



Universidad Nacional de Córdoba  
Escuela de Posgrado- Facultad de Ciencias Químicas  
Doctorado en Neurociencias

*“EFECTO NEUROPROTECTOR DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL FRENTE A  
MODIFICACIONES FUNCIONALES DOPAMINERGICAS  
INDUCIDAS POR 6-HIDROXIDOPAMINA EN RATAS  
MACHO”*

**TESIS DOCTORAL**

**Bioingeniera María Paula Bonaccorso Marinelli**

Director: Dr. Ricardo Jorge Cabrera

Co director: Dr. Gustavo Baiardi



## INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	- 6 -
ABREVIATURAS.....	- 8 -
RESUMEN .....	- 10 -
1. INTRODUCCIÓN .....	- 13 -
1.1. Enfermedad de Parkinson .....	- 13 -
1.2. Núcleos de la base.....	- 15 -
1.3. Sistema dopaminérgico.....	- 17 -
1.3.1. Síntesis y liberación de DA.....	- 18 -
1.3.2. Receptores de DA .....	- 19 -
1.3.3. Enzimas involucradas en la síntesis y catabolismo dopaminérgico .....	- 20 -
1.4. Organización anatómofuncional fisiológica y fisiopatológica de los ganglios basales. ....	- 21 -
1.4.1. Actividad motora normal.....	- 21 -
1.4.2. Actividad motora patológica.....	- 24 -
1.5. Modelo Experimental de 6-OHDA.....	- 26 -
1.6. Neuroesteroides.....	- 28 -
1.6.1. Estrógenos .....	- 30 -
1.6.1.1. 17β-estradiol.....	- 30 -
1.6.1.2. Mecanismo de Acción.....	- 32 -
1.6.1.2.1. Mecanismo genómico y no genómico.....	- 33 -
1.6.1.3. Estrógenos en la Enfermedad de Parkinson .....	- 36 -
1.6.1.4. Astrocitos, EP y 17β-estradiol .....	- 37 -
1.6.1.5. Microglia, EP y 17β-estradiol .....	- 39 -
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	- 41 -
2.1. Hipótesis.....	- 41 -
2.2. Objetivo general.....	- 41 -
2.3. Objetivos específicos.....	- 41 -
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 43 -
3.1. Animales de experimentación .....	- 43 -
3.1.1. Procedimiento quirúrgico .....	- 43 -
3.1.2. Tratamiento con 17β-estradiol.....	- 44 -

3.2.	Estudios comportamentales .....	- 44 -
3.2.1.	Test de campo abierto (OFT) .....	- 45 -
3.2.1.1.	Inducción farmacológica en OFT.....	- 46 -
3.2.2.	Test de actividad rotacional (RT) .....	- 47 -
3.2.2.1.	Inducción farmacológica en RT .....	- 47 -
3.2.3.	Test de natación forzada (FST).....	- 48 -
3.2.3.1.	Desarrollo del software para la evaluación del FST.....	- 49 -
3.2.3.2.	Validación del software (FST) .....	- 50 -
3.2.4.	Test de acinesia del miembro anterior (ST).....	- 50 -
3.2.4.1.	Inducción farmacológica en ST .....	- 52 -
3.2.4.2.	Desarrollo del software para la evaluación del ST.....	- 52 -
3.3.	Eutanasia .....	- 53 -
3.4.	Técnica de inmunohistoquímica para la determinación de Tirosina Hidroxilasa y Proteína Ácida Fibrilar de la Glia.....	- 53 -
3.4.1.	Tirosina Hidroxilasa (TH).....	- 54 -
3.4.1.1.	Adquisición de imágenes .....	- 54 -
3.4.1.2.	Parámetros de interés .....	- 55 -
3.4.1.3.	Desarrollo del software para la evaluación de neuronas TH+ .....	- 55 -
3.4.2.	Proteína Ácida Fibrilar de la Glia (GFAP).....	- 56 -
3.4.2.1.	Adquisición de imágenes .....	- 56 -
3.4.2.2.	Parámetros de interés .....	- 57 -
3.5.	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la determinación de DA y DOPAC.....	- 57 -
3.5.1.	Determinación de la concentración de DA y DOPAC.....	- 57 -
3.6.	Cultivos primarios de células gliales.....	- 58 -
3.6.1.	Animales de experimentación .....	- 58 -
3.6.2.	Preparación de las muestras.....	- 58 -
3.6.2.1.	Astroцитos .....	- 59 -
3.6.2.2.	Microglia .....	- 60 -
3.6.3.	Tratamiento de los cultivos y grupos experimentales.....	- 60 -
3.6.4.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).....	- 60 -
3.6.4.1.	Astroцитos .....	- 60 -
3.6.4.2.	Microglia .....	- 61 -
3.7.	Análisis estadístico .....	- 62 -

4.	RESULTADOS.....	- 63 -
4.1.	Estudios comportamentales .....	- 63 -
4.1.1.	Test de campo abierto (OFT) .....	- 63 -
4.1.1.1.	Sin inducción farmacológica .....	- 63 -
4.1.1.2.	Con inducción farmacológica: anfetamina .....	- 64 -
4.1.1.3.	Con inducción farmacológica: apomorfina .....	- 65 -
4.1.2.	Test de actividad rotacional (RT) .....	- 66 -
4.1.2.1.	Con inducción farmacológica: anfetamina .....	- 66 -
4.1.2.2.	Con inducción farmacológica: apomorfina .....	- 68 -
4.1.3.	Test de natación forzada (FST).....	- 71 -
4.1.3.1.	Cámara vertical .....	- 71 -
4.1.3.2.	Cámara frontal .....	- 72 -
4.1.3.2.1.	Desarrollo del software para la evaluación del FST .....	- 75 -
4.1.3.2.1.1.	Interfaz gráfica- entrada .....	- 75 -
4.1.3.2.2.	Procesamiento de imágenes .....	- 77 -
4.1.3.2.3.	Cálculo de parámetros .....	- 79 -
4.1.3.2.4.	Trayectorias .....	- 81 -
4.1.3.3.	Validación.....	- 81 -
4.1.4.	Test de acinesia del miembro anterior (ST).....	- 85 -
4.1.4.1.	Sin inducción farmacológica .....	- 85 -
4.1.4.2.	Con inducción farmacológica: apomorfina .....	- 86 -
4.1.4.3.	Desarrollo del software para la evaluación del ST.....	- 87 -
4.1.4.3.1.	Implementación .....	- 87 -
4.1.4.3.2.	Validación .....	- 90 -
4.2.	Inmunohistoquímica .....	- 92 -
4.2.1.	Tirosina Hidroxilasa.....	- 92 -
4.2.1.1.	Sustancia Nigra .....	- 92 -
4.2.1.1.1.	Adquisición de imágenes.....	- 92 -
4.2.1.1.2.	Parámetros de interés .....	- 94 -
4.2.1.1.3.	Desarrollo del software para la evaluación de neuronas TH+ .....	- 94 -
4.2.1.1.3.1.	Validación.....	- 96 -
4.2.1.1.3.2.	Grado de lesión .....	- 98 -
4.2.1.1.3.3.	Variables estereológicas .....	- 98 -

4.2.1.1.3.4.	Relación entre área ocupada y total de neuronas en cada imagen.....	- 99 -
4.2.1.2.	Cuerpo Estriado .....	- 99 -
4.2.1.2.1.	Adquisición de imágenes.....	- 99 -
4.2.2.	Proteína Ácida Fibrilar de la Glia.....	- 101 -
4.2.2.1.	Sustancia Nigra .....	- 101 -
4.2.2.1.1.	Adquisición de imágenes.....	- 101 -
4.2.2.1.1.1.	Parámetros de interés.....	- 102 -
4.2.2.1.2.	Cuerpo Estriado .....	- 103 -
4.2.2.1.2.1.	Adquisición de imágenes .....	- 103 -
4.2.2.1.2.2.	Parámetros de interés.....	- 105 -
4.2.3.	Relación TH-GFAP .....	- 105 -
4.3.	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia .....	- 106 -
4.3.1.	Determinación de la concentración de Dopamina y DOPAC.....	- 106 -
4.3.1.1.	Sustancia Nigra .....	- 106 -
4.3.1.2.	Cuerpo estriado .....	- 108 -
4.4.	Cultivos primarios de células gliales.....	- 110 -
4.4.1.	Astrocitos .....	- 110 -
4.4.2.	Microglia .....	- 111 -
5.	DISCUSIÓN .....	- 114 -
6.	CONCLUSIONES .....	- 124 -
	BIBLIOGRAFÍA.....	- 127 -



## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional de Córdoba, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y a los responsables del Programa de Doctorado en Neurociencias por la educación pública, laica y gratuita. A los directores, profesores y al personal administrativo de la carrera.*

*A mi director Dr. Ricardo Cabrera por la oportunidad, el espacio y los conocimientos brindados lo que permitió realizar este trabajo de investigación. A mi codirector Dr. Gustavo Baiardi por el acompañamiento y la enseñanza. A la Dra. Ana de Paul y al Dr. Daniel Mascó, miembros de la Comisión Asesora por los valiosos aportes brindados a lo largo de estos años.*

*Al personal directivo, administrativo y técnico del Instituto de Biología Experimental de Cuyo (IMBECU). A la Dra. Susana Valdez, por combinar cariño, saber, buen juicio y disciplina. A todas las demás personas que por mi paso en IMBECU se transformaron en entrañables. A Elisa, Graciela, Mariella, Martha y JP. A mis queridas amigas Estefanía, Tamara, Flavia, Belén, por la compañía, los mates y las canciones cuando ya no quedaba nadie más que nosotras en el instituto, por momentos inolvidables de trabajo y alegría. También a Mariana, Martín, Silvina y Leyla, por estar juntos en esto de ser becarios. A todos ellos, mi agradecimiento por tantos momentos de compañerismo y amistad.*

*A todo el personal de la Universidad de Mendoza, especialmente a la Facultad de Ingeniería por continuar acompañándome en este camino. Gracias a Alfredo, Ana, Silvina, Gastón, Alejandra, Emilce y Pablo. A Ruth y los demás responsables del Programa de Becas Santander Río, por el beneficio de la beca Iberoamérica que permitió mi estancia en el Instituto Cajal en Madrid. A Ricardo y Bibiana, de la Dirección de Investigaciones de la Universidad de Mendoza por el proyecto que facilitó en gran medida la consecución de los resultados que se presentan en este trabajo. A mis compañeras de cátedra Andrea y Cecilia. A mi grupo de laboratorio INBIOMED, Sebastián, Belén, Juan, Mariel, Alicia, Víctor y Carolina por compartir el camino todos los días. A Roberto, Myriam y Antonella por el tiempo compartido. A Fernando, Vanesa, Macarena, Franco y Mauricio porque en INBIOMED nos conocimos y gestamos una profunda amistad, gracias.*

*Tanto aprendí estando en el exterior... A los profes Hernán Lara y Alfonso Paredes (Pocho) por la maravillosa estancia en la Universidad de Chile. A Vale y Agustín por haberme recibido con tanto cariño. A Sara, Constanza, Frenshi, Vale por ser mis más queridas amigas trasandinas. A María de los Ángeles, Íñigo, Elisa y Andrea por haber aceptado a esta argentina en el C01 del Cajal. Al Dr. Luis Miguel García Segura, con admiración. A Ana y Danny por ser tres en Madriz, por los abrazos y buenos momentos. A Lutxy y Zack porque Chiquinquirá fue nuestro hogar.*

*A mis padres, Viviana y Medardo por la alegría de la vida, por compartirla, por amar y tener fe.*

*A Leandro, por el amor, cariño y respeto. A su familia que es la mía. A nuestra familia.*

*A Alfio, mi amado hijo, por llegar en el momento justo y entregarme el mejor título; el ser su mamá. Gracias por elegirme luz de mi vida.*



*A Marco y Guadalupe por enseñarme a luchar y darme las fuerzas más enormes. A mi hermana, María Luvina, siempre.*

*A mi niña científica Natural, por creer en mí y enseñarme que la ciencia es, sobre todo, un juego y que la mejor manera de crear y aprender es jugando.*

*A mis abuelos Edith, Antonino, Vicente, Paula y a la Nana Silvia, al Nono Pipo y Piri por ser mis raíces, mi historia y mis recuerdos. A Pachito.*

*A mis tíos y tías por escuchar las muchas e inconclusas explicaciones acerca de qué se trata el doctorado. Por la confianza, y el aliento.*

*A Moly y a mi padrino Juan Pablo, por el amor de hermanos y por ser los fan n°1.*

*A mis amigas y amigos.*

*A mis queridos estudiantes.*

*Han sido muchos los que me han ayudado a llegar hasta este momento. Algunos están aquí, otros muy lejos, incluso algunos en el cielo. Todos tenemos personas especiales que, con su amor, nos hicieron lo que somos hoy. Humildemente he pensado en cada una de esas personas y he agradecido, ya que ellas me ayudaron a ser quien soy. Especialmente, se dedicaron y se preocuparon por mí, gracias desde lo más profundo de mi alma.*

*¡Qué placer y orgullo sentir de saber la diferencia que han hecho en mi vida!*

## ABREVIATURAS

AC	Adenil cilasa	MPTP	Metil-fenil Tetrahidropiridina
Allo	Allopregnanolona	MSR1	Receptor Captador de Macrófagos 1
AMPC	Adenosin Monofosfato cíclico	MTIR	Metoxitiramina
Anf	Anfetamina	M-MLV	Enzima Transcriptasa Inversa
ANOVA	Análisis de Varianza	NA	Noradrenalina
AP	Antero Posterior	NST	Núcleo subtalámico
Apo	Apomorfina	OFT	Test de Campo Abierto
ATP	Adenosin Trifosfato	ON	Óxido nítrico
BH4	Cofactor tetrahidrobiopterina	ONS	Óxido nítrico sintasa
CA	Catecolamina	PBS	Buffer Fosfato Salino
CD36	Receptor de Colágeno Tipo IV	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio	PI3k/ AkT	Vía fosfoinositol-3-quinasa
COMT	Catecol-O-metiltransferasa	PKA	Proteína quinasa A
CPu	Cuerpo Estriado	PKC	Proteína quinasa C
DA	Dopamina	POETRY	La enfermedad de Parkinson en el reemplazo de estrógenos en los años de la menopausia
DAT	Transportador de Dopamina		Esteroidogénesis
DHPE	Dihidroxifeniletanol	px	Pixel
DMEM F-12	Delbecco's modified Eagle's médium	P2RY6	Receptor Purimidinérgico
DOBA	Dihidroxibenzoido	P4	Progesterona
DOPA	Dihidroxifenilacético	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
DV	Dorso Ventral	RT	Test de Actividad Rotacional
D <sub>1</sub>	Receptor de Dopamina 1	Scrab1	Receptor Eliminador Clase 3 Tipo 1
D <sub>2</sub>	Receptor de Dopamina 2	SEM	Error Estándar de la Media
D <sub>3</sub>	Receptor de Dopamina 3	SIF	Sin Inducción Farmacológica
D <sub>4</sub>	Receptor de Dopamina 4	SN	Sustancia Nigra
D <sub>5</sub>	Receptor de Dopamina 5	SNC	Sistema Nervioso Central
EP	Enfermedad de Parkinson	SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
ERE	Elemento de respuesta a estrógeno	SNpr	Sustancia Nigra pars reticulata
E <sub>1</sub>	Estriol	StAR	Proteína reguladora de la Barra Dental
E <sub>2</sub>	17β-estradiol	TB	Tirosina Hidroxilasa
E <sub>3</sub>	Estrona	TH	Cuerpos celulares positivos a TH
FBS	Suero Fetal Bovino	TH+	Tirosina
FST	Test de Natación Forzada	Tir	Receptor de Disparo Expresado en Células Mieloides 2
GABA	Ácido Gammaaminobutírico	TREM2	Proteína traslocadora
GADPH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa	TSPO	Ácido vanílico
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar de la Glía	VA	Transportador monoamínico vesicular 2
GP	Globo pálido	VMAT2	Alfa sinucleína
GPe	Globo pálido externo	α-sin	Metoxitirosina
GPI	Globo pálido interno	3MT	Gen Ribosomal de Transferencia
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	36B4	6-hidroxidopamina
HMPE	Hedroxi-metoxi.feniletanol	6-OHDA	
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución		
HVA	Acido homovanílico		
IHQ	Inmunohistoquímica		
L-DOPA	Levodopa		
MAO	Monoaminoxidasa		
ML	Medio Lateral		

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurológico degenerativo y progresivo secundario a una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriada. En las últimas décadas se ha convertido en uno de los desórdenes neurodegenerativos más comunes. Paralelamente al aumento de la expectativa de vida, la EP se ha incrementado significativamente, por lo que se prevé que se transforme en un serio problema de salud pública a nivel mundial.

La degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas en la pars compacta de la sustancia nigra (SN) y el déficit dopaminérgico en el cuerpo estriado (CPu), genera modificaciones funcionales de los ganglios basales con las consecuentes disfunciones motoras características en el ser humano (temblores, rigidez, bradicinesia, trastornos en la marcha).

Aunque actualmente se conoce bastante acerca de los síntomas, poco se sabe sobre su exacta etiología. El diagnóstico suele ser tardío, cuando más del 80% de las neuronas dopaminérgicas se han degenerado. A pesar de los avances científicos, no existe aún un tratamiento efectivo para frenar su progresión y la búsqueda de marcadores biológicos hasta el momento ha sido poco fructífera.

Muchos grupos de investigación se han abocado a identificar marcadores tempranos que permitan un abordaje más efectivo en el estudio de esta enfermedad; por lo que se proponen múltiples teorías que podrían explicar el fenómeno neurodegenerativo. Particularmente, el modelo de hemiparkinsonismo (HP) de ratas inyectadas con la neurotoxina 6-OHDA (6-hidroxidopamina) en CPu, ha demostrado ser una excelente herramienta para estudiar los efectos de los neuroesteroides y otras moléculas sobre los procesos fisiopatológicos involucrados en esta enfermedad.

El cambio en la vista tradicional de que la función del cerebro está modulada por hormonas de origen periférico surgió mediante el hallazgo de que ciertos esteroides (incluidos los sexuales) se producen *de novo* en el Sistema Nervioso Central (SNC), por lo que han sido llamados “Neuroesteroides” y los secretados por glándulas periféricas “Esteroides Neuroactivos”. Esto ha permitido identificar propiedades benéficas de algunas de estas moléculas en el SNC tanto en humanos como en modelos animales de la enfermedad, tales como protección frente a noxas, potenciación de capacidades cognitivas y neurogénesis. Sumado a esto, se ha descrito que estas moléculas se unen a sitios específicos de la membrana en células nerviosas en regiones del SNC que regulan funciones diferentes a aquellas implicadas en las funciones reproductivas.

En relación a que esta patología afecta mayormente a hombres que a mujeres; se cree que los esteroides sexuales femeninos podrían proteger a las mujeres de la EP. Existen numerosos reportes que demuestran la influencia de los esteroides sexuales femeninos en los mecanismos neuroprotectores en la EP. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio indican que el tratamiento subcutáneo con P4 en un modelo de ratas macho hemiparkinsonianas (HP), mejora la disfunción motora e induce efectos neuromoduladores sobre los sistemas de neurotransmisión estriatal. También, hemos demostrado que P4 y Allo

modulan la actividad del sistema dopaminérgico nigroestriatal y que esta modulación es diferencial dependiendo de la dosis de esteroide administrada o el estado del ciclo reproductivo de la rata.

Otros estudios experimentales demuestran la existencia de una amplia gama de acciones del 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) sobre el SNC de los mamíferos (que exceden a su clásica función reguladora sobre el eje hipotálamo-hiposario-gonadal), tales como: promotoras de la supervivencia celular, moduladoras la sinaptogénesis y de la arborización axonal y dendrítica y reguladoras de la expresión de receptores y segundos mensajeros. Por lo tanto, por tener capacidades tanto tróficas como moduladoras dentro del SNC, se cree que E<sub>2</sub> tiene funciones cruciales en la protección del cerebro lesionado y participa en la reparación/ limitación de daños diseñados para reducir la muerte celular.

Basados en la hipótesis de que los esteroides neuroactivos y los neuroesteroides modulan la funcionalidad de sistemas neurogliales íntimamente relacionados con patologías neurodegenerativas; propusimos estudiar, utilizando un modelo experimental de ratas macho adutas HP inducido por 6-OHDA, la participación del esteroide neuroactivo 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) como un factor neuroprotector y/o neuroregenerador sobre las redes neuronales asociadas al control de la funcionalidad dopaminérgica del sistema nigroestriatal.

Dentro del amplio espectro de acción conocido del E<sub>2</sub>, nuestra propuesta se enfocó en el estudio de la actividad dopaminérgica en la vía dopaminérgica nigroestriatal, asociado con el comportamiento y la actividad motora. En particular, para la evaluación de la natación forzada, de la acinesia del miembro anterior y para la determinación de neuronas reactivas a tirosina hidroxilasa (TH+) en sustancia nigra, desarrollamos sistemas informáticos en relación a la adquisición, el cálculo y el análisis datos. Así detectamos de manera precoz y con alta sensibilidad las modificaciones motoras, locomotoras e inmunohistoquímicas; eliminando la subjetividad y la cuantificación directa o manual de las observaciones. Las técnicas automatizadas están desarrolladas con software libre y pueden ser compartidas con los usuarios a través de un sistema de actualización integrado.

Con una batería de evaluaciones comportamentales a lo largo de ocho semanas, observamos un deterioro de la actividad locomotora y exploratoria en los animales HP. También pudimos examinar el efecto del tratamiento en la disminución de los signos neurodegenerativos y en la restauración del movimiento, a corto y largo plazo. Los resultados revelaron que los signos motores de neurodegeneración propios de la EP pueden estar influenciados por la administración del 17 $\beta$ -estradiol; sugiriendo un rol neuroprotector del esteroide neuroactivo en este modelo *in vivo* de la EP.

Gran cantidad de estudios relacionan los resultados de los test comportamentales y la pérdida de neuronas TH+ y de dopamina (DA) en la vía dopaminérgica nigroestriatal. Investigamos los efectos del 17 $\beta$ -estradiol a nivel celular y encontramos que permite activar mecanismos compensatorios sobre la síntesis y liberación de DA en SN *pars compacta* (SNpc) y CPu en animales lesionados. Vimos además que se produce un cambio en la dinámica de funcionalidad dopaminérgica donde los valores de la actividad metabólica tienden a restaurarse a niveles fisiológicos. Estos resultados evidencian que las deficiencias comportamentales observadas fueron consistentes y sugieren que el 17 $\beta$ -estradiol está actuando a nivel de las neuronas en relación a la síntesis de DA, mejorando las anormalidades que se presentan en los animales lesionados.

En relación a los astocitos, pudimos observar que, tanto la neurotoxina como la lesión mecánica aumentan la reactividad de la astrogliia. Asimismo, el tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol disminuye el número de astrocitos reactivos en los animales lesionados. Además, aminora el

cambio en la astrogliá reactiva en relación al daño mecánico, disminuyendo el tamaño de la cicatriz glial y la proliferación de los astrocitos. Pudimos también establecer una relación entre las neuronas y astrocitos en la SNpc que permite analizar variables como el comportamiento de la lesión, la respuesta al daño y la evolución de cada proceso para cada grupo en particular.

En general, la evidencia disponible apoya la opinión de que los astrocitos son objetivos importantes para los estrógenos circulantes, lo que podría contribuir a las diferencias de sexo en la EP. En particular, observamos que el 17 $\beta$ -estradiol participa en la regulación de activación de las vías dopaminérgicas a través de los receptores D1 y D2 en cultivos de astrocitos; por lo que (al modular la expresión de los receptores) está influyendo en la síntesis, liberación y metabolismo de la DA.

Los resultados sugieren que las células responden a fenómenos plásticos compensatorios que actúan bidireccionalmente por interacciones neurona-glía; y que el tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol está promoviendo la supervivencia celular, la recuperación y la reparación.

Aunque las implicaciones funcionales requieren mayor estudio, los datos sugieren que en los machos los astrocitos pueden generar una mayor respuesta neuroinflamatoria potencialmente dañina, mientras que en las hembras los astrocitos contribuyen a compensar y promover la supervivencia.

Sumado a esto, nuestros resultados muestran que el tratamiento participa en la modulación de factores pro y anti inflamatorios en cultivos de microglia.

Observamos que las células de la microglia de los animales macho que no habían recibido tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol aumentaron la expresión de marcadores pro inflamatorios y disminuyeron significativamente la expresión de factores antiinflamatorios. Sugiriendo que el tratamiento es un poderoso regulador de la actividad de las células microgliales.

En conjunto, todas estas aproximaciones nos brindaron una amplia variedad de resultados los cuales nos permitieron clarificar el entendimiento sobre la función neuroprotectora del 17 $\beta$ -estradiol en las células neurogliales de la vía dopaminérgica nigroestriatal en estados fisiológicos y patológicos. Los datos presentes muestran la potencialidad terapéutica del tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol tras la lesión con 6-OHDA; en el que este esteroide neuroactivo podría desempeñar un papel importante en el restablecimiento de las propiedades fisiológicas y morfológicas de las neuronas dopaminérgicas y células de la glía lesionadas, así como mejorar las sinapsis y la liberación a través de los receptores específicos de DA. Por lo expuesto, se estima que el tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol podría ser una terapia beneficiosa para patologías donde se vea afectada la síntesis, el transporte y la liberación de dopamina en el SNC.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP), una patología caracterizada por temblor en reposo, bradicinesia y pérdida de los reflejos posturales, fue descrita por James Parkinson en 1817 con el nombre de parálisis agitante (Parkinson, 1817).

El *Ayurveda* (Ayu=vida, veda=ciencia), reconocido como el sistema médico más antiguo del mundo que data de 4500 a.C, hace referencia a la parálisis agitante como *Kampavata* (kampa=temblor, vata=humor responsable del movimiento o las sensaciones, incluidos los actos motores) (Manyan, 1990). En esta descripción se incluyen: la falta de propensión al movimiento (probablemente acinesia), la salivación, tendencia a la soledad (posiblemente debida a la depresión), somnolencia constante y mirada fija. Particularmente, en relación al movimiento, se describe el temblor excesivo, temblor del esqueleto, temblor cefálico, pérdida de movimiento, rigidez generalizada y tartamudeo.

Puntualmente, en relación al movimiento Parkinson escribe en su ensayo “*movimiento involuntario tremulante con disminución parcial de la potencia muscular, en parte, no durante la acción, y aún apoyado, con una tendencia a inclinar el tronco hacia delante y a pasar de un paso de marcha al de correr.*” En su observación también indica que los inicios de la parálisis agitante son insidiosos, y que se pueden establecer estadios. La primera etapa con temblores de la cabeza, pero principalmente y más frecuencia de temblores en las manos o brazos. El segundo estadio consiste en un aumento de los síntomas en las partes primeramente afectadas y en la extensión gradual que involucra a las regiones simétricas en el lado opuesto del cuerpo. A medida que la enfermedad avanza, la incapacidad aumenta progresivamente, con marchas cada vez más tediosas, movimientos que no responden a la voluntad y dificultades en la masticación y deglución. Asimismo, los pacientes presentan somnolencia y agotamiento pronunciado.

Esta descripción del cuadro clínico fue enriquecida por las contribuciones de Marshall Hall (Hall, 1841), quien agrega características sobre un caso de un joven con hemiparkinson, y temblores que sufren los trabajadores de minas de mercurio. El conocimiento del cuadro aumenta con las destacables las colaboraciones de Trousseau (Trousseau y cols., 1868) y Charcot (Charcot & Vulpian, 1872; Charcot, 1892). Trousseau enunció los trastornos intelectuales (relacionados con la pérdida de memoria) que pueden ocurrir en estadios avanzados de la enfermedad, el concepto de rigidez muscular y definió la bradicinesia. Charcot por su parte, describió en base a informaciones anatomopatológicas, que la enfermedad corresponde a las neurosis, diferenció el temblor parkinsoniano, la postura característica del enfermo, la tendencia a propulsión y retropropulsión y la pérdida del equilibrio. En su estudio resume: “*las lesiones específicas de la parálisis agitante aún deben ser buscadas*” (Charcot, 1892).

William Gowers (Gowers, 2007) en el Manual de Enfermedades del Sistema Nervioso, resume su experiencia de la EP, y encuentra un leve predominio en los pacientes de sexo masculino (63% en 80 casos). En cuanto a la edad de comienzos de los síntomas, indica que

se manifiestan generalmente después de los 40 años, con el más precoz de los casos encontrados a los 29 y el más tardío a los 69. En un 15% halló susceptibilidad hereditaria.

En 1912, Friedrich Heinrich Lewy describió los cuerpos de inclusiones concéntricas en el citoplasma de células de la SN que hoy llevan su nombre (Lewy, 1912). Tetriakoff, en 1919 destacó que las células pigmentadas de la SN se reducen en la EP (confirmando las observaciones de Lewy) y relacionó estos cambios con las anomalías del tono muscular de los pacientes examinados (Tetriakoff, 1919). Estudios posteriores destacaron que la afección predominante en la SN ocurría en la zona compacta de esa estructura (Bethlem & Den Hartog Jager, 1960).

Se han descrito cuatro signos motores cardinales 1) temblor de reposo, 2) rigidez, 3) bradicinesia-hipocinesia e 4) inestabilidad postural, los cuales se complementan con otros signos-síntomas de naturaleza no motora como trastornos emocionales, alteraciones sensitivas, problemas de sueño, trastornos gastrointestinales, deterioro cognitivo y trastornos autonómicos (Hayes y cols., 2010).

Sin tratamiento, la EP produce un acortamiento de la esperanza de vida y se calcula una expectativa de unos 20 años desde la aparición de los primeros signos motores cardinales de la enfermedad (Savica y cols., 2010).

Uno de los primeros tratamientos de la EP comienza con la observación de que una sustancia inhibitoria sobre la actividad motora de conejos, la reserpina, podía ser revertida con la administración de DA (Carlsson y cols., 1957; Carlsson, 1959). Además, este hallazgo potenció en aquel entonces la observación de que la concentración de DA estaba disminuida en ciertos ganglios basales en la EP. Como consecuencia, en 1961 Birkmayer y Hornykiewicz, administraron levodopa (L-DOPA) a pacientes parkinsonianos (Birkmayer & Hornykiewicz, 1964). Aunque este tratamiento mejoraba significativamente los signos y síntomas, en el transcurso de la terapia se evidenciaba intolerancia a la medicación, necesidad de dosis terapéuticas más altas y duración de acción del fármaco corta (Cenci y cols., 1998; Murer y cols., 1998; Perier y cols., 2003; Nicoletti y cols., 2007).

Melvin Yahr desarrolló la escala con estadios que lleva su nombre (Olanow, 2004) y realizó un estudio prospectivo de doble ciego controlado con placebo y L-DOPA en la EP, donde demostró la eficacia clínica de este tratamiento. Posteriormente, se complementó su administración con un inhibidor periférico de la dopa descarboxilasa (bencerasida y la carbidopa), o de agonistas dopaminérgicos selectivos para los receptores dopaminérgicos D2 (bromocriptina, pramiprexole) que disminuyeron de manera significativa la aparición de discinesias tardías. Avances sobre el tratamiento llevaron a que, en la actualidad la carbidopa y L-DOPA sean el tratamiento más eficaz contra la EP (Cotzias y cols., 1967).

Esta enfermedad ha afectado a varias personalidades famosas, siendo destacable el caso del actor Michael J. Fox que desarrolló la enfermedad a los 29 años y creó una fundación para promover el conocimiento y financiar investigaciones (Kempster, 2004).

De las teorías etiológicas, hay evidencia de que la EP tiene como uno de los factores de riesgo más importantes una historia familiar positiva (Allam y cols., 2005). Estos hallazgos se refuerzan con avances recientes en genética molecular, donde se ha encontrado que la proteína neuronal alfa sinucleína ( $\alpha$ -sin, componente mayor de los cuerpos de Lewy), está presente en los pacientes portadores de la EP y también en aquellos que presentan la forma esporádica de la enfermedad (Vila & Przedborski, 2004).

Otra de las teorías etiológicas tiene base en los efectos tóxico ambientales que evidencian la exposición de personas a drogas de uso recreacional contaminadas con una sustancia conocida como metil-fenil tetrahidropiridina (MPTP) que produce el daño y muerte neuronal

de células dopaminérgicas por oxidación y daño mitocondrial (Greenamyre & Hastings, 2004)

## 1.2. Núcleos de la base

Este término hace referencia a todas las masas subcorticales de la sustancia gris situadas en los hemisferios cerebrales que incluyen al núcleo caudado, lenticular, antemuro (claustró), complejo nuclear amigdalino y el tálamo (Nolte, 1994). Debido a que el núcleo subtalámico (NST) y la SN poseen relación funcional con estas estructuras, también se los considera dentro de esta clasificación (Williams & Warwick, 1995). Por lo tanto, en la Figura 1.2.1 se muestran los núcleos comprenden los ganglios basales.

