(7480): p. 394-400.
22. Jung, Y.J. and W.S. Chung, *Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains*. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018. 26(4): p. 350-357.
23. Alvarez, J.I., T. Katayama, and A. Prat, *Glial influence on the blood brain barrier*. *Glia*, 2013. 61(12): p. 1939-58.
24. Sofroniew, M.V., *Astrogliosis*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. 7(2): p. a020420.
25. Orr, M.B. and J.C. Gensel, *Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses*. *Neurotherapeutics*, 2018. 15(3): p. 541-553.
26. Burda, J.E. and M.V. Sofroniew, *Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease*. *Neuron*, 2014. 81(2): p. 229-48.

27. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. 32(12): p. 638-47.
28. Adams, K.L. and V. Gallo, *The diversity and disparity of the glial scar*. Nat Neurosci, 2018. 21(1): p. 9-15.
29. Cekanaviciute, E., et al., *Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice*. Glia, 2014. 62(8): p. 1227-40.
30. Li, S., X. Gu, and S. Yi, *The Regulatory Effects of Transforming Growth Factor-beta on Nerve Regeneration*. Cell Transplant, 2017. 26(3): p. 381-394.
31. Schachtrup, C., et al., *Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage*. J Neurosci, 2010. 30(17): p. 5843-54.
32. Diniz, L.P., et al., *Astrocyte Transforming Growth Factor Beta 1 Protects Synapses against A-beta Oligomers in Alzheimer's Disease Model*. J Neurosci, 2017. 37(28): p. 6797-6809.
33. Younger, D., et al., *Microglia Receptors in Animal Models of Traumatic Brain Injury*. Mol Neurobiol, 2018.
34. Arevalo, M.A., et al., *Selective oestrogen receptor modulators decrease the inflammatory response of glial cells*. J Neuroendocrinol, 2012. 24(1): p. 183-90.
35. Arevalo, M.A., I. Azcoitia, and L.M. Garcia-Segura, *The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors*. Nat Rev Neurosci, 2015. 16(1): p. 17-29.
36. Rosenfeld, C.S., D.A. Shay, and V.J. Vieira-Potter, *Cognitive Effects of Aromatase and Possible Role in Memory Disorders*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. 9: p. 610.
37. Garcia-Segura, L.M., et al., *Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair*. Neuroscience, 1999. 89(2): p. 567-78.
38. Jia, M., K. Dahlman-Wright, and J.A. Gustafsson, *Estrogen receptor alpha and beta in health and disease*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015. 29(4): p. 557-68.
39. Barros, R.P. and J.A. Gustafsson, *Estrogen receptors and the metabolic network*. Cell Metab, 2011. 14(3): p. 289-99.

40. Saczko, J., et al., *Estrogen Receptors in Cell Membranes: Regulation and Signaling*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2017. 227: p. 93-105.
41. Crider, A. and A. Pillai, *Estrogen Signaling as a Therapeutic Target in Neurodevelopmental Disorders*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017. 360(1): p. 48-58.
42. Kelly, M.J. and E.R. Levin, *Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors*. *Trends Endocrinol Metab*, 2001. 12(4): p. 152-6.
43. Acaz-Fonseca, E., et al., *Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions*. *Prog Neurobiol*, 2016. 144: p. 5-26.
44. Spence, R.D., et al., *Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ERalpha signaling on astrocytes but not through ERbeta signaling on astrocytes or neurons*. *J Neurosci*, 2013. 33(26): p. 10924-33.
45. Ghisletti, S., et al., *17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization*. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(8): p. 2957-68.
46. Duenas, M., et al., *Gonadal hormone regulation of insulin-like growth factor-I-like immunoreactivity in hypothalamic astroglia of developing and adult rats*. *Neuroendocrinology*, 1994. 59(6): p. 528-38.
47. Lee, E., et al., *GPR30 regulates glutamate transporter GLT-1 expression in rat primary astrocytes*. *J Biol Chem*, 2012. 287(32): p. 26817-28.
48. Bruce-Keller, A.J., et al., *Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation*. *Endocrinology*, 2000. 141(10): p. 3646-56.
49. Sierra, A., et al., *Steroid hormone receptor expression and function in microglia*. *Glia*, 2008. 56(6): p. 659-74.
50. Wu, W.F., et al., *Targeting estrogen receptor beta in microglia and T cells to treat experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(9): p. 3543-8.
51. Murphy, A.J., P.M. Guyre, and P.A. Pioli, *Estradiol suppresses NF-kappa B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages*. *J Immunol*, 2010. 184(9): p. 5029-37.

52. Baker, A.E., V.M. Brautigam, and J.J. Watters, *Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta*. *Endocrinology*, 2004. 145(11): p. 5021-32.
53. Zhao, T.Z., et al., *GPER expressed on microglia mediates the anti-inflammatory effect of estradiol in ischemic stroke*. *Brain Behav*, 2016. 6(4): p. e00449.
54. Vegeto, E., V. Benedusi, and A. Maggi, *Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases*. *Front Neuroendocrinol*, 2008. 29(4): p. 507-19.
55. Chuffa, L.G., et al., *The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers*. *Steroids*, 2017. 118: p. 93-108.
56. Smith, C.L. and B.W. O'Malley, *Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators*. *Endocr Rev*, 2004. 25(1): p. 45-71.
57. Tapia-Gonzalez, S., et al., *Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs*. *J Endocrinol*, 2008. 198(1): p. 219-30.
58. Cerciati, M., et al., *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*, 2010. 58(1): p. 93-102.
59. Barreto, G.E., M. Santos-Galindo, and L.M. Garcia-Segura, *Selective estrogen receptor modulators regulate reactive microglia after penetrating brain injury*. *Front Aging Neurosci*, 2014. 6: p. 132.
60. Li, R., et al., *Raloxifene suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis and NF-kappaB-dependent CCL20 expression in reactive astrocytes*. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e94320.
61. Mosquera, L., et al., *Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha*. *Brain Res*, 2014. 1561: p. 11-22.
62. Ishihara, Y., et al., *Selective estrogen-receptor modulators suppress microglial activation and neuronal cell death via an estrogen receptor-dependent pathway*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015. 145: p. 85-93.

63. Jordan, V.C., *Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(1): p. 46-53.
64. Reed, M.J. and H.J. Kloosterboer, *Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR)*. Maturitas, 2004. 48 Suppl 1: p. S4-6.
65. Kloosterboer, H.J., *Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. 76(1-5): p. 231-8.
66. Kloosterboer, H.J., *Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone*. Maturitas, 2004. 48 Suppl 1: p. S30-40.
67. Behl, C., et al., *Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship*. Mol Pharmacol, 1997. 51(4): p. 535-41.
68. Verheul, H.A. and H.J. Kloosterboer, *Metabolism of exogenous sex steroids and effect on brain functions with a focus on tibolone*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006. 102(1-5): p. 195-204.
69. Pinto-Almazan, R., et al., *Effects of Tibolone on the Central Nervous System: Clinical and Experimental Approaches*. Biomed Res Int, 2017. 2017: p. 8630764.
70. Beltran-Campos, V., et al., *Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus*. Neurologia, 2015. 30(7): p. 401-6.
71. Qiu, J., et al., *Tibolone rapidly attenuates the GABAB response in hypothalamic neurones*. J Neuroendocrinol, 2008. 20(12): p. 1310-8.
72. Genazzani, A.R., et al., *Effect of tibolone administration on central and peripheral levels of allopregnanolone and beta-endorphin in female rats*. Menopause, 2006. 13(1): p. 57-64.
73. Gibbs, R.B., et al., *Effects of long-term hormone replacement and of tibolone on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the brains of ovariectomized, cynomolgus monkeys*. Neuroscience, 2002. 113(4): p. 907-14.
74. Pinto-Almazan, R., et al., *Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat*. J Neurosci Res, 2012. 90(4): p. 878-86.
75. Aguiar, R.B., et al., *Estradiol valerate and tibolone: effects on memory*. Pharmacol Biochem Behav, 2006. 85(4): p. 689-96.

76. Farfan-Garcia, E.D., et al., *Tibolone prevents oxidation and ameliorates cholinergic deficit induced by ozone exposure in the male rat hippocampus*. *Neurochem Res*, 2014. 39(9): p. 1776-86.
77. Vergouwen, M.D., R.E. Anderson, and F.B. Meyer, *Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia*. *Brain Res*, 2000. 878(1-2): p. 88-97.
78. Avila Rodriguez, M., et al., *Tibolone protects T98G cells from glucose deprivation*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014. 144 Pt B: p. 294-303.
79. Avila-Rodriguez, M., et al., *Tibolone protects astrocytic cells from glucose deprivation through a mechanism involving estrogen receptor beta and the upregulation of neuroglobin expression*. *Mol Cell Endocrinol*, 2016. 433: p. 35-46.
80. Hidalgo-Lanussa, O., et al., *Tibolone Reduces Oxidative Damage and Inflammation in Microglia Stimulated with Palmitic Acid through Mechanisms Involving Estrogen Receptor Beta*. *Mol Neurobiol*, 2018. 55(7): p. 5462-5477.
81. Prendergast, B.J., K.G. Onishi, and I. Zucker, *Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014. 40: p. 1-5.
82. Beery, A.K. and I. Zucker, *Sex bias in neuroscience and biomedical research*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011. 35(3): p. 565-72.
83. Clayton, J.A. and F.S. Collins, *Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies*. *Nature*, 2014. 509(7500): p. 282-3.
84. Franconi, F., et al., *Gender differences in drug responses*. *Pharmacol Res*, 2007. 55(2): p. 81-95.
85. Sorge, R.E. and S.K. Totsch, *Sex Differences in Pain*. *J Neurosci Res*, 2017. 95(6): p. 1271-1281.
86. Becker, J.B. and G.F. Koob, *Sex Differences in Animal Models: Focus on Addiction*. *Pharmacol Rev*, 2016. 68(2): p. 242-63.
87. Golden, L.C. and R. Voskuhl, *The importance of studying sex differences in disease: The example of multiple sclerosis*. *J Neurosci Res*, 2017. 95(1-2): p. 633-643.



88. Du, L., et al., *Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway*. J Biol Chem, 2004. 279(37): p. 38563-70.
89. Ruiz-Palmero, I., et al., *Oestradiol synthesized by female neurons generates sex differences in neurogenesis*. Sci Rep, 2016. 6: p. 31891.
90. Yanguas-Casas, N., et al., *Sex differences in the phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid*. Glia, 2018. 66(3): p. 522-537.
91. Franconi, F., et al., *Human cells involved in atherosclerosis have a sex*. Int J Cardiol, 2017. 228: p. 983-1001.
92. Mecha, M., M, L., Hernangómez, M., Borrell, J., & Guaza, C., *An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach*. Protocol Exchange, 2011. 218.
93. Greer, J.B., M.C. Schmale, and L.A. Fieber, *Whole-transcriptome changes in gene expression accompany aging of sensory neurons in Aplysia californica*. BMC Genomics, 2018. 19(1): p. 529.
94. Pfaffl, M.W., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnol Lett, 2004. 26(6): p. 509-15.
95. Garcia-Estrada, J., et al., *Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury*. Brain Res, 1993. 628(1-2): p. 271-8.
96. Lopez Rodriguez, A.B., et al., *Estradiol decreases cortical reactive astrogliosis after brain injury by a mechanism involving cannabinoid receptors*. Cereb Cortex, 2011. 21(9): p. 2046-55.
97. Miyake, T., et al., *Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex*. Brain Res, 1988. 451(1-2): p. 133-8.
98. Hozumi, I., D.A. Aquino, and W.T. Norton, *GFAP mRNA levels following stab wounds in rat brain*. Brain Res, 1990. 534(1-2): p. 291-4.
99. Fernaud-Espinosa, I., M. Nieto-Sampedro, and P. Bovolenta, *Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue*. Glia, 1993. 8(4): p. 277-91.

100. Hampton, D.W., et al., *The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain*. Neuroscience, 2004. 127(4): p. 813-20.
101. Potter, K.A., et al., *Stab injury and device implantation within the brain results in inversely multiphasic neuroinflammatory and neurodegenerative responses*. J Neural Eng, 2012. 9(4): p. 046020.
102. Goc, J., et al., *A spatiotemporal study of gliosis in relation to depth electrode tracks in drug-resistant epilepsy*. Eur J Neurosci, 2014. 39(12): p. 2151-62.
103. Michell-Robinson, M.A., et al., *Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair*. Brain, 2015. 138(Pt 5): p. 1138-59.
104. Burda, J.E., A.M. Bernstein, and M.V. Sofroniew, *Astrocyte roles in traumatic brain injury*. Exp Neurol, 2016. 275 Pt 3: p. 305-315.
105. Perry, V.H. and C. Holmes, *Microglial priming in neurodegenerative disease*. Nat Rev Neurol, 2014. 10(4): p. 217-24.
106. von Bernhardt, R., L. Eugenin-von Bernhardt, and J. Eugenin, *Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration*. Front Aging Neurosci, 2015. 7: p. 124.
107. Pekny, M., et al., *Astrocytes: a central element in neurological diseases*. Acta Neuropathol, 2016. 131(3): p. 323-45.
108. Villapol, S., K.R. Byrnes, and A.J. Symes, *Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury*. Front Neurol, 2014. 5: p. 82.
109. Gonzalez-Giraldo, Y., et al., *Tibolone Preserves Mitochondrial Functionality and Cell Morphology in Astrocytic Cells Treated with Palmitic Acid*. Mol Neurobiol, 2018. 55(5): p. 4453-4462.
110. Barreto, G., et al., *Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured brain: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones*. Endocrinology, 2009. 150(11): p. 5010-5.
111. Kawano, H., et al., *Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system*. Cell Tissue Res, 2012. 349(1): p. 169-80.

112. Mathewson, A.J. and M. Berry, *Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats*. Brain Res, 1985. 327(1-2): p. 61-9.
113. Turtzo, L.C., et al., *Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat*. J Neuroinflammation, 2014. 11: p. 82.
114. Verheul, H.A., et al., *Levels of tibolone and estradiol and their nonsulfated and sulfated metabolites in serum, myometrium, and vagina of postmenopausal women following treatment for 21 days with tibolone, estradiol, or estradiol plus medroxyprogesterone acetate*. Reprod Sci, 2007. 14(2): p. 160-8.
115. Lee, S.W., et al., *Microglial Inflammasome Activation in Penetrating Ballistic-Like Brain Injury*. J Neurotrauma, 2018. 35(14): p. 1681-1693.
116. Ma, J., et al., *Propofol Inhibits NLRP3 Inflammasome and Attenuates Blast-Induced Traumatic Brain Injury in Rats*. Inflammation, 2016. 39(6): p. 2094-2103.
117. Signoretti, S., et al., *Assessment of mitochondrial impairment in traumatic brain injury using high-resolution proton magnetic resonance spectroscopy*. J Neurosurg, 2008. 108(1): p. 42-52.
118. Cornelius, C., et al., *Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection*. Antioxid Redox Signal, 2013. 19(8): p. 836-53.
119. Simoncini, T. and A.R. Genazzani, *Tibolone inhibits leukocyte adhesion molecule expression in human endothelial cells*. Mol Cell Endocrinol, 2000. 162(1-2): p. 87-94.
120. Simoncini, T., et al., *Tibolone activates nitric oxide synthesis in human endothelial cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(9): p. 4594-600.
121. Guzman, C.B., et al., *Agonist activity of the 3-hydroxy metabolites of tibolone through the oestrogen receptor in the mouse N20.1 oligodendrocyte cell line and normal human astrocytes*. J Neuroendocrinol, 2007. 19(12): p. 958-65.
122. Blurton-Jones, M. and M.H. Tuszynski, *Reactive astrocytes express estrogen receptors in the injured primate brain*. J Comp Neurol, 2001. 433(1): p. 115-23.
123. Garcia-Ovejero, D., et al., *Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury*. J Comp Neurol, 2002. 450(3): p. 256-71.
124. Habib, P. and C. Beyer, *Regulation of brain microglia by female gonadal steroids*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015. 146: p. 3-14.