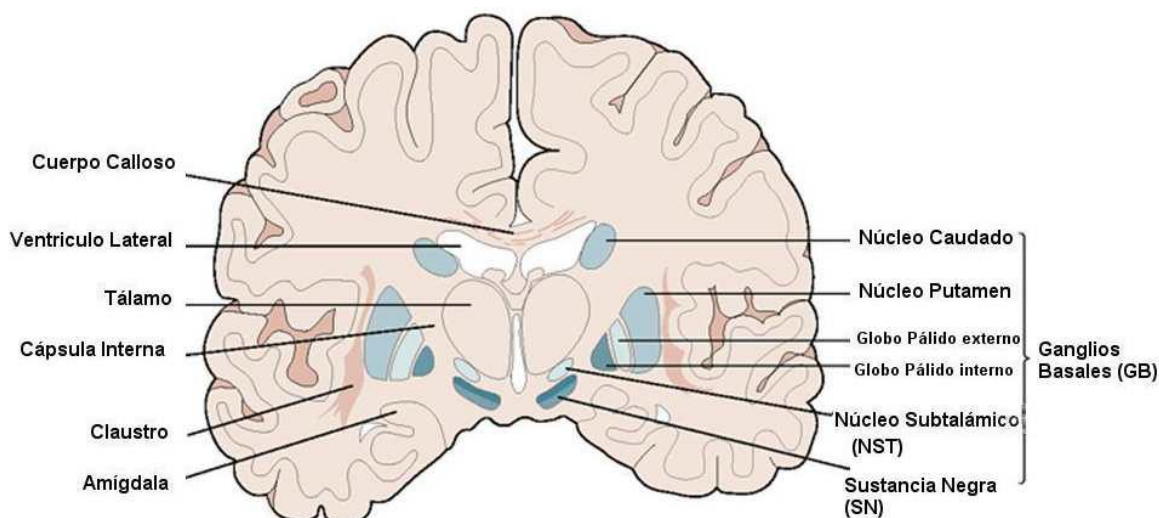


Figura 1.2.2 Corte coronal del cerebro con los ganglios de la base en relación a sus estructuras vecinas. Modificada de Kandel y cols. (Kandel y cols., 2001).

El CPu es la estructura más extensa y se divide en dos partes: dorsal y ventral. La porción dorsal está formada por los núcleos caudado y lenticular (putamen y globo pálido), y la porción ventral está constituida por el tubérculo olfatorio, el núcleo acústico y la parte ventral del GP (Carpenter y cols., 1994). Está compuesto en un 95% por neuronas espinosas de tamaño intermedio y un número reducido de interneuronas, es el receptor subcortical de conexiones por excelencia (Figura 1.2.2).

Se sabe que la porción dorsal interactúa de modo predominante con la neocorteza y que la parte ventral se relaciona con la corteza orbito frontal, temporal y con el sistema límbico (Williams & Warwick, 1995).



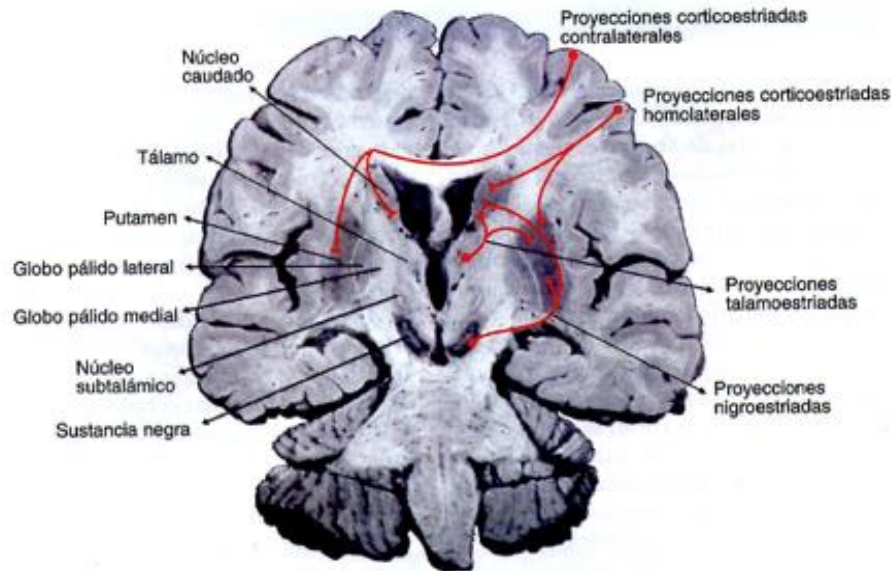


Figura 1.2.3 Esquema de las principales proyecciones aferentes al núcleo caudado y putamen. Las proyecciones corticoestriadas son bilaterales con predominio homolateral; las contralaterales cruzan la línea media por el cuerpo caloso. Las proyecciones talamoestriadas alcanzan al CPu. Las nigroestriadas se originan en la SN y se proyectan sobre el CPu. Modificada de Diaz & Mascitti (Diaz & Mascitti, 2006).

Si bien las principales fibras eferentes se dirigen al globo pálido, otras se proyectan hacia la SN y el tálamo como se muestra en la siguiente figura (Figura 1.2.3).

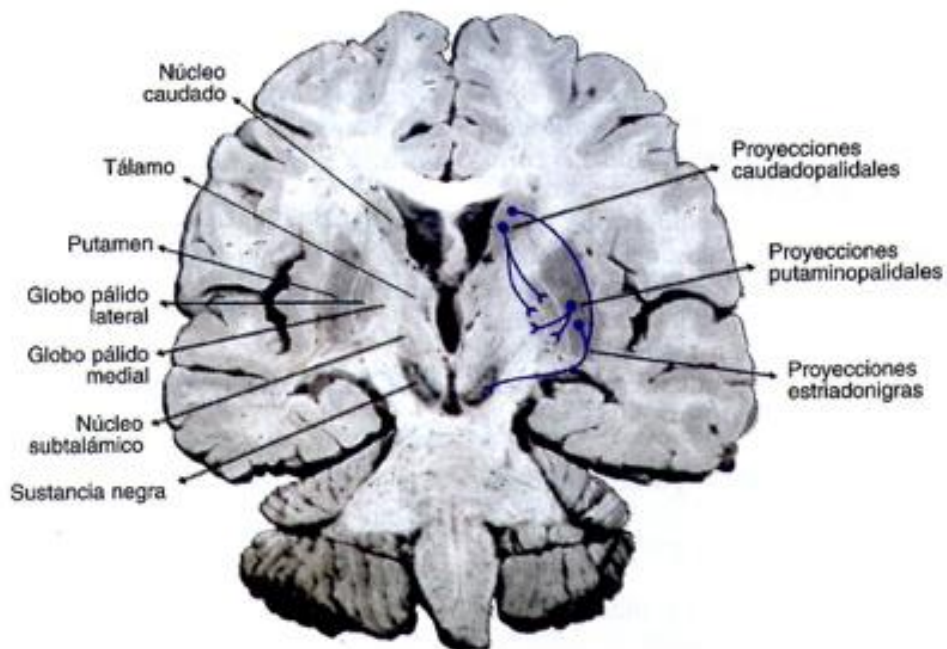


Figura 1.2.4 Esquema de las eferencias del núcleo caudado y putamen. Las proyecciones estriadopalidales se originan en el núcleo CPu y se dirigen a ambos segmentos del globo pálido. Las proyecciones estriadonigras provienen del núcleo CPu y se proyectan principalmente sobre la porción reticular de la SN. Modificada de Diaz & Mascitti (Diaz & Mascitti, 2006).

La SN representa las masas nucleares de mayor tamaño del mesencéfalo. Las investigaciones más recientes sugieren que sea dividida en cuatro secciones: parte reticular (SNpr), parte compacta (SNpc), lateral y una parte con células mixtas en la superficie dorso medial de la parte compacta (Alheid y cols., 1990). Cabe destacar que, de estas divisiones, el área más relevante para este trabajo es la SNpc; estas estructuras en conjunto con la parte lateral corresponden al grupo celular A9 y contienen la mayor población de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Particularmente, la citoarquitectura de la SNpc es rica en células de gran tamaño, con dendritas largas pobres en espinas.

Las proyecciones aferentes de la SN pueden ser: estriadonigras (neuronas espinosas medianas provenientes del CPu que terminan en SNpr), palidonigras (se originan en el sector lateral y medial del globo pálido y alcanzan SNpr y SNpc), subtalomonigras (originadas en el núcleo subtalámico y destinadas a la SNpr) y corticonigras (que inician en los sectores corticales y alcanzan SNpc y SNpr) (Diaz & Mascitti, 2006). Por otro lado, las proyecciones eferentes más relevantes para este trabajo son las nigroestriadas que se originan en SNpc proyectando en forma bilateral con predominio homolateral en el CPu. Además, se encuentran las fibras nigrotalámicas y nigrotectales.

Las conexiones de los núcleos de la base generan que la organización sea la de una vía multisináptica recurrente, donde las aferencias provienen de la corteza cerebral, el tálamo y la SN y las eferencias proyectan de nuevo a la corteza a través del tálamo. Dentro de las funciones destaca principalmente la organización motora, pero también son importantes la coordinación y regulación de fenómenos cognitivos y comportamentales.

La vascularización de estas estructuras recibe aporte de las ramas ganglionares provenientes del círculo arterial cerebral y de arterias adyacentes (Carpenter y cols., 1994; Williams & Warwick, 1995).

### 1.3. Sistema dopaminérgico

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente luego de la enfermedad de Alzheimer. Es una enfermedad crónica, progresiva e irreversible, secundaria a una degeneración de las neuronas DA de la vía nigroestriatal.

Dentro de la variada gama de neurotransmisores presentes los ganglios basales, alrededor del 70% de la DA se encuentra presente en el CPu. Según la extensión de sus proyecciones, existen tres tipos de neuronas dopaminérgicas: las ultracortas ubicadas en la retina y en el bulbo olfatorio, las de longitud intermedia ubicadas sobre todo en la región hipotálamo-hipofisaria, y las de prolongación larga que se hallan en los cuerpos celulares en el mesencéfalo. Este tercer tipo es el más importante por su envergadura y además se subdivide en mesoestriado y mesolímbico. El primero se proyecta desde la SNpc a todo el CPu y puede diferenciarse a su vez en un sistema dorsal y ventral según donde se proyecten sus terminales. El estriado está invadido por una multitud de varicosidades dopaminérgicas que son levemente más grandes en la porción ventral (Dahlstorm & Fuxe, 1964; Lavoie y cols., 1989). Cuando las terminales dopaminérgicas hacen contacto con las dendritas de las células espinosas en el CPu, fundamentalmente sobre las que reciben conexiones corticales, el sistema dopaminérgico modula la actividad de las conexiones corticales excitadoras sobre la célula espinosa (Parent & Hazrati, 1995).

### 1.3.1. Síntesis y liberación de DA

Como se muestra en la Figura 1.3.1.1, la DA se sintetiza en las neuronas dopaminérgicas y en sus terminales a partir de tirosina, la cual a su vez se produce por acción de la fenilalanina hidroxilasa sobre la fenilalanina. La tirosina atraviesa la barrera hematoencefálica por intermedio de un transportador enzimático y llega a la célula dopaminérgica, donde es transformada en DA por la acción de tirosina hidroxilasa (TH). Esta enzima es la limitante en la cascada de la síntesis de DA. La L-dopa se descarboxila por acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa y se transforma en DA, que es captada activamente por un sistema de captación dependiente de ATP (transportador) y almacenada en vesículas en forma de complejos de ATP y proteínas llamadas cromograninas, para luego ser liberada como neurotransmisor. Este almacenamiento puede ser bloqueado por fármacos como la reserpina (Fernández Pardal y cols., 2006).

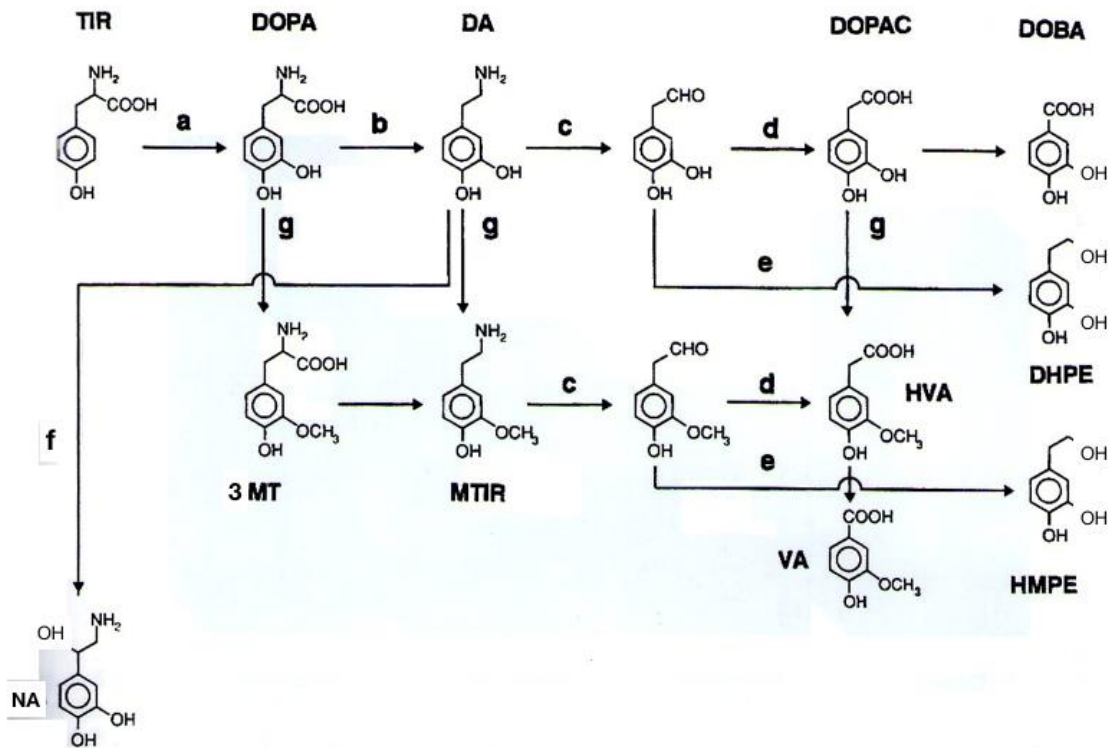


Figura 1.3.1.1 Cadena de síntesis y degradación de DA. Tir: Tirosina; DOPA: dihidroxifenilalanina; DA: dopamina; HVA: ácido homovanílico; DOPAC: dihidroxifenilacético; DHPE: dihidroxifeniletanol; VA: ácido vanílico; DOBA: dihidroxibenzoico; 3MT: metoxitirosina; MTIR: metoxitiramina; NA: noradrenalina; HMPE: hedroxi-metoxi.feniletanol. a) TH: tirosina hidroxilasa, b) descarboxilasa, c) MAO: monoaminoxidasa, d) aldeído deshidrogenasa, e) alcohol deshidrogenasa, f) dopamina betahidroxilasa, g) COMT: catecol-O-metiltransferasa. Modificado de Fernández Pardal (Fernández Pardal y cols.).

La DA es liberada por las terminales neuronales cuando éstas se despolarizan al arribar el potencial de acción, el cual abre los canales dependientes de calcio activados por voltaje. La entrada de calcio produce la fusión de vesículas con la membrana terminal y la liberación del contenido granular.

### 1.3.2. Receptores de DA

La DA ejerce su acción en las neuronas de los ganglios basales a través de su unión a receptores específicos que inicialmente fueron divididos en D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> por su conexión con el segundo mensajero, la adenilcilasa, y por sus diferencias entre agonistas y antagonistas. La secuencia de aminoácidos de estos receptores revela que provienen de una superfamilia con siete dominios transmembrana y acoplados a proteína G. Más recientemente, se han establecido diferencias en la secuencia de aminoácidos de la estructura molecular de estos receptores, en el loop intracitoplasmático que gobierna la unión a la proteína G, y últimamente se han clonado los receptores D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> (de la subfamilia D<sub>2</sub>) y D<sub>5</sub> (de la subfamilia D<sub>1</sub>) (Fernández Pardal y cols., 2006).

Los receptores de la subfamilia D<sub>1</sub> se acoplan con la subunidad alfa de la proteína estimuladora G y activan adenilcilasa, lo cual incrementa la producción de AMP cíclico (AMPC) (Bahena Trujillo y cols., 2000). Por otra parte, la subfamilia de D<sub>2</sub> está conectada con proteína G inhibidora, la cual disminuye la producción de AMPC.

Si bien la presencia de receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> se ha confirmado en neuronas del CPU y otras estructuras; su presencia aún es motivo de controversia donde se cree que D<sub>1</sub> ejercería efectos facilitadores sobre la vía directa mientras que los efectos de D<sub>2</sub> serían inhibitorios sobre el sistema indirecto estriotalámico (Surmeier y cols., 1994; Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

Los receptores D<sub>3</sub> también se expresan en el CPU y en áreas límbicas; D<sub>4</sub> se ha identificado en corteza frontal y D<sub>5</sub> en circuitos límbicos (Sunahara y cols., 1991; Bahena Trujillo y cols., 2011).

En la siguiente tabla se muestran las principales características de cada receptor.

Subtipo	Familia D <sub>1</sub>		Familia D <sub>2</sub>		
	D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
Gen cromosómico	5q35.1	4p16.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5
Nº de intrones codificantes	-	-	6	5	3
Nº de aminoácidos	446	477	414-443	400	387
Acoplamiento a proteínas G	G <sub>αs</sub> , G <sub>αolf</sub>	G <sub>αs</sub> , G <sub>αq</sub>	G <sub>αi</sub> , G <sub>αo</sub>	G <sub>αi</sub> , G <sub>αo</sub>	G <sub>αi</sub> , G <sub>αo</sub>
Afinidad por DA	μM	Sub-μM	μM	nM	submicromolar
Agonistas selectivos	SKF-38393 SKF-81297 Fenoldopam	SKF-38393	Bromocriptina Pergolida Cabergolina Ropinirole	7-OH-DPAT Pramipexole Rotigotina	A-412997 ABT-690 PD-168,667
Antagonistas selectivos	SCH-23390 SCH-39166 SKF-83566	SCH-23390	Haloperidol Racloprida Sulpirida Risperidona	Nafadotrida GR103,691,218,231 SB 277011A	A381393 FAUC213 L745,870,750,667

Tabla 1.3.2.1 Características de los receptores dopaminérgicos. Adaptado de Bahena y Beaulieu (Bahena Trujillo y cols., 2000; Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

Los receptores también se encuentran en la pre sinapsis de la misma célula dopaminérgica, donde cumplen funciones reguladoras de la sinapsis de DA, y en su liberación a la hendidura

sináptica (Skirboll y cols., 1979). La transmisión dopaminérgica depende entonces de la liberación por exocitosis de la DA ubicada en vesículas sinápticas, de unión a receptores específicos que median la transmisión de señales y luego de la disociación del receptor; también depende de un sistema eficiente de recaptación de DA ubicado en la hendidura sináptica. Este sistema de recaptación puede ser bloqueado farmacológicamente por acción de anfetaminas y cocaína. El ciclo lo completa otro sistema de transporte que bombea DA desde el citosol presináptico a las vesículas sinápticas. En los últimos años se ha identificado que gran parte de esta tarea es realizada por el transportador de DA (DAT) (Guastella y cols., 1990; Giros y cols., 1992); el mecanismo de la liberación y recaptación de DA se muestra en la siguiente figura.

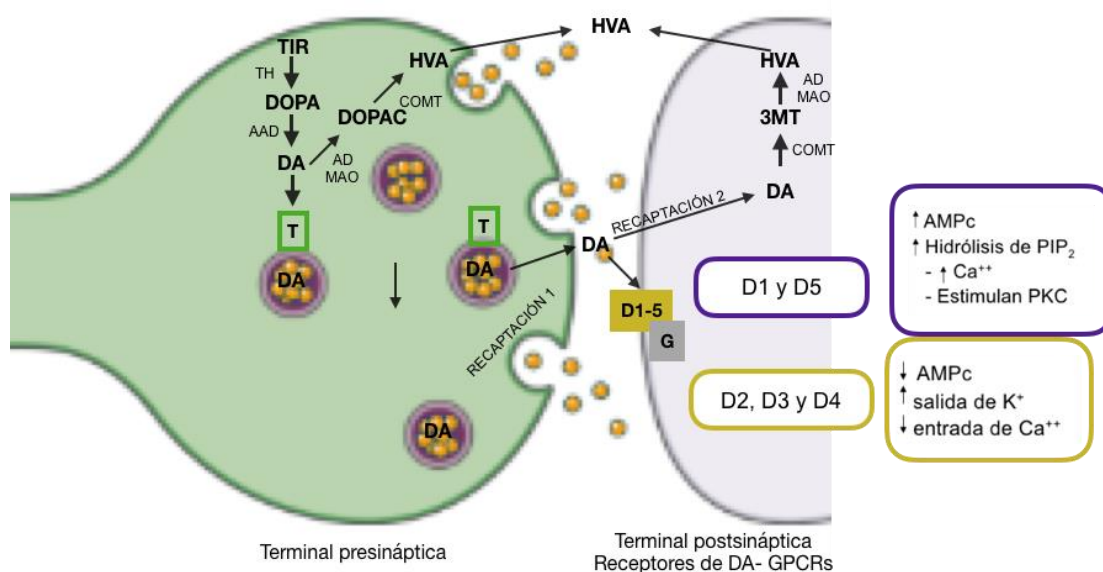


Figura 1.3.2.1 Esquema de terminal dopaminérgica. Modificado de Fernández Pardal (Fernández Pardal y cols., 2006).

### 1.3.3. Enzimas involucradas en la síntesis y catabolismo dopaminérgico

Tirosina hidroxilasa (TH) es una enzima (de alrededor de 20 kDa) expresada en neuronas catecolaminérgicas y se considera su marcador. Se encuentra presente en distintas regiones del cerebro, principalmente en los ganglios basales. Cuando la DA en la EP disminuye, esta enzima se halla reducida en la SN y CPU de los pacientes (Haycock & Haycock, 1990). La función de TH es catalizar el paso limitante de la síntesis de DA. En estado fisiológico, TH a menudo no está saturada ya que posee una constante de disociación de orden micromolar y, quien controla la reacción es la cantidad de cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) (Haycock & Haycock, 1990). TH está compuesta por dos partes, un segmento catalítico (ubicado en el segmento C-terminal) y un segmento regulador (ubicado en el segmento N-terminal). Su configuración depende de los residuos de cisteína a través de



puentes disulfuro que interaccionan con hierro. En la SN hay altas concentraciones de hierro (Fujisawa & Okuno, 1989). El segmento N-terminal inhibe la actividad de la enzima y es regulado a través de fenómenos de fosforilación. Asimismo, la despolarización de terminales catecolaminérgicas resulta en un fenómeno de fosforilación que aumenta la actividad de la enzima.

Es importante destacar que la DA liberada en la hendidura sináptica puede también controlar la actividad de TH por medio de la estimulación de receptores presinápticos dopaminérgicos (Lee y cols., 1989).

Otra de las enzimas de gran interés es la monoaminoxidasa (MAO). Esta proteína mitocondrial es probablemente la más importante en la degradación de monoaminas intercelulares. Tiene dos formas MAO-A y MAO-B que se diferencian en cuanto a sus propiedades inmunológicas, distribución celular y especificidad para sustrato e inhibidor (Kalaria y cols., 1988). Ambas formas se ubican en neuronas y células gliales del cerebro, pero cabe destacar que la forma MAO-A tiene predilección por las neuronas dopaminérgicas (Konradi y cols., 1988).

Finalmente, la enzima catecol-oxígeno metiltransferasa (COMT) tiene como función general eliminar los catecoles biológicamente activos o tóxicos y otros metabolitos oxidados. Se distribuye extensamente en el organismo, en hígado, pulmón riñón, etc. En el tejido nervioso se localiza en células gliales. La isoenzima presente en cerebro tiene 271 aminoácidos y está relacionada con el metabolismo de pequeñas cantidades de sustrato (Guldbergn & Marsden, 1975).

## 1.4. Organización anatómofuncional fisiológica y fisiopatológica de los ganglios basales.

### 1.4.1. Actividad motora normal

La ejecución de todo movimiento voluntario requiere información acerca del contexto sensitivo en el que se va a realizar (planificación), intención del movimiento a ejecutar (iniciación) y el estado de las partes del cuerpo que lo realizarán (coordinación). Toda esta información es aportada por dos circuitos neurales en paralelo que involucran a los ganglios basales y al cerebelo. Estas estructuras modulan su actividad mediante una región central de procesamiento, núcleos de relevo intermedios, la afluencia de múltiples aferencias corticales y la proyección de sus eferencias nuevamente hacia la corteza.

En lo que respecta a la organización anatómica y funcional, los ganglios basales resultan ser fundamentales para el estudio de la fisiología y fisiopatología de la ejecución del movimiento. En este circuito, el CPU es la puerta de entrada a las inervaciones glutamatérgicas corticales y estas aferencias están casi exclusivamente moduladas por inervaciones dopaminérgicas de la SNpc.

En 1989 (Albin, 1989) propuso un modelo dividido en directo e indirecto (Figura 1.4.1.1). El circuito directo es monosimpático y proyecta sobre la región sensitivomotora del Gpi y la SNpr. Tiene su origen en neuronas GABAérgicas espinosas medias que expresan receptores de la familia D<sub>1</sub>. Su acción es inhibitoria.

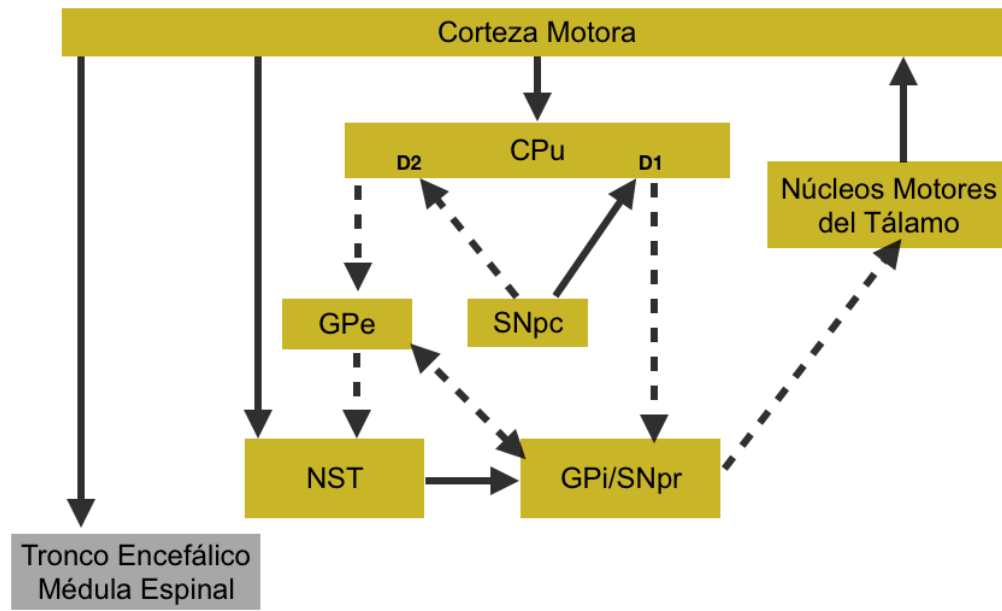


Figura 1.4.1.2 **Modelo anatómico del circuito corticobasal talamocortical.** Estado fisiológico. Las líneas sólidas representan sinapsis excitatorias; las interlineadas, sinapsis inhibitorias. El grosor indica la actividad (aumento o disminución, según sea el caso) de la transmisión en las conexiones. Modificado de Simon y cols. (Simon y cols., 2008).

Un concepto importante para comprender cómo influyen los GB en el control motor cortical es la desinhibición. En un circuito desinhibitorio simple, una neurona inhibitoria transitoriamente activa (CPu) hace sinapsis sobre una neurona inhibitoria tónicamente activa (GPM) que luego hace sinapsis sobre una neurona excitatoria de los núcleos motores del tálamo (complejo talámico VA/VL). Cuando la inhibición tónica generada por el circuito es interrumpida transitoriamente por acción de la primera neurona, otras aferencias pueden excitar a la célula blanco y hacer que dispare. De esta forma, dos neuronas inhibitorias pueden en realidad facilitar la excitación transitoria de una tercera neurona blanco.

Esta inhibición se desarrolla en uno de los principales circuitos funcionales de los GB, la vía directa. De esta manera, las neuronas del CPu tienen escasa actividad espontánea y son activadas transitoriamente por inervación cortical (glutamato). La actividad cortical suele comenzar antes del inicio del movimiento y cesa una vez que ha comenzado. Cuando las neuronas palidales son inhibidas transitoriamente por acción de las neuronas espinosas intermedias (CPu), las neuronas talámicas (VA/VL) pueden ser excitadas por otras aferencias (desde distintas regiones corticales) que estimulan la generación de una señal nuevamente hacia las cortezas premotoras.

La vía indirecta antagoniza la vía directa. El circuito indirecto es polisináptico y parte de las neuronas GABAérgicas estriatales expresan receptores de la familia D2. Este circuito se proyecta al GPe, que envía la señal sensitivomotora del NST.

El GP se encuentra dividido en un segmento interno (GPM) que proyecta directamente hacia el tálamo y otro externo (GPi) cuyas neuronas tónicamente inhibitorias reciben aferencias del CPu y proyectan hacia el NST. A su vez, el NST proyecta hacia el GPM lo cual permite que la vía indirecta desde el CPu influya en la actividad del tálamo. El NST utiliza glutamato como neurotransmisor, lo que proporciona excitación adicional a las neuronas tónicamente inhibitorias en el GPM y excita a los núcleos de salida.

GPi y SNpr extienden eferencias GABAérgicas sobre los núcleos motores ventral lateral y anterior del tálamo en la ruta hacia la corteza y a los núcleos troncoencefálicos. Las eferencias

talamocorticales glutamatérgicas se proyectan sobre las áreas sensitivomotoras corticales y cierran el circuito. En consecuencia, el NST aumenta la inhibición tónica del tálamo que surge del GPM. Desde los núcleos troncoencefálicos se envían proyecciones descendentes a la asta anterior de la médula espinal.

En el CPu, como región central de procesamiento de los GB, se pueden distinguir dos tipos de neuronas:

- Espinosas, que poseen espinas en sus dendritas y que constituyen el 95-96% del total de neuronas del núcleo. Constituyen el centro integrador del estriado, ya que sobre ellas convergen aferencias intrínsecas y extrínsecas y envían sus axones a otros GB, es decir, son las neuronas de proyección del núcleo. Por sus neurotransmisores se las puede dividir en dos grupos:
  - Grupo1: utiliza GABA y como cotransmisor encefalina. Proyecta al GPi (vía estriopalidal).
  - Grupo2: utiliza GABA y como cotransmisor sustancia P o dinorfina. Proyecta a la SN y al GPM (vía estriónigra/pálido interna).
- No espinosas (no tienen espinas en sus dendritas). Son interneuronas y se dividen en tres clases, de acuerdo con su morfología, características bioquímicas y neurotransmisoras:
  - Clase I: neuronas grandes, emplean acetilcolina como neurotransmisor, son espontáneamente activas y se las considera las neuronas asociativas más importantes del núcleo.
  - Clase II: neuronas medianas, de cuerpo ovoide, son las más numerosas y utilizan GABA como neurotransmisor. Estas interneuronas son las principales responsables de los mecanismos inhibitorios del estriado.
  - Clase III: interneuronas medianas de soma redondo son también GABAérgicas y poseen en su citoplasma la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS), que interviene en la síntesis de óxido nítrico (ON). El bloqueo de esta síntesis reduce la liberación de todos los neurotransmisores del núcleo (GABA, glutamato, acetilcolina y dopamina). Son importantes para el funcionamiento general del estriado al modular la funcionalidad neuroquímica del mismo.

La innervación dopaminérgica estriatal es uno de los principales elementos en este circuito motor como vía de entrada. A nivel del CPu, los axones dopaminérgicos establecen contacto con las neuronas espinosas de tamaño mediano, que constituyen el principal grupo eferente del CPu. El 60% de las neuronas eferentes hacen sinapsis con el cuello de las dendritas de estas neuronas y modulan su actividad cortical aferente (Calabresi y cols., 2000).

Ya que el CPu es la región central de procesamiento en los GB, para influir en los comandos motores, los núcleos de relevo intermedio (GP, SN, NST) deben proyectar sus eferencias hacia la corteza motora. En este camino, la única ruta hacia la corteza es la del tálamo. El efecto neto de los movimientos iniciados en la corteza resulta en un circuito ejecutor o facilitador del movimiento. Asimismo, la retroalimentación negativa funcionalmente podría interpretarse como una inhibición de las contracciones musculares inadecuadas o detección del movimiento. Estos dos circuitos estriopalidales en equilibrio permiten que la ejecución de un movimiento determinado sea precisa.



La DA ejerce un efecto dual sobre las neuronas estriatales (excitador sobre la vía directa e inhibidor sobre la indirecta) (Onn y cols., 2000) por lo que varios autores le adjudican una función tónica sobre las dos vías de los GB, lo cual mantiene inhibidos los núcleos de salida (GPm y SNpr) y facilita permanentemente la ejecución de planes motores corticales (Onn y cols., 2000; Wichmann & DeLong, 1997, 2003). Sin embargo, una visión actual otorga mayor complejidad al modelo incluyendo cambios en el patrón de descarga espacial y temporal dependiendo de circunstancias y funciones específicas, conexiones recíprocas entre núcleos, proyecciones directas de la corteza motora al estriado y al NST, inervación dopaminérgica de todos los núcleos de los GB y el tálamo, circuitos moduladores y un sistema funcional de sincronización de las descargas neuronales en el NST y en el GPm (Mathai & Smith, 2011). Además, la importancia de los GB en otras áreas como el aprendizaje, planificación, memoria de trabajo y modulación de emociones explicaría otras alteraciones que sobrevienen en enfermedades como Parkinson, Huntington, entre otras.

#### 1.4.2. Actividad motora patológica

Desde que Ehringer y Hornykiewicz demostraron en 1960 una disminución importante en el contenido de DA en pacientes con EP, numerosos estudios han validado la estrecha relación existente entre la pérdida del neurotransmisor y los trastornos de la postura y el movimiento característico de esta enfermedad (Ehringer & Hornykiewicz, 1960; Ljungdahl y cols., 1975). Desde hace años ha crecido el interés por el funcionamiento de los GB en presencia de una pérdida de neuronas dopaminérgicas.

En la Figura 1.4.2.1 se observa este circuito motor afectado por la patología de la EP. Uno de los conceptos fundamentales en que se sustenta este modelo es que la proyección de DA nigroestriatal modula con signo contrario a las poblaciones del CPu que se sitúan en el origen del circuito directo e indirecto (Rodríguez Oroz & Obeso, 2006).

La acción dopaminérgica sobre las neuronas que dan origen al circuito indirecto es inhibidora al actuar sobre los receptores D<sub>2</sub> y sobre las neuronas en el origen del circuito directo es excitadora a través de receptores del tipo D<sub>1</sub>.

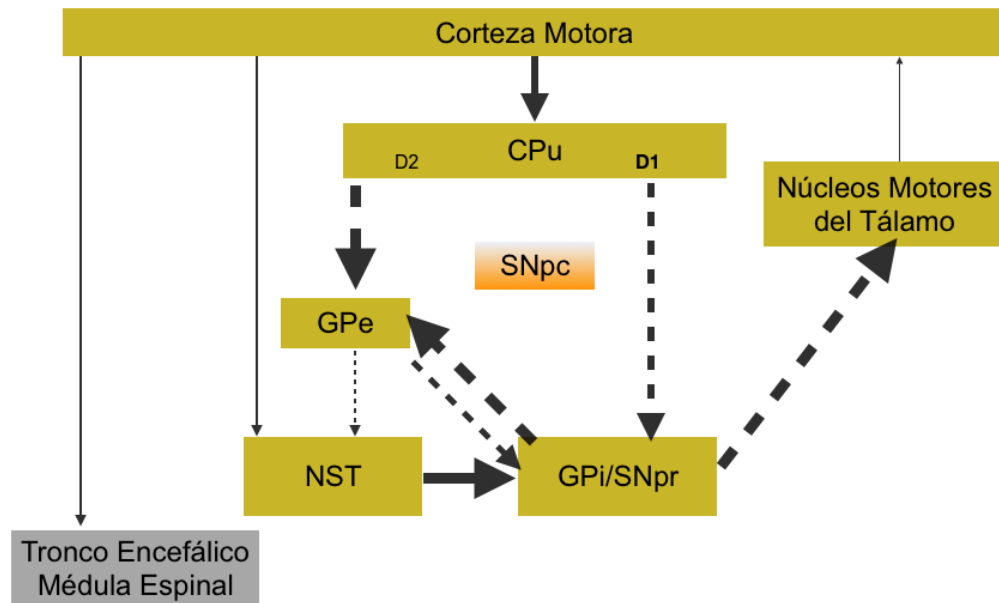


Figura 1.4.2.2 **Modelo anatómico-químico del circuito corticobasal talamocortical.** Estado patológico: Enfermedad de Parkinson. Las líneas sólidas representan sinapsis excitatorias; las interlineadas, sinapsis inhibitorias. El grosor indica la actividad (aumento o disminución, según sea el caso) de la transmisión en las conexiones. Modificado de Simon y cols. (Simon y cols., 2008).

Brevemente, en la EP, la pérdida de neuronas en la SNpc afecta a las vías directa e indirecta entre el CPU y los núcleos eferentes de los GB (GPe y SNr) de forma diferente (Wichmann & DeLong, 2003). Por un lado, disminuye la inhibición sobre las neuronas GABA-encefalinérgicas y, por el otro aumenta la actividad que sobre inhibe al GPe.

Estudios en primates tratados con el neurotóxico MPTP han mostrado un incremento en el promedio de descarga de las neuronas GABAérgicas del GPe y una disminución en el patrón de descarga de las neuronas del GPi (Wichmann & DeLong, 1997) lo que sugiere que la falta de dopamina desequilibra la transmisión glutamatérgica desde las áreas motoras pre centrales dificultando así, el movimiento iniciado corticalmente.

Como la inhibición del NST está disminuida, éste aumenta su actividad e hiperexcita al GPi y a la SNpr, que quedan hiperactivos. La depleción de DA sobre la vía directa disminuye la excitación sobre la vía nigroestriatal; esto disminuye la inhibición GABAérgica de las neuronas sobre el GPi y la SNpr y, en consecuencia, aumenta la actividad que se suma a la obtenida por la vía indirecta.

Los cambios en la vía directa y en los dos brazos de la vía indirecta resultan en una hiperactividad de los núcleos eferentes: GPe y SNr y sus proyecciones inhibitorias hacia el tálamo ventrolateral (Wichmann & DeLong, 2003). La ausencia de DA produce, entonces, incremento de la actividad del GPe/SNr y de la inhibición talámica. Los cambios de los programas realizados por el área motora suplementaria son impedidos por la hiperactividad tónica de las estructuras involucradas en la vía directa e indirecta, lo que produce las manifestaciones motoras características de la EP: dificultad para iniciar el movimiento, para cambiar de actividad, hipocinesia, etc.

Las manifestaciones clínicas de la EP deberían considerarse en momentos evolutivos distintos. En los estadios iniciales las alteraciones son originadas por disfunción del circuito (cortico-estrio-pálido-tálamo-cortical) sin lesión estructural. Entonces, existe un desequilibrio en la neurotransmisión y en los patrones de actividad de las neuronas

implicadas en el producto de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Marsden & Obeso, 1994). Por otro lado, en los estadios avanzados se observan cambios morfofuncionales en el propio circuito o en sus proyecciones como modificación de la sensibilidad y densidad de receptores, cambios en la eficacia sináptica, entre otros (Mouradian y cols., 1988).

## 1.5. Modelo Experimental de 6-OHDA

La EP está definida por criterios clínicos, morfológicos y neuroquímicos a partir de los cuales se han desarrollado varios modelos experimentales que imitan la lesión neuropatológica y permiten definir estrategias terapéuticas y mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad (Kyohei y cols., 2019). Entre estos, los más frecuentemente empleados se logran mediante la aplicación de neurotoxinas intracerebralmente como la 6-OHDA o la rotenona en roedores y el MPTP en primates (Saravanan & Mohanakumar, 2005; Larramendy y cols., 2008, Bourque y cols., 2009). Además, se han identificado varias mutaciones causantes de formas de la EP lo que ha llevado a la generación de otros modelos basados en la sobreexpresión de la proteína  $\alpha$ -sin mediados, en su mayoría, por vectores virales (Lindgren y cols., 2012).

De las neurotoxinas, el modelo de 6-OHDA es el más ampliamente utilizado como herramienta fundamental de la patofisiología de la denervación dopaminérgica y, al mismo tiempo, induce lesiones noradrenérgicas (Murray y cols., 2003). Inyectada en la vía nigroestriatal de los roedores destruye selectivamente las neuronas catecolaminérgicas y produce la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigrales, de sus terminales estriatales y reduce los niveles de DA, serotonina, encefalina y sustancia P estriatales. La degeneración neuronal afecta, por igual, tanto a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (A9) que proyectan al estriado como a las del área tegmental ventral (A10) que forman parte del sistema mesolímbico (Ungerstedt, 1968, 1971). La inyección de esta neurotoxina en el CPu o en el haz medial del cerebro anterior (MFB) resulta en una extensión y desarrollo de la lesión diferencial. La administración vía intraestriatal produce una degeneración menos severa, más lenta y progresiva que se asemeja más a lo que ocurre en la EP (Przedborski, 1995).

La 6-OHDA suministrada de forma selectiva y de manera unilateral en distintas zonas del CPu produce lesiones parciales que originan cambios espontáneos en la función motora y sensitivo-motora de los roedores, semejantes a los que aparecen en la EP en humanos, induciendo un hemiparkinsonismo. El daño parece ser consecuencia de la degeneración antidrómica secundaria a la lesión de las terminales y no al transporte axonal retrógrado de la neurotoxina. También se observan cambios neuroquímicos y neurofisiológicos compensatorios del déficit dopaminérgico que tardan un tiempo en establecerse. Se ha descrito una inducción y activación de TH en las neuronas dopaminérgicas funcionales, un incremento de la DA liberada en el CPu y un incremento en el número de receptores dopaminérgicos estriatales postsinápticos (fenómeno conocido como "*up regulation*"). Este fenómeno de hipersensibilidad por denervación afecta sobre todo a los receptores estriatales D2 (Creese & Leff, 1982).

La inyección unilateral de 6-OHDA produce una degeneración progresiva del sistema nigroestriatal en el lado lesionado lo que permite la comparación interna con el lado contralateral intacto. Esta condición se denomina hemiparkinsonismo ya que involucra la degeneración de la vía nigroestriatal en sólo un hemisferio cerebral (Deumens y cols., 2002;

Dauer & Przedborski, 2003; Przedborski, 1995). Por otro lado, una administración bilateral de la neurotoxina impide la posibilidad de contar con un patrón de comparación interno y, además, produce una alta mortalidad en ratas ya que causa afagia y adipsia por lo que no constituye un buen modelo para el estudio de la EP.

Las deficiencias motoras generadas en el modelo de administración unilateral se pueden evaluar por medio de test que examinan, entre otros signos, la acinesia, la desviación del eje del cuerpo, el comportamiento rotatorio asimétrico inducido por fármacos, comportamientos motores espontáneos (Morky, 1995; Deumens y cols., 2002; Kirik y cols., 1998; Yunes y cols., 2015). La respuesta rotatoria ante la administración de fármacos, puede ser considerada como un indicador del grado de severidad de la lesión nigroestriatal (Figura 1.5.1). La administración de sustancias que aumentan la liberación de DA, como la anfetamina (Anf), produce rotación ipsilateral, con respecto al lado lesionado. Por otro lado, la administración de un agonista no selectivo de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, como la apomorfina (Apo), induce una rotación contralateral al lado lesionado. Esto es debido a que en el lado de la lesión hay una sobreexpresión de receptores dopaminérgicos producto de una respuesta compensatoria.

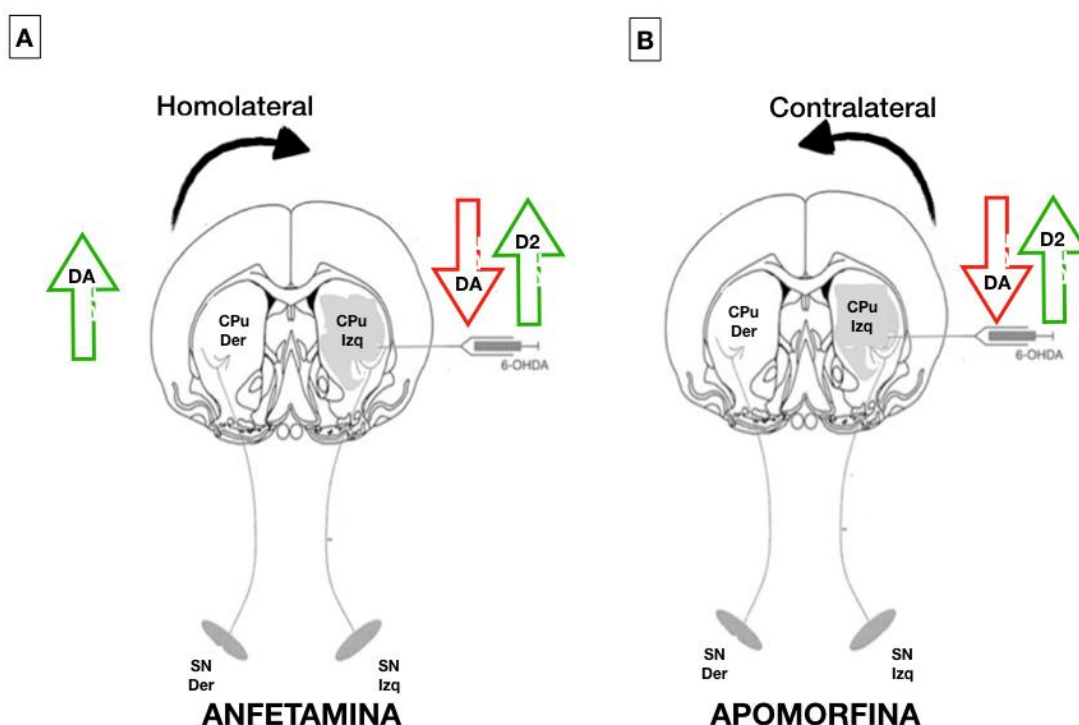


Figura 1.5.2 Rotaciones inducidas por agonistas dopaminérgicos en un modelo de lesión unilateral (hemisferio izquierdo) de 6-OHDA. A-Rotaciones homolaterales inducidas por anfetamina. B- Rotaciones contralaterales inducidas por apomorfina. Modificado de Deumens (Deumens y cols., 2002).

La lesión unilateral disminuye la innervación dopaminérgica generando acinesia, bradicinesia y asimetrías en el uso del miembro anterior (Decressac y cols., 2012) que pueden ser estudiadas con el test de acinesia en el miembro anterior, conocido como Stepping test (Olsson y cols., 1995). Asimismo, es posible ver y cuantificar el comportamiento ambulatorio

en el test de campo abierto (Casas y cols., 2013; Gould y cols., 2009), el nado de los animales (Morris, 1981; Porsolt y cols., 1997), entre otras evaluaciones y caracterizar cada una de las conductas según el estadio de la enfermedad en que se encuentra el animal (Deumens y cols., 2002).

## 1.6. Neuroesteroides

Es sabido que el cerebro es un órgano influenciado por la acción de las hormonas esteroidales. En la mayoría de las estructuras que regulan funciones neuroendocrinas se han identificado receptores intracelulares de esteroides, involucrados en la transcripción de genes específicos. Estos receptores poseen patrones de distribución únicos en la compleja anatomía del cerebro y ejercen sus funciones mediante mecanismos de retroalimentación inducidos por esteroides los que se correlacionan con la expresión del comportamiento (Cabrera & Bregonzio, 1996; Cabrera y cols., 2002, Laconi & Cabrera, 2003; Giuliani y cols., 2011, 2013). Además, sus funciones están involucradas en la regulación de la síntesis de neurotransmisores, receptores, hormonas y neuromoduladores, relacionándose también con la organización de los distintos circuitos neurales que ocurren durante el desarrollo y persisten en la vida adulta (Cabrera & Navarro 1996, Laconi y cols., 2007).

En las últimas décadas un importante cúmulo de evidencias científicas sostiene que el cerebro además de ser un importante órgano blanco de las hormonas esteroidales, es un órgano donde el metabolismo esteroide es realmente considerable (McEwen, 1999; Do Rego y cols., 2009).

Tanto las neuronas como las células de la glía, presentan un variado número de enzimas que producen metabolitos esteroidales activos a partir de precursores como el colesterol. Se ha caracterizado la vía biosintética de estas neurohormonas (Figura 1.6.1) y numerosas investigaciones se han desarrollado para esclarecer sus acciones fisiológicas y sus potenciales efectos farmacológicos. Actualmente se los considera importantes moléculas regulatorias de diferentes sistemas de neurotransmisión y, por su síntesis cerebral, se las denomina “neuroesteroides”.

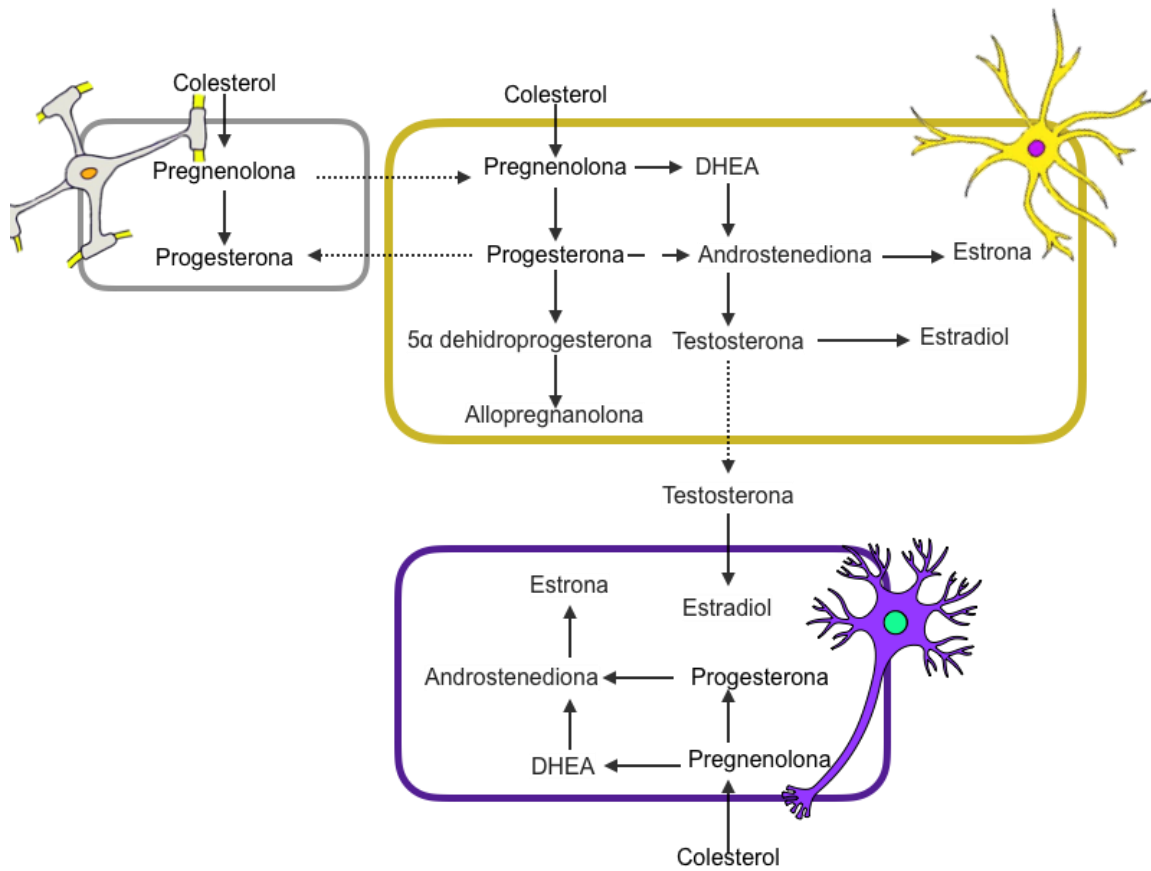


Figura 1.6.2 **Biosíntesis de neuroesteroides de acuerdo a la especificidad celular.** La célula en gris es un oligodendrocito; la amarilla un astrocito y en violeta se representa una neurona. Adaptación de Herberden (Herberden, 2017).

El término “neuroesteroide” fue propuesto en 1981 por Baulieu y colaboradores (Baulieu, 1981, 1997) y se aplica a aquellas moléculas esteroidales cuya síntesis y secreción en el SNC y periférico ocurre de forma independiente de la producción de las glándulas endocrinas esteroidogénicas. Esta síntesis ocurre *de novo* en el sistema nervioso a partir de colesterol. Sin embargo, en varios casos, el precursor de un neuroesteroide dado, como E<sub>2</sub>, puede ser sintetizado por el sistema nervioso o también ser producto de la biosíntesis a partir de la secreción de glándulas del sistema endocrino (ovario, glándula adrenal y/o placenta). Entonces, la vista clásica de los esteroides de origen gonadal, progestágenos, estrógenos y andrógenos, con funciones netamente reproductivas ha cambiado durante los últimos años, ya que un cúmulo de investigaciones y estudios clínicos sostienen sus diversos efectos neuromoduladores y neuroprotectores.

Estas hormonas son lipófilas y de bajo peso molecular, por lo que cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica quedando disponibles para sus funciones en el cerebro, incluyendo la regulación del sistema neuroendócrino reproductivo, estado de ánimo y cognición, así como efectos neuroprotectores (Behl, 2002).

Por su origen son denominadas esteroides neuroactivos. Robel observó que varios días posteriores a la remoción de las glándulas esteroidogénicas aún permanecían altas concentraciones de estos esteroides en el sistema cerebral (Robel y cols., 1999). En concreto, E<sub>2</sub> puede ser sintetizado directamente en el SNC y ejercer sus funciones allí, o provenir desde la periferia. La significancia fisiológica del E<sub>2</sub> neuroesterooidal es claramente diferente de la

periférica que es de función netamente endocrina; ya que actúa de forma parácrina a nivel de los distintos tipos celulares del SNC.

Los neuroesteroides, al igual que los esteroides producidos por las glándulas esteroidogénicas, son sintetizados a partir de colesterol por una serie de reacciones enzimáticas mediadas por enzimas de la familia de los citocromos P450 y no-P450. La presencia de estas enzimas en el sistema nervioso ha sido evidenciada por el análisis proteico y de ARNm en una amplia variedad de especies. Las propiedades de estas enzimas esteroidogénicas, su localización en el sistema nervioso y su síntesis durante el desarrollo han sido también ampliamente estudiadas (Compagnone & Mellon, 2000).

### 1.6.1. Estrógenos

En la última década, diversos estudios se llevaron a cabo con el fin de elucidar los efectos neuroprotectores de los estrógenos en enfermedades e injurias del sistema nervioso. Estas investigaciones desencadenaron en el reconocimiento del potencial impacto de las hormonas sexuales esteroidales en dichas perturbaciones (García Segura y cols., 2001).

El estrógeno promueve, directamente, la supervivencia celular y la plasticidad sináptica y previene la pérdida axonal y dendrítica. Además, ayuda a evitar el mal funcionamiento de las neuronas al alterar los niveles de neurotransmisores, de los receptores de neurotransmisores y de segundos mensajeros (Dluzen & McDermott, 2000; Dluzen, 2000).

Los estrógenos son producidos principalmente por los ovarios, la placenta durante el embarazo y en menores cantidades por las glándulas adrenales y el SNC. Los principales estrógenos derivan de los andrógenos, hormonas sexuales masculinas y son:

- Estrona ( $E_1$ ): la enzima aromatasa lo sintetiza a partir de la progesterona.
- Estradiol ( $E_2$ ): la enzima aromatasa lo sintetiza a partir de la testosterona.
- Estriol ( $E_3$ ): la enzima aromatasa lo sintetiza a partir de la androsterona

#### 1.6.1.1. $17\beta$ -estradiol

Estudios recientes sugieren que el  $E_2$  no sólo tiene acciones neuroprotectoras sino que está involucrado en la activación de procesos restaurativos en el sistema nervioso (Figura 1.6.1.1.1) (Azcoitia y cols., 2011).



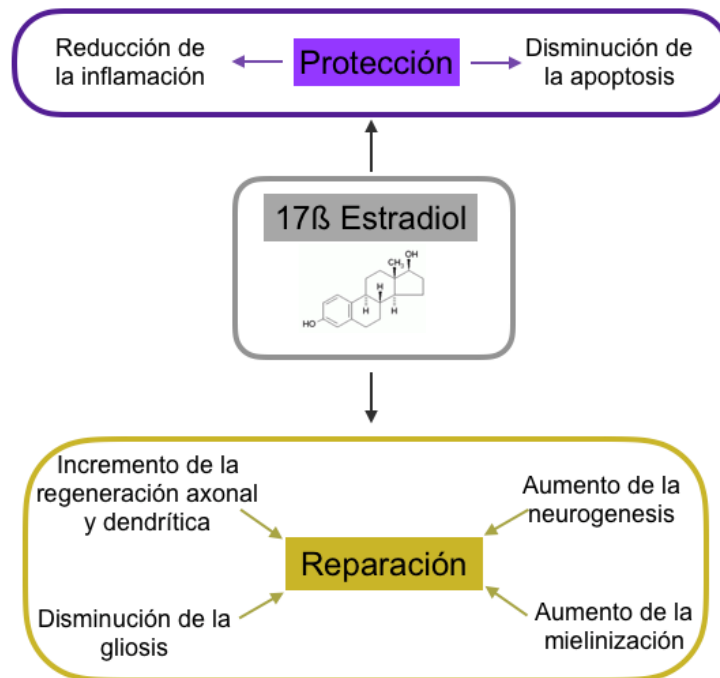


Figura 1.6.1.1.1 Esquema de acciones del 17β-estradiol sobre la protección y reparación en el SNC. Adaptación de Azcoitia (Azcoitia y cols., 2011).

Como se muestra en la Figura 1.6.1.1.2, el E<sub>2</sub> desencadena mecanismos protectores y reparadores que actúan sobre diferentes dianas celulares en el SNC. Particularmente, actúa sobre las neuronas que expresan receptores de estrógeno (RE) nucleares y de membrana para promover la supervivencia neuronal, la neurogénesis y la función sináptica.

Actuando sobre las células madre y los progenitores, el E<sub>2</sub> regula la generación de nuevas células neurales, incluyendo las neuronas. Además, la hormona reduce la inflamación local de los astrocitos y la microglia y promueve la supervivencia neuronal a través de la liberación de factores de crecimiento de los astrocitos. El E<sub>2</sub> también reduce la pérdida de células de oligodendrocitos y la desmielinización y facilita la remielinización.

Las acciones del estradiol sobre las células endoteliales, las células del músculo liso, las plaquetas y los leucocitos también están implicadas en el control hormonal de la respuesta inflamatoria local y en la regulación del flujo sanguíneo, el metabolismo de la unidad neurovascular, la adhesión de los leucocitos y la supervivencia de las células endoteliales (Azcoitia y cols., 2011).



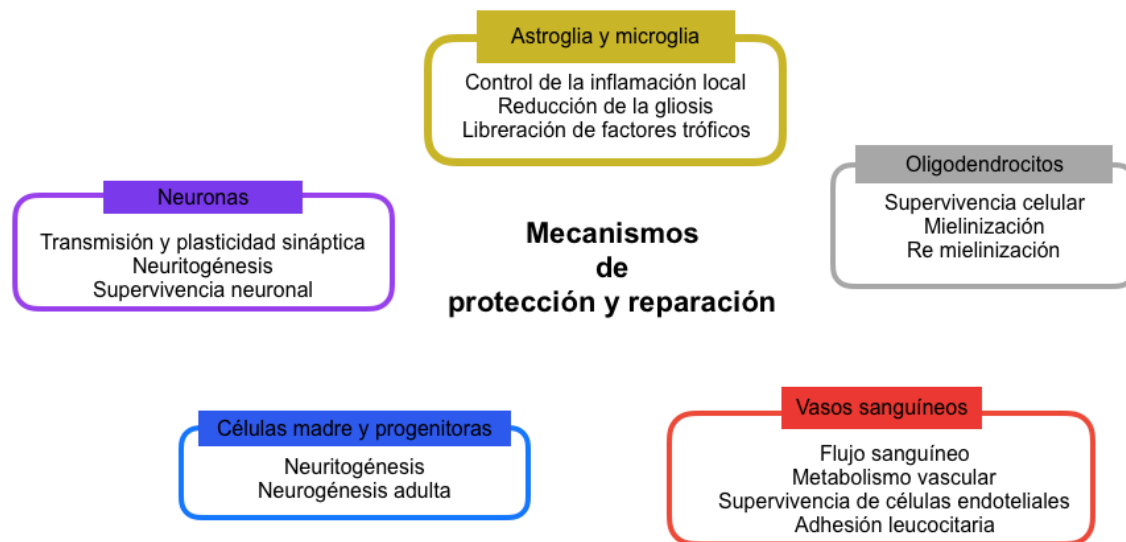


Figura 1.6.1.1.2 *Mecanismos que subyacen a protección y reparación en el SNC.* Adaptación de Azcoitia (Azcoitia y cols., 2011).

### 1.6.1.2. Mecanismo de Acción

A pesar que los estrógenos son agentes neuroprotectores bien caracterizados, los mecanismos por los cuales ejercen sus acciones son aún desconocidos. Tienen abundantes efectos celulares incluyendo la activación nuclear de RE, la expresión aumentada de proteínas anti-apoptóticas, interacción de cascadas de segundos mensajeros, alteraciones en la activación glutamatérgica, el mantenimiento del homeostasis de calcio intracelular, y la actividad antioxidante (McEwen, 1999; Dluzen, 2000; Do Rego y cols., 2009; Don Carlos y cols., 2009).

Varios de estos efectos están involucrados en la supervivencia neuronal; sin embargo, el papel exacto de cada una de estas vías en la neuroprotección mediada por E<sub>2</sub> permanece sin elucidar (García Segura y cols., 2001). Sin embargo, como se muestra en la Figura 1.6.1.2.1, es posible observar cómo las interacciones neuronales y gliales se interrumpen cuando hay degeneración inducida por un neurotóxico.

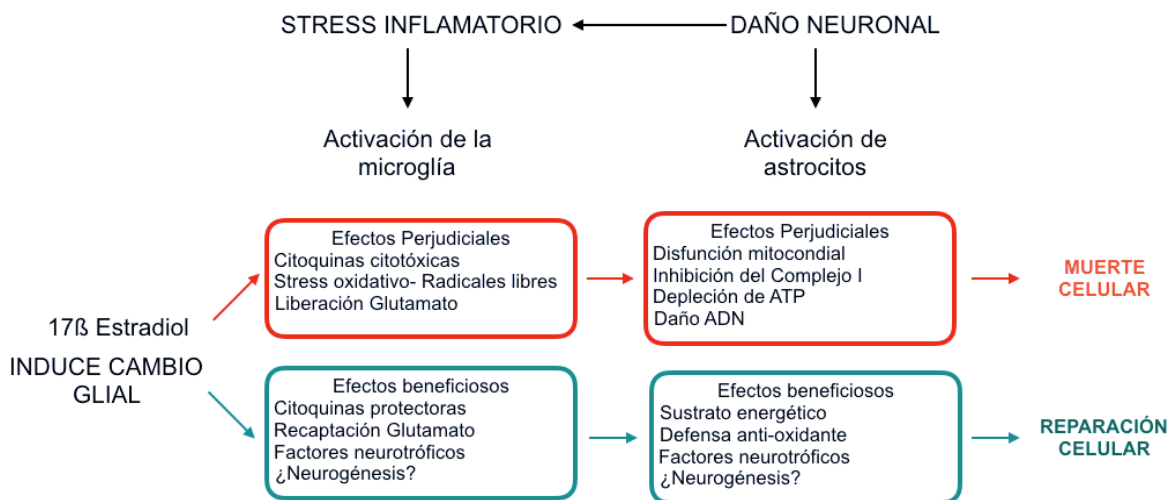


Figura 1.6.1.2.1. E<sub>2</sub> induce cambio glial de muerte a reparación celular. Adaptación de Morale y cols. (Morale y cols., 2006).

En la representación se observa que hay dos caminos en la EP; mientras que uno de ellos es perjudicial, el otro es beneficioso. Morale y sus colaboradores (Morale y cols., 2006) sugieren que esto ocurre porque el E<sub>2</sub> tiene el rol principal de “conmutador glial”. Los efectos dañinos citotóxicos (oxidativos y nitrotóxicos) en situaciones de estrés inflamatorio pueden generar la desaparición de la DA nigral y la muerte de la neurona. Por otra parte, los efectos benéficos ejercen protección sobre las neuronas nigrales y ocurren principalmente por acción de los astrocitos. Estas células se encargan de eliminar el glutamato del espacio extracelular, producir factores que inducen enzimas antioxidantes y expresan moléculas neurotróficas cruciales, regulando el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las neuronas, como parte de las interacciones bidireccionales, neurológicas-gliales.