125. Kuo, J., et al., *Membrane estrogen receptors stimulate intracellular calcium release and progesterone synthesis in hypothalamic astrocytes*. J Neurosci, 2010. 30(39): p. 12950-7.
126. Finley, S.K. and M.F. Kritzer, *Immunoreactivity for intracellular androgen receptors in identified subpopulations of neurons, astrocytes and oligodendrocytes in primate prefrontal cortex*. J Neurobiol, 1999. 40(4): p. 446-57.
127. DonCarlos, L.L., et al., *Novel cellular phenotypes and subcellular sites for androgen action in the forebrain*. Neuroscience, 2006. 138(3): p. 801-7.
128. Arevalo, M.A., et al., *Gonadal hormones and the control of reactive gliosis*. Horm Behav, 2013. 63(2): p. 216-21.
129. Lei, B., et al., *Anti-inflammatory effects of progesterone in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia*. PLoS One, 2014. 9(7): p. e103969.
130. Escande, A., et al., *Regulation of activities of steroid hormone receptors by tibolone and its primary metabolites*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. 116(1-2): p. 8-14.
131. Gatson, J.W., et al., *Estrogen treatment following severe burn injury reduces brain inflammation and apoptotic signaling*. J Neuroinflammation, 2009. 6: p. 30.
132. Bao, Y.J., et al., *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, 2011. 48(3): p. 185-94.
133. Li, L.Z., Y.J. Bao, and M. Zhao, *17beta-estradiol attenuates programmed cell death in cortical pericontusional zone following traumatic brain injury via upregulation of ERalpha and inhibition of caspase-3 activation*. Neurochem Int, 2011. 58(1): p. 126-33.
134. Sohrabji, F., *Estrogen-IGF-1 interactions in neuroprotection: ischemic stroke as a case study*. Front Neuroendocrinol, 2015. 36: p. 1-14.
135. Sohrabji, F. and S. Bake, *Age-related changes in neuroprotection: is estrogen pro-inflammatory for the reproductive senescent brain?* Endocrine, 2006. 29(2): p. 191-7.

136. Barreto, G., et al., *Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone*. Eur J Neurosci, 2007. 25(10): p. 3039-46.
137. Webster, K.M., et al., *Progesterone treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress and brain damage and improves long-term outcomes in a rat model of repeated mild traumatic brain injury*. J Neuroinflammation, 2015. 12: p. 238.
138. Djebaili, M., et al., *The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats*. J Neurotrauma, 2005. 22(1): p. 106-18.
139. Irwin, R.W., et al., *Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria*. Endocrinology, 2008. 149(6): p. 3167-75.
140. Balls, M., et al., *The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM Workshop 11*. Altern Lab Anim, 1995. 23(6): p. 838-66.
141. Steckelbroeck, S., et al., *Tibolone is metabolized by the 3alpha/3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four human isozymes of the aldo-keto reductase 1C subfamily: inversion of stereospecificity with a delta5(10)-3-ketosteroid*. Mol Pharmacol, 2004. 66(6): p. 1702-11.
142. Giatti, S., et al., *Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation*. J Mol Endocrinol, 2012. 49(3): p. R125-34.
143. Jellinck, P.H., et al., *Selective conversion by microglia of dehydroepiandrosterone to 5-androstenediol-A steroid with inherent estrogenic properties*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. 107(3-5): p. 156-62.
144. Gottfried-Blackmore, A., et al., *Brain microglia express steroid-converting enzymes in the mouse*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. 109(1-2): p. 96-107.
145. Jellinck, P.H., et al., *Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in the brain: identification by liquid chromatography/mass spectrometry of the delta-4-isomer of DHEA and related steroids formed from androstenedione by mouse BV2 microglia*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006. 98(1): p. 41-7.

146. Lam, D., S. Lively, and L.C. Schlichter, *Responses of rat and mouse primary microglia to pro- and anti-inflammatory stimuli: molecular profiles, K(+) channels and migration*. J Neuroinflammation, 2017. 14(1): p. 166.
147. Tsai, M.J. and E.H. Lee, *Characterization of L-DOPA transport in cultured rat and mouse astrocytes*. J Neurosci Res, 1996. 43(4): p. 490-5.
148. Tsai, M.J. and E.H. Lee, *Differences in the disposition and toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in cultured rat and mouse astrocytes*. Glia, 1994. 12(4): p. 329-35.
149. Brown, G.C., *Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase*. Biochem Soc Trans, 2007. 35(Pt 5): p. 1119-21.
150. Sasaki, H., et al., *Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. 11(1): p. 106-10.
151. Kawanokuchi, J., et al., *Production of interferon-gamma by microglia*. Mult Scler, 2006. 12(5): p. 558-64.
152. Masters, S.L., et al., *Regulation of interleukin-1beta by interferon-gamma is species specific, limited by suppressor of cytokine signalling 1 and influences interleukin-17 production*. EMBO Rep, 2010. 11(8): p. 640-6.
153. De Boer, M.L., et al., *IFN-gamma inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta in primary murine macrophages via a Stat1-dependent pathway*. J Interferon Cytokine Res, 2001. 21(7): p. 485-94.
154. Celada, A. and R.A. Maki, *IFN-gamma induces the expression of the genes for MHC class II I-A beta and tumor necrosis factor through a protein kinase C-independent pathway*. J Immunol, 1991. 146(1): p. 114-20.
155. Colotta, F., et al., *Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes*. J Immunol, 1992. 148(3): p. 760-5.
156. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. 29(6): p. 313-26.
157. Rauch, I., M. Muller, and T. Decker, *The regulation of inflammation by interferons and their STATs*. JAKSTAT, 2013. 2(1): p. e23820.
158. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. 13: p. 453-61.

159. Lin, A.A., et al., *Gamma interferon signaling in macrophage lineage cells regulates central nervous system inflammation and chemokine production.* J Virol, 2009. 83(17): p. 8604-15.
160. Gstraunthaler, G., *Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture.* ALTEX, 2003. 20(4): p. 275-81.
161. Han, J., R.A. Harris, and X.M. Zhang, *An updated assessment of microglia depletion: current concepts and future directions.* Mol Brain, 2017. 10(1): p. 25.
162. Ulland, T.K., et al., *TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease.* Cell, 2017. 170(4): p. 649-663 e13.
163. Tahara, K., et al., *Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance.* Brain, 2006. 129(Pt 11): p. 3006-19.
164. Park, J.Y., et al., *Microglial phagocytosis is enhanced by monomeric alpha-synuclein, not aggregated alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease.* Glia, 2008. 56(11): p. 1215-23.
165. Voet, S., M. Prinz, and G. van Loo, *Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology.* Trends Mol Med, 2019. 25(2): p. 112-123.
166. David, S. and A. Kroner, *Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury.* Nat Rev Neurosci, 2011. 12(7): p. 388-99.
167. Arandjelovic, S. and K.S. Ravichandran, *Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis.* Nat Immunol, 2015. 16(9): p. 907-17.
168. Nelson, L.H., S. Warden, and K.M. Lenz, *Sex differences in microglial phagocytosis in the neonatal hippocampus.* Brain Behav Immun, 2017. 64: p. 11-22.
169. Klein, S.L. and K.L. Flanagan, *Sex differences in immune responses.* Nat Rev Immunol, 2016. 16(10): p. 626-38.
170. Habib, P., et al., *Regulation of hypoxia-induced inflammatory responses and M1-M2 phenotype switch of primary rat microglia by sex steroids.* J Mol Neurosci, 2014. 52(2): p. 277-85.
171. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, *The cell biology of phagocytosis.* Annu Rev Pathol, 2012. 7: p. 61-98.



172. Harris-White, M.E., et al., *Estrogen (E2) and glucocorticoid (Gc) effects on microglia and A beta clearance in vitro and in vivo*. *Neurochem Int*, 2001. 39(5-6): p. 435-48.
173. Li, R., et al., *Estrogen enhances uptake of amyloid beta-protein by microglia derived from the human cortex*. *J Neurochem*, 2000. 75(4): p. 1447-54.
174. Thakkar, R., et al., *17beta-Estradiol Regulates Microglia Activation and Polarization in the Hippocampus Following Global Cerebral Ischemia*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. 2018: p. 4248526.
175. Vegeto, E., et al., *Estrogen blocks inducible nitric oxide synthase accumulation in LPS-activated microglia cells*. *Exp Gerontol*, 2000. 35(9-10): p. 1309-16.
176. Vegeto, E., et al., *Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia*. *J Neurosci*, 2001. 21(6): p. 1809-18.
177. Grassi, D., et al., *Estradiol and testosterone regulate arginine-vasopressin expression in SH-SY5Y human female neuroblastoma cells through estrogen receptors-alpha and -beta*. *Endocrinology*, 2013. 154(6): p. 2092-100.
178. Vegeto, E., et al., *Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(16): p. 9614-9.
179. Aguila, S., et al., *Specific and non-overlapping functions of testosterone and 11-ketotestosterone in the regulation of professional phagocyte responses in the teleost fish gilthead seabream*. *Mol Immunol*, 2013. 53(3): p. 218-26.
180. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. *Science*, 2005. 308(5726): p. 1314-8.
181. Uray, I.P., Y. Liang, and S.M. Hyder, *Estradiol down-regulates CD36 expression in human breast cancer cells*. *Cancer Lett*, 2004. 207(1): p. 101-7.
182. Stuart, L.M., et al., *CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex*. *J Biol Chem*, 2007. 282(37): p. 27392-401.
183. O'Driscoll, D.N., et al., *Expression of X-linked Toll-like receptor 4 signaling genes in female vs. male neonates*. *Pediatr Res*, 2017. 81(5): p. 831-837.



184. Cushing, L., et al., *IRAK4 kinase activity controls Toll-like receptor-induced inflammation through the transcription factor IRF5 in primary human monocytes*. J Biol Chem, 2017. 292(45): p. 18689-18698.
185. Berghofer, B., et al., *TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females*. J Immunol, 2006. 177(4): p. 2088-96.
186. Meier, A., et al., *Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1*. Nat Med, 2009. 15(8): p. 955-9.
187. Suzuki, N., S. Suzuki, and W.C. Yeh, *IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity*. Trends Immunol, 2002. 23(10): p. 503-6.
188. Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl, *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity*. Trends Immunol, 2007. 28(3): p. 138-45.
189. Yu, P., et al., *An in vitro model of reactive astrogliosis and its effect on neuronal growth*. Methods Mol Biol, 2012. 814: p. 327-40.
190. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. 71: p. 635-700.
191. Chow, J.C., et al., *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. J Biol Chem, 1999. 274(16): p. 10689-92.
192. Park, B.S. and J.O. Lee, *Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes*. Exp Mol Med, 2013. 45: p. e66.
193. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *The Toll receptor family and microbial recognition*. Trends Microbiol, 2000. 8(10): p. 452-6.
194. Tarassishin, L., H.S. Suh, and S.C. Lee, *LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14*. Glia, 2014. 62(6): p. 999-1013.
195. Ma, D., et al., *The neurotoxic effect of astrocytes activated with toll-like receptor ligands*. J Neuroimmunol, 2013. 254(1-2): p. 10-8.
196. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. 119(1): p. 7-35.
197. Lobo-Silva, D., et al., *Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation*. J Neuroinflammation, 2016. 13(1): p. 297.
198. Skripuletz, T., et al., *Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination*. Brain, 2013. 136(Pt 1): p. 147-67.

199. Bialas, A.R. and B. Stevens, *TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement*. Nat Neurosci, 2013. 16(12): p. 1773-82.
200. Tasdemir-Yilmaz, O.E. and M.R. Freeman, *Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons*. Genes Dev, 2014. 28(1): p. 20-33.
201. Nguyen, J.V., et al., *Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(3): p. 1176-81.
202. Chung, W.S., et al., *Novel allele-dependent role for APOE in controlling the rate of synapse pruning by astrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. 113(36): p. 10186-91.
203. Vinoses, S.A. and M.M. Herman, *Phagocytosis of myelin by astrocytes in explants of adult rabbit cerebral white matter maintained on Gelfoam matrix*. J Neuroimmunol, 1993. 43(1-2): p. 169-76.
204. Bellesi, M., et al., *Sleep Loss Promotes Astrocytic Phagocytosis and Microglial Activation in Mouse Cerebral Cortex*. J Neurosci, 2017. 37(21): p. 5263-5273.
205. Morizawa, Y.M., et al., *Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway*. Nat Commun, 2017. 8(1): p. 28.
206. Yu, W., et al., *Estrogen promotes Leydig cell engulfment by macrophages in male infertility*. J Clin Invest, 2014. 124(6): p. 2709-21.
207. Villa, A., et al., *Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells*. Sci Rep, 2015. 5: p. 15224.
208. Vohra, S., McArthur, S., Solito, E., Gillies, G., *ERβ and GPR30 mediate distinct and opposite oestrogenic influences on microglial phagocytosis of apoptotic neuronal cells*. Society for Endocrinology, British Endocrine Society Annual Conference, Endocrine Abstracts, Harrogate, 2012: p. OC 2.4.
209. Konkle, A.T. and M.M. McCarthy, *Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain*. Endocrinology, 2011. 152(1): p. 223-35.

210. Zhang, J.Q., et al., *Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats*. Brain Res, 2002. 935(1-2): p. 73-80.
211. Orikasa, C., et al., *Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(5): p. 3306-11.
212. Kuhnemann, S., et al., *Sex differences in the development of estrogen receptors in the rat brain*. Horm Behav, 1994. 28(4): p. 483-91.
213. Rainbow, T.C., B. Parsons, and B.S. McEwen, *Sex differences in rat brain oestrogen and progestin receptors*. Nature, 1982. 300(5893): p. 648-9.
214. Caruso, D., et al., *Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats*. Psychoneuroendocrinology, 2013. 38(10): p. 2278-90.
215. Mohammed, H., et al., *Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer*. Nature, 2015. 523(7560): p. 313-7.
216. Rowan, B.G. and B.W. O'Malley, *Progesterone receptor coactivators*. Steroids, 2000. 65(10-11): p. 545-9.
217. Zwain, I.H. and S.S. Yen, *Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain*. Endocrinology, 1999. 140(8): p. 3843-52.
218. Emanuelsson, I., et al., *Expression and regulation of CYP17A1 and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cells of the nervous system: Potential effects of vitamin D on brain steroidogenesis*. Neurochem Int, 2018. 113: p. 46-55.
219. Liu, M., et al., *Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. 27(1): p. 135-41.
220. Raven, G., et al., *In men, peripheral estradiol levels directly reflect the action of estrogens at the hypothalamo-pituitary level to inhibit gonadotropin secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(9): p. 3324-8.
221. Santos-Galindo, M., et al., *Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide*. Biol Sex Differ, 2011. 2: p. 7.