### 1.6.1.2.1. Mecanismo genómico y no genómico

El primer paso para que 17β-estradiol, sea sintetizado a partir del colesterol ocurre en la membrana mitocondrial externa, en donde el colesterol es transportado hacia la membrana mitocondrial interna para convertirlo en pregnenolona (Tsutsui & Haraguchi, 2015). Se conoce que en este proceso están implicadas la proteína de regulación aguda de esteroidogénesis (StAR), la proteína translocadora de 18KDa (TSPO) y la enzima P450<sub>scc</sub>, una enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol.

A través de una serie de reacciones enzimáticas consecutivas, la pregnenolona se convierte en otros esteroides en el retículo endoplásmico, entre los que se encuentra la testosterona, que a través de la enzima P450<sub>aromatasa</sub> (P450<sub>arom</sub>), pasa a formar el E<sub>2</sub> (MacLusky & Naftolin, 1981).

Los neuroesteroides ejercen varias acciones biológicas en el cerebro durante la embriogénesis y en la vida adulta.

La síntesis local de E<sub>2</sub> hace que esta hormona actúe de forma endocrina y paracrina, autocrina e intracrina, ejerciendo su acción de forma genómica mediada por receptores esteroidales nucleares y también de forma rápida o no genómica modulando receptores de neurotransmisores (Rupprecht y cols., 1999; Vrtačnik y cols., 2014).

Los estrógenos, clásicamente, ejercen sus efectos por el mecanismo de acción nuclear de sus RE. Estos receptores son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, capaces de activar genes mediante la unión directa a secuencias específicas de ADN, conocidas como elementos de respuesta de estrógenos (EREs) (Sohrabji & Miranda, 1995), localizadas en regiones promotoras de genes.

En este contexto, cuando el esteroide ingresa a la célula por difusión pasiva, se une a su RE nuclear y sigue una serie de pasos de activación que finaliza en que el complejo estrógeno-RE se asocia con el elemento de respuesta al estrógeno (ERE) y funciona como un potenciador (“*enhancer*”) de los genes que contienen ERE (García Segura y cols., 2001).

Los complejos mecanismos de señalización del E<sub>2</sub> principalmente pueden darse a través de los receptores clásicos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , que poseen varias similitudes en cuanto a su secuencia de aminoácidos y se ha demostrado que ambos poseen roles característicos y no redundantes (Dahlman-Wright y cols., 2006); o también por medio del receptor acoplado a proteínas G, GPER1. En la siguiente tabla se describen sus características principales:

<b>Característica</b>	<b>ER<math>\alpha</math></b>	<b>ER<math>\beta</math></b>	<b>GPER1</b>
<b>Superfamilia</b>	Receptores nucleares de hormonas esteroideas 419,3		Receptores acoplados a proteína G
<b>Tipo</b>	Nuclear y unidos a membrana		Unido a membrana, acoplado a proteína G
<b>Estructura</b>	Dominio de unión a ADN		7 regiones $\alpha$ -hélice transmembrana, 4 segmentos extracelulares y 4 citosólicos
<b>Nº de isoformas</b>	3	5	1
<b>Tamaño (aa)</b>	595	530	375

*Tabla 1.6.1.2.1.1 Representación esquemática de los mecanismos de acción de los estrógenos a través de sus receptores. Adaptado de Heldring y cols. (Heldring y cols., 2007).*

La vía genómica directa es el mecanismo clásico de señalización de los estrógenos a través de estos receptores (Figura 1.6.1.2.1.1A). La unión de E<sub>2</sub> a ER $\alpha$  o ER $\beta$ , produce un cambio conformacional que permite la dimerización del receptor, su translocación al núcleo y la unión a los EREs en las regiones promotoras de genes diana que reclutan coactivadores y correpresores transcripcionales (Arévalo y cols., 2012).

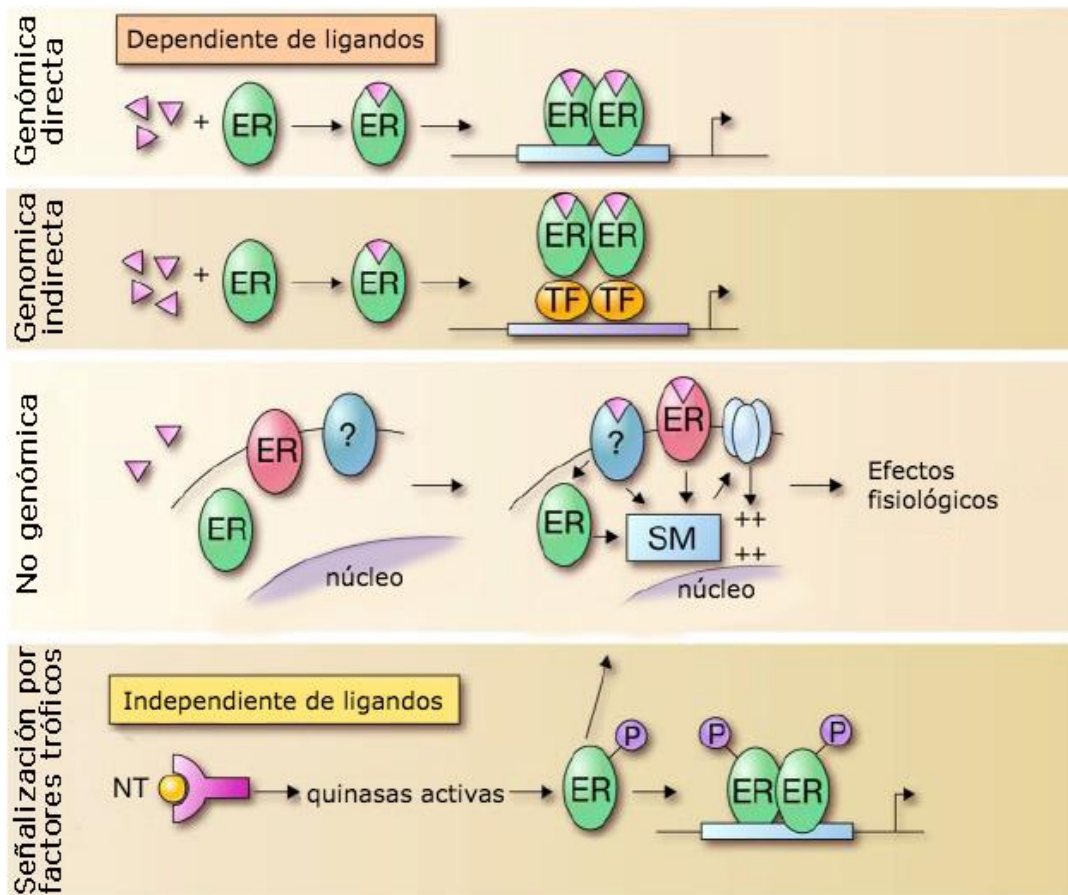


Figura 1.6.1.2.1.2 **Representación esquemática de los mecanismos de acción de los estrógenos a través de sus receptores.** A- Señalización clásica; B- Señalización a través de correguladores que se unen a factores de transcripción (TF); C- Señalización a través del receptor GPER o por interacción de otros receptores a través de segundos mensajeros (SM); D- Señalización independiente de ligandos, generalmente a través de neurotrofinas (NT). Adaptado de Heldring y cols. (Heldring y cols., 2007).

Además, esta unión ligando-receptor hace que se pongan en funcionamiento co-reguladores que alteran la estructura de la cromatina y facilitan la transcripción (Vrtačnik y cols., 2014). Adicionalmente se conoce, en la actualidad, que el E<sub>2</sub> puede modular la expresión génica sin unirse directamente al ADN, en genes que no poseen EREs en su región promotora, sino a través de interacciones proteína-proteína con otros tipos de factores de transcripción que contactan de forma compleja con el ADN; esta es una forma de señalización genómica indirecta (Figura 1.6.1.2.1.3 B)(Björnström & Sjöberg, 2005).

Varias evidencias sugieren que los efectos neuroprotectores del E<sub>2</sub> no ocurren sólo mediante el mecanismo nuclear de RE, ya que antagonistas del RE $\beta$  no atenúan sus acciones protectoras en todos los modelos de neurotoxicidad (Green y cols., 1998). Además, sus efectos neuroprotectores actúan aún en presencia de ARNm o proteínas inhibitoras (Sawada y cols., 1998).

Existen además ciertos cambios inducidos por el E<sub>2</sub> que son demasiado rápidos para ser relacionados con algún tipo de transcripción génica y posterior síntesis proteica que, generalmente, son propiedad de las hormonas esteroideas y que se relacionan con la activación de la señalización por proteína-quinasa (Vrtačnik y cols., 2014). Esta señalización no genómica (Figura 1.6.1.2.1.4 C) se produce a través de la activación de los

receptores clásicos en el citosol o anclados a la membrana celular y de un receptor de membrana, miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Arévalo y cols., 2015) que no tiene relación genética ni estructural con los receptores clásicos y se expresa de forma independiente a ellos, aunque su afinidad por el E<sub>2</sub> es considerablemente más baja (Vrtačnik y cols., 2014).

Dentro de las acciones no genómicas del estradiol se encuentran la movilización de calcio intracelular, la estimulación de la adenil ciclasa (AC) y producción de AMPc, la activación de las rutas de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), la activación de receptores de membrana tirosina-quinasa (Akt, PKA, PKC) y la atenuación directa del receptor de glutamato (Björnström & Sjöberg, 2005; Vrtačnik y cols., 2014; Arévalo y cols., 2015).

Por último, existen mecanismos por los cuales los RE pueden ser activados de forma independiente de la unión a sus ligandos (Figura 1.6.1.2.1.5 D) a través de la señalización de factores tróficos por la fosforilación de quinasas, como las proteína-quinasas A y C, señales extracelulares de factores tróficos, citoquinas, neurotransmisores y reguladores del ciclo celular (Vrtačnik y cols., 2014). Estudios en animales muestran que los estrógenos influyen en la síntesis, liberación y metabolismo de neurotransmisores como la dopamina y puede modular la expresión y función del receptor de dopamina (García Segura y cols., 2001).

### 1.6.1.3. Estrógenos en la Enfermedad de Parkinson

La ciencia básica, la epidemiología y la evidencia clínica sugieren que las hormonas sexuales femeninas pueden influenciar el comienzo y la severidad de los síntomas de la EP.

La prevalencia de la EP es superior en hombres que en mujeres, en una relación aproximada 3:2 (Mayeux y cols., 1992) sugiriendo una posible influencia protectora de los estrógenos en la predisposición a la enfermedad (Dluzen & McDermott, 2000; Dluzen, 2000). Estudios clínicos, como el realizado sobre la EP en el reemplazo de estrógenos en los años de la menopausia (POETRY), sugieren que los síntomas en la EP pueden exacerbarse luego de la menopausia y pueden ser retrasados o aliviados con una terapia de reemplazo hormonal. Sin embargo, otros estudios han fallado en observar efectos estrogénicos positivos, por lo que existen serias controversias como estrategia terapéutica.

Las diferencias de género en los niveles de estrógenos pueden también explicar por qué las drogas dopaminérgicas utilizadas en el tratamiento de la EP afectan a hombres y a mujeres de manera diferente con respecto a la respuesta terapéutica, la eliminación del fármaco y la presión arterial (Wright y cols., 1997; Kraus y cols., 1999).

Los estudios en animales han demostrado que la modulación pre y postsináptica está modulada por el E<sub>2</sub> en la SN y el CPu, así como también la habilidad de proteger las neuronas dopaminérgicas del efecto de neurotoxinas tales como el MPTP y la 6-OHDA (Shulman & Bhat, 2003; Smith & Dahodwala, 2014). La neuroprotección después de la exposición a neurotoxinas en estudios en animales se define de dos maneras: es posible que el E<sub>2</sub> prevenga la reducción de la dopamina estriatal y sus metabolitos relacionados DOPAC y HVA; o también puede ocurrir que se mantenga la integridad neuronal de la vía de síntesis de dopamina mediada por DAT, el transportador monoamínico vesicular 2 (VMAT2) y el ARNm, o la inmunorreactividad de la enzima TH (Smith & Dahodwala, 2014). Bourque y colaboradores, proponen dos escenarios dependiendo de la viabilidad de las células en respuesta a la acción del 17β-estradiol. Uno sugiere que si las neuronas están sanas en el

momento del tratamiento, su respuesta es beneficiosa tanto para la función neurológica como para la supervivencia; mientras que en el otro caso, si la función neuronal está dañada, la exposición al tratamiento con el tiempo exacerba la lesión neurológica (Bourque y cols., 2009). Estas observaciones concuerdan con un informe que sugiere que con la administración de concentraciones más bajas de toxinas como MPTP o 6-OHDA, la pérdida de procesos dendríticos en las células de la SN positivas a TH es menor. En una etapa temprana de degeneración, cuando las neuronas DA de la SN se lesionan, pero no mueren, puede ser un momento apropiado para la neuroprotección con esteroides. De hecho, en el ser humano es en las primeras etapas de la EP, antes de iniciar la terapia de levodopa, cuando se informa que la terapia de estrógenos es beneficiosa (Bourque y cols., 2009).

Además, E<sub>2</sub> podría afectar la patogénesis de la EP a través de su influencia en la función mitocondrial y la respuesta al estrés oxidativo. Es sabido que el 17β-estradiol reduce la toxicidad del glutamato, aniones superóxido y peróxido de hidrógeno en el cultivo neuronal in vitro de células ventrales mesencefálicas. Debido a que este efecto fue independiente del RE, los investigadores plantearon la hipótesis de que ocurrió por secuestro de calcio citosólico (Sawada y cols., 1998).

Existen varios mecanismos adicionales por los cuales el E<sub>2</sub> puede actuar para estabilizar y preservar la función mitocondrial frente a varios tipos de estrés. A modo de ejemplo, el estrógeno protege el potencial de la membrana mitocondrial, previene el agotamiento del ATP y reduce la producción de radicales libres.

En cuanto a los efectos de la transcripción a través de RE, ocurre un aumento de la expresión del transportador de glucosa y un aumento de la producción de enzimas de la vía glicolítica, lo que en general conduce a un aumento de la utilización de la glucosa y a una disminución de la producción de glutamato libre tóxico. Asimismo, se ha demostrado que el E<sub>2</sub> también aumenta la transcripción del ADN mitocondrial, puede tener efectos antioxidantes directos y puede tener efectos antiinflamatorios, incluyendo la disminución de los niveles de citoquinas y otros moduladores inflamatorios, la entrada de leucocitos en el SNC y la activación de microglia in vitro e in vivo (Smith & Dahodwala, 2014).

En resumen, el E<sub>2</sub> modula los índices de funcionamiento de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas y previene la depleción neuronal dopaminérgica inducida por neurotoxinas en modelos animales de EP, por lo tanto, es neuroprotector. La modulación puede ocurrir a nivel síntesis, liberación, recaptación de DA, y unión a receptores específicos. También los resultados neuroprotectores son dependientes del tratamiento en relación al período de administración y dosis y del estatus gonadal de los animales estudiados. Si se establecen los mecanismos específicos por los que el estrógeno ejerce sus efectos neuroprotectores en la EP, se pueden desarrollar nuevas combinaciones de terapias dirigidas con modificaciones estructurales para maximizar la neuroprotección y minimizar los efectos sistémicos no deseados.

#### 1.6.1.4. Astrocitos, EP y 17β-estradiol

Los astrocitos comprenden una población de células gliales que juegan un papel crítico durante el desarrollo, así como en el mantenimiento de las funciones del SNC. Estas células gliales se definen a menudo como una población que comparte características y funciones comunes en todo el SNC, que son células ubicuas en el cerebro normal y representan el 50% de todas las células cerebrales. Entre sus funciones, los astrocitos integran y procesan



información sináptica, liberando varias moléculas neuroactivas que influyen en la función sináptica y la plasticidad (Perea y cols., 2009).

Una lesión del SNC desencadena un espectro de cambios finamente afinado que van desde alteraciones reversibles en la expresión génica e hipertrofia celular hasta proliferación celular con formación compacta de cicatrices y reorganización tisular permanente (Sofroniew, 2015) y, en muchos casos, migración hacia el sitio lesionado (Zhan y cols., 2017).

Factores como el envejecimiento y el empobrecimiento del medio circundante afectan significativamente a estas células a reducir su complejidad morfológica (Diniz y cols., 2016), ocasionando cambios similares después de diferentes tipos de lesiones. Este fenómeno se llama astrogliosis reactiva y está altamente regulado por factores específicos del contexto liberados por las neuronas, otros tipos de células gliales y los propios astrocitos (Cragolini y cols., 2018). Además, recientemente se ha reconocido la existencia de poblaciones de astrocitos morfológicamente diferentes que responden de manera diferencial en situaciones de reposo o lesión. Esta heterogeneidad de los astrocitos también afecta a su potencial sinaptogénico, principalmente debido a los distintos perfiles de expresión de genes (Buosi y cols., 2017) y también se ve reflejada en los factores que liberan y en cómo afectan su entorno. Así, se ha informado que los cultivos astrogliales obtenidos de la corteza, el cerebelo y la médula espinal liberan combinaciones y cantidades únicas de quimiocinas y citoquinas (Fitting y cols., 2010) y que ocasionan la multiplicación de las células gliales (Otto & Unsicker, 1994).

En relación con con el estradiol, se sabe que las señales neuronales regulan los efectos del estradiol sobre los astrocitos y que estas células expresan RE, muestran modificaciones morfológicas y funcionales en respuesta al tratamiento y participan en la regulación hormonal de la plasticidad sináptica y en eventos neuroendocrinos (Torres-Aleman y cols., 1992). En los astrocitos, los receptores reclutados por estradiol reclutan una cohorte de cofactores transcripcionales a las regiones reguladoras de los genes diana y regulan la transcripción de dichos genes (Azcoitia y cols., 2010).

En condiciones patológicas, el estradiol interfiere con la activación de estas células y modula la liberación de factores neurotróficos y moléculas inflamatorias y se le han asignado condiciones neuroprotectoras bajo condiciones neurodegenerativas (Azcoitia y cols., 2010). Dentro de sus acciones, se ha encontrado que el tratamiento disminuye la proliferación de astrocitos y la formación de cicatrices gliales cuando hay heridas (Barreto y cols., 2007), reduce la neurodegeneración inducida por excitotóxicos (Ciriza y cols., 2004) y tiene acciones benéficas en un modelo experimental de la EP (Tripanichkul y cols., 2006).

La interacción entre astrocitos y neuronas es un componente esencial de los mecanismos que intervienen en las acciones neuroendocrinas y neuroprotectoras del estradiol. En la membrana de los astrocitos el estradiol ejerce eventos de señalización rápida en astroglia a través de la regulación de la activación de las vías de señalización (Zhang y cols., 2002; Dhandapani y cols., 2005) así como también puede regular la comunicación entre glía-glía y glía-neurona mediante la modificación de los niveles de calcio intracelular en los astrocitos (Micevych y cols., 2010). Aunque el estradiol puede actuar directamente sobre los astrocitos, la respuesta final a la hormona in vivo está probablemente influenciada por las interacciones astrocitos-neuronas en comunicación bidireccional (Azcoitia y cols., 2010).

Si bien varios estudios han demostrado que las células gliales están relacionadas con la patogénesis de la EP, y se han informado acerca de los receptores y transportadores de neurotransmisores que se expresan en las células gliales, sólo unos pocos informes han

demostrado la expresión de los receptores de DA en los astrocitos (Miyazaki, 2004; Asanuma y cols. 2014).

La siguiente tabla muestra los resultados acerca de la expresión de los receptores de DA en astrocitos estriatales; evidenciando que la DA afecta a los astrocitos y que la transducción de señales mediada por estos receptores ocurre en los astrocitos (Bal y cols., 1994; Miyazaki, 2004).

			D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>
MC	Neurona	ARNm	+	+	+	+	+
		Proteína	+++	+++	+	+++	+
	Astrocito	ARNm	+	SD	SD	+	+
		Proteína	SD	SD	SD	+	+
CPu	Neurona	ARNm	+	+	+	+	+
		Proteína	+++	++	+	SD	+
	Astrocito	ARNm	+	+	+	+	+
		Proteína	+(DT)	SD	++(DT)	+++	+

Tabla 1.6.1.4.1 **Expresión de los receptores de dopamina en neuronas y astrocitos.** Mc=mesencéfalo, CPu= cuerpo estriado; SD=sin detección; DT=distinto tamaño. Adaptado de Miyazaki (Miyazaki y cols., 2004).

### 1.6.1.5. Microglia, EP y 17β-estradiol

Cuando ocurre un daño o lesión se activan las células de la microglia desencadenando una cascada de eventos inflamatorios, aumentando la expresión de marcadores inflamatorios e incrementando su capacidad fagocítica. Estas acciones en conjunto contribuyen a restaurar de manera coordinada la integridad y función en el tejido.

El inicio de la fagocitosis eficiente requiere la expresión y cooperación de varios receptores (Aderem & Underhill, 1999) que pueden reconocer señales inflamatorias, tales como los receptores de tipo Toll (Toll-like receptors- TLRs), los cuales son clave en el reconocimiento de patógenos y/o moléculas propias alteradas con la capacidad de disparar la respuesta inmunológica; los coreceptores de diferenciación como el CD36, el receptor de desecho de fagocitosis de macrófagos como (MSR1), entre otros. Estas células también expresan receptores que reconocen restos celulares de apoptosis o proteínas mal plegadas, incluyendo receptores desencadenantes expresados en las células mieloides (TREM2), receptores de manosa o receptores pirimidinérgicos (P2RY6) (Husemann y cols., 2002; Lucin & Wyss-Coray, 2009).

La acción conjunta contribuye a la reorganización del citoesqueleto de actina microglial y al engullimiento de micropartículas dañinas.

La neuroinflamación, acompañada con el aumento de la edad, ocasionan que la microglia responda de manera disfuncional o distrófica (Lucin & Wyss-Coray, 2009). La senescencia durante el envejecimiento se ha considerado como un factor importante a la hora de evaluar la evolución de los desórdenes neurodegenerativos (Streit, 2006) y cada vez se considera más la idea de que los desórdenes neurológicos se originan de la interrupción en el desarrollo normal o en la maduración de las células gliales tal como ocurre en las neuronas (Marin, 2016).

Se sabe que las alteraciones en la actividad fagocítica de la microglia contribuyen al desarrollo de la enfermedad cerebral (Diaz-Aparicio y cols., 2016) y que también las diferencias sexuales inciden en las manifestaciones clínicas, curso y prognosis de las enfermedades neurodegenerativas. En relación a esto, existe evidencia de que el desarrollo



celular ocurre de manera más rápida en machos que en hembras (en roedores y humanos); por lo que se estima que se encuentra regulado por hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) (Hanamsagar y cols., 2017). Cuando hay inflamación la actividad fagocítica de la microglia aumenta, ocasionando que en hembras exista una mayor capacidad de fagocitosis en relación con los machos en condiciones basales o proinflamatorias (Nelson y cols., 2017). Esta maduración distintiva de microglia, junto con la diferencia entre citoquinas y quimioquinas durante el desarrollo es la base de la hipótesis más fuerte para explicar la sensibilidad diferencial entre sexos en relación a los desafíos inmunológicos de la vida temprana o de la vida adulta, respectivamente.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

El esteroide neuroactivo  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) participa como un factor neuroprotector y/o neuroregenerador sobre las redes neuronales asociadas al control de la funcionalidad dopaminérgica del sistema nigroestriatal.

### 2.2. Objetivo general

Estudiar la participación del esteroide neuroactivo  $17\beta$ -estradiol como factor neuroprotector y/o neuroregenerador sobre las vías asociadas al control de la funcionalidad dopaminérgica del sistema nigroestriatal en un modelo de hemiparkinsonismo inducido por la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas macho.

### 2.3. Objetivos específicos

Evaluar el efecto del tratamiento con  $E_2$  sobre el comportamiento de los animales.

- a. Evaluar el efecto del  $E_2$  sobre la actividad motora y locomotora y sus posibles modificaciones asociadas al tratamiento.
- b. Desarrollar e implementar sistemas informáticos para la automatización de las observaciones, la adquisición de datos, el cálculo y el análisis de los patrones cinéticos asociados al comportamiento.

Verificar el grado de daño neuronal y la neuroprotección mediante el uso de marcadores biológico- celulares específicos en muestras de tejidos.

- a. Determinar en cortes coronales que incluyan a la sustancia nigra (SN) y cuerpo estriado (CPu), la inmunorreactividad de tirosina hidroxilasa (TH) y de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) en respuesta a la administración del neurotóxico. Evaluar la inmunoreactividad comparativa en todos los grupos de estudio.
- b. Desarrollar e implementar un sistema para la cuantificación automatizada de células dopaminérgicas positivas a TH en SN.

Analizar el metabolismo y la actividad dopaminérgica en CPu y SNpc de los animales.

- a. Determinar la dinámica de funcionalidad dopaminérgica.

Evaluar el efecto del  $E_2$  en la expresión de proteínas que regulan la actividad de poblaciones gliales específicas.

- a. Determinar el efecto de  $E_2$  sobre la expresión de los receptores de dopamina  $D_1$ ,  $D_2$  y DAT en cultivo primario de astrocitos de rata.
- b. Analizar la acción del  $E_2$  sobre la expresión de marcadores específicos de neuroinflamación en cultivo primario de microglia de rata.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos realizados en este trabajo de tesis siguieron las pautas para cuidado y uso de animales de laboratorio provistas por el Nacional Research Council, (National Research Council Institute of Laboratory Animal Resources).

Todos los protocolos experimentales han sido aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina; con aval n° 86/2016.

Todos los esfuerzos fueron maximizados para minimizar el sufrimiento del animal.

#### 3.1. Animales de experimentación

A Se utilizaron ratas macho adultas (8 a 12 animales por grupo) de la cepa Sprague-Dawley criadas en nuestro bioterio. Durante el curso de los estudios comportamentales, los animales se mantuvieron en condiciones óptimas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y luz controlada (12 horas luz/ 12 horas oscuridad, luces encendidas de 7.00 a.m. a 7.00 p.m.) y tuvieron libre acceso a alimento y agua.

##### 3.1.1. Procedimiento quirúrgico

A los 60 días post nacimiento, con un peso entre los 280-340 g., se anestesió a los animales según los protocolos de rutina con ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (10 mg/kg, i.p.). Luego de la anestesia, los animales fueron colocados en un equipo de cirugía estereotáxica (David Kopf, USA) para inducir la condición de hemiparkinsonismo. Tomando como referencia al punto de Bregma y con una inclinación de  $0^\circ$ , se realizó una perforación en el cráneo usando un torno manual, siguiendo las coordenadas AP: +1,2 mm; ML: +2,5 mm; DV: -5,0 mm; TB en 0 mm, como se ilustra en la Figura 3.1.1.1 (Paxinos & Watson, 2005).

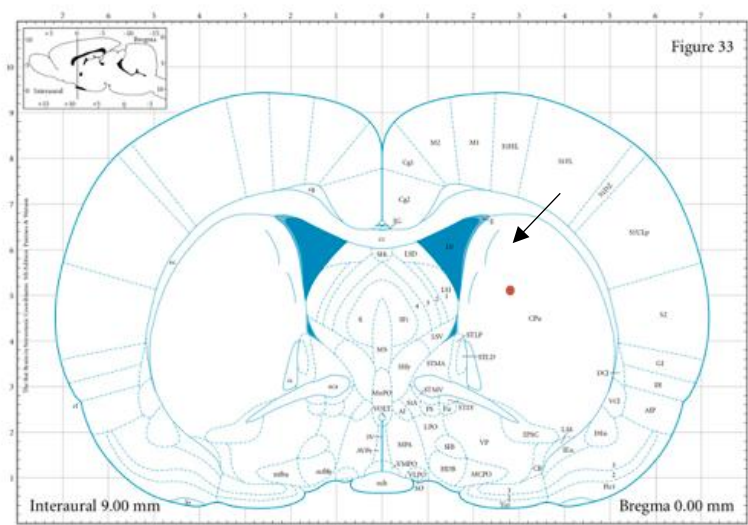


Figura 3.1.1.1 Representación esquemática de un corte coronal de cerebro donde se muestra el lugar de microinyección de la 6-OHDA en el CPu. Modificado de Paxinos G. and Watson C (Paxinos & Watson, 2005).

La 6-OHDA se disolvió en una concentración de 2 µg/µl salina en 0,1% de ácido ascórbico siguiendo las coordenadas anteriormente mencionadas (Casas y cols., 2013). La inyección del neurotóxico en CPu izquierdo se realizó con una jeringa Hamilton adaptada al aparato estereotáxico a un flujo de 0,5µL/min.

Finalizada la cirugía, los animales fueron regresados a sus respectivas cajas por una semana de recuperación; tiempo en el que se iniciaron el tratamiento con 17β-estradiol y los estudios comportamentales.

### 3.1.2. Tratamiento con 17β-estradiol

A los 7 días posteriores a la lesión y durante 10 días consecutivos los animales de cada grupo recibieron una inyección diaria subcutánea con una dosis de vehículo (aceite de maíz), o de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>=Benzoato de estradiol 0,1µg/kg/día). La dosis seleccionada es utilizada para administrar de forma subcrónica la hormona, que puede actuar a nivel del SNC para ejercer además del efecto neuroendócrino clásico, un potencial efecto neuroprotector (Caligaris y cols., 1972; Schiaffini y cols., 1974).

Los animales se distribuyeron en 4 grupos experimentales:

- C: rata lesionada en CPu izquierdo con vehículo y tratada con vehículo.
- E: rata lesionada en CPu izquierdo con vehículo y tratada con E<sub>2</sub>.
- HP: rata lesionada en CPu izquierdo con 6-OHDA (HP), tratada con vehículo.
- HP+E: rata lesionada en CPu izquierdo con 6-OHDA (HP), tratada con E<sub>2</sub>.

### 3.2. Estudios comportamentales

El protocolo experimental que se implementó en este trabajo se presenta en el esquema de la Figura 3.2.1.

Posterior al procedimiento quirúrgico y al tratamiento, dependiendo del grupo experimental, se realizaron diversas evaluaciones comportamentales para evaluar la presencia de alteraciones en la funcionalidad motora involucradas por la lesión con 6-OHDA.

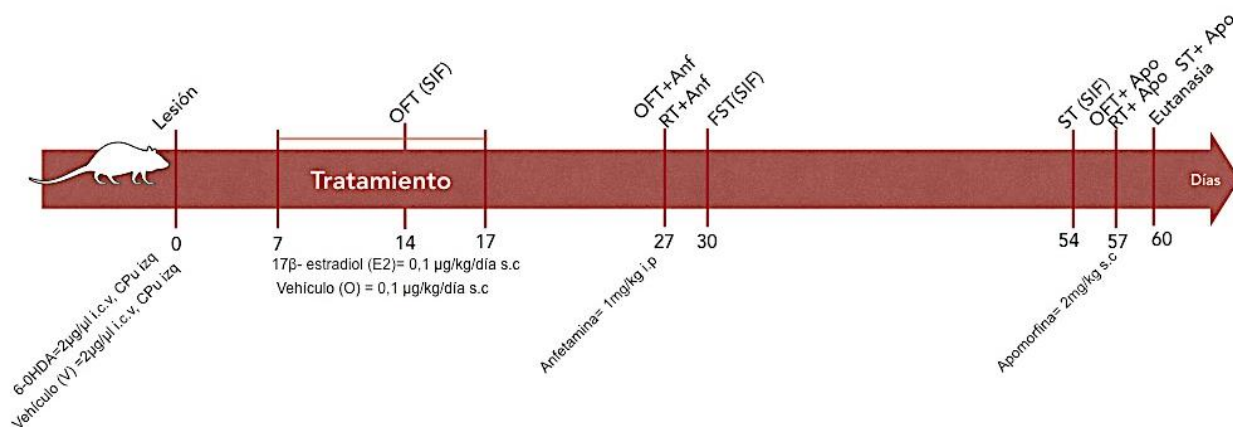


Figura 3.2.1 **Esquema representativo del protocolo experimental.** Las siglas corresponden a OFT: Test de campo abierto; RT: test de actividad rotacional; FST: test de natación forzada y ST: test de acinesia del miembro anterior.

Se realizaron los test de actividad rotacional (RT), de campo abierto (OFT), de acinesia del miembro anterior (ST) y de natación forzada (FST). Dependiendo del test específico, las evaluaciones se realizaron durante la semana 2<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> y 8<sup>o</sup> para cada grupo.

Algunos desempeños comportamentales fueron inducidos farmacológicamente con anfetamina (Anf) y apomorfinina (Apo); mientras que en otros casos no hubo inducción farmacológica (SIF). Cabe destacar que las pruebas se realizaron durante el día, desde las 10:00 a.m. hasta las 17:00 a.m.

### 3.2.1. Test de campo abierto (OFT)

El experimento consiste en la exposición del animal a una situación novedosa durante 5 minutos; período en que se evalúa la exploración, locomoción del animal y la actividad no ambulatoria (Gould y cols., 2009).

En cada performance el cada animal fue expuesto a un campo abierto sin la presencia de ningún estímulo adicional, de modo que se permitió que explorara libremente la zona.

El campo abierto consiste en una caja de madera de 60cm de ancho x 80cm de largo x35cm de alto. El piso de la caja es de color negro y está dividido con líneas blancas en 48 cuadrados de 9,5cm de lado cada uno. La caja debe estar ubicada en una habitación acondicionada para tal fin (Gould y cols., 2009; Casas y cols., 2013).

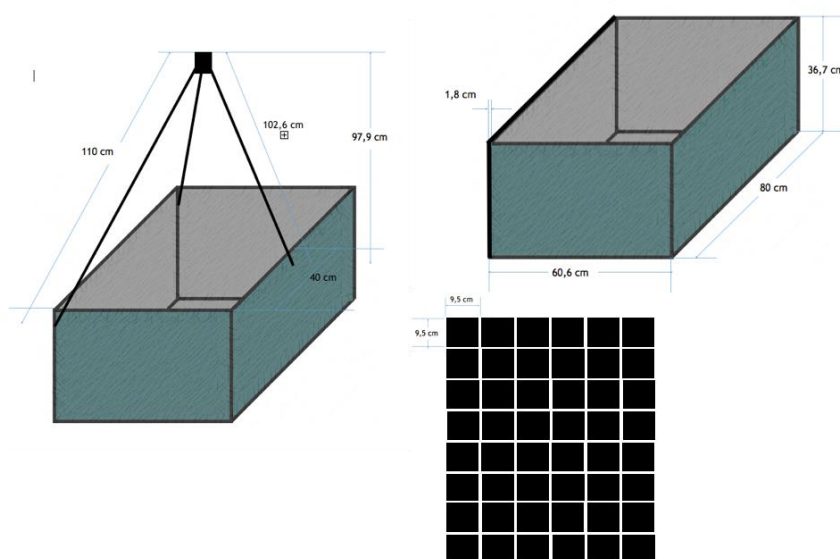


Figura 3.2.1.1 Disposición de elementos para el test de campo abierto. Se muestran las dimensiones de la caja sus grillas interiores y la altura del trípode que contiene la cámara filmadora.

Los animales fueron llevados a la sala de evaluación comportamental con una hora de anterioridad a la ejecución del test. Para el momento de la evaluación fueron ubicados en el centro de la caja y filmados por 5 minutos (300 segundos).

Cada video fue procesado tiempo real con el software Anymaze v4.99 (Figura 3.2.1.2) donde se evaluaron las siguientes variables:

#### Actividad ambulatoria: movimientos detectados como desplazamiento.

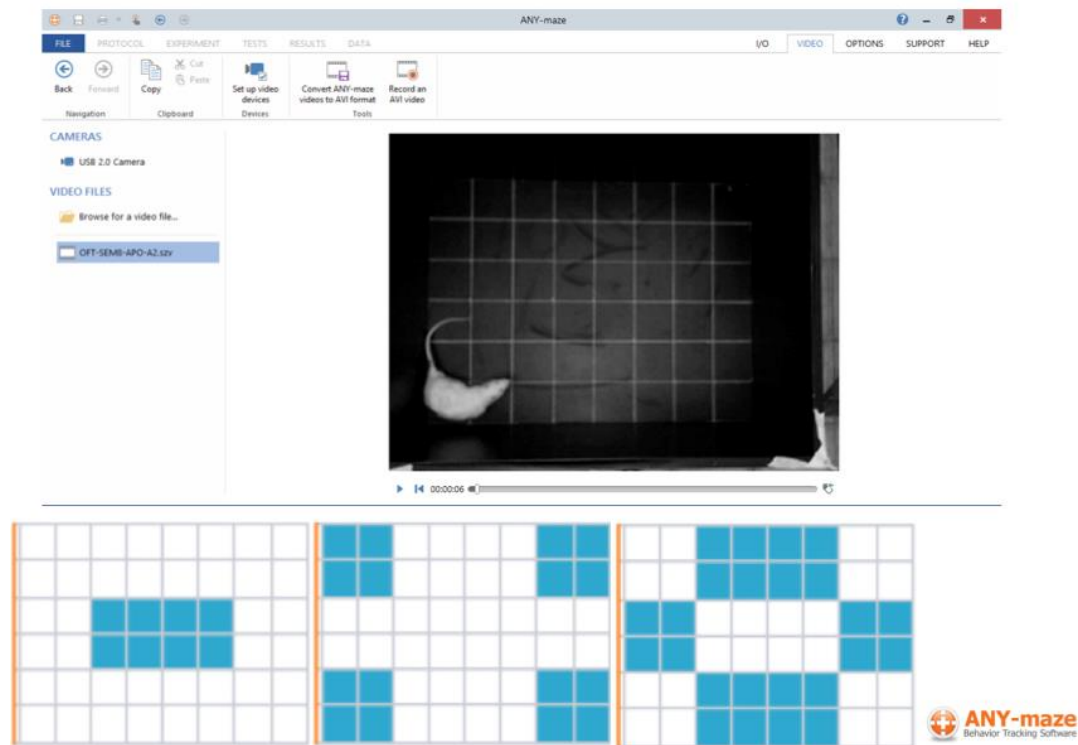
- Cruce de líneas [n°]: frecuencia de cruce con las cuatro extremidades en la cuadrícula.
- Tiempo en cada zona [s]: como muestra la Figura 3.2.1.2 se definieron tres zonas de

interés, el centro, las esquinas y los bordes.

- Velocidad promedio [m/s]: relación espacio tiempo promedio de la actividad exploratoria.
- Distancia total recorrida [m]: espacio recorrido durante la totalidad del test.
- Trayectorias recorridas.

**Actividad no ambulatoria: cantidad de veces en que el animal se detiene y no se desplaza.**

- Cantidad de episodios [nº] y tiempo [s] de inmovilidad; tomando por convención como referencia para el inicio de esta actividad 2000 ms.
- Freezing: veces [nº] que el animal permanece en un mismo lugar en estado estacionario, con o sin piloerección y tiempo [s] total en que efectúa. Por convención, se contabiliza cuando el tiempo supera los 250ms.



*Figura 3.2.1.2 Software Anymaze para la evaluación del OFT. En la parte superior, se observa una captura de pantalla donde se están evaluando en tiempo real, los parámetros de interés. En la parte inferior de la figura se presentan las zonas de interés (centro, esquinas y bordes).*

### 3.2.1.1. Inducción farmacológica en OFT

En el día 14 post lesión, se evaluó la actividad en el campo abierto como se describió anteriormente, sin ninguna inducción farmacológica (SIF). En el día 27 y 57 post lesión, los animales recibieron una inyección de anfetamina (Anf= 1mg/kg i.p.) y de apomorfina (Apo=

2mg/kg s.c.), respectivamente (Deumens y cols., 2002). Posterior a cada una de las administraciones de los fármacos se esperaron dos minutos antes de colocarlos en el campo abierto.

### 3.2.2. Test de actividad rotacional (RT)

Este test evalúa la asimetría en el modelo de hemiparkinsonismo generada por el desequilibrio que existe en el contenido de DA entre el CPU homolateral inyectado con el neurotóxico y el CPU contralateral. Esta actividad es interpretada como un signo motor de degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal de la enfermedad en roedores (Dauer & Przedborski, 2003).

Como se muestra en la Figura 3.2.2.1, el dispositivo utilizado (Raturn) consiste de un recipiente plástico semiesférico (bowl), apoyado sobre una base giratoria conectado a un programa informático específico que contabiliza la cantidad de rotaciones que otorga un sensor colocado en un brazo mecánico (Casas y cols., 2011).

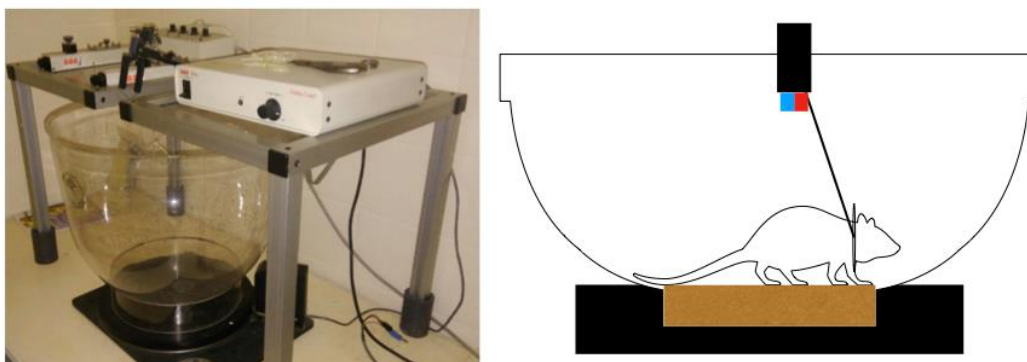


Figura 3.2.2.1 *Equipamiento específico para evaluar la actividad rotacional.* En la figura de la izquierda se observa la maquinaria del equipo Raturon; en la de la derecha la disposición de los sensores que registran las conductas rotatorias realizadas por el animal.

En este test se realizó la inducción farmacológica y se determinaron las siguientes variables:

- Rotaciones a la derecha/ izquierda [n°]
- Rotaciones netas [n°]
  - Con anfetamina, se calcula como la diferencia entre el número de rotaciones hacia el lado izquierdo menos el número de rotaciones hacia el lado derecho.
  - Con apomorfina, se calcula como la diferencia entre el número de rotaciones hacia el lado derecho menos el número de rotaciones hacia el lado izquierdo.
- Tiempo total de rotación a la derecha/ izquierda [s]
- Tiempo máximo de rotación a la derecha/ izquierda [s]

#### 3.2.2.1. Inducción farmacológica en RT

En las semanas 4 y 8 post lesión, luego del OFT, los animales fueron evaluados en el Raturon.



Específicamente, el día 27 post lesión, posterior a la inyección de anfetamina (Anf= 1mg/kg i.p.) se contabilizaron las rotaciones ipsilaterales (vueltas a la izquierda/60 min). En la semana 8 post-lesión (día 57) posterior a la inyección de apomorfina (Apo= 2mg/kg s.c.) se contabilizaron las rotaciones contralaterales (vueltas hacia la derecha/60 min) (Casas y cols., 2011).

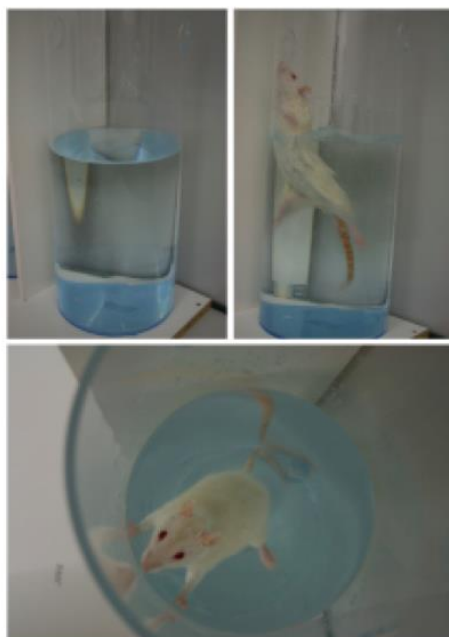
En ambos casos, los animales fueron colocados en el equipo diez minutos antes de comenzar con el experimento, de manera que se habituaran al nuevo ambiente.

### 3.2.3. Test de natación forzada (FST)

Esta prueba comportamental fue descrita en sus inicios para evaluar la actividad de los animales cuando estaban bajo el efecto de drogas antidepresivas (Porsolt y cols., 1978,1997). Si bien en la actualidad continua siendo un método validado para medir la depresión (Gao y cols., 2014) se ha incrementado su uso para validar distintos tipos de tratamientos relacionados con la actividad de nado del animal (Mazes: Forced Swimming Test <https://mazeengineers.com/portfolio/>).

En este trabajo, la actividad natatoria permite evaluar la depleción dopaminérgica de la vía nigroestriada luego de la injuria con 6-OHDA, la orientación espacial y la atención del animal en el nado forzado.

El test consiste en introducir al animal en un tanque de acrílico (60cm de alto y 35 cm de diámetro, Figura 3.2.3.1) lleno con agua templada (20°C) por 5 minutos y monitorear su actividad de nado.



*Figura 3.2.3.1 Tanque de acrílico donde se evaluó el FST. Vistas del tanque y la cámara frontal o lateral (arriba izquierda y derecha) y la cámara vertical (abajo).*

Los roedores son nadadores naturales, por lo que la evaluación de la actividad en cortos períodos de tiempo (menores de 12 minutos) no los estresa (Quillfeldt, 2016). Igualmente, es importante destacar que el nivel de agua debe ser suficiente para que los animales no

toquen la base del cilindro con la cola o los miembros posteriores y, al mismo tiempo, en el extremo superior debe ser tal que no puedan escapar, de manera que el test sea evaluado correctamente.

En el día 30 post lesión los animales fueron llevados con una hora de antelación a la sala de comportamiento donde se realizó el test. En esta evaluación no se utilizó ninguna inducción farmacológica (SIF).

Una vez finalizado el experimento, los animales fueron retirados del tanque, secados con una toalla y colocados cercanos a una estufa en una habitación adyacente. El agua del tanque se renovó completamente en intervalos de tres animales.

Cada video fue filmado con una cámara vertical y una frontal en relación al tanque como se muestra en la Figura 3.2.3.1.

Todas las evaluaciones fueron analizadas en tiempo real con el software Anymaze v4.99 donde se determinaron las siguientes variables generales:

- Velocidad promedio [m/s]
- Distancia total de nado [m]
- Trayectorias de nado
- Episodios de movilidad e inmovilidad [n°]
- Tiempos de movilidad e inmovilidad [s]

Para el caso del posicionamiento frontal de la cámara se determinaron cuatro zonas de interés como se muestran a continuación:



Figura 3.2.3.2 Tanque de acrílico vista frontal. Las áreas que se determinaron fueron (de izquierda a derecha): salto, flote, sumergida y buceo.

Con esta configuración, además de los parámetros mencionados anteriormente, se consideraron la cantidad de entradas [n°] y el tiempo total en cada zona [s].

Para el caso del posicionamiento de la cámara vertical no se determinaron zonas, pero si se pudieron analizar (además de las variables generales) las rotaciones horarias y antihorarias de los animales en el tanque.

### 3.2.3.1. Desarrollo del software para la evaluación del FST

Debido a que este test es ampliamente utilizado para evaluar conductas en nuestro laboratorio, se buscó la forma de automatizar las observaciones con un software propio. El diseño fue realizado con software libre usando el lenguaje Python v2.7 (<https://www.python.org/>) (Nieto y cols., 2020). En la figura 3.2.3.1.1 se presenta el diagrama de bloques de la interfaz.

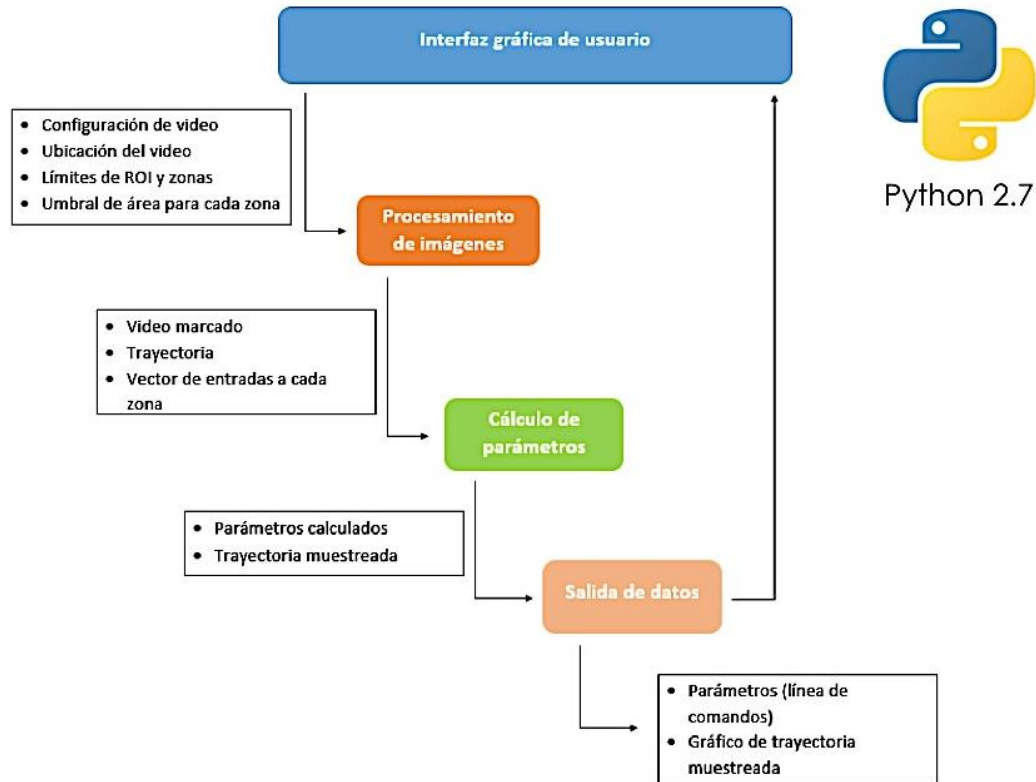


Figura 3.2.3.1.1 Interfaz gráfica del usuario y diagrama de bloques con entrada y salida de datos para el desarrollo del software para FST.

Para este desarrollo solo se empleó una cámara posicionada de forma frontal frente al tanque y se trabajó con las mismas zonas del software comercial Anymaze (Figura 3.2.3.2).

### 3.2.3.2. Validación del software (FST)

En base al número de entradas y el tiempo de permanencia de los animales en cada zona se realizó la comparación entre resultados obtenidos en Anymaze y nuestro software. El estudio se hizo para cada uno de los grupos experimentales, pero debido a que la actividad para algunos casos en las zonas de salto y buceo es escasa o nula, las zonas seleccionadas para este análisis fueron flote y sumergida.

### 3.2.4. Test de acinesia del miembro anterior (ST)

El Test de acinesia del miembro anterior o Stepping Test (ST) es una herramienta de gran utilidad para analizar deficiencias motoras en las extremidades anteriores de los animales lesionados, análogos a la acinesia de extremidades y problemas de la marcha que se presentan la EP humana (Olsson y cols., 1995). Se ha propuesto como un método altamente útil que puede ser inducido por drogas o no, para monitorear la acinesia, bradicinesia e hipocinesia es decir ausencia, enlentecimiento y disminución progresiva de movimientos (Schallert y cols., 1992).

El test consiste en evaluar el movimiento de uno de los miembros anteriores mientras se desplaza al animal en una superficie de madera lisa. Debido a que requiere una alta manipulación o *handling* (Figura 3.2.4.1), los animales fueron entrenados tres días antes para habituarse a la sujeción que este análisis requiere y para familiarizarse con la mano del experimentador. No se tabularon los resultados de las pruebas de ensayo y habituación.

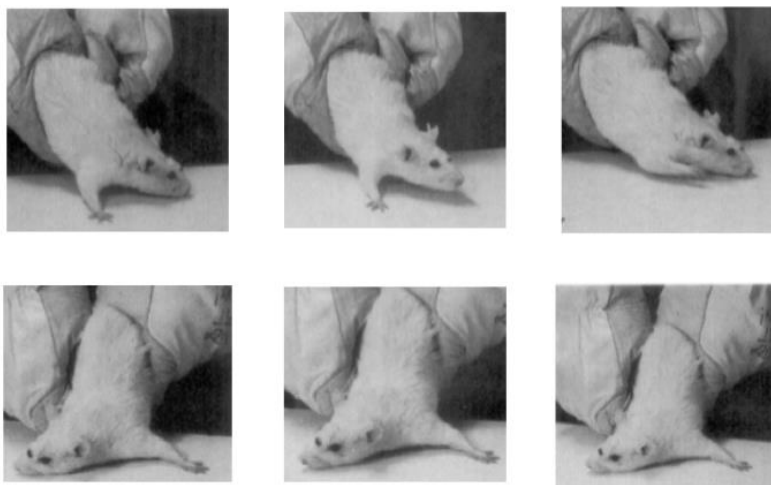


Figura 3.2.4.1 Manipulación del animal de experimentación en la secuencia de testeo para la evaluación del ST. Modificado de Olsson cols. (Olsson y cols., 1995).

Para realizar el test, el animal fue retenido por el experimentador con una mano fijando la pata trasera y levantando ligeramente la parte posterior del animal sobre la superficie. La otra mano fijó la extremidad anterior del animal para que no fuese filmada (Figura 3.2.4.2). La pata delantera libre debe recorrer 0.9 m de una superficie de madera en 5 segundos.



Figura 3.2.4.2 Captura de pantalla del video de un animal realizando el ST. Se observa la sujeción del experimentador y las dimensiones de la superficie de testeo.

El día del test se contabilizó la cantidad de pasos realizados a lo largo de la superficie. La evaluación se realizó en la siguiente secuencia:

- 1° Extremidad Derecha hacia el lado derecho (D-D)
- 2° Extremidad Derecha hacia el lado izquierdo (D-I)
- 3° Extremidad Izquierda hacia el lado izquierdo (I-I)
- 4° Extremidad Izquierda hacia el lado derecho (I-D)

El test se repitió tres veces y se obtuvo una media del número de pasos realizados. Este

parámetro fue el utilizado para la validación de las observaciones automatizadas.

### 3.2.4.1. Inducción farmacológica en ST

En el día 54 post lesión, se realizó el ST, sin inducción farmacológica (SIF). En el día 57 post lesión los animales recibieron una inyección de Apo (2mg/kg s.c.) y, luego del OFT y RT, fueron evaluados para ST.

Este test es el último que se ejecuta dentro de la batería de evaluaciones comportamentales debido a su alto grado de manipulación.

### 3.2.4.2. Desarrollo del software para la evaluación del ST

Otro de los objetivos planteados era automatizar el análisis de las observaciones para el ST. Partiendo del diagrama de implementación (Figura 3.2.4.2.1), se realizó el acondicionamiento de la sala de conducta para lograr una grabación adecuada de video para posteriormente analizar cada video.

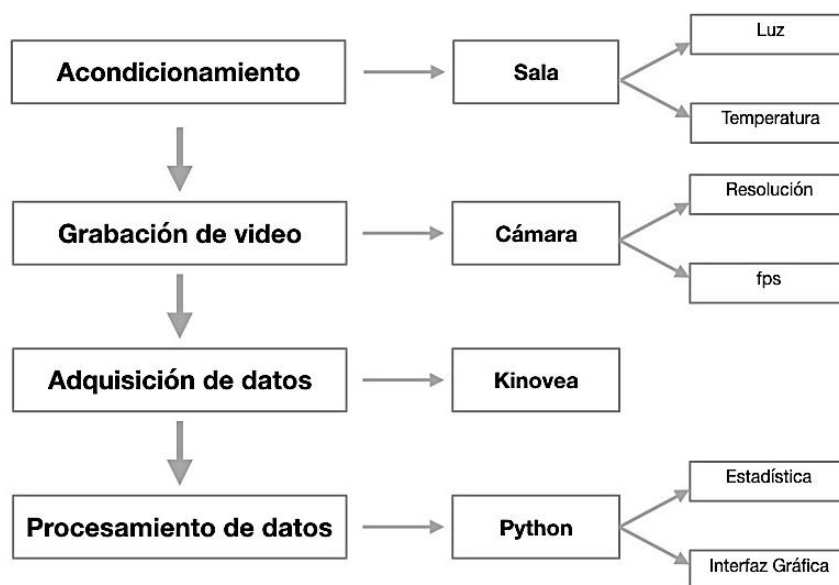


Figura 3.2.4.2.1. Etapas para la ejecución de la evaluación del test de acinesia del miembro anterior.

Para la adquisición de datos (trayectorias) se trabajó con un software libre llamado Kinovea (<https://www.kinovea.org/>) v0.8.15. Posteriormente, los datos obtenidos fueron procesados con Python para analizar los siguientes parámetros de movimiento:

- Número de pasos [n°]: contado para ambos miembros anteriores en la dirección de movimiento de revés y derecha.
- Tiempo de inicio [s]: hasta que el animal inició cada movimiento de la extremidad anterior.
- Tiempo de stepping [s]: desde la iniciación del movimiento hasta que el animal recorrió los 0.9m de la mesa.

- Longitud de pasos [cm]: magnitud del movimiento en cada paso.

El único parámetro que se puede correlacionar entre observaciones directas y automatizadas, es la cantidad de pasos. Los demás parámetros no pueden ser evaluados por observación directa del experimentador y solo pueden ser medidos con una interfaz diseñada para tal fin. Los valores promedios de las cantidades de pasos fueron utilizados para validar este software. Es importante destacar que este diseño cuenta, además del clásico cálculo de los parámetros mencionados, con un módulo estadístico y con una interfaz gráfica para el procesamiento acabado de los resultados.

### 3.3. Eutanasia

Las manifestaciones comportamentales estudiadas con este modelo se relacionan con el desequilibrio en la actividad de los sistemas de neurotransmisión de la vía dopaminérgica nigroestriatal; por lo que, luego de finalizados las evaluaciones comportamentales (a los 60 días post lesión) los animales de los diferentes grupos fueron sacrificados por decapitación. Luego de remover sus cerebros, se extrajeron las áreas cerebrales específicas involucradas directamente con la acción del neurotóxico (SNpc y CPu) para estudios posteriores. En el caso de las determinaciones inmunohistoquímicas los animales fueron eutanasiados bajo anestesia por perfusión transcardíaca como se explica en detalle en el siguiente apartado.

### 3.4. Técnica de inmunohistoquímica para la determinación de Tirosina Hidroxilasa y Proteína Ácida Fibrilar de la Glia

Los animales fueron anestesiados según los protocolos de rutina con ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (10 mg/kg, i.p.) y sometidos a la eutanasia por perfusión transcardíaca para la fijación del tejido cerebral.

Una vez que el animal alcanzó un plano quirúrgico de anestesia, se lo colocó sobre una bandeja poco profunda para ejecutar el procedimiento.

Brevemente, se realizó una incisión lateral de 5-6 cm a través del tegumento y la pared abdominal justo debajo de la caja torácica; separando cuidadosamente el hígado del diafragma. Posteriormente, se realizó una pequeña incisión en el diafragma con las tijeras romas y curvas; esta incisión se continuó a lo largo de toda la caja torácica para exponer la cavidad pleural. Desplazando cuidadosamente los pulmones a los lados, se realizó un corte lateral a través de la caja torácica hasta la clavícula. Este corte se repitió en el lado contralateral. Luego, se levantó el esternón, recortando cuidadosamente cualquier tejido que lo conectase con el corazón para tener una vista clara del área. Con un *butterfly* (23M) se realizó una pequeña incisión en el extremo posterior del ventrículo izquierdo; seguidamente se clampeó la aorta descendente para trabajar solamente con el circuito de la circulación menor. Procurando que el *butterfly* no se saliera de ese lugar, con tijeras oftalmológicas se realizó un corte en la aurícula derecha y se dio inicio al bombeo con bomba peristáltica de la solución salina 0,9%, pH=7,4 durante mínimo 15 minutos, dependiendo del tamaño de cada animal.

Una vez transcurrido este período se procedió a bombear solución de fijación durante 30 minutos. Para lo cual, se preparó buffer PBS (pH 7,4; 10X) con 1 L de H<sub>2</sub>O en el que se disolvieron 9 g NaCl, 144 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 795 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Luego, en PBS 1X se agregó paraformaldehído al 4% para realizar la solución de fijación.

Una vez finalizada la perfusión, los cerebros fueron removidos y guardados durante la noche en un tubo Falcon de 50 ml con 40 ml solución de fijación a 4°C. Al día siguiente, fueron pasados a un nuevo tubo Falcon que contenía 40 ml de sucrosa 30% en PBS 1X donde también permanecieron a 4°C hasta que estuvieron completamente embebidos. Ocurrido esto, fueron cuidadosamente colocados en papel aluminio y criopreservados a -80°C hasta el día en que se obtuvieron las secciones coronales con micrótomo.

### 3.4.1. Tirosina Hidroxilasa (TH)

Tirosina hidroxilasa (TH) es la primera enzima en la biosíntesis de catecolamina (CA) y cataliza la conversión de L-tirosina a L-DOPA; por lo tanto, es un marcador útil de todas las neuronas CA y permite su localización en diferentes áreas del cerebro. Brevemente, esta técnica ocasiona que el primer anticuerpo específico se acople a un segundo anticuerpo de manera que la reacción desarrolla color en las neuronas TH+ (Valdez y cols., 2007). Así, las neuronas que expresan TH se marcan y se detectan en las áreas de interés para luego observarlas al microscopio y contabilizarlas.

Los cerebros fijados mediante perfusión intracardiaca *ex vivo* se extrajeron del freezer y se seccionaron en cortes seriados de 30 µm con un criostato (-20°C) (Microm HM520, Thermo Fisher Scientific, DE). Se colectaron cortes correspondientes a los planos 23-35 relativos a CPU y correspondientes a la SN de los planos 71 al 80 (Paxinos & Watson, 2005).

Los cuerpos celulares inmunoreactivos a TH (TH+) de las secciones en *free floating* fueron procesados utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón contra TH diluido en una proporción de 1:50 en solución portadora (Semenko y cols., 1986; Valdez y cols., 2007). Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con biotina (Agilent DAKO, Santa Clara, EEUU) y se revelaron con avidina-peroxidasa (ABC Kit, Vector Corporation, Maraval Lifesciences, EEUU) diluida a 1:100 en tampón Tris (TB, Tris-HCl 0,1 M; pH 7,4) usando sulfato de níquel amonio como potenciador de tinción.

En los experimentos de control de especificidad, el anticuerpo primario se omitió en el curso de la inmunotinción.

Los sitios TH+ se localizaron luego utilizando el complejo de enzima avidina-biotina (kits VECTASTAIN ABC, Vector Laboratories, Reino Unido). La reacción se visualizó utilizando 3,3'-diaminobenzidina como un cromógeno.

Las secciones se montaron en portaobjetos silanizados, se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol, se aclararon en xileno y se cubrieron con portaobjetos en bálsamo de Canadá.

#### 3.4.1.1. Adquisición de imágenes

Las secciones seleccionadas se examinaron en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200, Nikon Instruments, EEUU). Las secciones de cada cerebro se clasificaron según la ubicación



dentro del CPu y la SN, según planos comparables con las figuras del atlas de cerebro de rata adulta (Paxinos & Watson, 2005).

Las microfotografías generadas por computadora de los diferentes planos se obtuvieron con una cámara digital (DN100) conectada al microscopio con objetivos 4X y 10X.

Las imágenes se reunieron en figuras (1178 x 1000 px) para un análisis adicional utilizando el software FIJI (V2.0.0 <https://fiji.sc/>) en las que se seleccionaron planos equivalentes a cada grupo experimental y en ellos se contabilizaron las marcas TH+ en la SN. En el caso del CPu, sólo se obtuvieron las imágenes y se observaron al microscopio, pero no se realizó el conteo.

### 3.4.1.2. Parámetros de interés

Se estimaron por el método de conteo convencional los siguientes parámetros en las figuras de SN:

- Número de neuronas TH+ en el hemisferio derecho (TH+NN)
- Número de neuronas TH+ en el hemisferio izquierdo (TH+NN)
- Número total de neuronas TH+: calculado como la diferencia de TH+ en ambos hemisferios (derecho- izquierdo; Total TH+NN).

En las secciones con marcas TH+ correspondientes al CPu, se observó la distribución e intensidad de la reacción.

### 3.4.1.3. Desarrollo del software para la evaluación de neuronas TH+

En la Figura 3.4.1.3.1 se muestra la estructura de las decisiones que toma el programa (desarrollado en Netbeans v8.2) que cuenta las neuronas marcadas con TH en SN.

Para realizar la interfaz se utilizó el lenguaje Java con la posibilidad de instalar y correr la macro generada en el software FIJI.



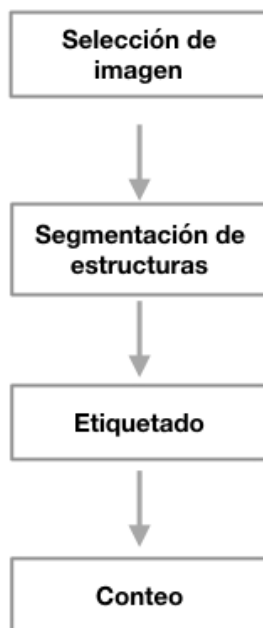


Figura 3.4.1.3.1 2Etapas de la automatización para el conteo de neuronas TH+ en la SN.

Se estimaron por el método automatizado los mismos parámetros que en el conteo manual. Ambos resultados se correlacionaron para darle validez al desarrollo informático.