222. Ciesielska, A., et al., *The impact of age and gender on the striatal astrocytes activation in murine model of Parkinson's disease*. *Inflamm Res*, 2009. 58(11): p. 747-53.
223. Azad, N.A., M. Al Bugami, and I. Loy-English, *Gender differences in dementia risk factors*. *Gend Med*, 2007. 4(2): p. 120-9.
224. Figueira, M.L. and S. Ouakinin, *Gender-related endocrinological dysfunction and mental disorders*. *Curr Opin Psychiatry*, 2010. 23(4): p. 369-72.
225. Jobin, C., et al., *Gender issues in multiple sclerosis: an update*. *Womens Health (Lond)*, 2010. 6(6): p. 797-820.
226. Voskuhl, R., *Sex differences in autoimmune diseases*. *Biol Sex Differ*, 2011. 2(1): p. 1.
227. Kim, S., et al., *Gender differences in risk factors for transition from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: A CREDOS study*. *Compr Psychiatry*, 2015. 62: p. 114-22.



---

# ANEXO 1

---

**Artículo original: *The Synthetic Steroid Tibolone Decreases Reactive Gliosis and Neuronal Death in the Cerebral Cortex of Females After a Stab Wound Injury***





# The Synthetic Steroid Tibolone Decreases Reactive Gliosis and Neuronal Death in the Cerebral Cortex of Female Mice After a Stab Wound Injury

Andrea Crespo-Castrillo<sup>1</sup> · Natalia Yanguas-Casás<sup>1,2</sup> · Maria Angeles Arevalo<sup>1,2</sup> · Iñigo Azcoitia<sup>2,3</sup> · George E. Barreto<sup>4</sup> · Luis M. Garcia-Segura<sup>1,2</sup> 

Received: 22 December 2017 / Accepted: 15 March 2018 / Published online: 26 March 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Previous studies have shown that estradiol reduces reactive gliosis after a stab wound injury in the cerebral cortex. Since the therapeutic use of estradiol is limited by its peripheral hormonal effects, it is of interest to determine whether synthetic estrogenic compounds with tissue-specific actions regulate reactive gliosis. Tibolone is a synthetic steroid that is widely used for the treatment of climacteric symptoms and/or the prevention of osteoporosis. In this study, we have assessed the effect of tibolone on reactive gliosis in the cerebral cortex after a stab wound brain injury in ovariectomized adult female mice. By 7 days after brain injury, tibolone reduced the number of glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive astrocytes, the number of ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) immunoreactive microglia, and the number of microglial cells with a reactive phenotype in comparison to vehicle-injected animals. These effects on gliosis were associated with a reduction in neuronal loss in the proximity to the wound, suggesting that tibolone exerts beneficial homeostatic actions in the cerebral cortex after an acute brain injury.

**Keywords** Astrocytes · Microglia · Neuroinflammation · Neuroprotection · Steroid receptors · Brain trauma

## Introduction

Different hormonal signals contribute to maintain the homeostasis of brain tissue. Among these, estradiol exerts a variety of regulatory functions on neurons and glial cells and has neuroprotective properties [1–4]. In acute brain lesions, estradiol reduces tissue damage and neurological deficits [5, 6]. The mechanisms involved in the neuroprotective actions of estradiol include the regulation of reactive gliosis [7–11] and

the decrease in the inflammatory activity of astrocytes and microglia [12–14].

The therapeutic use of estradiol as a neuroprotectant is limited by its peripheral hormonal actions. Therefore, several studies have tested the neuroprotective potency of different estrogenic compounds that imitate the protective actions of estradiol but do not exert undesirable peripheral actions, such as increasing the risk of breast, endometrial and ovarian cancer [15]. These include selective estrogen receptor modulators (SERMs), which exert agonistic, antagonistic or neutral effects on estrogen receptors (ERs) depending on the tissue [16]. Previous studies have shown that some SERMs exert neuroprotective actions and regulate reactive gliosis and neuroinflammation [17–23]. An interesting characteristic of some SERMs, such as tamoxifen and raloxifene, is that in addition to exert neuroprotective actions, they act as ER antagonists in ER-positive breast cancers [24], which are one of the risks of estrogen therapy in postmenopausal women.

Estrogen therapy, alone or in combination with progestins, is an effective treatment to alleviate hot flushes and to prevent osteoporosis in postmenopausal women. However, the increased risk of breast and endometrial cancer associated with estrogen therapy promoted the investigation of new alternatives for the treatment of postmenopausal symptoms. This resulted in the introduction of tibolone, a synthetic steroid

✉ George E. Barreto  
gsampaio@javeriana.edu.co

✉ Luis M. Garcia-Segura  
lmgsc@cajal.csic.es

<sup>1</sup> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto Cajal, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>4</sup> Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia



classified as a selective tissue estrogenic activity modulator (STEAM) [25–27]. Tibolone is structurally different from estradiol and SERMs. For instance, it lacks the aromatic A ring of estradiol and the aromatic rings of SERMs. In particular, the hydroxyl group in the C3 position of the A ring, which is not present in tibolone, seems to confer antioxidant properties to the estradiol molecule [28].

Like SERMs, tibolone exerts tissue-specific actions, but by different mechanisms. Indeed, the tissue selectivity of tibolone depends on its tissue-specific local transformation to active metabolites that can exert estrogenic, progestogenic, and androgenic activities. Thus, tibolone is converted to its estrogenic metabolites 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxytibolone by the enzymes 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, respectively. Furthermore, tibolone is converted by the enzyme 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase to its  $\Delta$ 4-isomer, which activates androgen and progesterone receptors [27, 29]. Moreover, tibolone does not have estrogenic actions on ER-positive cancers and is now widely used for the treatment of climacteric symptoms and/or the prevention of osteoporosis [30].

Although tibolone is one of the main drugs used for the treatment of postmenopausal symptoms, there is limited information on its effects in the brain. Nevertheless, it is known that tibolone has effects on the nervous system, since it reverses the loss of dendritic spines caused by ovariectomy in rat CA1 hippocampal pyramidal cells [31]. The steroid has also rapid effects in the activity of pro-opiomelanocortin (POMC) hypothalamic neurons, acting on membrane estrogen receptors [32]. In agreement with this direct effect of tibolone on POMC neurons, the steroid increases  $\beta$ -endorphin levels in different brain regions of ovariectomized rats [33]. Furthermore, tibolone decreases the activity of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the medial septum/diagonal band of Broca of ovariectomized monkeys [34], suggesting a modulation of cholinergic neurons. It has also been shown that tibolone decreases the hyperphosphorylation of the neuronal protein Tau in the hippocampus and cerebellum [35]. In addition, tibolone reduces anxiety, at least in young female rats [36]. It has also been shown that tibolone reduces oxidative stress and ameliorates cholinergic deficits in the hippocampus of male rats exposed to ozone [37]. Neuroprotective actions of tibolone after an acute brain injury have also been reported. Thus, a high (200  $\mu$ g) subcutaneous dose of tibolone has been shown to reduce infarct volume in ovariectomized female rats exposed to focal cerebral ischemia [38].

Regulation of reactive gliosis and neuroinflammation may represent a therapeutic approach for the treatment of neurodegenerative diseases. The possible actions of tibolone on gliosis are unknown. Studies on glial cells *in vitro* have revealed that tibolone reduces oxidative damage [39] and exerts anti-

inflammatory actions by decreasing NF- $\kappa$ B activation [40, 41]. These findings suggest that tibolone may exert anti-inflammatory actions and reduce gliosis in the injured brain *in vivo*. To test this hypothesis, we have assessed the effect of tibolone on the number of astrocytes and microglia after a penetrating cortical injury.

## Materials and Methods

### Animals

Experiments were performed in 90-day-old C57bL6 female mice (Harlan, Spain). Animals were housed with controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C), 12-h light/dark cycle and with food and water *ad libitum*. Animal care and procedures were approved by our institutional animal use and care committee and by the Comunidad de Madrid (PROEX 134/17) and followed the European Parliament and Council Directive (2010/63/EU) and the Spanish regulation (Ley 6/2013, 11th June) on the protection of animals for experimental use.

### Cortical Injury and Experimental Treatments

At 90 days of age, animals were bilaterally ovariectomized under isoflurane anesthesia. We have used in this study ovariectomized mice since ovariectomy is a model for human menopause, the main condition in which tibolone is used in clinical practice. Brain lesions were performed 4 days after ovariectomy. Previous studies have shown that in rodents, estradiol levels in plasma are already reduced by 3 days after ovariectomy to the low values detected 1 month after surgery (to less than 50 pg/ml in rats) [42]. For brain lesions, animals were anesthetized once more with isoflurane and placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments). An incision with the scalp was made, and the cranium was exposed. Then, a unilateral opening of the skull was made with a dental drill. Stab wound lesions were generated with a needle by making a sagittal cut through the neocortex and corpus callosum of the left hemisphere, 1 mm lateral from the midline and extending from  $-1.0$  to  $-3.0$  mm posterior from bregma. Coordinates were determined according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Franklin [43].

Animals received one subcutaneous injection of tibolone (Sigma-Aldrich, T0827; 0.04 mg/kg) or vehicle (corn oil) immediately after brain injury, a second injection 24 h later and a third injection 48 h later. Tibolone was administered during the period of glial activation. This protocol of administration was selected because it was previously used to determine the antigliotic effects of estradiol and SERMs in ovariectomized rodents [20, 44]. The dose of tibolone was selected on the basis of previous studies in animal models *in vivo* [30] and on the posology used in clinical practice (2.5 mg/day).



## Tissue Fixation and Immunohistochemistry

At 3, 7, and 14 days after brain surgery, animals were deeply anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg body weight) and perfused through the left cardiac ventricle, first with pre-warmed (37 °C) 0.9% NaCl and then for 5 min with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4; 37 °C). Brains were post-fixed for 4 h at 4 °C in the same fixative and washed three times with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at room temperature. Coronal sections of the brain, 50 µm thick, were obtained using a Vibratome (VT 1000S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Immunohistochemistry was carried out in free-floating sections under moderate shaking. All washes and incubations were done in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, containing 0.3% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100. The endogenous peroxidase activity was quenched for 10 min at room temperature in a solution of 3% hydrogen peroxide in 30% methanol. After several washes in buffer, sections were incubated overnight at 4 °C with a rabbit antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP; diluted 1:1000; DAKO), a marker of reactive and resting astrocytes, or with a mouse monoclonal antibody against NeuN (diluted 1:1000; Millipore), a marker of neurons. Sections were then rinsed in buffer and incubated for 2 h at room temperature with the corresponding anti-mouse or anti-rabbit biotinylated secondary antibody (diluted 1:300; Pierce). After several washes in buffer, sections were incubated for 90 min at room temperature with avidin-biotin-peroxidase complex (diluted 1:500; ImmunoPure ABC peroxidase staining kit). The reaction product was revealed by incubating the sections with 2 µg/mL 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and 0.01% hydrogen peroxide in 0.1 M phosphate buffer. Then, sections were mounted on gelatinized slides, dehydrated, coverslipped, and examined with a Leica DMRB-E microscope.

For immunofluorescence, free-floating sections were washed in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, containing 0.5% Triton X-100. Then, all washes and incubations were done in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, containing 0.3% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100. After several washes in buffer, sections were incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal antibody for Iba1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1), marker of microglia/macrophages (Wako Chemical Industries, Japan; diluted 1:2000). Sections were then rinsed in buffer and incubated for 2 h at room temperature with a goat anti-rabbit Alexa secondary antibody (diluted 1:1000; 568 nm). Glass coverslip were mounted on slides with Vectashield antifade mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The Z-stack images were visualized on a Leica TCS-SP5 confocal system. 3D images of Iba1+ cells were obtained from stacks of 0.25 µm and the ImageJ program using the 3D viewer plugin (freely available at <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/3d-viewer/>).

## Morphometric Analysis

Morphometric analysis was performed by an investigator that was unaware of the identity of the experimental groups. The number of NeuN+, GFAP+, and Iba1+ cells was assessed in five consecutive rectangles (lateral frames F1-F5) of 200 µm (horizontal side) × 600 µm (vertical side), starting from the lateral wound edge and moving laterally. In addition, for GFAP and Iba1 immunoreactive cells, each lateral rectangle was divided in three dorsoventral sectors (S1–S3) of 200 µm<sup>2</sup> (Fig. 1).

The number of GFAP, Iba1, and NeuN immunoreactive cells was estimated with the optical disector method, using total section thickness for disector height using a ×40 objective [45, 46] and a counting frame of 200 × 200 µm. Section thickness was measured using a digital length gauge device (Heidenhain-Metro MT 12/ND221; Traunreut, Germany) attached to the stage of a Leitz microscope. In addition, the number of Iba1 immunoreactive cells with different morphologies was assessed by immunofluorescence in a confocal microscope (Leica TCS-SP5 confocal system). Iba1+ cells were classified in two morphological phenotypes, according to previous reports [47–51]. Iba1+ cells with enlarged cell body, short and thick cellular processes and/or amoeboid morphology were considered reactive (Figs. 2a, b and 3a, b). Those with ramified morphology with long cellular processes were considered non-reactive (Figs. 2c, d and 3c, d).

## Statistical Analysis

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using SPSS v21.0 software (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Main and interactive effects were analyzed by three-way analysis of variance (ANOVA), with time after lesion, treatment, and distance from the lesion as independent factors. When justified by the ANOVA analysis, differences between individual group means were analyzed by the Bonferroni post hoc test for homoscedastic data, the Games-Howell test for non-homoscedastic data, and the Kruskal-Wallis test for non-parametric data. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ . All the analyses were carried out with an experimental  $N$  of 5–6 animals injected with vehicle and 5–6 animals injected with tibolone for each time after brain injury.