Se calculó el grado de lesión para cada grupo experimental tomando el grupo Control como el 100%. Se estimaron variables estereológicas como: el coeficiente de error, el coeficiente de varianza y la variabilidad biológica (West y cols., 1991; Finkelstein y cols., 1995).

Finalmente, ya que el software permitía analizar el área ocupada por las neuronas, se realizaron regresiones para establecer la relación entre área ocupada y total de neuronas en cada imagen.

### 3.4.2. Proteína Ácida Fibrilar de la Glia (GFAP)

Por otra parte, similar a la técnica descrita para TH, pero utilizando anticuerpo específico contra la Proteína Ácida Fibrilar de la Glía (GFAP); se determinó la densidad astrocitaria en cortes de SN y CPu.

Para este estudio, el GFAP (Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein antibody produced in mouse, Merk, Chile) estaba diluido en una proporción de 1:600 en solución portadora y el anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra conjugado con biotina (Anti-Mouse IgG (whole molecule - Biotin antibody produced in goat, Merk, Chile) en una concentración 1:1000.

#### 3.4.2.1. Adquisición de imágenes

Se procedió de la misma forma que en el apartado 3.4.1.1, las imágenes se adquirieron de la misma manera que para TH y la cuantificación de las marcas se realizó utilizando FIJI.

### 3.4.2.2. Parámetros de interés

Se estimaron por el método de conteo convencional los siguientes parámetros en las figuras de SN y CPu:

- Número de células GFAP+ en el hemisferio derecho
- Número de células GFAP+ en el hemisferio izquierdo
- Número total de GFAP+: calculado como razón entre la suma de astrocitos de ambos hemisferios y el espesor de corte.

Con los valores obtenidos de neuronas TH+ y astrocitos GFAP+ en SN se realizó una regresión para conocer la distribución conjunta de estas variables en cada grupo experimental.

## 3.5. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la determinación de DA y DOPAC

Por sus siglas en inglés, HPLC: High Performance Liquid Chromatography; es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica.

En nuestro proyecto analizamos por medio de esta técnica el catabolismo de DA. Trabajamos con la determinación de DA y su principal metabolito, DOPAC. Estas mediciones son de nuestro interés debido a que la formación de DOPAC puede utilizarse como indicador de la actividad dopaminérgica o recambio de DA en ratas. A su vez, la relación DOPAC/DA permite inferir sobre la depleción del sistema.

Para este objetivo, los animales de todos los grupos de estudio fueron sacrificados por decapitación, sus cerebros removidos para la extracción de estructuras.

En primer lugar, se extrajeron las SNpc de ambos hemisferios, utilizando para ello una tijera oftalmológica. Posteriormente, se extrajeron ambos CPu que con una espátula curva. Las estructuras fueron separadas en izquierda y derecha, guardadas en tubos Eppendorf de 0,5 ml y conservadas a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 3.5.1. Determinación de la concentración de DA y DOPAC

Se realizó el protocolo publicado por Greiner y cols., con algunas modificaciones (Greiner y cols., 2008). Primeramente, para cuantificar la concentración de DA y DOPAC en las estructuras, los tejidos fueron pesados y colocados en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. A cada muestra se le agregó 1ml ácido perclórico 0,25 N y luego se la sonicó por un minuto. Luego, las muestras fueron envueltas en papel aluminio criopreservarlas a -80°C.

Para la cuantificación el sobrenadante fue filtrado (filtro estéril de 0,22µm) y en el sistema Waters de HPLC (464; Waters Corp., Milford, MA) equipado con una columna de fase reversa C18 (Lichrosphere, 60 RP-Select B, Merck, Darmstadt, Germany) acoplada a un detector electroquímico (464; Waters Corp.) se inyectó un volumen de 20µl de la solución. La fase móvil contenía 100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (PM: 137.99), 0,42 mM de octil sulfato

de sodio (PM: 232,3); 0,02% EDTA (EDTA-Na<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O PM: 372.25) y 0,5% de acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN; pH 2,5) con un flujo de 1ml/min. El potencial del detector amperométrico era de 0,65 V y la sensibilidad de 1 nA.

Con estas condiciones experimentales, el tiempo de retención para DA fue de 14 minutos y para DOPAC de 22 minutos. Curvas estándar de calibración para DA y DOPAC de 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 pg fueron medidas para realizar la cuantificación de cada una de las medidas (Figura 3.5.1.1).

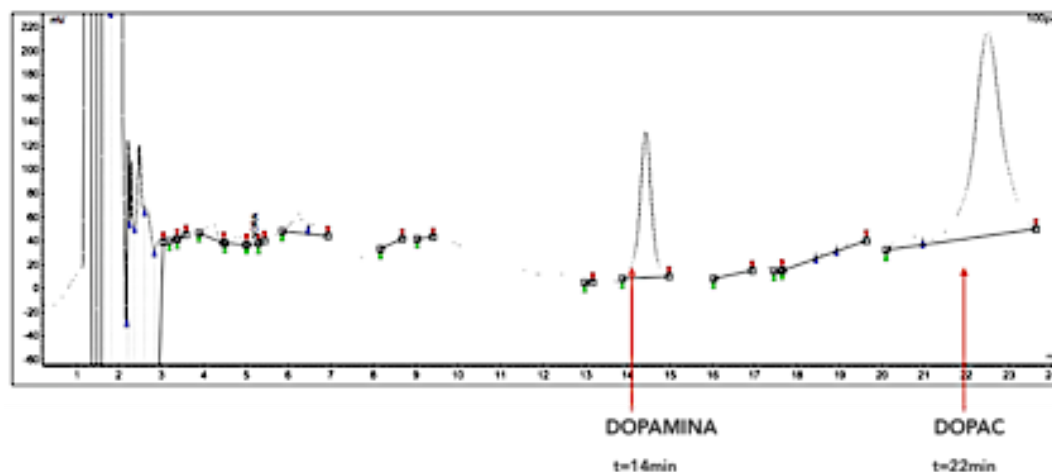


Figura 3.5.1.1 Curvas estándar y tiempos de retención obtenidos con por cromatografía líquida de alta eficacia con detección electroquímica para Dopamina y DOPAC.

Para este experimento se estimaron los siguientes parámetros:

- Concentración de DA en cada muestra [pg DA/mg tejido]
- Concentración de DOPAC en cada muestra [pg DOPAC/mg tejido]
- Relación DOPAC/DA

Con estos datos, además se calcularon correlaciones entre hemisferio derecho e izquierdo para cada uno de los parámetros y grupos experimentales.

## 3.6. Cultivos primarios de células gliales

### 3.6.1. Animales de experimentación

Los cultivos primarios se obtuvieron de ratas de la cepa Wistar postnatales de entre 0 y 2 días (P0-P2). Los animales se obtuvieron del animalario del Instituto Cajal. El sacrificio y manipulación de los animales se llevó a cabo según la normativa de la Comisión Europea (86/609/CEE y 2010/63/UE) y el Real Decreto Español, R. D. 53/2013, de Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Instituto Cajal y la Consejería de Medio Ambiente y Territorio (Comunidad de Madrid, Ref. PROEX 200/14).

### 3.6.2. Preparación de las muestras

Una vez obtenidos los animales posnatales (P0-P2), se procedió al sexado de los animales. El criterio empleado para distinguir el sexo fue la presencia de una mayor distancia ano genital en los machos.

Los cerebros se colocaron en HBSS (Hank's balanced salt solution, Sigma-Aldrich), se retiraron las meninges y se separó la región del mesencéfalo (de ambos hemisferios) del resto de la corteza cerebral.

A continuación, se disgregó mecánicamente y lavó dos veces en HBSS. Luego, se completó la disgregación en DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium y suplemento F-12 en proporción 1:1, Sigma-Aldrich) con rojo fenol y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen) y 1% de antibiótico/antimicótico (DMEM 10:10:1, Invitrogen). La suspensión celular fue filtrada a través de una malla con un tamaño de poro de 40  $\mu\text{m}$  para conseguir una solución de células individuales. Posteriormente, las células fueron centrifugadas por 10 minutos a 1150 rpm, resuspendidas en el mismo medio de cultivo y sembradas en botellas de 75  $\text{cm}^2$  cubiertas con poly-L-lisina (Sigma-Aldrich) (Mecha y cols., 2011).

Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la confluencia (aproximadamente tras 7 días en cultivo).

### 3.6.2.1. Astrocitos

Para el cultivo de astrocitos, las células fueron agitadas a 37°C y 280 rpm en un agitador orbital (Infors HT) durante toda la noche. Luego, se eliminó el medio para minimizar la presencia de oligodendrocitos y microglia en el cultivo.

A continuación, las células se incubaron con tripsina al 0,05% (Sigma-Aldrich) para despegar las células. La suspensión celular fue centrifugada y el pellet se resuspendió en DMEM-F12 sin rojo fenol suplementado.

Las células se sembraron en botellas de 75  $\text{cm}^2$  cubiertas con poly-L-lisina y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar de nuevo la confluencia (generalmente 5 días después). Se volvió a repetir el proceso de agitación, tripsinización y centrifugación. A continuación, para el análisis de la expresión génica, las células se sembraron a una densidad de 300.000 células/ $\text{cm}^2$  en placas de 6 pocillos recubiertas con poly-L-lisina a 0,05mg/mL. Como medio de cultivo se empleó DMEM-F12 sin rojo fenol suplementado. Mediante este protocolo se obtuvieron cultivos de glía enriquecidos en astrocitos con un contenido menor del 5% en células Iba-1 positivas (microglia).

### 3.6.2.2. Microglia

Para obtener las células de la microglia se centrifugaron las células de las botellas a 230 rpm durante 3h a 37°C. Las células que se despegaron fueron centrifugadas a 168g por 10 minutos. Se utilizó como medio para la microglia purificada RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Thermo Fisher) a 37°C suplementado con 0,1% de FBS inactivado por calor. Las células se sembraron a una densidad de 200.000 células por cm<sup>2</sup> para el análisis por PCR (Yanguas Casás y cols., 2017).

### 3.6.3. Tratamiento de los cultivos y grupos experimentales

Tras 24 horas desde la siembra, se procedió a la aplicación del tratamiento. En primer lugar, se retiró el medio DMEM-F12 10:1 sin rojo fenol y se añadió de medio RPMI 0,1% en FBS en las placas durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se añadió a cada placa el tratamiento de 17β-estradiol (concentración de 0,01μM) con RPMI o sólo RPMI para el grupo control y se dejó actuar durante las siguientes 24 horas. Posteriormente las placas fueron llevadas a una cámara frigorífica (4°C) donde permanecieron almacenadas hasta su posterior análisis. Los cultivos, tanto de astrocitos como de microglia, se distribuyeron en 4 grupos experimentales:

- mc: cultivos de células machos que no recibieron tratamiento, solo RPMI.
- me: cultivos de células machos con tratamiento de E<sub>2</sub>.
- hc: cultivos de células hembras sin tratamiento, solo RPMI.
- he: cultivos de células hembras con tratamiento de E<sub>2</sub>.

### 3.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

#### 3.6.4.1. Astrocitos

Para analizar los cambios en la transcripción de los genes de interés tras realizar el tratamiento en el cultivo de astrocitos, en primer lugar, se procedió a extraer el ARN. Para ello se empleó el kit Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare).

Después, se sintetizó el ADN copia (ADNc) a partir de 2 μg de ARN usando la enzima transcriptasa inversa (M-MLV, Promega) según las instrucciones del fabricante.

Finalmente, el ADNc se amplificó mediante PCR a tiempo real con ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), usando los parámetros recomendados por el fabricante (40 ciclos consistentes en 15 s a 95°C seguidos de 1 min a 60°C). La enzima polimerasa utilizada fue la presente en SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) y los cebadores empleados fueron diseñados usando el programa Primer Blast del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y referencias específicas como se indica en la siguiente tabla.

Primer	Acceso #		Secuencia
<b>D<sub>1</sub></b>	NM_012546	S	5'- GCAGGAGAGTCTTTACCCCG -3'
		AS	5'- CCAGTTGCTGCCTGGACTAA -3'
<b>D<sub>2</sub></b>	NM_012547	S	5'- ACACCACTCAAGGATGCTGC -3'
		AS	5'- GTTGCTATGTAGGCCGTGGT -3'
<b>DAT</b>	NM_001044.4	S	5'- CGCAGGAGTCAGTCGAAGAA-3'
		AS	5'- TGAAGACATTGGTCCCACGG-3'

Tabla 3.6.4.1.1 *Primers específicos para la amplificación de secuencias en cultivo primario de astrocitos. La nomenclatura corresponde a D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> (Receptor de dopamina 1 y 2, respectivamente), y DAT (Transportador de dopamina).*

Para cada par de cebadores se seleccionó la dilución de ADNc apropiada para conseguir la misma eficiencia de amplificación que la de los genes de control endógeno ARNr 18S (acceso #X01117), 36B4(acceso #NM\_022402.2) y Rpl13a (acceso #A8017711). Los cambios en la expresión de ARNm se calcularon según el método  $\Delta\Delta Ct$  (Pfaffl y cols., 2004). 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 (Pfaffl , 2011).

### 3.6.4.2. Microglia

El procedimiento para RT-qPCR para analizar la transcripción de genes en microglia fue similar al descrito para astrocitos con la diferencia de que la síntesis de ADN copia (ADNc) se realizó a partir de 0,75  $\mu$ g de ARN usando la enzima transcriptasa inversa (M-MLV, Promega) según las instrucciones del fabricante y como genes de control endógeno se seleccionó 36B4 (acceso #NM\_022402.2) y GADPH (acceso #NM\_017008.4) (Yanguas Casás y cols., 2017).

Primer	Acceso #		Secuencia
<b>CD36</b>	NM_001109218.1	S	5'-CATTGGCGATGAGAAAGTGG-3'
		A	5'-GCCACAAACATCAGTACTCCA-3'
		S	
<b>Receptor de manosa</b>	NM_001106123.2	S	5'-GGTTGGATTGAGGCCTGAAA-3'
		A	5'-AACGTCCCTTTGTTTTGAACATC-3'
		S	
<b>MSR1</b>	NM_0011911939.1	S	5'-AGTAAAAAGGGCTCGCAGGA-3'
		A	5'-CTTCTGGGCCCTACAGCTTG-3'
		S	
<b>P2RY6</b>	NM_057124.2	S	5'-GGTGAAAGCAGGCCAACGACT-3'
		A	5'-TCTCAGCCTCAAGCTACCCTA-3'
		S	
<b>Scrab1</b>	NM_031541.1	S	5'-AGTAAAAAGGGCTCGCCAGGA-3'
		A	5'-CTTCTGGGCCCTACAGCTTG-3'
		S	
<b>TREM2</b>	NM_001106884.1	S	5'-CCACGTGTTTGTCTGTTGC-3'
		A	5'-CAGTGCCTCAAGGCGTCATA-3'
		S	

Tabla 3.6.4.2.1 *Primers específicos para la amplificación de secuencias en cultivo primario de microglia. La nomenclatura corresponde a: CD36 (Receptor de Colágeno tipo IV, Receptor de Trombospondina), Receptor de Manosa (Mannose Receptor), MSR1 (Receptor captador de macrófagos 1), P2RY6(Receptor plrimidinérgico), Scrab1 (Receptor eliminador clase B tipo 1), TREM2 (Receptor de disparo expresado en células mieloides 2).*

### 3.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism v.6.0. Inicialmente, los datos fueron sometidos al test Shapiro Wilks para probar si presentaban una distribución normal. Para los resultados paramétricos, las pruebas estadísticas utilizadas fueron evaluadas con t de Student de dos colas para comparar las medias entre dos grupos; ANOVA de una o dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples entre los diferentes grupos experimentales. Para los datos no paramétricos se realizaron evaluaciones con el test de Kruskal Wallis para comparaciones entre los cuatro grupos con post hoc test de Dunn. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la (media $\pm$ SEM).

Para algunos ensayos se estudió la correlación entre variables. Como las observaciones resultaron ser lineales; se empleó el Coeficiente de Correlación lineal de Pearson.

Otros resultados fueron sometidos a un análisis de regresión. Por prueba y error se buscó el modelo de regresión lineal (o no lineal) con el mejor Coeficiente de Determinación.

En todos los análisis los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudios comportamentales

#### 4.1.1. Test de campo abierto (OFT)

##### 4.1.1.1. Sin inducción farmacológica

Dos semanas posteriores a la lesión, los animales HP presentaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros cinéticos descritos en la Tabla 4.1.1.1.1 comparados con los otros grupos en el comportamiento evaluados con el OFT. Hubo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la distancia total recorrida y la velocidad promedio en para los grupos que recibieron tratamiento con  $17\beta$ -estradiol (E y HP+E) en comparación con HP.

	HP+E vs. HP	HP vs. E	HP vs. C	C vs. E
Distancia Total Recorrida (m)	8,96±2,18**	-7,22±2,36*	ns	ns
Velocidad Promedio (m/s)	0,03±0,007**	0,002±0,008**	ns	ns
Episodios Totales de Movilidad (n°)	5,88±2,02*	-9,17±2,18**	-8,67±2,18**	ns
Episodios Totales de Inmovilidad (n°)	-9,25±2,79*	11,13±3,02**	ns	ns

Tabla 4.1.1.1.1 **Parámetros de movilidad medidos con el OFT (SIF)**. Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=8), HP+E (n=8). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ns =no significativo.

Los episodios de movilidad aumentaron para los grupos C, E y HP+E; por el contrario, los animales HP presentaron mayor inmovilidad en comparación con los demás grupos.

No hubo diferencias significativas relativas a la actividad en las distintas zonas del OFT.

En la Tabla 4.1.1.1.2 se presenta la evaluación de los tiempos.

Tiempos (s)	HP+E vs. HP	HP vs. E	HP vs. C	C vs. E
Freezing	ns	30,33±9,43*	ns	ns
Centro	-16,03±4,140**	ns	ns	ns
Esquinas	-41,65±12,87*	ns	ns	ns
Bordes	50,35±11,63**	-59,93±14,24**	-12,08±12,56*	-47,85±15,01*

Tabla 4.1.1.1.2 **Tiempos medidos con el OFT (SIF)**. Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=8), HP+E (n=8). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ns =no significativo.

Los resultados muestran que los animales HP permanecieron significativamente la mayor cantidad de tiempo en los bordes en comparación con los demás grupos. Además, los tiempos de HP+E en comparación con HP fueron significativamente mayores en la zona central y bordes. Los animales HP se mantuvieron más tiempo en las esquinas.

Además los animales HP estuvieron más tiempo realizando freezing. Esta actividad fue significativamente menor en comparación con los demás grupos.

Del análisis de las trayectorias (Figura 4.1.1.1.1), se puede ver que los animales HP realizaron recorridos escasos y periféricos. Distinto es el caso de los animales de los demás grupos experimentales (principalmente los que recibieron  $17\beta$ -estradiol), que presentaron un



aumento de la actividad aleatoria, sin patrones espaciales.

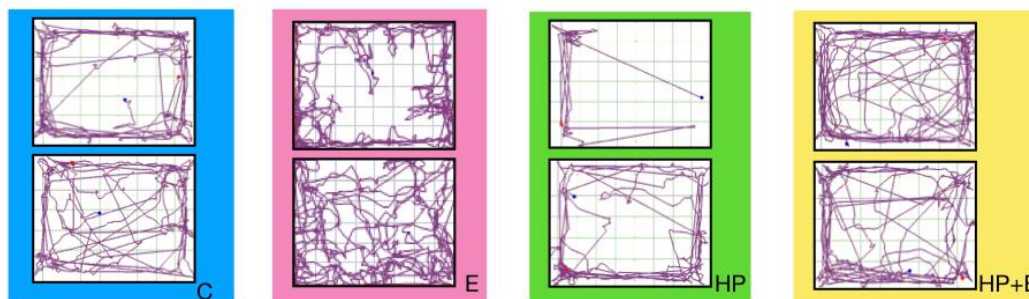


Figura 4.1.1.1.1 Trayectoria de la actividad en el OFT (SIF). Selección de dos imágenes (correspondientes a dos animales diferentes) representativas de cada grupo experimental<sup>1</sup>.

#### 4.1.1.2. Con inducción farmacológica: amfetamina

Como se puede observar en la Tabla 4.1.1.2.1, la administración de amfetamina en el día 27 post lesión indujo que las diferencias en los patrones de actividad ambulatoria (también observadas en el apartado anterior) se vieran aumentadas.

Tal es así que, los animales lesionados con 6-OHDA que no recibieron tratamiento con el neuroesteroide (HP), presentaron una distancia total recorrida significativamente menor ( $p < 0,05$ ) a los demás grupos experimentales. Asimismo, los HP disminuyeron significativamente la velocidad promedio en comparación con los grupos C y HP+E.

Otro parámetro que aumentó, fue la cantidad de episodios totales de freezing. Este valor fue estadísticamente mayor ( $p < 0,05$ ) para los animales HP en comparación con C, E y HP+E. Los animales HP+E no presentaron diferencias significativas en los episodios de freezing comparados con los grupos E o C.

	HP vs. HP+E	E vs. HP	C vs. HP	C vs. E
Distancia Total Recorrida (m)	-10±2,1***	8,7±2,3**	9,42±2,3**	ns
Velocidad Promedio (m/s)	-0,029±0,008**	ns	0,026±0,009*	ns
Episodios Totales de Freezing (n°)	19±6,3*	-19±6,9*	-20±6,8*	ns

Tabla 4.1.1.2.1 Parámetros de movilidad medidos con el OFT (Anf). Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=8), HP+E (n=8). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ns =no significativo.

La Tabla 4.1.1.2.2 se observa que los animales lesionados que no recibieron tratamiento con  $17\beta$ -estradiol (HP) estuvieron más tiempo realizando freezing en comparación con los demás grupos experimentales ( $p < 0,05$ ). Los HP presentaron menores tiempos de movimiento y mayor permanencia en la zona de las esquinas.

En los animales lesionados, el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol mejoró significativamente los

<sup>1</sup> En algunas ocasiones el software comenzaba a grabar el inicio de la trayectoria luego de que el animal diera sus primeros pasos, por lo que se presentaban diagramas como el de HP arriba. Es importante destacar que en todo momento el test comenzó con el animal posicionado en el centro del campo abierto.

tiempos de movimiento ( HP vs. HP+E;  $p<0,05$ ).

Tiempos (s)	HP vs. HP+E	E vs. HP	HP vs. C	C vs. E	C vs. HP+E
Movimiento	-96±2,1 ***	75±22*	ns	-109±24***	-131±22****
Freezing	35±10*	-37±11*	-31±11*	ns	ns
Esquinas	146±14****	-147±15****	-121±15****	ns	ns

Tabla 4.1.1.2.2 **Tiempos medidos con el OFT (Anf)**. Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias ( $Mdif \pm SE_{dif}$ ). Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=8), HP+E (n=8). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns=no significativo.

Con Anf, las trayectorias de los animales HP fueron aún más escasas y periféricas que en la evaluación SIF (Figura 4.1.1.2.1).

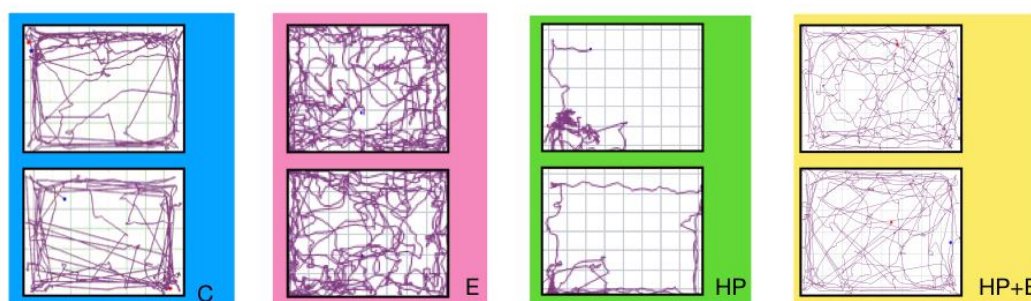


Figura 4.1.1.2.1 **Trayectoria de la actividad en el OFT (Anf)**. Selección de dos imágenes (correspondientes a dos animales diferentes) representativas de cada grupo experimental<sup>2</sup>.

Los animales HP+E, presentaron un aumento de la locomoción dado por una mayor cantidad de entradas a la zona central y a los bordes; así como por una disminución la duración de episodios en las esquinas. La densidad de líneas y los patrones de movimiento en HP+E fue similar a los de E.

### 4.1.1.3. Con inducción farmacológica: apomorfina

La actividad ambulatoria los animales que HP disminuyó significativamente en comparación con C, E y HP+E (Tabla 4.1.1.3.1). El tratamiento con 17β-estradiol (a largo plazo, 57 días post lesión) hizo que los animales HP+E se comportaran significativamente diferente de los (HP) y similares a los grupos de animales lesionados con vehículo (C y E). En este examen no se vieron resultados significativos para el análisis de la actividad no ambulatoria.

	HP vs. HP+E	E vs. HP	C vs. HP	C vs. E
Distancia Total Recorrida (m)	-3.7±1.1*	3.4±1.2*	3.4±1.2*	ns
Velocidad Promedio (m/s)	-0,010±0,003*	0,011±0,003*	0,014±0,003**	ns
Episodios Totales de Movilidad (n°)	-10±3,6*	18±4***	-11±3,7*	ns
Cruce de Líneas (n°)	-56±19*	58±21*	61±20*	ns

<sup>2</sup> Misma aclaración que en página 64, nota al pie n° 1.

Entradas en el centro (n°)	-13±10*	ns	15±8*	ns
----------------------------	---------	----	-------	----

Tabla 4.1.1.31. Parámetros de movilidad medidos con el OFT (Apo). Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo C (n=10), E (n=8), HP (n=10), HP+E (n=11). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001, ns =no significativo.

Como muestra la Tabla 4.1.1.3.2, los animales C, E y HP+E estuvieron más tiempo en movimiento que los HP (p<0,05). En las esquinas, los animales de los grupos E y HP+E permanecieron por menos tiempo que los HP, p<0,05. Además, la comparación de los tiempos de freezing entre HP y HP+E, fue significativamente mayor para HP.

Tiempos (s)	HP vs. HP+E	E vs. HP	C vs. HP	C vs. E
Movimiento	-49±17*	67±19**	59±18*	ns
Freezing	ns	-94±32*	ns	ns
Esquinas	95±25**	-81±27*	ns	ns

Tabla 4.1.1.3.2. **Tiempos medidos con el OFT (Apo).** Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo C (n=10), E (n=8), HP (n=10), HP+E (n=11). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*p<0,05, \*\* p<0,01, ns =no significativo.

En la Figura 4.1.1.3.1 se exponen algunas trayectorias representativas. De los resultados de la actividad en OFT, se observa que la performance de los HP fue mucho menor que para los otros grupos. Estos animales realizaron escasos movimientos y permanecieron mayormente en las esquinas. Contrariamente, los animales de los demás grupos experimentales, exhibieron movimientos aleatorios por todo el campo abierto.

Es interesante destacar que, incluso en este estadio tardío de la neurodegeneración, el tratamiento con 17β-estradiol continuó mostrando efectos positivos en la actividad motora de los animales HP+E.

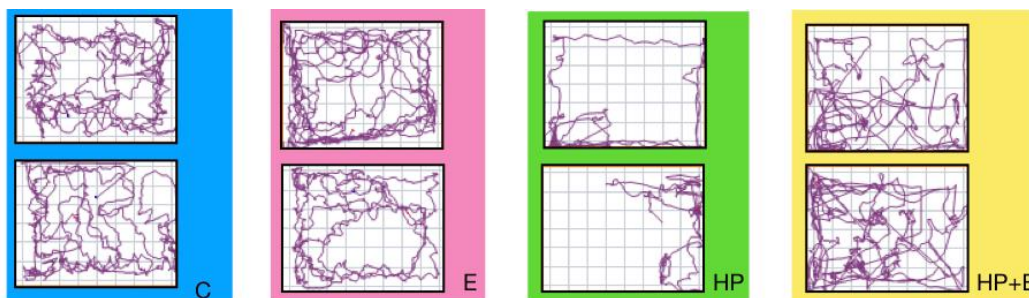


Figura 4.1.1.3.1 Trayectoria de la actividad en el OFT (Apo). Selección de dos imágenes (correspondientes a dos animales diferentes) representativas de cada grupo experimental<sup>3</sup>.

## 4.1.2. Test de actividad rotacional (RT)

### 4.1.2.1. Con inducción farmacológica: anfetamina

Los resultados de la evaluación de la actividad rotacional respaldaron los resultados obtenidos con el campo abierto. Se observó que los animales HP presentaban una marcada

<sup>3</sup> Misma aclaración que en página 64, nota al pie n° 1.

lateralidad (hacia el lado de la lesión) (Figura 4.1.2.1.1 A). Asimismo, los HP, mostraron también una disminución de las vueltas contralaterales (Figura 4.1.2.1.1 B).

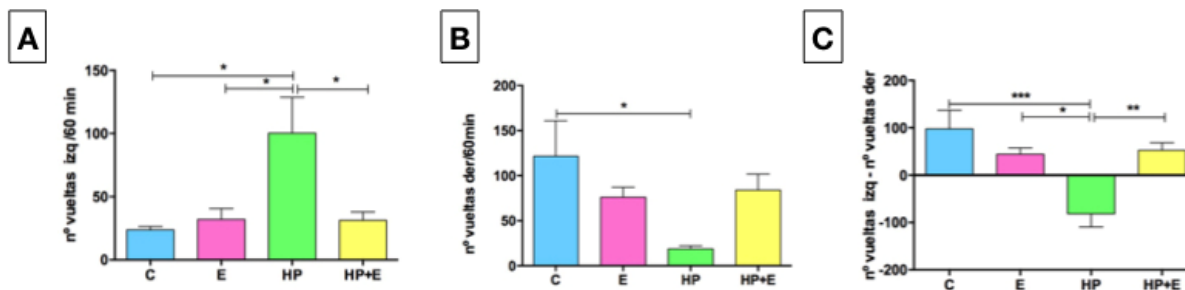


Figura 4.1.2.1.1 Evaluación de las rotaciones inducidas con Anf. A-Evaluación del número de vueltas a la izquierda. B-Evaluación del número de vueltas a la derecha. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=7), HP+E (n=7). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ . C- Evaluación de la cantidad neta de rotaciones. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=7), HP+E (n=7). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Como muestra la Figura 4.1.2.1.1 C) los animales HP realizaron más cantidad de giros en sentido ipsilateral. La cantidad neta de rotaciones de este grupo fue estadísticamente significativa en comparación con los demás grupos experimentales ( $p < 0,05$ ). Especialmente la respuesta compensatoria a la denervación del grupo HP+E, alcanzó valores semejantes a los animales lesionados con vehículo (C y E).

Además, los animales HP presentaron los mayores tiempos máximos de rotaciones ipsilaterales ( $p < 0,001$ ) (Figura 4.1.2.1.2 A); mientras que en las demás comparaciones no se observaron diferencias significativas. Entre ambos lados, la duración máxima de giro fue significativamente mayor para el lado izquierdo del grupo HP.

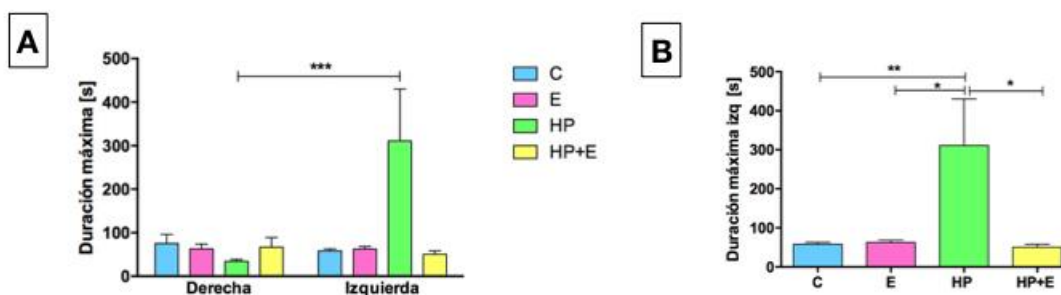


Figura 4.1.2.1.2 Evaluación de la duración máxima de rotaciones inducidas con Anf. A-Comparación entre izquierda y derecha. B- Duración máxima a la izquierda. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=7), HP+E (n=7). Estadística para las comparaciones en A: Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; y para las diferencias entre grupos (B) Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En 4.1.2.1.2 B, se muestran las comparaciones entre los grupos experimentales en relación a la duración máxima de giro en sentido izquierdo. Los animales HP realizaron más vueltas en sentido ipsilateral al lado lesionado, y además las vueltas fueron de mayor duración.

En la Figura 4.1.2.1.3 se presentan las diferencias observadas entre el lado izquierdo y derecho para todos los parámetros evaluados en cada grupo experimental. Se observó que el desbalance locomotor ipsilateral observado en HP inducido por Anf, que es un agonista dopaminérgico indirecto, favoreció al lado no lesionado y fue revertido en el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol, tal como evidencia el grupo HP+E.