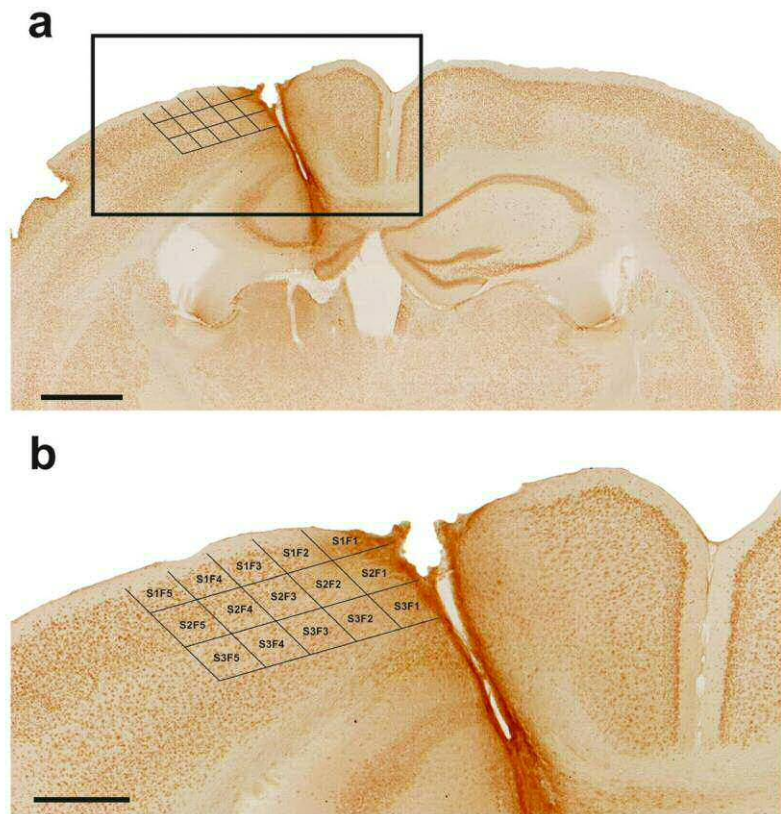
## Results

### Effects of Tibolone on the Number of Astrocytes and Microglia in the Injured Cerebral Cortex

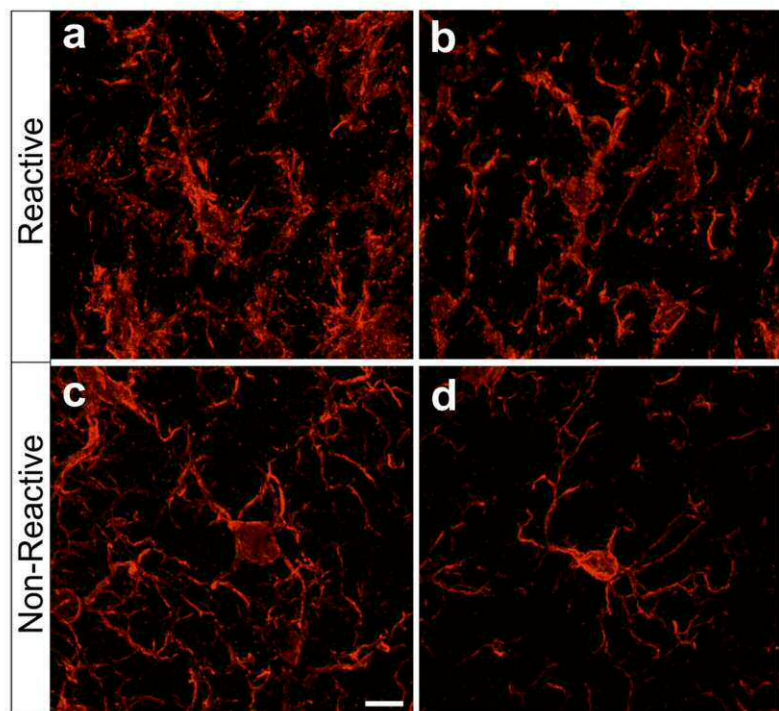
The number of GFAP+ cells and the number of Iba1+ cells was counted at 3 and 7 days after brain injury. Counts were



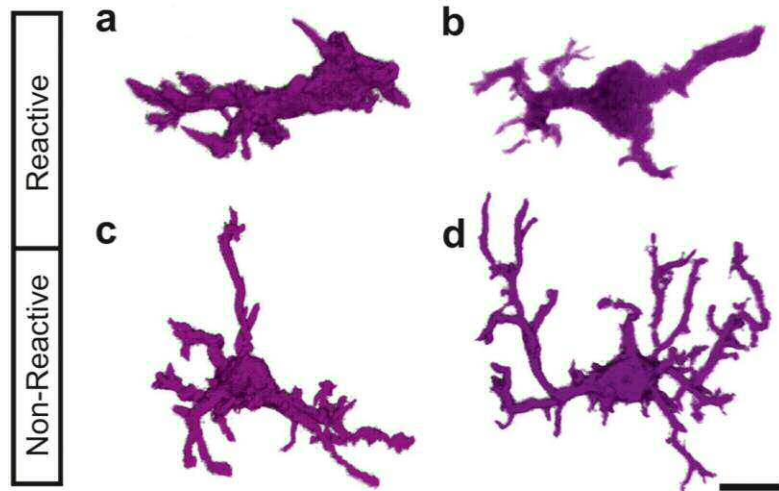
**Fig. 1** Representative histological section of the cerebral cortex at 14 days after a stab wound injury. **a** Panoramic view (reconstructed from microphotographs taken at 10 $\times$ ) of a representative section from a vehicle injected animal which was immunostained for the neuronal marker NeuN. Scale bar, 800  $\mu$ m. The box is shown at higher magnification (approx. 20 $\times$ ) in **b**. **b** Detail of the injured area. Lateral and dorsoventral frames used for the morphometric analysis are shown overlapped to the section. Scale bar, 400  $\mu$ m



**Fig. 2** Examples of Iba-1 immunoreactive cells with reactive and resting morphology. **a, b** Examples of Iba1+ cells with reactive phenotype, with short and thick cellular processes. **c, d** Examples of Iba1+ cells with non-reactive phenotype, with numerous long cellular processes. Scale bar, 7.5  $\mu$ m



**Fig. 3** Three-dimensional reconstructions of microglia cells with reactive and resting morphology. **a, b** Examples of Iba1+ cells with reactive phenotype, with short and thick cellular processes. **c, d** Examples of Iba1+ cells with non-reactive phenotype, with numerous long cellular processes. Scale bar, 7.5  $\mu$ m

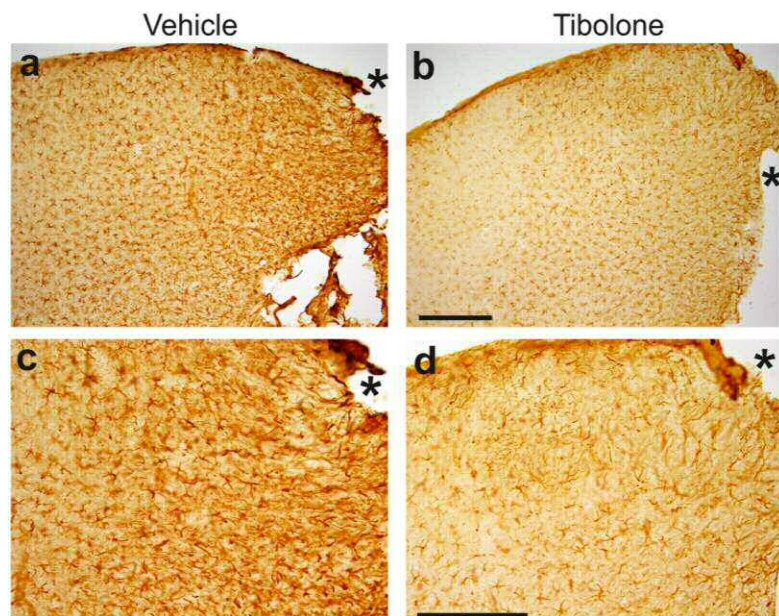


performed in the five lateral zones delimited by frames (F1–F5) and in the three dorsoventral sectors (S1–S3) within each frame. Figure 4 shows representative examples of cortical sections immunostained for GFAP. Figure 5 shows representative examples of cortical sections immunostained for Iba1.

### Astrocytes

Figure 6 shows the number of GFAP+ cells per  $\text{mm}^3$  in the five lateral zones delimited by frames F1–F5 at 3 and 7 days after brain injury in animals treated with vehicle or tibolone. In Fig. 6a, data from the three dorsoventral sectors (S1–S3) were grouped together. Data sorted by dorsoventral sectors are shown in Fig. 6b–d.

**Fig. 4** Representative examples of GFAP immunostained sections of the cerebral cortex 7 days after injury. **a** From a vehicle-injected animal at 10 $\times$ . **b** From a tibolone-injected animal at 10 $\times$ . **c** From a vehicle-injected animal at 20 $\times$ . **d** From a tibolone-injected animal at 20 $\times$ . The asterisk indicates the lesion border. Scale bars, 200  $\mu$ m

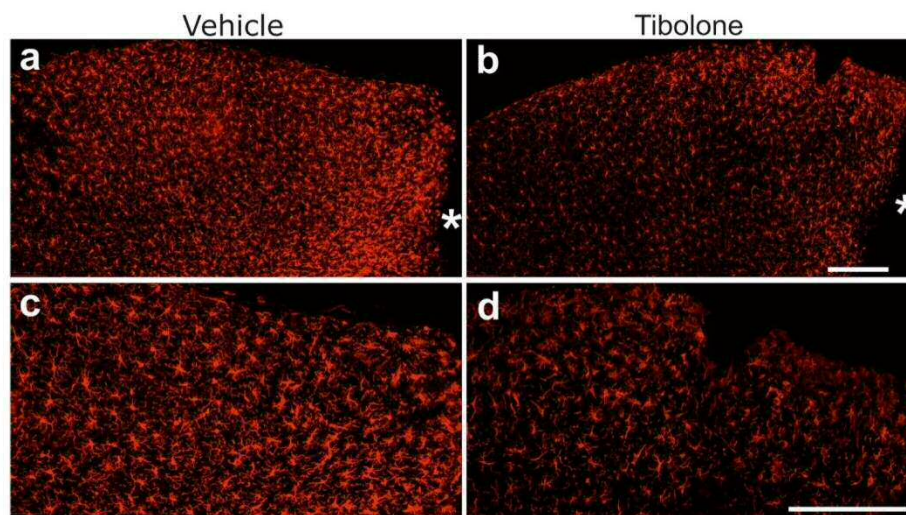


Three-way ANOVA for the number of GFAP+ cells in the five lateral zones (Fig. 6a) revealed significant effects of the treatment, the distance to the lesion, and the time after injury. Furthermore, significant interactions of the treatment with the time after injury and of the distance to the lesion with the time after injury were detected. Results of the ANOVA analysis are shown in the legend of Fig. 6. Similar but not identical results were observed when the number of GFAP+ cells was analyzed separately in each dorsoventral sector (S1–S3; Fig. 6b–d).

As shown in Fig. 6a, a significant decrease in the number of GFAP+ cells was observed in the lateral frames F4 and F5 between 3 and 7 days after brain injury in vehicle-injected animals, when counts from the three dorsoventral sectors were grouped together. The analysis of the data sorted by dorsoventral sectors (Fig. 6b–d) revealed that the decrease in the



**Fig. 5** Representative examples of Iba1 immunostained sections of the cerebral cortex 7 days after injury. **a** From a vehicle-injected animal at 20 $\times$ , **b** From a tibolone-injected animal at 20 $\times$ , **c** From a vehicle-injected animal at 40 $\times$ , **d** From a tibolone-injected animal at 40 $\times$ . The asterisk indicates the lesion border. Scale bars, 200  $\mu$ m



number of GFAP+ cells between 3 and 7 days in the lateral frames F4 and F5 occurred in both S1, S2, and S3.

In tibolone-injected animals, the number of GFAP+ cells dropped down in F2–F5 between 3 and 7 days after brain injury (Fig. 6a). The decrease in F2 was exclusively due to GFAP+ cells located in the third dorsoventral sector, corresponding to a distance between 400 and 600  $\mu$ m from the dorsal cortical surface (Fig. 6b–d).

Compared to vehicle-injected animals, treatment with tibolone resulted in a significant decrease in the number of GFAP+ cells in F1 at 3 days after brain injury (Fig. 6a). This decrease was due to GFAP+ cells located at a distance between 200 and 400  $\mu$ m from the six dorsal cortical surfaces (Fig. 6b–d). Furthermore, tibolone treatment decreased the number of GFAP+ cells in F1–F4 7 days after brain injury, compared to vehicle-injected animals (Fig. 6a). The effect of tibolone in F2 and F3 was detected in the three dorsoventral sectors analyzed, while the effect in F1 and F4 was detected in the upper and middle dorsoventral sectors (S1 and S2; Fig. 6b–d). No significant effect of tibolone was detected in the number of GFAP+ cells in the contralateral hemisphere (data not shown).

### Total Microglia/Macrophages Iba1+ Cells

Three-way ANOVA for the number of Iba1+ cells in the five lateral zones delimited by seven frames F1–F5 (Fig. 7a) revealed significant effects of the treatment, the distance to the lesion, and the time after injury. Furthermore, significant interactions of the treatment with the time after injury and of the distance to the lesion with the time after injury were detected. Similar but not identical results were observed when the number of Iba1+ cells was analyzed separately in the three dorsoventral sectors (S1–S3; Fig. 7b–d). Results of the ANOVA analysis are shown in the legend of Fig. 7.

As shown in Fig. 7a, a significant increase in the number of Iba1+ cells was observed in the lateral frames F1 and F2 between 3 and 7 days after brain injury in vehicle-injected animals. This change was detected in the 3 dorsoventral sectors analyzed of the lateral frames F1 and F2 (Fig. 7b–d). In addition, a significant increase in the number of Iba1+ cells was also detected in the third dorsoventral sector (S3) of the lateral frame F3 (Fig. 7d).

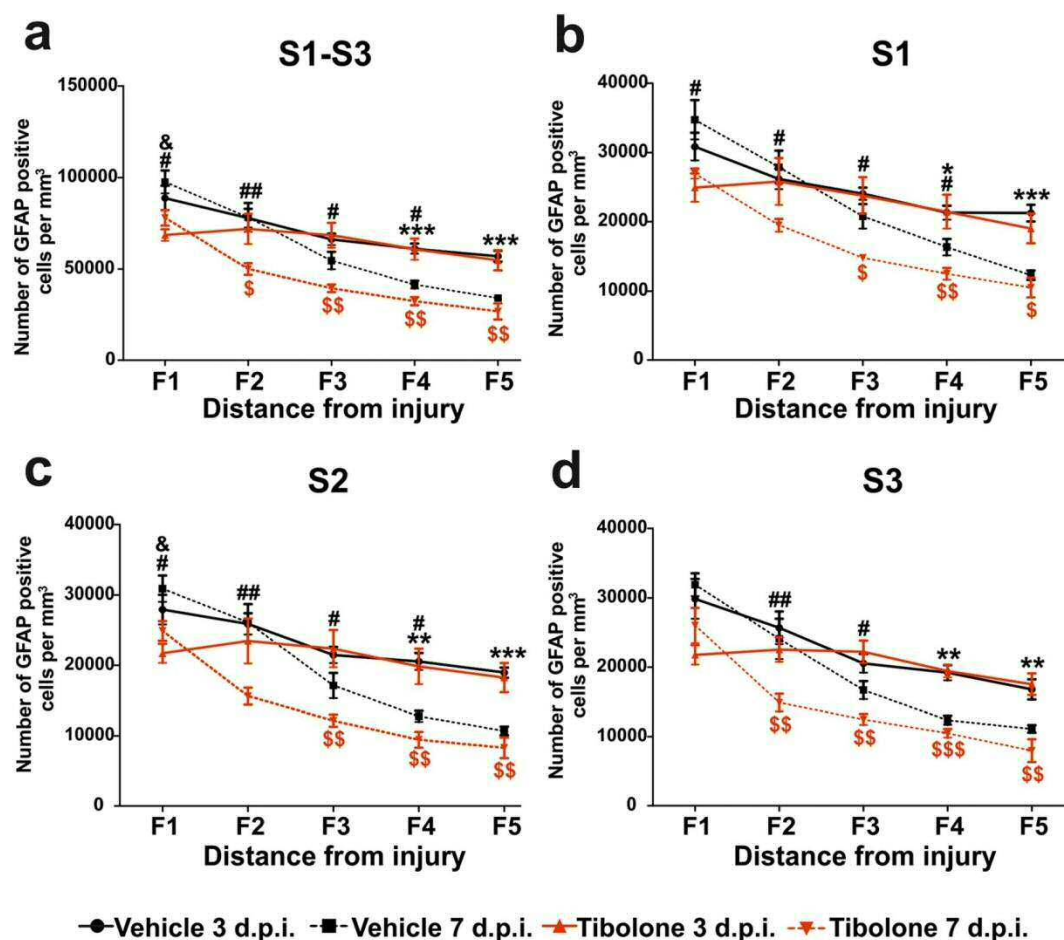
A significant decrease in the number of Iba1+ cells was observed between 3 and 7 days after brain injury in the lateral frames F4 and F5 of tibolone-injected animals (Fig. 7a). In contrast, the number of Iba1+ cells increased between days 3 and 7 after injury in F1 of tibolone-injected animals. This increase was due to Iba1+ cells located in the third dorsoventral sector (Fig. 7d).

Compared to vehicle-injected animals, treatment with tibolone resulted in a significant decrease in the number of Iba1+ cells within the lateral frames F2 and F5 at 7 days after brain injury (Fig. 7a). The effect of tibolone in F2 was due to Iba1+ cells located in the second and third dorsoventral sectors, while the effect in F5 was due to Iba1+ cells located in the upper dorsoventral sector. In addition, differences between tibolone and vehicle values at day 7 after injury were observed in the dorsoventral sector S2 of the lateral frame F1 and the dorsoventral sector S3 of the lateral frame F3 (Fig. 7b–d). No significant effect of tibolone was detected in the number of Iba1+ cells in the contralateral hemisphere (data not shown).

### Microglia with Reactive Phenotype

Iba1+ cells were classified in either reactive or non-reactive (resting) according to their morphology. Three-way ANOVA for the number of Iba1+ cells with reactive



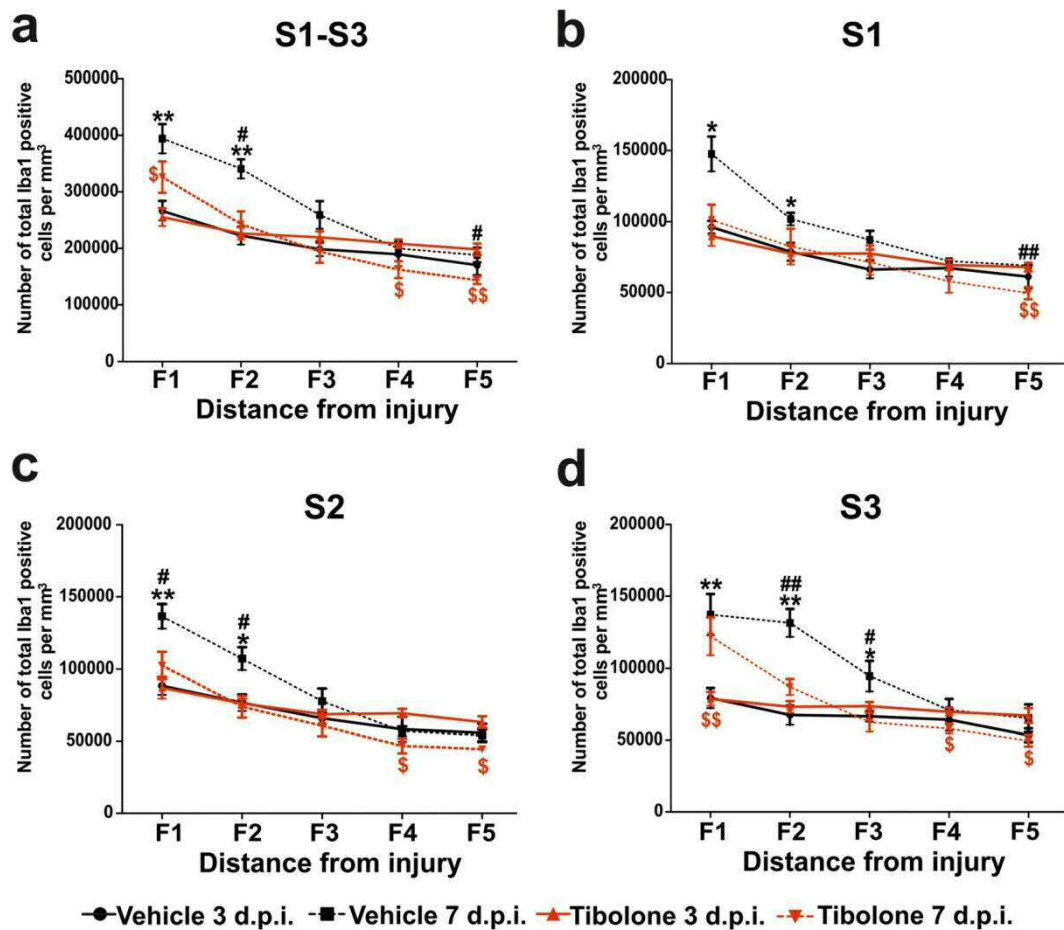


**Fig. 6** Effect of tibolone on the number of GFAP+ astrocytes in the cerebral cortex 3 and 7 days after a stab wound injury. The number of GFAP+ cells was assessed in five consecutive lateral frames (F1–F5) of  $200 \mu\text{m} \times 600 \mu\text{m}$ , starting from the wound edge and in three consecutive dorsoventral sectors (S1–S3) of  $200 \mu\text{m}^2$  starting from the dorsal cortical surface. **a** Number of GFAP+ cells in the five lateral frames when data from the three dorsoventral sectors are grouped together. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 24.012$ ;  $p < 0.001$ ), the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 44.964$ ;  $p < 0.001$ ), and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 43.705$ ;  $p < 0.001$ ). Furthermore, significant interactions of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 5.954$ ;  $p = 0.017$ ) and of the distance to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 8.785$ ;  $p < 0.001$ ) were detected. **b** Number of GFAP+ cells in sector 1 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 20.827$ ;  $p < 0.001$ ), the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 37.328$ ;  $p < 0.001$ ), and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 28.106$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interactions of the distance with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 6.786$ ;  $p < 0.001$ ) and of the treatment to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 5.725$ ;  $p = 0.019$ ) were detected. **c** Number of GFAP+ cell in sector 2 of the five lateral frames. Three-way

ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 21.901$ ;  $p < 0.001$ ), the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 34.373$ ;  $p < 0.001$ ), and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 45.587$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interactions of the distance with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 8.724$ ;  $p < 0.001$ ) and of the treatment to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 5.365$ ;  $p = 0.023$  in S2) were detected. **d** Number of GFAP+ cells in sector 3 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 19.950$ ;  $p < 0.001$ ), the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 45.124$ ;  $p < 0.001$ ), and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 54.809$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interactions of the distance with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 9.058$ ;  $p < 0.001$ ) and of the treatment to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 6.960$ ;  $p = 0.010$ ) were detected. Significant differences with the post hoc test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  between vehicle 3 days and vehicle 7 days. Significant differences  $^{\$}p < 0.05$ ;  $^{\$\$}p < 0.01$ ;  $^{\$ \$ \$}p < 0.001$  between tibolone 3 days and tibolone 7 days. Significant differences  $^{\&}p < 0.05$  between vehicle 3 days and tibolone 3 days. Significant differences  $^{\#}p < 0.05$ ;  $^{\#\#}p < 0.01$  between vehicle 7 days and tibolone 7 days

phenotype in the five lateral zones delimited by frames F1–F5 (Fig. 8a) revealed significant effects of the treatment and the distance to the lesion. Furthermore, significant interactions of the treatment with the time after injury and of the distance to the lesion with the time after injury

were detected. Similar but not identical results were observed when the number of Iba1+ cells was analyzed separately in the three dorsoventral sectors (S1–S3; Fig. 8b–d). Results of the ANOVA analysis are shown in the legend of Fig. 8.



**Fig. 7** Effect of tibolone on the number of Iba1+ microglia in the cerebral cortex 3 and 7 days after a stab wound injury. The number of Iba+ cells was assessed in five consecutive lateral frames (F1–F5) of  $200 \mu\text{m} \times 600 \mu\text{m}$ , starting from the wound edge and in three consecutive dorsoventral sectors (S1–S3) of  $200 \mu\text{m}^2$  starting from the dorsal cortical surface. **a** Number of Iba1+ cells in the five lateral frames when data from the three dorsoventral sectors are grouped together. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 8.397$ ;  $p = 0.005$ ), the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 38.003$ ;  $p < 0.001$ ), and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 6.659$ ;  $p = 0.012$ ). Furthermore, significant interactions of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 26.262$ ;  $p < 0.001$ ) and of the distance to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 6.619$ ;  $p < 0.001$ ) were detected. **b** Number of Iba1+ cells in sector 1 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 8.685$ ;  $p = 0.004$ ) and the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 21.679$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interaction of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 17.083$ ;  $p < 0.001$ ) was

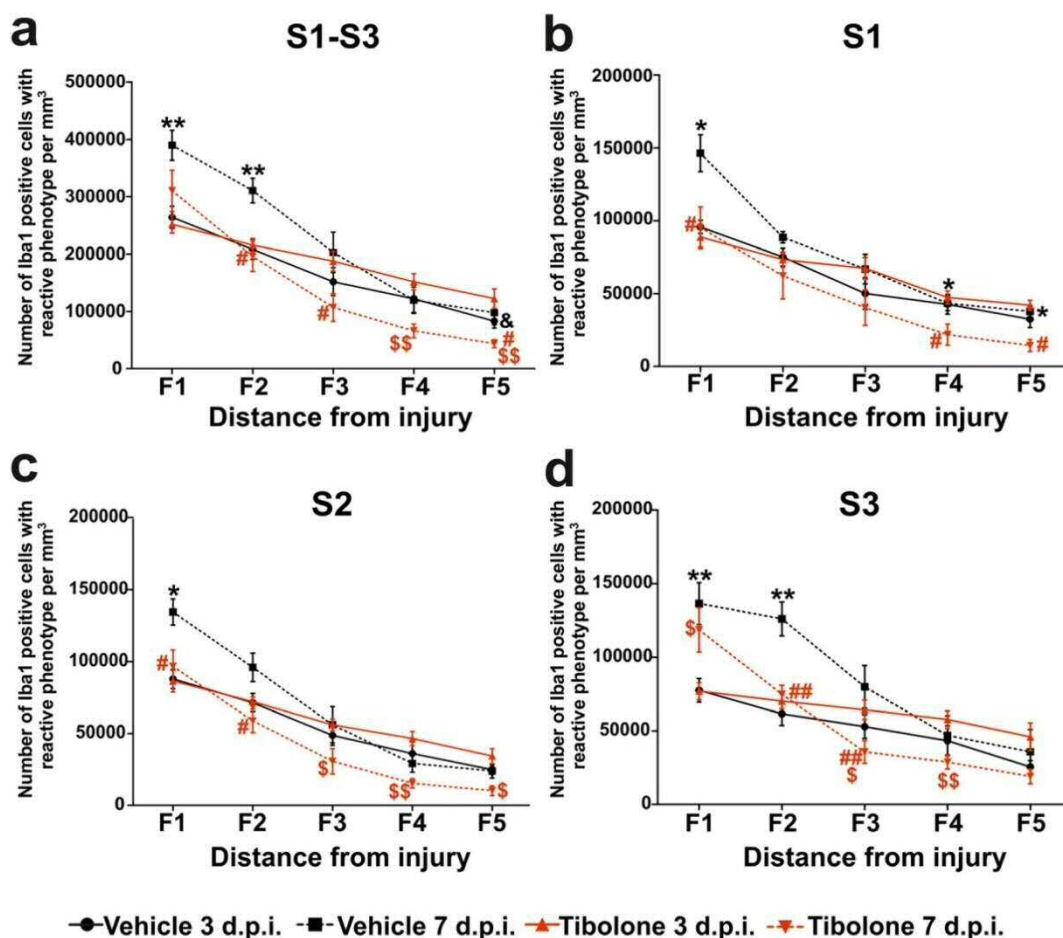
detected. **c** Number of Iba1+ cells in sector 2 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 3.352$ ;  $p = 0.071$ ) and the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 40.384$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interactions of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 13.430$ ;  $p < 0.001$ ) and of the distance to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 4.876$ ;  $p = 0.001$ ) were detected. **d** Number of Iba1+ cells in sector 3 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 20.828$ ;  $p < 0.001$ ) and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 8.749$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interactions of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 18.322$ ;  $p < 0.001$ ) and of the distance to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 5.678$ ;  $p < 0.001$ ) were detected. Significant differences with the post hoc test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  between vehicle 3 days and vehicle 7 days. Significant differences  $^{\$}p < 0.05$ ;  $^{SS}p < 0.01$  between tibolone 3 days and tibolone 7 days. Significant differences  $^{\#}p < 0.05$ ;  $^{##}p < 0.01$  between vehicle 7 days and tibolone 7 days

As shown in Fig. 8a, a significant increase in the number of Iba1+ cells with reactive phenotype was observed in the lateral frames F1 and F2 between 3 and 7 days after brain injury. The increase in F1 was detected in the three analyzed dorsoventral sectors, but the increase in F2 was exclusively due to Iba1+ cells located in the dorsoventral sector S3 (Fig. 8b–d).

In tibolone-injected animals, a significant decrease in the number of Iba1+ cells with reactive phenotype was

observed in the lateral frames F4 and F5 between 3 and 7 days after brain injury. The decrease in F4 was detected in the dorsoventral sectors S2 and S3. The decrease in F5 was only detected in the dorsoventral sector S2. In addition, tibolone treatment decreased the number of Iba1+ cells with reactive phenotype between 3 and 7 days after injury in the dorsoventral sector S2 of the lateral frames F3 and F5 (Fig. 8b–d).