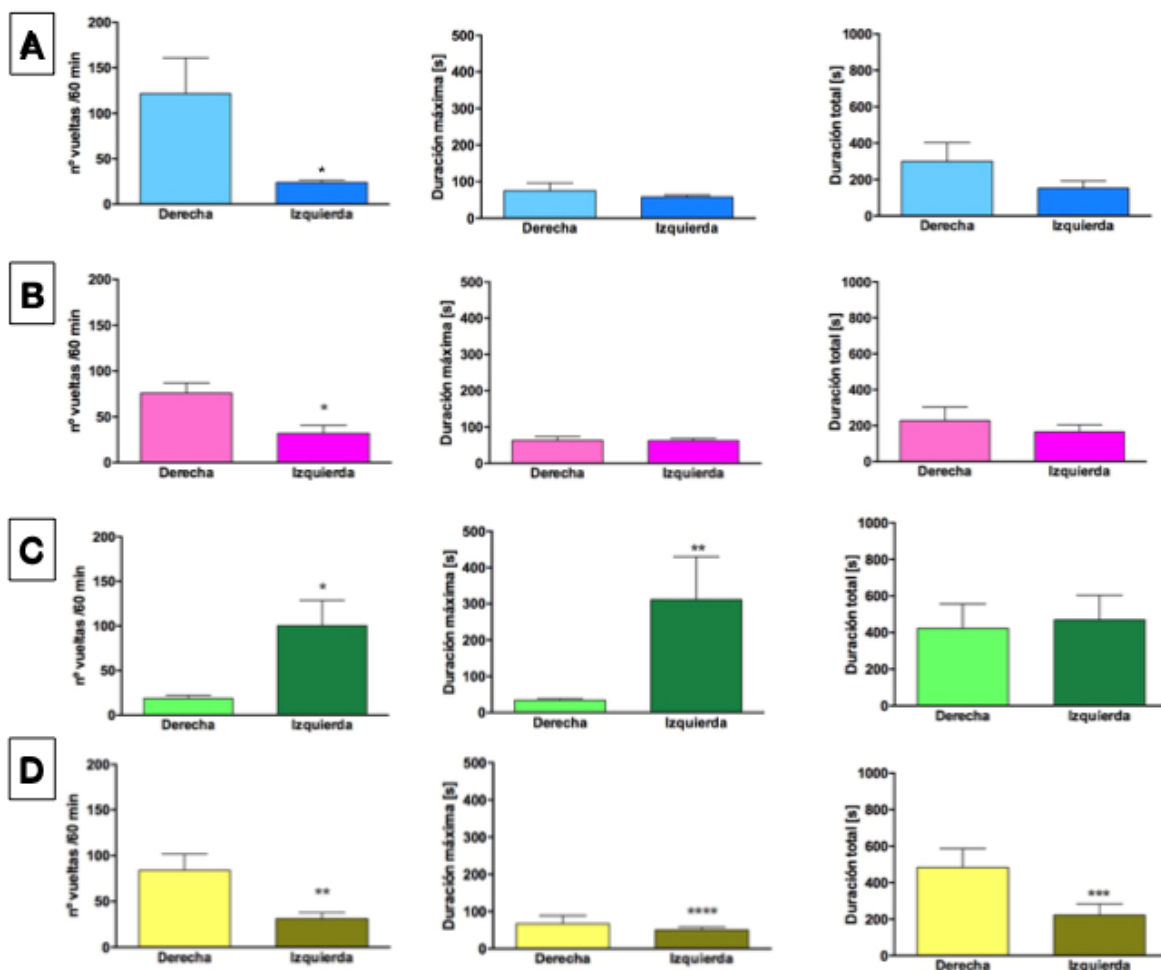


Figura 4.1.2.1.1 Comparación de parámetros de RT entre lado izquierdo y derecho de los grupos. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=6) en fila A, E (n=6) fila B, HP (n=7) fila C y HP+E (n=7) en la fila D. Estadística: t test pareado; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

#### 4.1.2.2. Con inducción farmacológica: apomorfina

En el estudio de la actividad rotacional mediante la inducción con Apo, se evaluaron nuevamente las modificaciones motoras asociadas al deterioro motor. Este agonista directo generó una contralateralidad estadísticamente significativa en los animales HP (Figura 4.1.2.2.1). Particularmente, los animales HP manifestaron un aumento de vueltas hacia la derecha ( $p<0,01$ ) (4.1.2.2.1 A) y una disminución de la cantidad de vueltas a la izquierda ( $p<0,05$ ) (4.1.2.2.1 B). Resultados que fueron estadísticamente significativos en comparación con HP+E.

La Figura 4.1.2.2.1 C muestra los resultados comportamiento contralateral que presentaron los animales del grupo HP; donde la cantidad neta de rotaciones fue estadísticamente significativa en comparación con todos los grupos ( $p<0,01$ ).

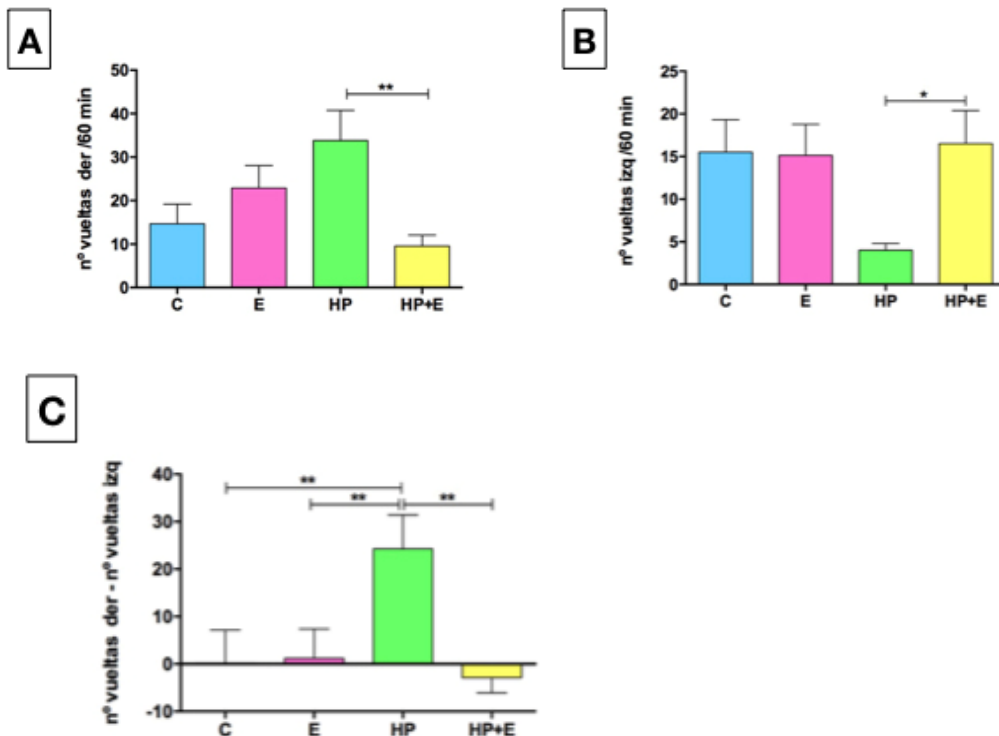


Figura 4.1.2.2.1 Evaluación de las rotaciones inducidas con Apo. A-Evaluación del número de vueltas a la derecha. B-Evaluación del número de vueltas a la izquierda. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=10), E (n=10), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . C- Evaluación de la cantidad neta de rotaciones. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=10), E (n=10), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*\*  $p < 0,01$ .

Los tiempos máximos de giro hacia la derecha e izquierda se presentan en la Figura 4.1.2.2.2. Se observó que el grupo HP ejecutó una elevada duración de vueltas a la derecha; resultado que fue estadísticamente significativo en comparación con el grupo HP+E ( $p < 0,05$ ).

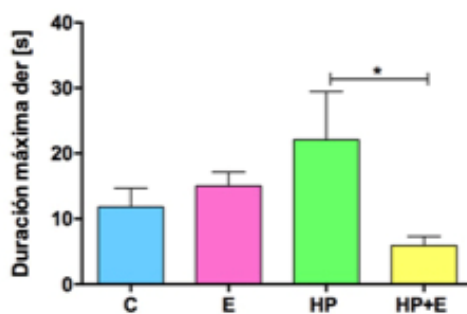


Figura 4.1.2.2.2 Evaluación de la duración máxima de rotaciones inducidas con Apo. Duración máxima a la derecha. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=10), E (n=10), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ .

En la Figura 4.1.2.2.3 se exhiben los resultados de las comparaciones de la duración total de vueltas hacia ambos lados. Los animales HP rotaron la mayor parte del tiempo hacia la derecha ( $p < 0,05$ ). Nuevamente los resultados fueron opuestos para el grupo HP+E.



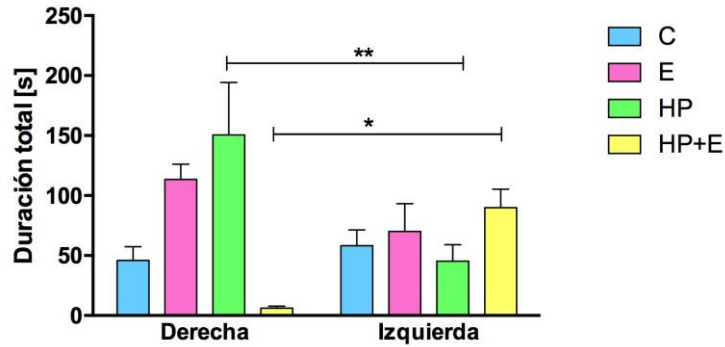


Figura 4.1.2.2.3 Evaluación de la duración total de rotaciones inducidas con Apo. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=10), E (n=10), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística: Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Al igual que en la evaluación con Anf, en la Figura 2.1.2.2.4 se presentan las comparaciones de los resultados entre el lado izquierdo y derecho para todos los parámetros evaluados. Se observó que la contralateralidad manifestada como signo de neurodegeneración en los HP fue retrasada por el tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol en los animales HP+E.

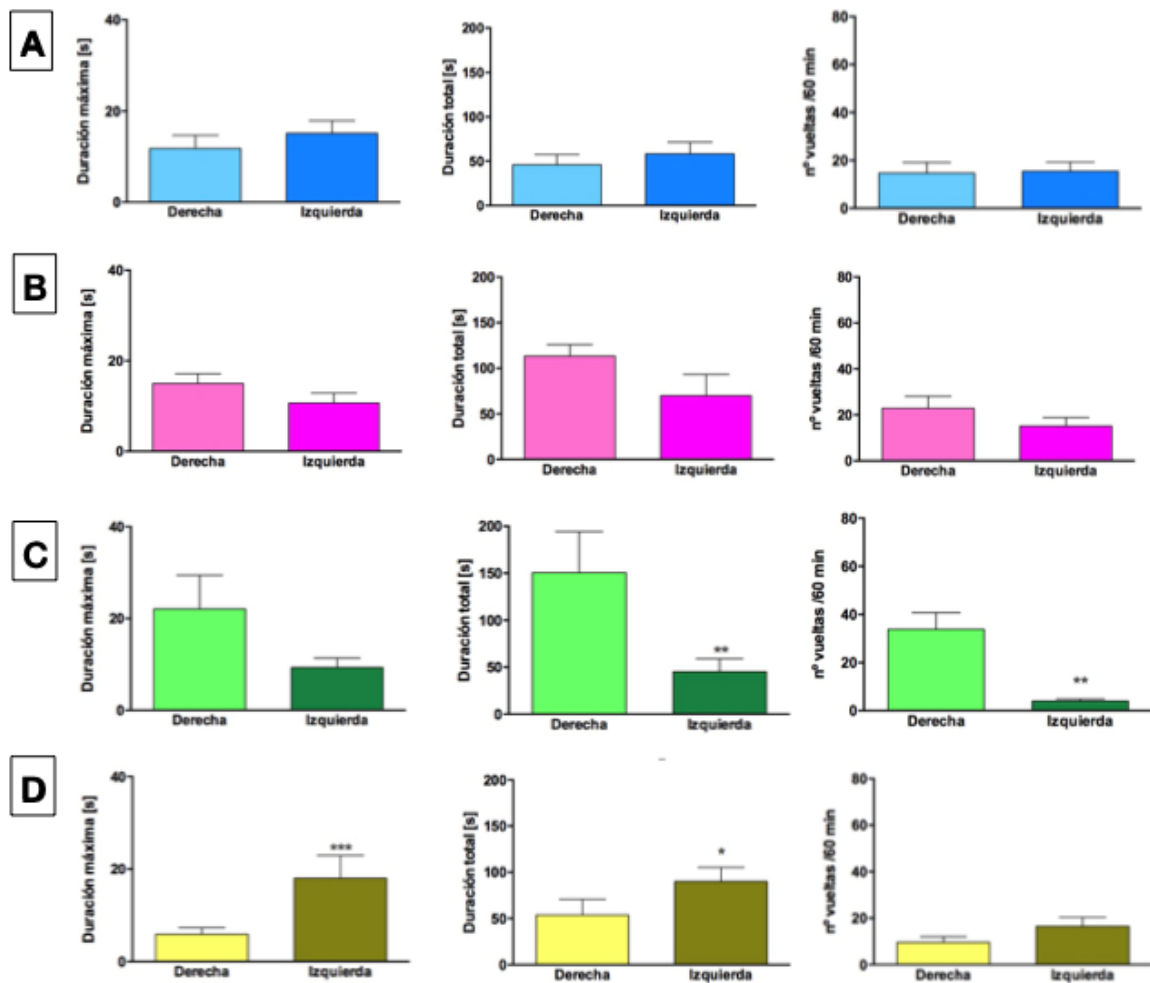


Figura 4.1.2.2.4 Comparación de parámetros de RT entre lado izquierdo y derecho de los grupos. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=10) en fila A, E (n=10) fila B, HP (n=12) fila C y HP+E (n=12) en la fila D.

### 4.1.3. Test de natación forzada (FST)

#### 4.1.3.1. Cámara vertical

Con la cámara dispuesta de forma vertical, se observó una disminución estadísticamente significativa velocidad promedio de nado en los animales HP en comparación con los dos grupos que habían recibido tratamiento con 17β-estradiol (E y HP+E) (Figura 4.1.3.1.1 A). En cuanto a la distancia total recorrida (en relación al eje horizontal del tanque, Figura 4.1.3.1.1 B) los animales hemiparkinsonianos (tanto HP como HP+E) nadaron más que los animales C. El grupo E no se presentó diferencias en comparación con los otros grupos.

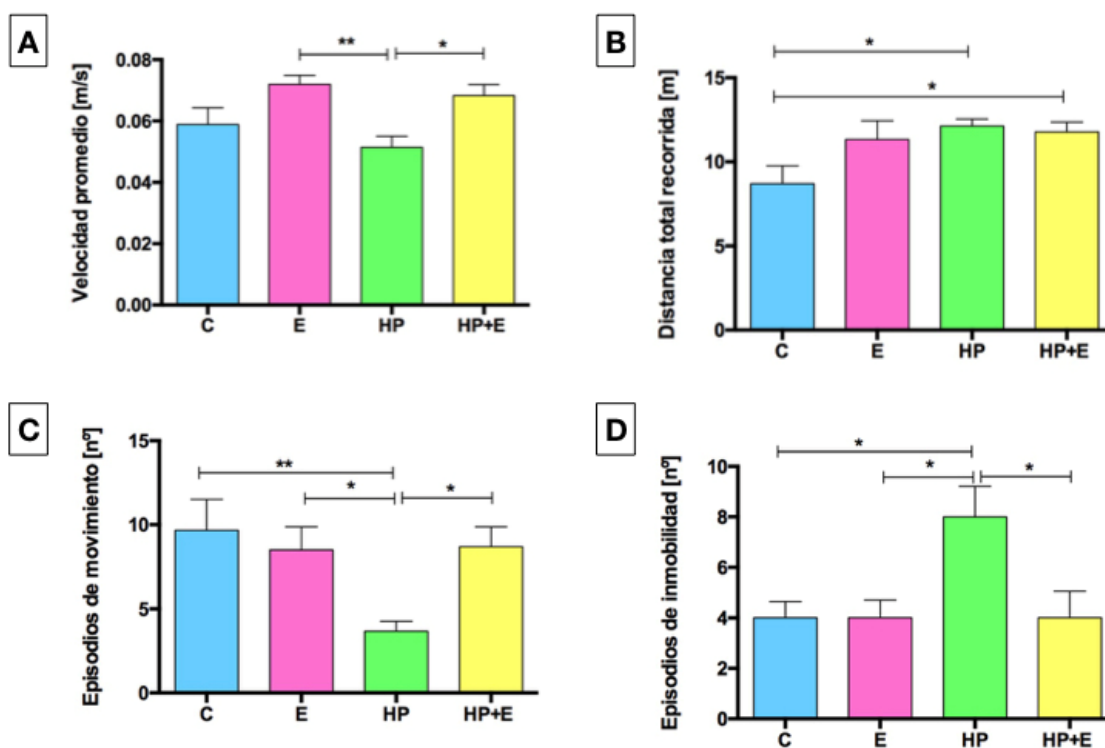


Figura 4.1.3.1.1 Evaluación de parámetros de movimiento en el test de natación forzada. A- Velocidad promedio. B- Distancia total recorrida. C- Episodios de movimiento. D- Episodios de inmovilidad. Resultados expresados como Media  $\pm$  SEM. Grupo C (n=9), E (n=8), HP (n=12), HP+E (n=10). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*p<0,05, \*\*p<0,01.

En la Figura 4.1.3.1.1 C se observa que los animales del grupo HP menos cantidad de episodios de movimiento en relación a los demás grupos. Con la cámara dispuesta en forma vertical, lo que el software percibe como inmovilidad es un estado de nado constante o invariable. Esta situación fue predominante para los animales del grupo HP (Figura 4.1.3.1.1 D, p<0,05).

En la Figura 4.1.3.1.2 se muestran trayectorias de nado representativas para cada condición experimental.



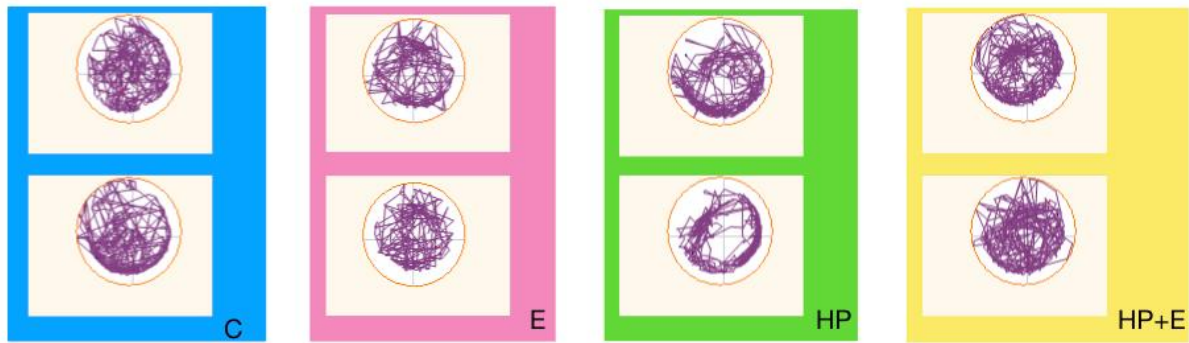


Figura 4.1.3.1.1 Trayectoria representativas de la actividad de nado en FST con cámara vertical. Selección de dos imágenes (correspondientes a dos animales diferentes) representativas de cada grupo experimental.

Los grupos C, E y HP+E presentaron patrones aleatorios; mientras que los HP realizaron menos actividad y de forma concéntrica. Tanto en los episodios de movilidad como en los de inmovilidad, el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol ocasionó que los animales HP+E tuviesen patrones de nado contrarios a HP y similares a C y E.

Como muestra la Figura 4.1.3.1.3, se analizaron las rotaciones ejecutadas en el tanque. Similar a lo evaluado con el RT, se observó que los animales del grupo HP presentaron un mayor número de rotaciones alrededor del tanque ( $p < 0,05$ ). Remarcamos el hecho de que este parámetro medido en el FST no fue inducido por ningún fármaco; aunque igualmente es evidente que los animales lesionados con 6-OHDA manifiestan lateralización en la ejecución de movimientos y los resultados son estadísticamente significativos en comparación con los demás grupos experimentales.

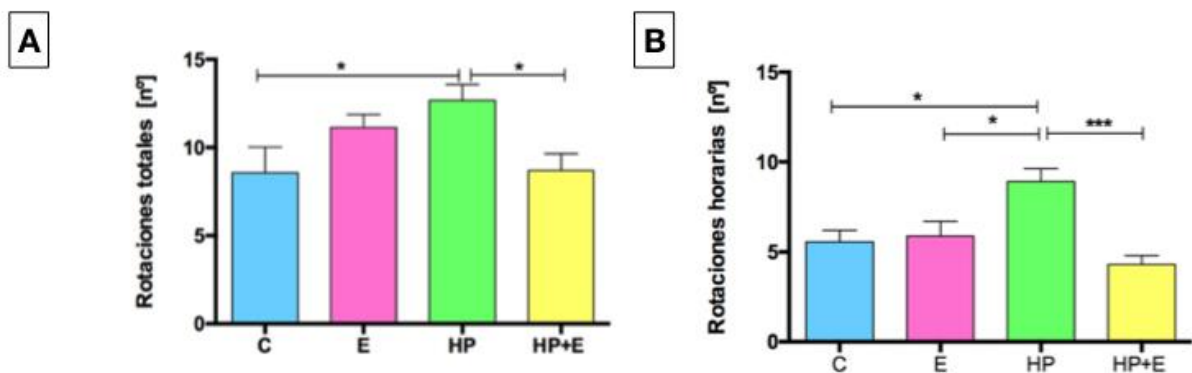


Figura 4.1.3.1.3 Evaluación de las rotaciones totales. A- Rotaciones totales, B- Rotaciones en sentido horario. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=9), E (n=8), HP (n=12), HP+E (n=10). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.1.3.2. Cámara frontal

Tal como ocurrió en el enfoque con la cámara vertical, los animales HP exhibieron una velocidad promedio significativamente menor que los demás grupos experimentales (Figura 4.1.3.2.1 A).

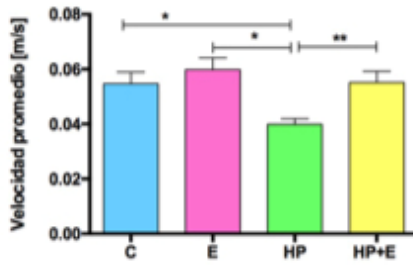
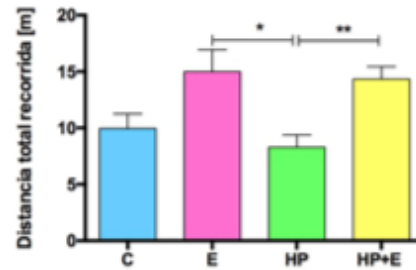
**A****B**

Figura 4.1.3.2.1 Evaluación de parámetros evaluados con cámara frontal. A- Velocidad promedio, B-Distancia total recorrida). Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=9), E (n=8), HP (n=12), HP+E (n=10). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

En la Figura 4.1.3.2.1 B se puede observar que las distancias (medidas sobre el eje vertical al tanque) recorridas por los animales HP fueron menores y estadísticamente significativas en relación a los grupos E y HP+E ( $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$ , respectivamente).

En cuanto al análisis de las trayectorias, se observaron mayor cantidad de nados profundos y un número considerable de saltos en el tanque para los animales HP. Los demás grupos ejecutaron sumergidas alternadas con flotes durante el nado y menor cantidad de buceos.

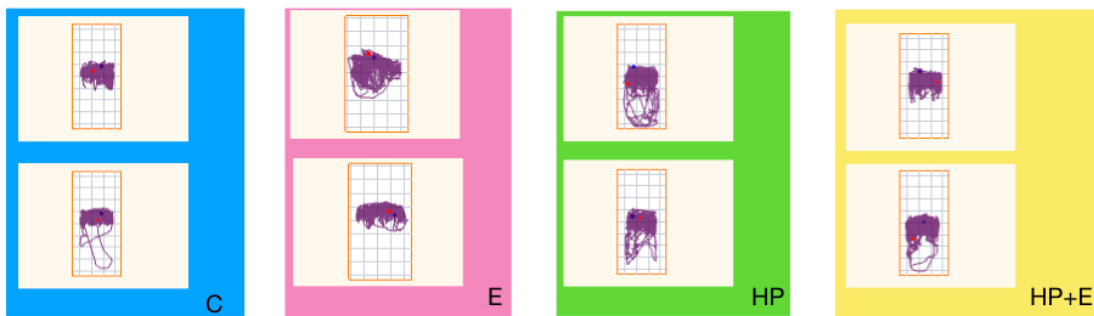


Figura 4.1.3.2.2 Trayectoria representativas de la actividad de nado en FST con cámara frontal. Selección de dos imágenes (correspondientes a dos animales diferentes) representativas de cada grupo experimental.

Debido a que la trayectoria de nado en las distintas zonas fue variable según las condiciones experimentales de cada grupo, decidimos estudiar en detalle los parámetros de número de entradas, tiempo, distancia recorrida y velocidad promedio para cada una de las zonas (salto, flote, sumergida y buceo). Independiente de la condición experimental, el efecto de la división en zonas fue estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 4.1.3.2.1 se presentan los resultados evaluados para el grupo C. Estos animales flotaron en la zona central del tanque, con alternados saltos y sumergidas. Asimismo, ejecutaron poca cantidad de buceos. Distribuyeron su tiempo y las distancias recorridas en las zonas de salto, flote y sumergida. Gráficamente, los parámetros se pueden observar en la Figura 4.1.3.2.3.

C	nº entradas	Tiempo en la zona	Distancia recorrida	Velocidad promedio
Salto vs. flote	-45,20 $\pm$ 10,46 **	ns	ns	ns

Salto vs. sumergida	-45,67± 10,46**	-243± 18,86****	-8,691±1,55****	ns
Flote vs. sumergida	ns	-220,5±13,78 ****	-7,52±1,251****	ns
Flote vs. buceo	45±7,642****	242,7±13,78 ****	ns	ns
Sumergida vs. buceo	45.55±7,642****	ns	8,6±0,8432****	ns

Tabla 4.1.3.2.1. **Variaciones de los parámetros en cada zona para el grupo C.** Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo C (n=9). Estadística: Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,0001, ns =no significativo.

Similar es la situación que se presentó en el estudio por zonas para los animales del grupo E (Tabla 4.1.3.2.2). Si bien las zonas en las que más permanecieron fueron las mismas que el grupo C, estos animales realizaron mayor número de entradas por zona y recorrieron distancias significativamente más altas.

<b>E</b>	nº entradas	Tiempo en la zona	Distancia recorrida	Velocidad promedio
Salto vs. flote	-59±11,34 ****	ns	ns	ns
Salto vs. sumergida	-59,60± 11.34**	-228± 21,67****	-10,15±1,053****	ns
Flote vs. sumergida	ns	-203,1±20,43 ****	-8,294±1,251****	ns
Flote vs. buceo	58,80±9,667****	ns	ns	ns
Sumergida vs. buceo	59,40±11,34 ****	227,9±20,43 ****	10,15±1,251****	ns

Tabla 4.1.3.2.2. **Variaciones de los parámetros en cada zona para el grupo E.** Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo C (n=9). Estadística: Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,0001, ns =no significativo.

En la Tabla 4.1.3.2.3 muestra la actividad para el grupo HP. Estos, presentaron mayor cantidad de buceos que los demás grupos. Debido a que gran parte del tiempo los animales bucearon, la zona de sumergida (contigua a buceo) presentó el número más elevado en tiempo y distancia.

<b>HP</b>	nº entradas	Tiempo en la zona	Distancia recorrida	Velocidad promedio
Salto vs. flote	-40,73±8,8 **	ns	ns	ns
Salto vs. sumergida	-37,68± 8,52**	-284,8± 15,36****	-12,57±0,94****	ns
Flote vs. sumergida	ns	-217,7±13,48 ****	-11,22±0,87****	ns
Flote vs. buceo	37,72±7,67***	ns	ns	ns
Sumergida vs. buceo	34,67±7,32 ***	283±13,19 ****	12.33±0,08****	ns

Tabla 4.1.3.2.3. **Variaciones de los parámetros en cada zona para el grupo HP.** Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo HP (n=12). Estadística: Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001, ns =no significativo.

El análisis de los nados por zonas para los animales HP+E se encuentra en la Tabla 4.1.3.2.4. Para estos animales, el número de entradas por zonas no presentó diferencias estadísticamente significativas. Las distancias recorridas y los tiempos en las zonas de sumergida fueron los más altos; en las demás zonas (salto, flote y buceo) estos parámetros alcanzaron valores similares, y no hubo diferencias significativas entre ellos. Donde sí se produjeron diferencias, fue en la velocidad promedio (p<0,05). Este parámetro alcanzó valores altos en las zonas de salto y flote, y las comparaciones resultan ser estadísticamente diferentes a los valores de velocidad en sumergida y buceo (p<0,01).

<b>HP+E</b>	nº entradas	Tiempo en la zona	Distancia recorrida	Velocidad promedio
Salto vs. flote	ns	ns	ns	0,84±0,17*

Salto vs. sumergida	ns	-261,8±17,20****	-10,75±1,05 ****	ns
Flote vs. sumergida	ns	-254,3±14,75 ****	-10,32±0,90 ****	0,80±0,18**
Flote vs. buceo	ns	ns	ns	0,77±0,19**
Sumergida vs. buceo	ns	260,7±13,19****	10,55±0,81****	ns

Tabla 4.1.3.2.4. **Variaciones de los parámetros en cada zona para el grupo HP+E.** Resultados expresados como Media y error estándar de la diferencia de medias (Mdif ±SEdif). Grupo C (n=9). Estadística: Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,0001, ns =no significativo.

En la Figura 4.1.3.2.3 se observan las gráficas de este estudio de dos factores (zonas y tratamientos). Por motivos de simpleza no se han indicado las diferencias significativas, para ello consultar las Tablas 4.1.3.2.1-4.

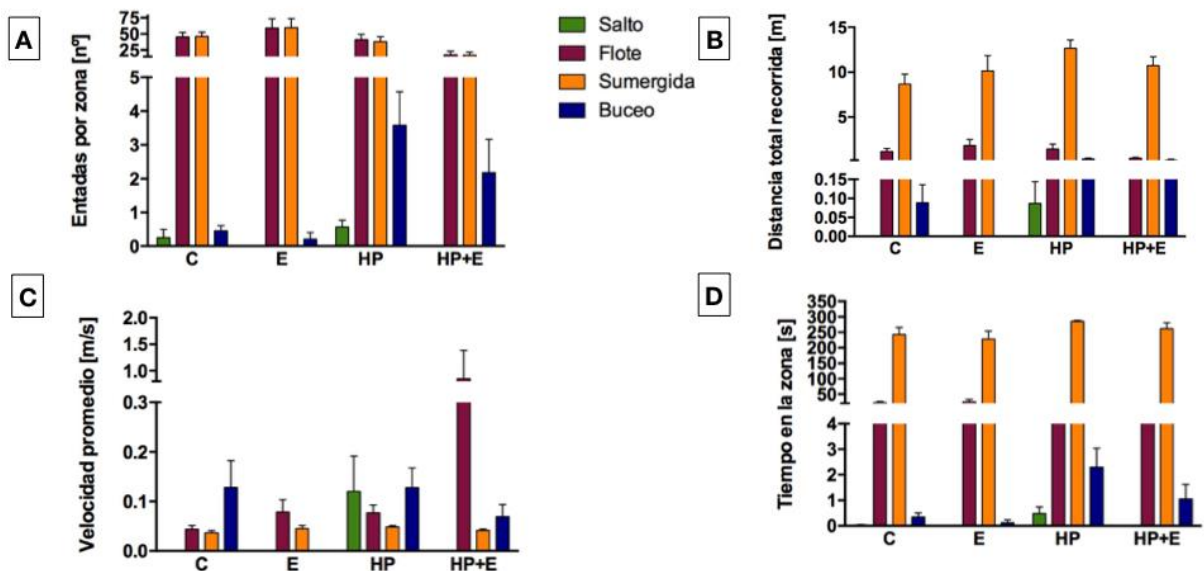


Figura 4.1.3.2.3 **Evaluación de los parámetros por zona.** A- Entradas por zona, B- Distancia total recorrida, C-Velocidad promedio, D- Tiempo en la zona. Comparación entre zonas para los distintos grupos experimentales. Estadística para las comparaciones en A: Anova de 2 vías, Tukey post hoc test. Las diferencias significativas se presentan en las tablas correspondientes de cada grupo.