**Fig. 8** Effect of tibolone on the number of Iba1+ microglia with reactive phenotype in the cerebral cortex 3 and 7 days after a stab wound injury. The number of Iba1+ cells with reactive phenotype was assessed in five consecutive lateral frames (F1–F5) of  $200 \mu\text{m} \times 600 \mu\text{m}$ , starting from the wound edge and in three consecutive dorsoventral sectors (S1–S3) of  $200 \mu\text{m}^2$  starting from the dorsal cortical surface. **a** Number of Iba1+ cells with reactive phenotype in the five lateral frames when data from the three dorsoventral sectors are grouped together. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 9.851$ ;  $p = 0.002$ ) and the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 68.720$ ;  $p < 0.001$ ). Furthermore, significant interactions of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 27.651$ ;  $p < 0.001$ ) and of the distance to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 7.101$ ;  $p < 0.001$ ) were detected. **b** Number of Iba1+ cells with reactive phenotype in sector 1 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 11.615$ ;  $p = 0.001$ ) and the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 44.212$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interactions of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 25.557$ ;  $p < 0.001$ ) and of the distance to the lesion with the time

after injury ( $F_{(4,19)} = 2.928$ ;  $p = 0.026$ ) were detected. **c** Number of Iba1+ cells with reactive phenotype in sector 2 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ( $F_{(1,19)} = 10.058$ ;  $p = 0.002$ ) and the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 79.885$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interactions of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 23.316$ ;  $p < 0.001$ ) and of the distance to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 7.012$ ;  $p < 0.001$ ) were detected. **d** Number of Iba1+ cells with reactive phenotype in sector 3 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 36.439$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interactions of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 22.121$ ;  $p < 0.001$  in S3) and of the distance to the lesion with the time after injury ( $F_{(4,19)} = 6.657$ ;  $p < 0.001$  in S3) were detected. Significant differences with the post hoc test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  between vehicle 3 days and vehicle 7 days. Significant differences  $^{\$}p < 0.05$ ;  $^{SS}p < 0.01$  between tibolone 3 days and tibolone 7 days. Significant difference  $^{\&}p < 0.05$  between vehicle 3 days and tibolone 3 days. Significant differences  $^{\#}p < 0.05$ ;  $^{##}p < 0.01$  between vehicle 7 days and tibolone 7 days

Compared to vehicle-injected animals, treatment with tibolone resulted in a significant decrease in the number of Iba1+ cells with reactive phenotype in the lateral frame F5 at 3 days and in lateral frames F2, F3, and F5 at 7 days after brain injury (Fig. 8a). The effect of tibolone in F2 at 7 days was due to cells located in the dorsoventral sectors

S2 and S3. The effect of tibolone in F3 was only detected in the dorsoventral sector S3 and the effect of tibolone in F5 was only detected in the dorsoventral sector S1. In addition, tibolone decreased the number of Iba1+ cells with reactive phenotype in the dorsoventral sectors S1 and S2 of the lateral frame F1 (Fig. 8b–d).

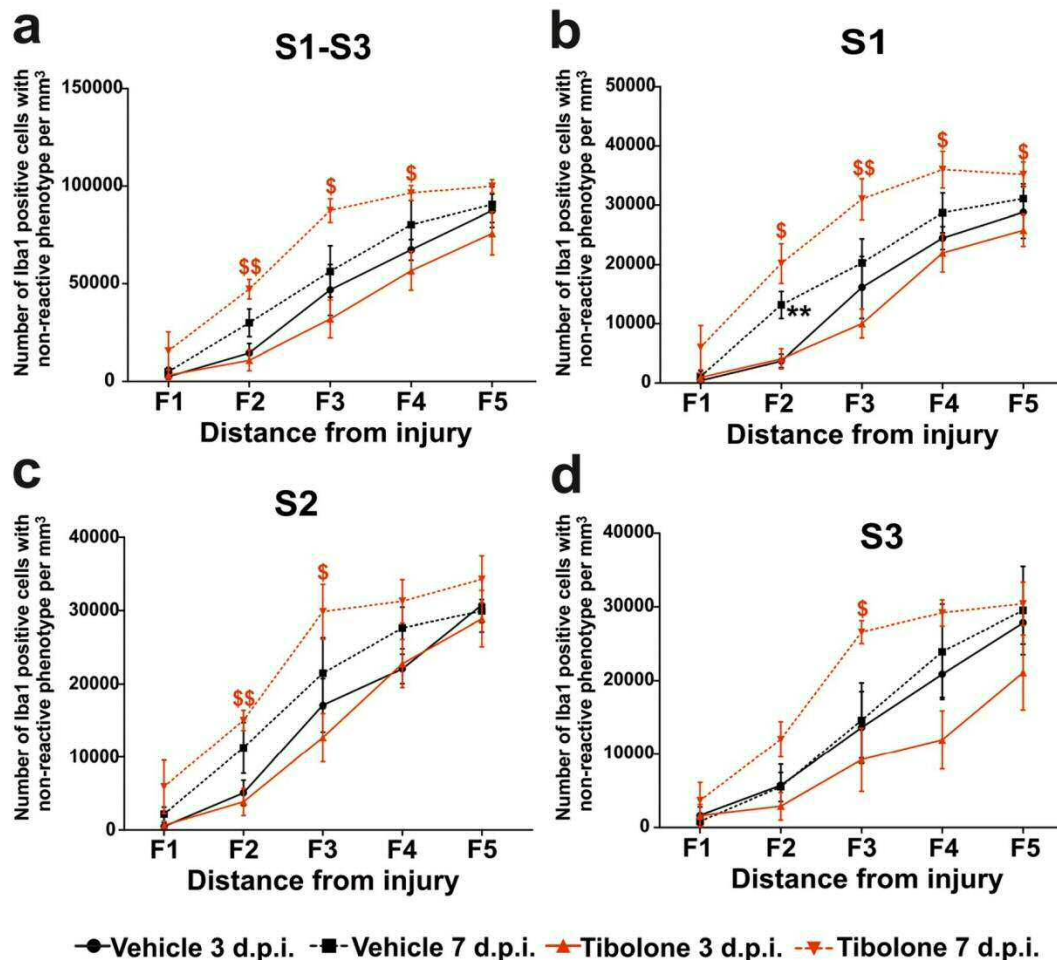


### Microglia with Resting Phenotype

Three-way ANOVA for the number of Iba1+ cells with non-reactive phenotype in the five lateral zones delimited by frames F1–F5 (Fig. 9a) revealed significant effects of the distance to the lesion and the time after injury. Furthermore, a significant interaction of the treatment with the time after injury was detected. Similar results were observed when the number of

Iba1+ cells with resting phenotype was analyzed separately in the three dorsoventral sectors (S1–S3; Fig. 9b–d). Results of the ANOVA analysis are shown in the legend of Fig. 9.

As shown in Fig. 9a, the number of Iba1+ cells with resting phenotype increased progressively from the lesion. In tibolone-injected animals, the number of Iba1+ cells with resting phenotype showed a significant increase in the lateral frames F2, F3, and F4 between days 3 and 7 after injury.



**Fig. 9** Effect of tibolone on the number of Iba1+ microglia with resting phenotype in the cerebral cortex 3 and 7 days after a stab wound injury. The number of Iba1+ cells with resting phenotype was assessed in five consecutive lateral frames (F1–F5) of  $200\ \mu\text{m} \times 600\ \mu\text{m}$ , starting from the wound edge and in 3 consecutive dorsoventral sectors (S1–S3) of  $200\ \mu\text{m}^2$  starting from the dorsal cortical surface. **a** Number of Iba1+ cells with resting phenotype in the five lateral frames when data from the three dorsoventral sectors are grouped together. Three-way ANOVA revealed significant effects of the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 68.264$ ;  $p < 0.001$ ) and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 35.473$ ;  $p < 0.001$ ). Furthermore, a significant interaction of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 11.423$ ;  $p = 0.001$ ) was detected. **b** Number of Iba1+ cells with resting phenotype in sector 1 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} =$

$65.854$ ;  $p < 0.001$ ) and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 42.293$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, a significant interaction of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 10.308$ ;  $p = 0.002$ ) was detected. **c** Number of Iba1+ cells with resting phenotype in sector 2 of the five lateral frames. Three-way ANOVA revealed significant effects of the distance to the lesion ( $F_{(4,19)} = 67.564$ ;  $p < 0.001$  in S2) and the time after injury ( $F_{(1,19)} = 24.866$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, significant interaction of the treatment with the time after injury ( $F_{(1,19)} = 4.692$ ;  $p = 0.033$ ) was detected. **d** Number of Iba1+ cells with resting phenotype in sector 3 of the five lateral frames. Significant difference with the post hoc test: \*\* $p < 0.01$  between vehicle 3 days and vehicle 7 days. Significant differences  $^{\$}p < 0.05$ ;  $^{\$\$}p < 0.01$  between tibolone 3 days and tibolone 7 days. Significant differences  $^{***}p < 0.01$  between vehicle 3 days and vehicle 7 days. Significant differences  $^{\$}p < 0.05$ ;  $^{\$\$}p < 0.01$  between tibolone 3 days and tibolone 7 days

This increase was observed in the dorsoventral sectors S1 and S2 of F2; the dorsoventral sectors S1, S2, and S3 of F3; and the dorsoventral sector S1 of F4 and F5 (Fig. 9b–d). In addition, in vehicle-injected animals, the number of Iba1+ cells with resting phenotype showed an increase between days 3 and 7 after injury in the dorsoventral sector S1 of the lateral frame F2 (Fig. 9b). No significant differences in the number of Iba1+ cells with resting phenotype were detected between the animals injected with vehicle and those injected with tibolone.

### Effects of Tibolone on the Number of Neurons in the Injured Cerebral Cortex

Cells immunoreactive for the neuronal marker NeuN were counted in the cerebral cortex of the injured and contralateral hemispheres. Neuronal cell counts were performed 14 days after brain injury to have an estimation of the number of remaining neurons after the successive waves of primary and secondary neuronal death [52]. Compared to the contralateral (non-injured) cortex, the injured cortex showed a significant decrease in the number of NeuN+ neurons in the border of the wound (lateral frames F1 and F2; Figs. 10 and 11). Animals treated with tibolone showed a similar reduction in the number of NeuN+ neurons in the close proximity to the wound (frame F1) than those treated with vehicle. However, tibolone resulted in a significant protection for neurons located within frame F2 (Fig. 11). Thus, in control animals injected with vehicle, brain injury resulted in a significant decrease in the number of neurons located within frame F2. In contrast, tibolone prevented neuronal loss in the lateral frame F2 of the injured cortex. Therefore, the number of NeuN+ neurons was significantly higher in this zone in the animals treated with tibolone compared to the animals treated with vehicle (Fig. 11).

### Discussion

Reactive gliosis after an acute brain injury follows a precise temporal and regional pattern. In this study, we have observed that the number of GFAP+ cells and the number of Iba1+ cells in the cerebral cortex change depending on the distance to the wound and the time after injury. In addition, reactive gliosis showed differences in function of the distance to the dorsal cortical surface. Changes in reactive gliosis after a stab wound injury in accordance with time after injury and the distance to the border of the injury have been previously reported [7, 9, 53–58]. However, changes in the number of reactive astrocytes and reactive microglia across cortical depth have been less explored. For example, Miyake et al. [53] reported differences in the number of GFAP+ cells between layer I and layers II–VI in the mouse cerebral cortex after a stab wound injury. Our findings indicate that spatial

differences in GFAP+ and Iba1+ cells in the cerebral cortex after brain injury not only depend on the distance to the lesion, but also on cortical depth.

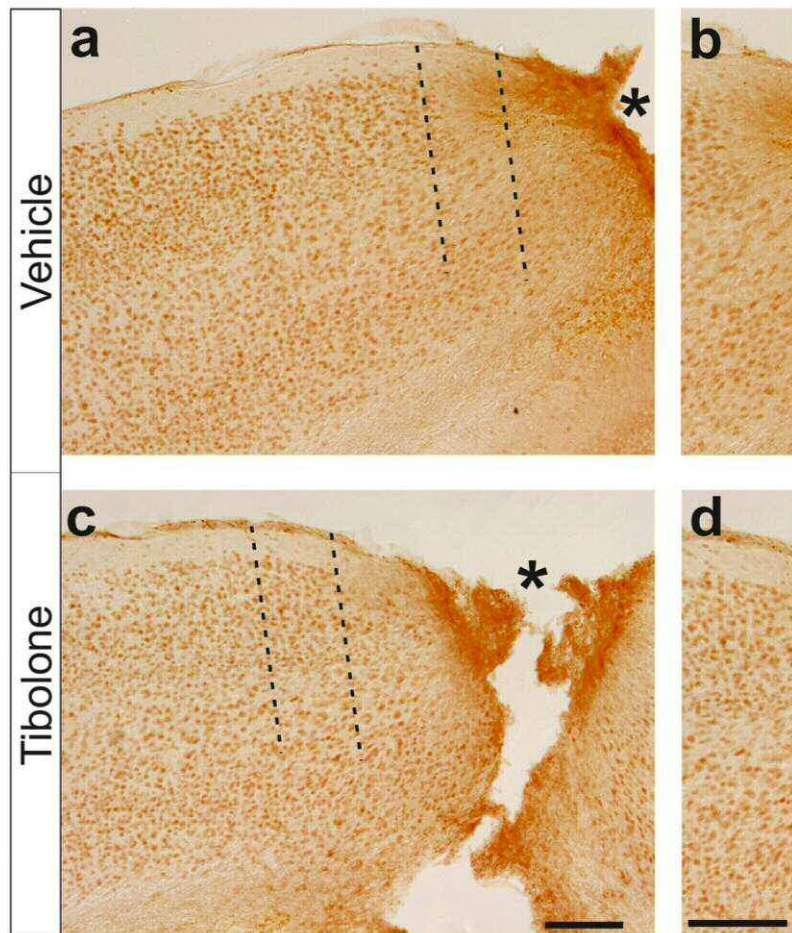
Our results indicate that the treatment with tibolone causes a reduction in the number of GFAP+ astrocytes and the number of Iba1+ microglia after an acute cortical injury. The effect of tibolone on GFAP+ and Iba1+ cells also showed differences depending on the time after injury, the distance to the lesion, and the position in the dorsoventral cortical axis, suggesting that the action of tibolone on reactive gliosis is regulated in a context-specific manner. The effect of tibolone was observed in cortical regions located in the proximity (0–600  $\mu\text{m}$ ) of the wound, where, in agreement with previous studies [9, 56, 57], we detected the higher number of astrocytes and microglia with a reactive phenotype after brain injury. In contrast, tibolone did not affect the number of glial cells in the contralateral hemisphere, suggesting that its action on glial cell number is restricted to the damaged tissue. It should be noted, however, that tibolone has effects on healthy brain tissue. For instance, tibolone increases the expression of superoxide dismutase-2 in the rat hippocampus [37] and regulates synaptic efficacy in hypothalamic POMC neurons [32]. Although tibolone did not reduce the number of glial cells in the contralateral hemisphere, the steroid may regulate other parameters in astrocytes and microglia in the healthy tissue. For instance, another steroid such as estradiol has been shown to reduce reactive gliosis in the injured brain but to promote the growth of astrocytic processes and the expression of GFAP in healthy brain tissue [59]. Further studies are therefore necessary to determine the effects of tibolone on astrocytes and microglia under physiological conditions.

Tibolone induced significant changes in the number of astrocytes and microglia at 7 days post-injury compared to control animals. Thus, while at 3 days, no significant differences in the number of GFAP+ or Iba1+ cells were detected between control and tibolone-injected animals (with the exception of a reduction by tibolone treatment in the number of GFAP+ cells at 0–200  $\mu\text{m}$  from the wound border and at 200–400  $\mu\text{m}$  from the cortical surface), at 7 days after injury animals injected with tibolone showed a decrease in the number of GFAP+ cells, in the number of total Iba1+ cells and in the number of Iba1+ cells with reactive phenotype. In contrast, tibolone did not affect the number of Iba1+ cells with resting phenotype in comparison to vehicle-injected animals. These findings indicate that at 7 days after injury, tibolone reduced reactive gliosis.

Reactive gliosis is an adaptive response aimed to restore neural tissue homeostasis [60–63]. However, under certain circumstances, reactive astrocytes and reactive microglia may exert detrimental actions [60, 64–66]. In the present



**Fig. 10** Representative examples of NeuN immunostained sections of the cerebral cortex 14 days after injury. **a** From a vehicle injected animal. **b** From a tibolone injected animal. The asterisk indicates the lesion border. Scale bars, 200  $\mu$ m



study, the regulation of reactive gliosis by tibolone was associated with an increased neuronal survival in the injured cerebral cortex at 14 days after injury. In traumatic brain injury, gliosis and neuroinflammation are associated with a delayed neuronal death that occurs for several days after the primary neuronal loss induced by the injury [52]. Thus, in our study, neuronal survival was assessed 14 days after brain injury, after the two waves of neuronal death. By maintaining a healthy metabolic and functional status in astrocytes and microglia [39–41, 67] and by reducing neuroinflammation [41] and gliosis, tibolone may improve the homeostatic function of these cells and increase their neuroprotective actions.

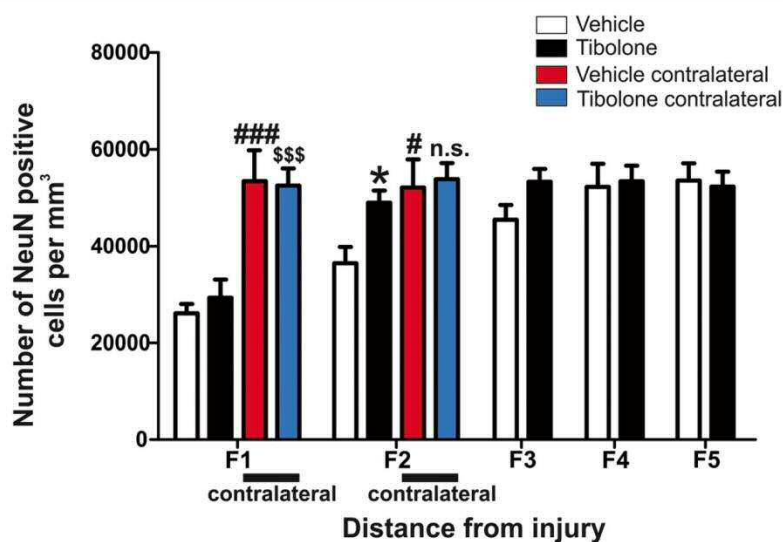
The protective action of tibolone on neurons was limited to the F2 region. The F1 region was probably too close to the injury site and suffered a process of fast primary neuronal death, as the core in ischemic injuries, which could not be protected by tibolone. In contrast, the F2 region may represent a site of secondary neuronal death (penumbra), where tibolone could exert a protective effect. In F3–F5 regions, no significant effect of tibolone

compared to vehicle was observed, probably since being these regions too far away from the stab wound site, neurons handled the stress situation better.

To compare the effects of tibolone on reactive gliosis with those reported for estradiol and SERMs, in the present study, the steroid was injected at 0, 24, and 48 h after brain injury as described in previous protocols [20, 44]. This time period corresponds to the phase of initiation of reactive gliosis. Astrocytes react within hours after a cerebral stab wound [68, 69], while the response of microglial cells occurs between 3 and 7 days post-injury [70]. In women, tibolone has a plasma half-life of 7 h and the levels of their metabolites reach their peak between 60 and 90 min after administration [71]. Although these values may be different in our animal model, they suggest that the effects of tibolone on gliosis at 7 days post-injury and on the number of neurons at 14 days post-injury are the consequence of the action of the steroid during the first days after brain injury.

The activation of the inflammasome in perilesional neurons and microglia is one of the early events initiated after brain injury [72] and plays a role in the secondary injury





**Fig. 11** Effect of tibolone on the number of NeuN+ neurons in the cerebral cortex at 14 days after a stab wound injury. The number of NeuN+ cells was assessed in five consecutive lateral frames (F1–F5) of 200  $\mu\text{m} \times 600 \mu\text{m}$ , starting from the wound edge and moving laterally. In addition, the number of NeuN+ cells was assessed in the contralateral

cortex, in regions similar to F1 and F2. Significant difference  $*p < 0.05$  between tibolone ipsilateral and vehicle ipsilateral in F2. Significant differences  $##p < 0.01$ ;  $###p < 0.001$  between vehicle ipsilateral and contralateral. Significant difference  $$$$p < 0.01$  between tibolone ipsilateral and contralateral

mechanisms [73]. Therefore, the anti-inflammatory activity of tibolone, detected in BV-2 microglia [41], may be one of the mechanisms by which the steroid reduces gliosis and reduces secondary neuronal death. Other causes for the secondary wave of tissue damage include oxidative stress and mitochondrial dysfunction [74, 75], which are also decreased by tibolone in glial cells in vitro [39–41, 67]. Furthermore, tibolone may also decrease tissue damage by protecting endothelial cell function [76, 77].

The effects of tibolone on primary astrocytes, T98G cells, and BV-2 microglia are mediated by estrogen receptors  $\alpha$  or  $\beta$  [40, 41, 78]. It is known that brain injury induces the expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in reactive astrocytes [79, 80]. Estrogen receptors are also expressed by microglia [17, 81–83]. Therefore, it is possible that tibolone may exert direct actions on reactive astrocytes and reactive microglia acting on estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  expressed by these cells. To our knowledge, there is no information on the possible binding of tibolone to G protein-coupled estrogen receptor 1, which is also expressed by microglia [83] and astrocytes [84]. Furthermore, depending on its tissue specific metabolism, tibolone may also activate androgen and progesterone receptors [26], which are also expressed by glial cells and participate in the regulation of gliosis [59, 80, 82, 85–88]. In the cerebral cortex of female ovariectomized monkeys, tibolone is mainly metabolized to 3 $\alpha$  and 3 $\beta$ -hydroxytibolone [29, 89] which are metabolites with estrogenic activity [78, 90] and to  $\Delta 4$ -isomer, which exerts androgenic and progestogenic actions [90].

The effect of tibolone on gliosis after brain injury observed in the present study is similar to that reported after the administration of estradiol or SERMs to ovariectomized rodents [20, 44]. This suggests that the mechanism of action of tibolone on gliosis is mediated by estrogen receptors. Acting on estrogen receptors, tibolone could not only reduce neuroinflammation and the activation of astrocytes and microglia, but also decrease the activation of caspase-3 reducing apoptosis [91–93] and promote blood-brain barrier integrity and angiogenesis [3, 94]. Tibolone could also potentially reduce reactive microglia acting on androgen receptors, since these receptors are known to decrease the activation of microglia after a penetrating brain injury, at least in male rats [8]. Activation of progesterone receptors could also contribute to the effect of tibolone on gliosis, since progesterone also reduces inflammation and oxidative stress after traumatic brain injury [95, 96] and increases the respiratory function of mitochondria [97].

A limitation of the present study is that we have used a model of brain injury that is convenient for the quantification of glial cells in the border of the lesion, but that induces very small neural damage, making the determination of functional recovery using behavioral assays difficult. Further studies using other traumatic brain injury models are therefore necessary. This will also allow to assess whether the antigliotic and neuroprotective actions of tibolone reported in the present study are extensible to other types of brain trauma, such as contusion or concussion injury. Since sex differences in the response to traumatic brain injury have been reported [98], it will be also important to assess the effect of tibolone on male animals. Furthermore, it would be interesting to study the



effect of tibolone in gonadally intact females, to determine if endogenous estradiol may potentiate the beneficial homeostatic actions of tibolone.

**Acknowledgements** We thank Elisa Baidés Rosell for excellent technical assistance.

**Funding** This work was supported by grants from Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO), Spain (grant numbers BFU2014–51836-C2-1-R and BFU2017-82754-R), Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), and Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain and Fondos Feder.

### Compliance with Ethical Standards

All procedures involving animals were approved by the CSIC institutional animal use and care committee and by the Comunidad de Madrid (PROEX 134/17) and followed the European Parliament and Council Directive (2010/63/EU) and the Spanish regulation (Ley 6/2013, 11th June) on the protection of animals for experimental use.

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

- Petrone AB, Simpkins JW, Barr TL (2014) 17beta-estradiol and inflammation: implications for ischemic stroke. *Aging Dis* 5(5):340–345. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0500340>
- Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2015) The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci* 16(1):17–29. <https://doi.org/10.1038/nrn3856>
- Sohrabji F (2015) Estrogen-IGF-1 interactions in neuroprotection: ischemic stroke as a case study. *Front Neuroendocrinol* 36:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.003>
- Thakkar R, Sareddy GR, Zhang Q, Wang R, Vadlamudi RK, Brann D (2018) PELP1—a key mediator of estrogen signaling and actions in the brain. *J Neuroendocrinol* 30:e12484. <https://doi.org/10.1111/jne.12484>
- Day NL, Floyd CL, D'Alessandro TL, Hubbard WJ, Chaudry IH (2013) 17beta-estradiol confers protection after traumatic brain injury in the rat and involves activation of G protein-coupled estrogen receptor 1. *J Neurotrauma* 30(17):1531–1541. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.2854>
- Lu H, Ma K, Jin L, Zhu H, Cao R (2018) 17beta-estradiol rescues damages following traumatic brain injury from molecule to behavior in mice. *J Cell Physiol* 233(2):1712–1722. <https://doi.org/10.1002/jcp.26083>
- García-Estrada J, Del Río JA, Luquin S, Soriano E, García-Segura LM (1993) Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res* 628(1–2):271–278
- 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):3039–3046. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05563.x>
- Lopez Rodriguez AB, Mateos Vicente B, Romero-Zerbo SY, Rodriguez-Rodriguez N, Bellini MJ, Rodriguez de Fonseca F, Bermudez-Silva FJ, Azcoitia I et al (2011) Estradiol decreases cortical reactive astrogliosis after brain injury by a mechanism involving cannabinoid receptors. *Cereb Cortex* 21(9):2046–2055. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq277>
- Perez-Alvarez MJ, Mateos L, Alonso A, Wandosell F (2015) Estradiol and progesterone administration after pMCAO stimulates the neurological recovery and reduces the detrimental effect of ischemia mainly in hippocampus. *Mol Neurobiol* 52(3):1690–1703. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8963-7>
- Perez-Alvarez MJ, Maza Mdel C, Anton M, Ordóñez L, Wandosell F (2012) Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. *J Neuroinflammation* 9:157. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-157>
- Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Eteri S, Maggi A (2006) The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology* 147(5):2263–2272. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1330>
- Arevalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2010) Actions of estrogens on glial cells: implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta* 1800(10):1106–1112. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.10.002>
- De Marinis E, Acáz-Fonseca E, Arevalo MA, Ascenzi P, Fiochetti M, Marino M, Garcia-Segura LM (2013) 17beta-Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor beta-mediated neuroglobin up-regulation. *J Neuroendocrinol* 25(3):260–270. <https://doi.org/10.1111/jne.12007>
- Chuffa LG, Lupi-Junior LA, Costa AB, Amorim JP, Seiva FR (2017) The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. *Steroids* 118:93–108. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.12.011>
- Smith CL, O'Malley BW (2004) Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25(1):45–71. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0023>
- 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):219–230. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0294>
- 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. <https://doi.org/10.1002/glia.20904>
- Arevalo MA, Diz-Chaves Y, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Garcia-Segura LM (2012) Selective oestrogen receptor modulators decrease the inflammatory response of glial cells. *J Neuroendocrinol* 24(1):183–190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02156.x>
- Barreto GE, Santos-Galindo M, Garcia-Segura LM (2014) Selective estrogen receptor modulators regulate reactive microglia after penetrating brain injury. *Front Aging Neurosci* 6:132. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00132>
- Li R, Xu W, Chen Y, Qiu W, Shu Y, Wu A, Dai Y, Bao J et al (2014) Raloxifene suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis and NF-kappaB-dependent CCL20 expression in reactive astrocytes. *PLoS One* 9(4):e94320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094320>
- Mosquera L, Colon JM, Santiago JM, Torrado AI, Melendez M, Segarra AC, Rodriguez-Orengo JF, Miranda JD (2014) Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha. *Brain Res* 1561:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.03.002>
- Ishihara Y, Itoh K, Ishida A, Yamazaki T (2015) Selective estrogen-receptor modulators suppress microglial activation and neuronal cell death via an estrogen receptor-dependent



- pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 145:85–93. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.002>
24. Jordan VC (2007) Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nat Rev Cancer* 7(1):46–53. <https://doi.org/10.1038/nrc2048>
  25. Reed MJ, Kloosterboer HJ (2004) Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR). *Maturitas* 48(Suppl 1):S4–S6. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.02.013>
  26. Kloosterboer HJ (2001) Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76(1–5):231–238
  27. Kloosterboer HJ (2004) Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas* 48(Suppl 1):S30–S40. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.02.012>
  28. 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):535–541
  29. Verheul HA, Kloosterboer HJ (2006) Metabolism of exogenous sex steroids and effect on brain functions with a focus on tibolone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1–5):195–204. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.037>
  30. Pinto-Almazan R, Segura-Urbe JJ, Farfan-Garcia ED, Guerra-Araiza C (2017) Effects of tibolone on the central nervous system: clinical and experimental approaches. *Biomed Res Int* 2017:8630764:1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/8630764>
  31. Beltran-Campos V, Diaz-Ruiz A, Padilla-Gomez E, Aguilar Zavala H, Rios C, Diaz Cintra S (2015) Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus. *Neurologia* 30(7):401–406. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2014.03.002>
  32. Qiu J, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Kloosterboer HJ, Kelly MJ (2008) Tibolone rapidly attenuates the GABAB response in hypothalamic neurones. *J Neuroendocrinol* 20(12):1310–1318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01789.x>
  33. Genazzani AR, Bernardi F, Pluchino N, Giretti MS, Begliomini S, Casarosa E, Luisi M, Kloosterboer HJ (2006) Effect of tibolone administration on central and peripheral levels of allopregnanolone and beta-endorphin in female rats. *Menopause* 13(1):57–64. <https://doi.org/10.1097/01.gme.0000191372.79052.d3>
  34. Gibbs RB, Nelson D, Anthony MS, Clarkson TB (2002) Effects of long-term hormone replacement and of tibolone on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the brains of ovariectomized, cynomolgus monkeys. *Neuroscience* 113(4):907–914
  35. Pinto-Almazan R, Calzada-Mendoza CC, Campos-Lara MG, Guerra-Araiza C (2012) Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. *J Neurosci Res* 90(4):878–886. <https://doi.org/10.1002/jnr.22808>
  36. Aguiar RB, Dickel OE, Cunha RW, Monserrat JM, Barros DM, Martinez PE (2006) Estradiol valerate and tibolone: effects on memory. *Pharmacol Biochem Behav* 85(4):689–696. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.10.023>
  37. Farfan-Garcia ED, Castillo-Hernandez MC, Pinto-Almazan R, Rivas-Arancibia S, Gallardo JM, Guerra-Araiza C (2014) Tibolone prevents oxidation and ameliorates cholinergic deficit induced by ozone exposure in the male rat hippocampus. *Neurochem Res* 39(9):1776–1786. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1385-0>
  38. Vergouwen MD, Anderson RE, Meyer FB (2000) Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 878(1–2):88–97
  39. Avila Rodriguez M, Garcia-Segura LM, Cabezas R, Torrente D, Capani F, Gonzalez J, Barreto GE (2014) Tibolone protects T98G cells from glucose deprivation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144 Pt B:294–303. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.009>
  40. Avila-Rodriguez M, Garcia-Segura LM, Hidalgo-Lanussa O, Baez E, Gonzalez J, Barreto GE (2016) Tibolone protects astrocytic cells from glucose deprivation through a mechanism involving estrogen receptor beta and the upregulation of neuroglobin expression. *Mol Cell Endocrinol* 433:35–46. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.024>
  41. Hidalgo-Lanussa O, Avila-Rodriguez M, Baez-Jurado E, Zamudio J, Echeverria V, Garcia-Segura LM, Barreto GE (2017) Tibolone reduces oxidative damage and inflammation in microglia stimulated with palmitic acid through mechanisms involving estrogen receptor Beta. *Mol Neurobiol* <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0777-y>
  42. Li CY, Song MY, Huang M, Li JC, Xiao JY, Zhao H (2015) Estradiol suppresses neuronal firing activity and c-Fos expression in the lateral habenula. *Mol Med Rep* 12(3):4410–4414. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3942>
  43. Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd edn. Academic Press
  44. Barreto G, Santos-Galindo M, Diz-Chaves Y, Pernia O, Carrero P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2009) Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured brain: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones. *Endocrinology* 150(11):5010–5015. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0352>
  45. 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):169–186
  46. Howard CV, Reed MG (1998) Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. BIOS Scientific Publishers Limited
  47. Kloss CU, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G (2001) Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol* 168(1):32–46. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7575>
  48. Stence N, Waite M, Dailey ME (2001) Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33(3):256–266
  49. Diz-Chaves Y, Pernia O, Carrero P, Garcia-Segura LM (2012) Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflammation* 9:71. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-71>
  50. Schwarz JM, Bilbo SD (2012) Sex, glia, and development: interactions in health and disease. *Horm Behav* 62(3):243–253. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.018>
  51. Lenz KM, Nugent BM, Haliyur R, McCarthy MM (2013) Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J Neurosci* 33(7):2761–2772. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1268-12.2013>
  52. Villapol S, Bymes KR, Symes AJ (2014) Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury. *Front Neurol* 5:82. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00082>
  53. Miyake T, Hattori T, Fukuda M, Kitamura T, Fujita S (1988) Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex. *Brain Res* 451(1–2):133–138
  54. Hozumi I, Aquino DA, Norton WT (1990) GFAP mRNA levels following stab wounds in rat brain. *Brain Res* 534(1–2):291–294
  55. Fernaund-Espinosa I, Nieto-Sampedro M, Bovolenta P (1993) Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia* 8(4):277–291. <https://doi.org/10.1002/glia.440080408>
  56. Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJ, Fawcett JW (2004) The responses of oligodendrocyte precursor cells,



- astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience* 127(4):813–820. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.05.028>
57. Potter KA, Buck AC, Self WK, Capadona JR (2012) Stab injury and device implantation within the brain results in inversely multiphasic neuroinflammatory and neurodegenerative responses. *J Neural Eng* 9(4):046020. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/9/4/046020>
  58. Goc J, Liu JY, Sisodiya SM, Thom M (2014) A spatiotemporal study of gliosis in relation to depth electrode tracks in drug-resistant epilepsy. *Eur J Neurosci* 39(12):2151–2162. <https://doi.org/10.1111/ejn.12548>
  59. Acáz-Fonseca E, Avila-Rodríguez M, Garcia-Segura LM, Barreto GE (2016) Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol* 144:5–26. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.06.002>
  60. Sofroniew MV (2014) Astroglialosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(2):a020420. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>
  61. Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS (2015) Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 138(Pt 5):1138–1159. <https://doi.org/10.1093/brain/awv066>
  62. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV (2016) Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 275(Pt 3):305–315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>
  63. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H (2017) Microglia in physiology and disease. *Annu Rev Physiol* 79:619–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
  64. Perry VH, Holmes C (2014) Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 10(4):217–224. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.38>
  65. von Bernhardi R, Eugenin-von Bernhardi L, Eugenin J (2015) Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 7:124. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00124>
  66. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew MV et al (2016) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 131(3):323–345. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
  67. Gonzalez-Giraldo Y, Garcia-Segura LM, Echeverria V, Barreto GE (2017) Tibolone preserves mitochondrial functionality and cell morphology in astrocytic cells treated with palmitic acid. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0667-3>
  68. Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G (2012) Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 349(1):169–180. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1336-5>
  69. Mathewson AJ, Berry M (1985) Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res* 327(1–2):61–69
  70. Turtzo LC, Lescher J, Janes L, Dean DD, Budde MD, Frank JA (2014) Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. *J Neuroinflammation* 11:82. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-82>
  71. Verheul HA, Blok LJ, Burger CW, Hanifi-Moghaddam P, Kloosterboer HJ (2007) Levels of tibolone and estradiol and their nonsulfated and sulfated metabolites in serum, myometrium, and vagina of postmenopausal women following treatment for 21 days with tibolone, estradiol, or estradiol plus medroxyprogesterone acetate. *Reprod Sci* 14(2):160–168. <https://doi.org/10.1177/1933719106298684>
  72. Lee SW, Gajavelli S, Spurlock MS, Andreoni C, de Rivero Vaccari JP, Bullock MR, Keane RWP, Dietrich WD (2018) Microglial inflammasome activation in penetrating ballistic-like brain injury. *J Neurotrauma*. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5530>
  73. Ma J, Xiao W, Wang J, Wu J, Ren J, Hou J, Gu J, Fan K et al (2016) Propofol inhibits NLRP3 inflammasome and attenuates blast-induced traumatic brain injury in rats. *Inflammation* 39(6):2094–2103. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0446-8>
  74. Signoretti S, Marmarou A, Aygok GA, Fatouros PP, Portella G, Bullock RM (2008) Assessment of mitochondrial impairment in traumatic brain injury using high-resolution proton magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg* 108(1):42–52. <https://doi.org/10.3171/JNS/2008/108/01/0042>
  75. Cornelius C, Crupi R, Calabrese V, Graziano A, Milone P, Pennisi G, Radak Z, Calabrese EJ et al (2013) Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 19(8):836–853. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4981>
  76. Simoncini T, Genazzani AR (2000) Tibolone inhibits leukocyte adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 162(1–2):87–94
  77. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Garibaldi S, Genazzani AR (2004) Tibolone activates nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89(9):4594–4600. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-032189>
  78. Guzman CB, Zhao C, Deighton-Collins S, Kleerekoper M, Benjamins JA, Skafar DF (2007) Agonist activity of the 3-hydroxy metabolites of tibolone through the oestrogen receptor in the mouse N2.01 oligodendrocyte cell line and normal human astrocytes. *J Neuroendocrinol* 19(12):958–965. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01611.x>
  79. Blurton-Jones M, Tuszynski MH (2001) Reactive astrocytes express estrogen receptors in the injured primate brain. *J Comp Neurol* 433(1):115–123
  80. Garcia-Ovejero D, Veiga S, Garcia-Segura LM, DonCarlos LL (2002) Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol* 450(3):256–271. <https://doi.org/10.1002/cne.10325>
  81. Sierra A, Gottfried-Blackmore A, Milner TA, McEwen BS, Bulloch K (2008) Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia* 56(6):659–674. <https://doi.org/10.1002/glia.20644>
  82. Habib P, Beyer C (2015) Regulation of brain microglia by female gonadal steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 146:3–14. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.018>
  83. Zhao TZ, Ding Q, Hu J, He SM, Shi F, Ma LT (2016) GPER expressed on microglia mediates the anti-inflammatory effect of estradiol in ischemic stroke. *Brain Behav* 6(4):e00449. <https://doi.org/10.1002/brb3.449>
  84. Kuo J, Hamid N, Bondar G, Prossnitz ER, Micevych P (2010) Membrane estrogen receptors stimulate intracellular calcium release and progesterone synthesis in hypothalamic astrocytes. *J Neurosci* 30(39):12950–12957. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1158-10.2010>
  85. Finley SK, Kritzer MF (1999) Immunoreactivity for intracellular androgen receptors in identified subpopulations of neurons, astrocytes and oligodendrocytes in primate prefrontal cortex. *J Neurobiol* 40(4):446–457
  86. DonCarlos LL, Sarkey S, Lorenz B, Azcoitia I, Garcia-Ovejero D, Huppenbauer C, Garcia-Segura LM (2006) Novel cellular phenotypes and subcellular sites for androgen action in the forebrain. *Neuroscience* 138(3):801–807. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.020>
  87. Arevalo MA, Santos-Galindo M, Acáz-Fonseca E, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2013) Gonadal hormones and the control of reactive gliosis. *Horm Behav* 63(2):216–221. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.021>
  88. Lei B, Mace B, Dawson HN, Warner DS, Laskowitz DT, James ML (2014) Anti-inflammatory effects of progesterone in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *PLoS One* 9(7):e103969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103969>

89. Verheul HA, van Iersel ML, Delbressine LP, Kloosterboer HJ (2007) Selective tissue distribution of tibolone metabolites in mature ovariectomized female cynomolgus monkeys after multiple doses of tibolone. *Drug Metab Dispos* 35(7):1105–1111. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.014118>
90. Escande A, Servant N, Rabenoelina F, Auzou G, Kloosterboer H, Cavailles V, Balaguer P, Maudelonde T (2009) Regulation of activities of steroid hormone receptors by tibolone and its primary metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116(1–2):8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.03.008>
91. Gatson JW, Maass DL, Simpkins JW, Idris AH, Minei JP, Wigginton JG (2009) Estrogen treatment following severe burn injury reduces brain inflammation and apoptotic signaling. *J Neuroinflammation* 6:30. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-30>
92. 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):185–194. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.07.004>
93. Li LZ, Bao YJ, Zhao M (2011) 17beta-estradiol attenuates programmed cell death in cortical pericontusional zone following traumatic brain injury via upregulation of ERalpha and inhibition of caspase-3 activation. *Neurochem Int* 58(1):126–133. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.11.006>
94. Sohrabji F, Bake S (2006) Age-related changes in neuroprotection: Is estrogen pro-inflammatory for the reproductive senescent brain? *Endocrine* 29(2):191–197. <https://doi.org/10.1385/ENDO:29:2:191>
95. Webster KM, Wright DK, Sun M, Semple BD, Ozturk E, Stein DG, O'Brien TJ, Shultz SR (2015) Progesterone treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress and brain damage and improves long-term outcomes in a rat model of repeated mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 12:238. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0457-7>
96. Djebaili M, Guo Q, Pettus EH, Hoffman SW, Stein DG (2005) The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 22(1):106–118. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.106>
97. Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J (2008) Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 149(6):3167–3175. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1227>
98. Acaz-Fonseca E, Duran JC, Carrero P, Garcia-Segura LM, Arevalo MA (2015) Sex differences in glia reactivity after cortical brain injury. *Glia* 63(11):1966–1981. <https://doi.org/10.1002/glia.22867>





---

# **ANEXO 2**

---

**Otras aportaciones científicas de la  
doctoranda**



## Listado de publicaciones durante el periodo de doctorado que no forman parte de esta tesis doctoral

**Crespo-Castrillo A**, Arevalo MA, Garcia-Segura LM, Yanguas-Casás N. *Estrogenic regulation of glia and neuroinflammation. An Introduction and Historical Perspective on the Field: Estrogen effects on the hippocampus and related brain regions*. Oxford University Press USA, 2019.

Yanguas-Casás N\*, **Crespo-Castrillo A\***, de Ceballos ML, Chowen JA, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. *Sex differences in the phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid*. *Glia*. 2018 Mar;66(3):522-537. doi: 10.1002/glia.23263. Epub 2017 Nov 15. \*Equal contribution

## Aportaciones como primera autora en congresos Nacionales e Internacionales

**Póster:** *The synthetic steroid tibolone decreases reactive gliosis and neuronal death after a stab wound injury in the cerebral cortex of female mice. XIII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Crespo-Castrillo A, Yanguas-Casás N, Arevalo MA, Azcoitia I, Barreto GE, Garcia-Segura LM). Oporto, Portugal (2019).*

**Póster:** *The synthetic steroid tibolone decreases reactive gliosis and neuronal death in the cerebral cortex of female mice after a stab wound injury. 10th International Meeting Steroids And Nervous System, 2019. (Crespo-Castrillo A, Yanguas-Casás N, Arevalo MA, Azcoitia I, Barreto GE, Garcia-Segura LM). Turín, Italia (2019).*

**Comunicación Oral:** *The synthetic steroid Tibolone decreases reactive gliosis and neuronal death in the cerebral cortex of female mice after a stab wound injury. Andrea Crespo Castrillo. Seminario de Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal. Madrid, España (2018).*

**Póster:** *The Synthetic steroid Tibolone decreases reactive gliosis and neuronal death in the cerebral cortex of female mice after a stab wound injury. Cajal Xmas Meeting*

(Crespo-Castrillo A, Yanguas-Casás N, Arevalo MA, Azcoitia I, Barreto GE, Garcia-Segura LM). Madrid, España (2017).

**Póster:** *Anti-inflammatory actions of tibolone in murine brain injury models.* **XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 2017 (Crespo-Castrillo, A., Yanguas-Casás, N., Barreto, G.E., García-Segura, L.M., Arévalo, M.A.).** Edimburgo, Reino Unido (2017).

**Comunicación Oral:** *Anti-inflammatory actions of tibolone in murine brain injury model.* **Andrea Crespo Castrillo.** Jornadas Cajal Junior, Madrid, España (2017).

**Póster:** *Regulatory roles of tibolone in murine brain injury models.* **9th International Meeting Steroids And Nervous System, 2017. (Crespo-Castrillo, A., Yanguas-Casás, N., Barreto, G.E., Garcia-Segura, L.M., Arévalo, M.A.).** Turín, Italia (2017).

**Póster:** *The synthetic steroid tibolone reduces reactive gliosis in the cerebral cortex after a penetrating brain injury.* **10th FENS Forum of Neuroscience**, pp. 1481. (A. Crespo-Castrillo, G.E. Barreto, E. Baidés, L.M. Garcia-Segura, M.A. Arévalo). Copenhague, Dinamarca (2016).

## Comunicación de la ciencia a público general

Miembro de la Asociación Con/Ciencia desde 2016.

Charla divulgativa *Brain Runner: del cerebro a la gran pantalla* por la Semana del Cerebro en 2018. Instituto Cajal.

Charla divulgativa *El Lado Oscuro de la Ciencia* en la Noche Europea de los Investigadores en 2018. Instituto Cajal.

Organización y ponencia en *El Sendero de la Neurociencia*, destinada a despertar la vocación en neurociencia. 2018, CSIC.

Publicación semanal en el blog de divulgación científica de la Asociación Con/Ciencia <https://asociacionconciencia.wordpress.com/>