#### 4.1.3.2.1. Desarrollo del software para la evaluación del FST

##### 4.1.3.2.1.1. Interfaz gráfica- entrada

La interfaz gráfica de usuario (GUI) se define como el programa principal que se encarga de ejecutar el resto de los bloques de procesamiento y de transmitir la información entre ellos. Para su desarrollo se utilizó la librería TKinter. El método de inicio de la clase Interfaz es el encargado configurar los resultados que se desean obtener y las condiciones de video.

Una vez finalizado este proceso, se sigue a una ventana para ingresar la cantidad de animales por cada grupo y añadirle una etiqueta con la condición experimental (Figura 4.1.3.2.1.1.1). Luego, se ejecuta un nuevo método que consiste en crear una plataforma en la que se carga y reproduce el video. Para la carga se puede copiar la dirección del video o bien utilizar el

explorador de archivos (Figura 4.1.3.2.1.1.1 apartado de la derecha).

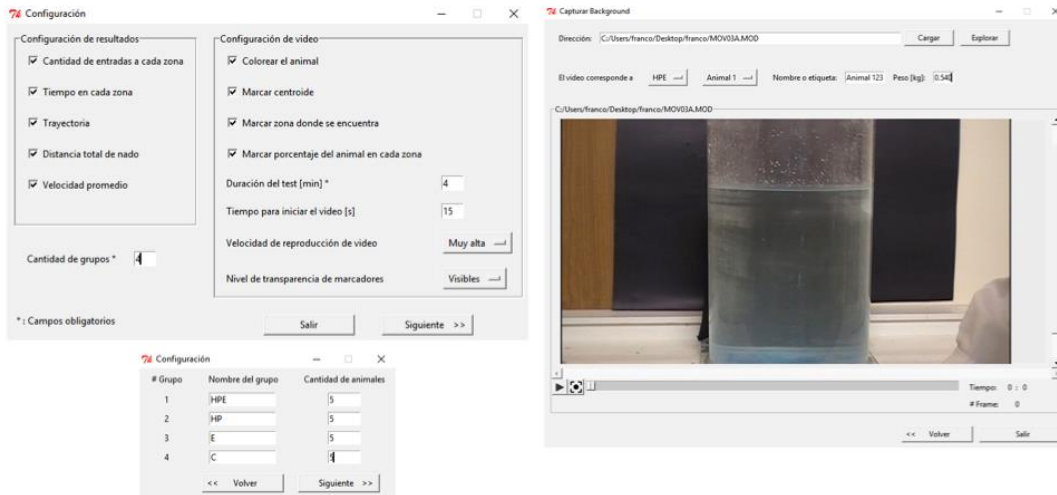


Figura 4.1.3.2.1.1.1 *Interfaz gráfica de la configuración del experimento.* A la izquierda, arriba se muestra la configuración de los resultados y del video. A la izquierda, abajo se muestra la determinación de los grupos experimentales (etiqueta) y cantidad de animales por grupo. A la derecha la carga del video y configuraciones adicionales o preferencias.

A continuación, sobre la imagen pausada del video, se procede a realizar una selección de la región de interés (ROI) para eliminar el fondo indeseado (background). Dicha selección se realiza generando un rectángulo sobre todo el tanque con el puntero del mouse (Figura 4.1.3.2.1.1.2 izquierda).

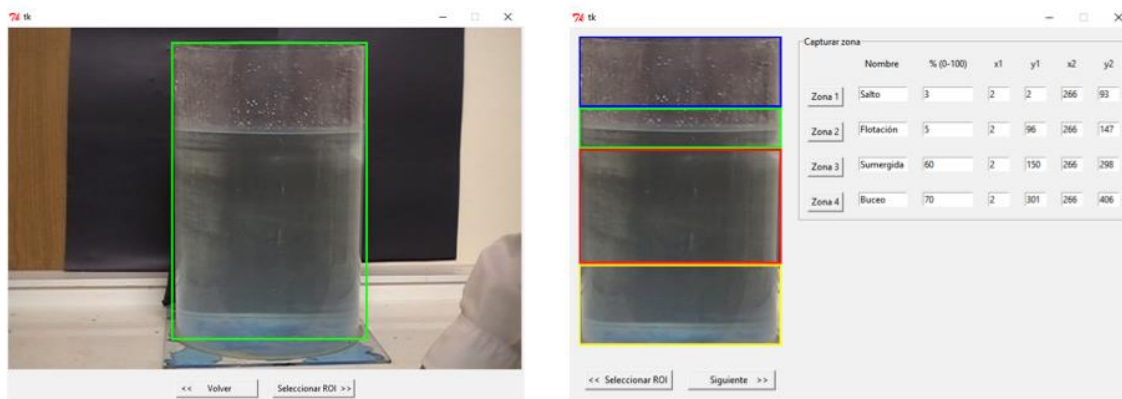


Figura 4.1.3.2.1.1.2 *Zonas de interés.* A la izquierda, la eliminación del background, a la derecha la determinación del nombre, porcentaje [%] del tanque que ocupa y coordenadas x-y que forman la zona.

Definida esta región se procede a seleccionar, como se muestra en la Figura 4.1.3.2.1.1.2 derecha, los sectores correspondientes a las zonas donde se evaluarán los distintos comportamientos. A medida que se carga cada sector, van apareciendo sus coordenadas en la pantalla de la derecha ( $[x_1, y_1]$  vértice superior izquierdo,  $[x_2, y_2]$  vértice inferior derecho); opcionalmente se puede rotular la zona. También se debe agregar el porcentaje que ocupa el animal en cada zona. Según la imagen, si el 3% del área del animal (o más) se encuentra en las coordenadas (“salto”) es cuando se considera que el animal está en ese espacio.

Una vez finalizadas las configuraciones, se produce el análisis automatizado del video. Cuando se ha cumplido el tiempo del ensayo, el programa regresa a la ventana de seleccionar fondo (video nuevo) mientras que se inicia el bloque de cálculo de parámetros que se imprimen por pantalla junto con la trayectoria recorrida.

#### 4.1.3.2.2. Procesamiento de imágenes

Para este proceso hace uso los siguientes datos:

- Dirección del video a analizar
- Imagen de fondo de referencia (background)
- ROI
- Equivalencia de pixeles a centímetros
- Límites de cada zona
- Porcentaje del animal en cada zona
- Duración del experimento
- Información que se desea presentar por pantalla.

El bloque de procesamiento está compuesto por una serie de funciones que realizan distintas tareas en forma secuencial dentro de un bucle o *loop*, el esquema se presenta en la Figura 4.1.3.2.2.1. Se utilizó este formato para trabajar individualmente en el procesamiento de cada imagen o *frame* del video.

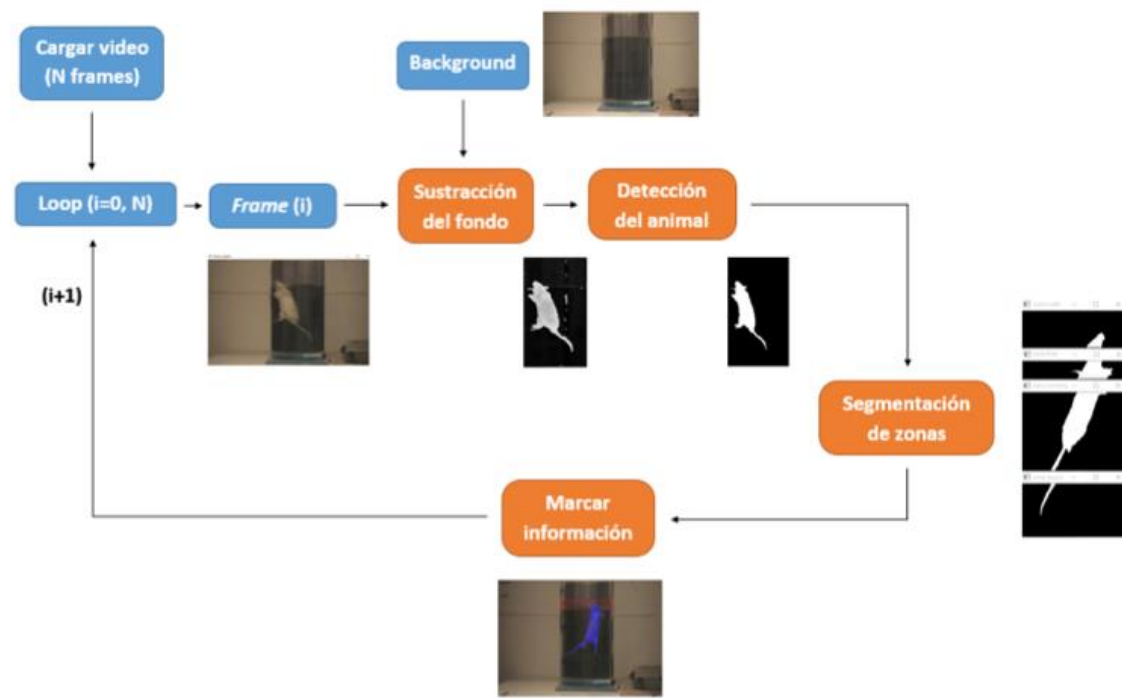


Figura 4.1.3.2.2.1. **Zonas de interés.** A la derecha la eliminación del background, a la derecha la determinación del nombre, porcentaje [%] del tanque que ocupa y coordenadas x-y que forman la zona.



La sustracción del fondo del animal en movimiento en el tanque comienza cuando se carga el video y el *background*. La ROI permite que se recorte la imagen de interés y, de esta forma se eliminen secciones indeseadas para el análisis. Posteriormente se convierte la imagen color (RGB) a una en escala de grises. Las operaciones se realizan una sola vez para el background (fuera del loop) y una vez para cada frame del nuevo video (dentro del loop).

Finalmente se obtiene una imagen en escala de grises donde los pixeles toman algún color en la escala de grises dependiendo de su variación entre el frame y el background, a saber:

- Si los pixeles permanecen invariables, se anulan quedando de color negro
- Si varían levemente se mantienen en colores de grises intermedios
- Si varían ampliamente toman valores cercanos al blanco

El resultado es una imagen que muestra en color blanco el animal en movimiento.

Es necesario realizar el filtrado de la imagen debido a que la misma contiene ruido proveniente en su mayoría de movimientos del agua, inherentes al nado del animal y de cambios en la luminosidad de la imagen. Las operaciones que se efectúan en cada frame son:

- Aplicar filtro Gaussiano para suavizar el ruido de alta frecuencia
- Umbralizar la imagen (255= blanco; 0= negro). El umbral se definió con un histograma resultante de la superposición de cada frame. Se fijó el nivel de gris en 180.
- Aplicar operaciones morfológicas: dilatación para el relleno de huecos y erosión para eliminar ruido y refinar el contorno.
- Aplicar un filtro que detecta los contornos blancos y calcula el área que encierran. Los que son menores que el umbral son eliminados.
- Calcular el centroide del contorno deseado y el área que encierra. Las coordenadas del centroide son almacenadas en un vector que determina la trayectoria descripta por el animal.

Una vez detectado el animal y su área total ( $A_t$ ), se procede a determinar en qué zona se encuentra. Para ello lo primero que se hace es segmentar la imagen según las zonas previamente definidas. Esto, resulta en cuatro imágenes distintas, donde cada una representa a una de las zonas de interés: salto, flote, sumergida o buceo ( $z = S, F, SU$  o  $B$ ).

Luego se detectan los contornos de cada imagen y se calcula su área ( $A_z$ ). Para el cálculo del área relativa porcentual ( $A_{rz}$ ) de cada zona se emplea la siguiente fórmula:

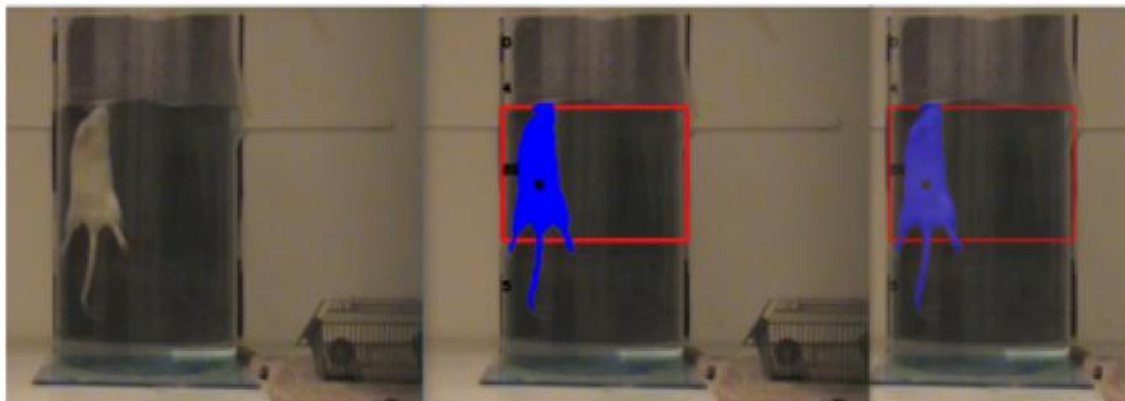
$$A_{rz} = \frac{A_z}{A_t} 100$$

Posteriormente, el programa ejecuta comparaciones entre  $A_{rz}$  y el área del umbral ( $A_{uz}$ ). Si el valor de  $A_{rz} > A_{uz}$  se considera que el animal se encuentra en la zona  $Z$ .

Si  $A_{rz} < A_{uz}$ , se evalúa la condición en la zona siguiente y se sigue hasta que se determine la condición y se indique en qué zona se encuentra el animal.

Una de las opciones desarrolladas en la configuración es que el usuario puede elegir si agrega marcadores en la imagen (Figura 4.1.3.2.2.2). Estos se aplican sobre una copia de los frames originales del video. Estas funciones se programaron usando los datos de las coordenadas del contorno detectado y del centroide, así como de la zona donde se encuentra el animal. El

resultado es un frame dibujado que se superpone con original, utilizando un determinado índice de transparencia (seleccionado en la configuración del video).



*Figura 4.1.3.2.2.3.2.2..2. Detección automatizada de la zona y del animal. De izquierda a derecha: frame original; original y marcadores superpuestos con el índice de transparencia seteado por defecto; original y marcadores superpuestos con el índice de transparencia en 0,5.*

#### 4.1.3.2.3. Cálculo de parámetros

El software emplea los resultados del bloque de procesamiento de imágenes: trayectoria [x,y] del animal, tiempo en cada frame, zonas en las que entró el animal y tiempo que permaneció en cada zona. Con ellos, calcula los parámetros distancia total recorrida, cantidad de entradas en cada zona, tiempo de permanencia en cada zona, cantidad de episodios y tiempo de movilidad e inmovilidad.

El proceso de la determinación de la cantidad y tiempo de permanencia en cada zona se diagrama en la Figura 4.1.3.2.3.1. Mediante una serie de decisiones en cada frame va creando los vectores que servirán de base para el cálculo de los parámetros.



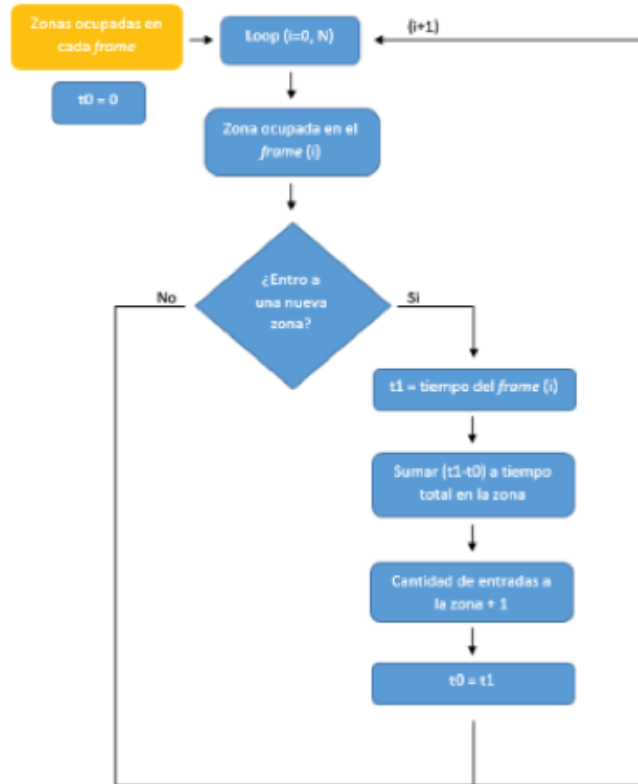


Figura 4.1.3.2.3.1. Proceso para la determinación de la cantidad de tiempo y entradas en cada zona. Diagrama de decisiones que se toman durante el transcurso del test para la determinación de los parámetros de nado.

En la Figura 4.1.3.2.3.2 se muestra el diagrama que se desarrolló para calcular en base a la longitud de la trayectoria original, los parámetros distancia total y velocidad promedio.

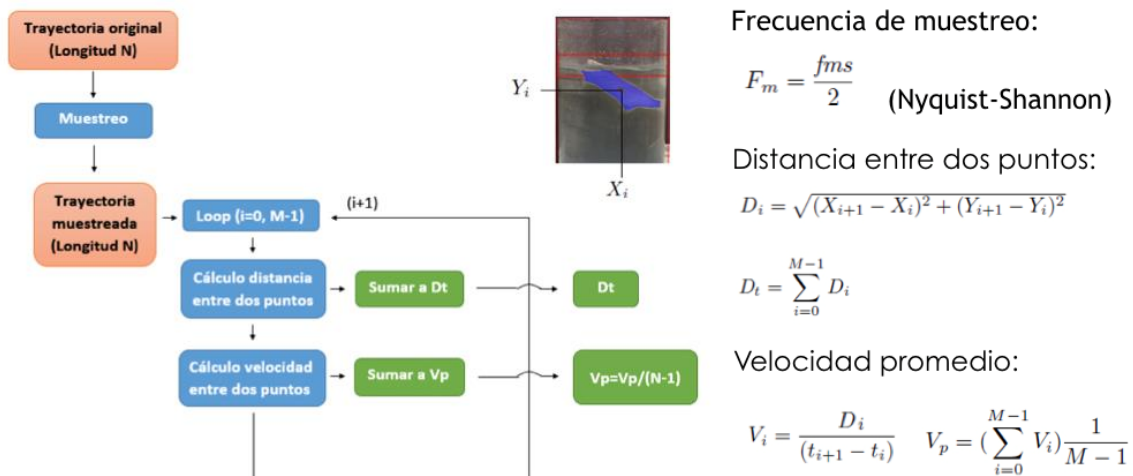


Figura 4.1.3.2.3.1. Proceso para la determinación de parámetros de interés. Diagrama de decisiones efectuado sobre la trayectoria del animal para la determinación de distancia recorrida y velocidad de nado.

En cada iteración se calcula la distancia (D<sub>i</sub>) y la velocidad (V<sub>i</sub>); donde en cada instante de muestreo i= 1,2,3,..., M-1. Finalmente, luego de la última iteración, se calcula la distancia

total  $D_T$  y la velocidad promedio VP.

#### 4.1.3.2.4. Trayectorias

Una de las opciones que presenta el software desarrollado es su capacidad de mostrar por pantalla la trayectoria de cada uno de los videos analizados. En la Figura 4.1.3.2.4.1 se presenta una gráfica representativa obtenida para cada uno de los grupos experimentales.

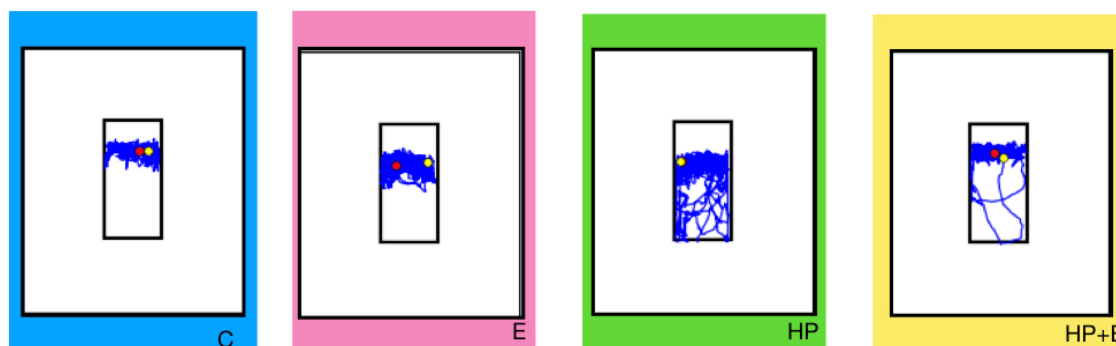


Figura 4.1.3.2.4.1 Trayectoria de la actividad de nado en FST con cámara lateral. Resultados obtenidos con software propio representativos para cada grupo experimental.

#### 4.1.3.3. Validación

Como se mencionó en la sección de Materiales y métodos, la validación se realizó para las zonas donde los animales de todos los grupos experimentales presentaban como mínimo 5 entradas. Las zonas seleccionadas fueron flote y sumergida, mientras que buceo y salto quedaron excluidas de este análisis por no cumplir el mínimo valor de número de entradas. Los resultados numéricos para la zona de flote se presentan en la Tabla 4.1.3.3.1. En esta, se puede observar una muy fuerte correlación para todos los grupos experimentales tanto en el número de entradas como en el tiempo en que permanecieron en la zona.

Grupo	Coefficiente de Correlación	p-valor
C- Tiempo	0,97	0,004
C- N° entradas	0,99	3,97 e <sup>-004</sup>
E- Tiempo	0,96	0,009
E- N° entradas	0,99	0,001
HP- Tiempo	0,98	0,001
HP- N° entradas	0,99	1,64 e <sup>-005</sup>
HP+E – Tiempo	0,98	0,003
HP+E – N° entradas	0,99	4,89 e <sup>-004</sup>

Tabla 4.1.3.3.1. Correlación de las variables tiempo y n° de entradas en la zona de flote con Anymaze y nuestro software. Grupo C (n=5), E (n=5), HP (n=5), HP+E (n=5). Estadística: Correlación de Pearson; \*\*\* p<0,001.

En la Figura 4.1.3.3.1 se presentan los resultados gráficos de las correlaciones lineales entre el software propio y el comercial para cada grupo experimental en relación al número de entradas y al tiempo en la zona de flote.

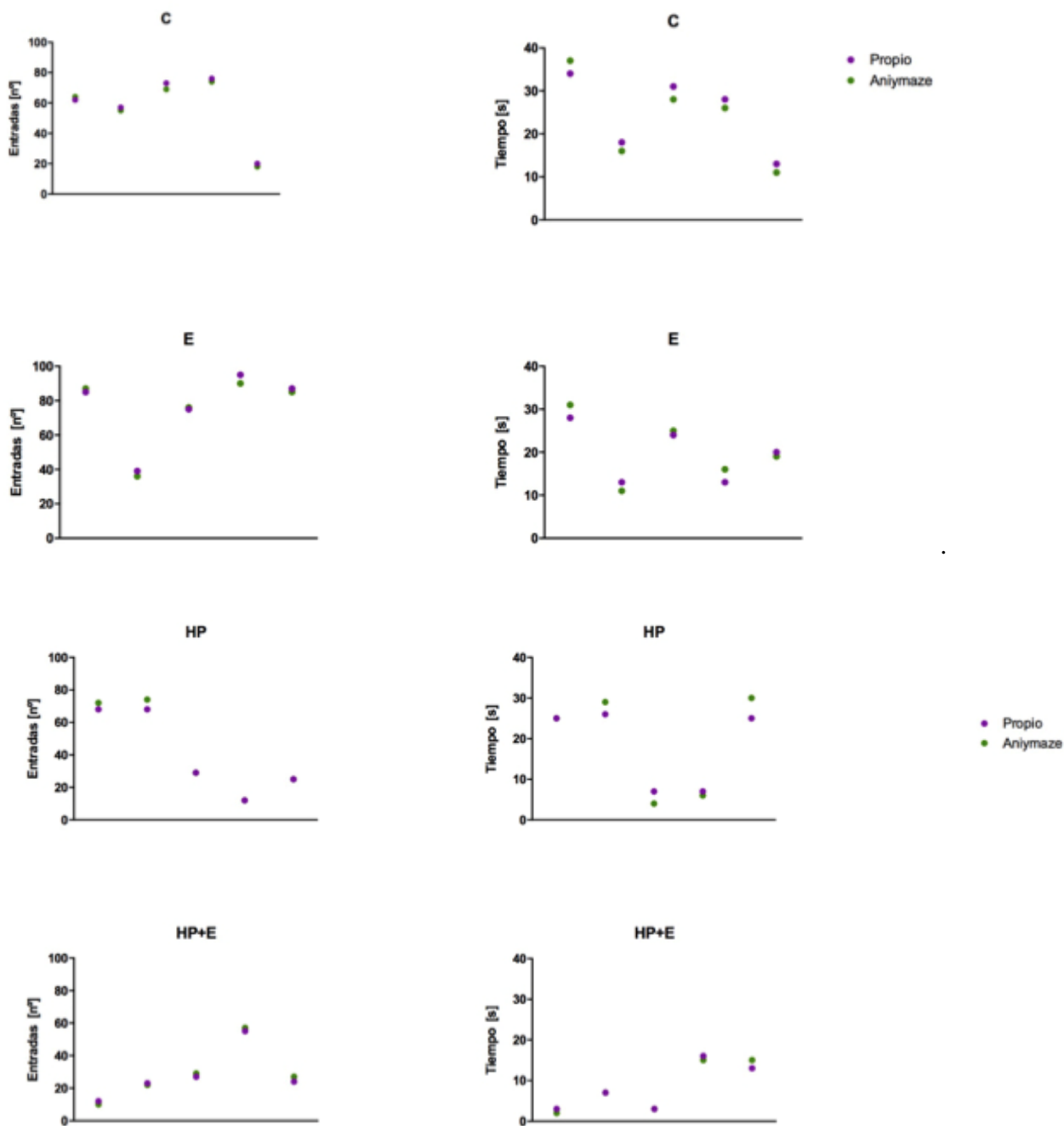


Figura 4.1.3.3.1. Correlación de valores de entradas (izquierda) y tiempos (derecha) para cada uno de los grupos experimentales en la zona de flote. El eje de las abscisas no presenta numeración porque corresponde a distintos animales en el grupo experimental correspondiente.

Los resultados numéricos para la zona de sumergida se presentan en la Tabla 4.1.3.3.2. Las

correlaciones entre los dos métodos para el análisis de FST fueron elevadas para el número de entradas y el tiempo en que permanecieron en la zona. El tiempo en la zona sumergida del grupo C tuvo una correlación perfecta.

Grupo	Coefficiente de Correlación	p-valor
C- Tiempo	1	8,29 e <sup>-006</sup>
C- N° entradas	0,98	0,001
E- Tiempo	0,99	4,65 e <sup>-004</sup>
E- N° entradas	0,98	0,001
HP- Tiempo	0,93	0,019
HP- N° entradas	0,99	4,16 e <sup>-004</sup>
HP+E – Tiempo	0,99	9,81 e <sup>-005</sup>
HP+E – N° entradas	0,99	0,001

*Tabla 4.1.3.3.2 Correlación de las variables tiempo y n° de entradas en la zona de sumergida con Anymaze y nuestro software. Grupo C (n=5), E (n=5), HP (n=5), HP+E (n=5). Estadística: Correlación de Pearson; \*\*\* p<0,001.*

En la Figura 4.1.3.3.2 se presentan los resultados gráficos de las correlaciones lineales para cada grupo experimental en relación al número de entradas y al tiempo en la zona de sumergida.

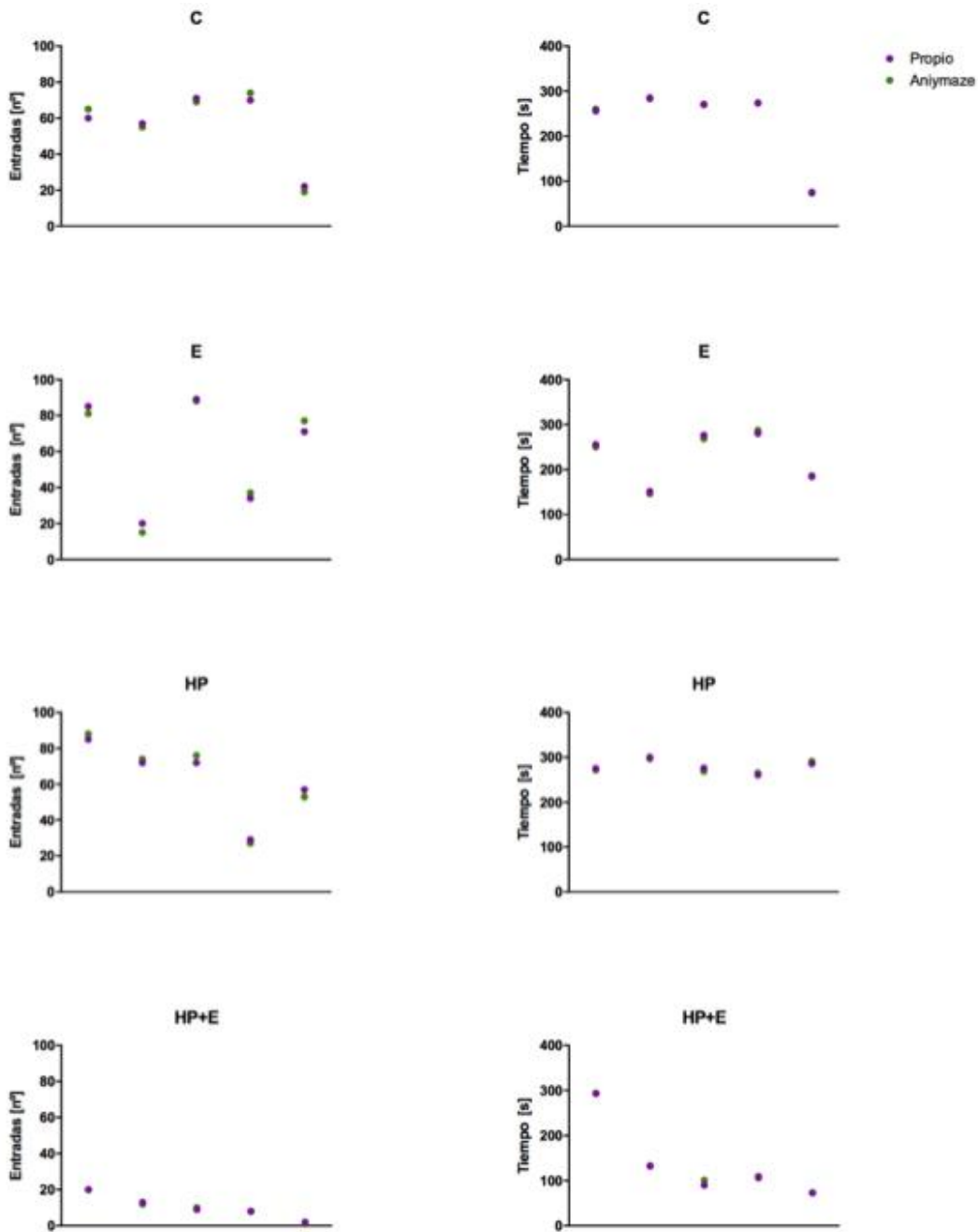


Figura 4.1.3.3.2 Correlación de valores de entradas (izquierda) y tiempos (derecha) para cada uno de los grupos experimentales en la zona de sumergida. El eje de las abscisas no presenta numeración porque corresponde a distintos animales en el grupo experimental correspondiente.

Los resultados obtenidos proporcionan datos que se procesan fácilmente, con resultados fiables y validados con un software comercial. El hardware es económico ya que consiste en el tanque, una cámara y un ordenador; y en términos de procesamiento, los cálculos están listos en menos de 5 minutos. Además, la subjetividad se elimina porque la trayectoria, los parámetros se obtienen automáticamente y el uso de una interfaz gráfica (GUI) agiliza el análisis de videos sucesivos.

#### 4.1.4. Test de acinesia del miembro anterior (ST)

##### 4.1.4.1. Sin inducción farmacológica

La evaluación del tiempo de stepping para el miembro anterior derecho a la derecha (D-D) (Figura 4.1.4.1.1), mostró la disminución estadísticamente significativa en el comportamiento del grupo HP en comparación con el grupo control y el lesionado tratado (HP+E).

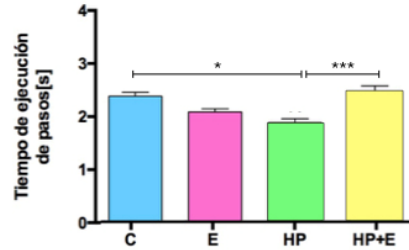


Figura 4.1.4.1.1 Evaluación del tiempo de ejecución de pasos del miembro anterior derecho a la derecha. Resultados expresados como Media  $\pm$  SEM. Grupo C (n=9), E (n=12), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Con el miembro contrario y en sentido opuesto (I-I), la respuesta comportamental del grupo HP aumentó significativamente el tiempo de stepping en relación con los otros grupos E y HP+E (Figura 4.1.4.1.2).

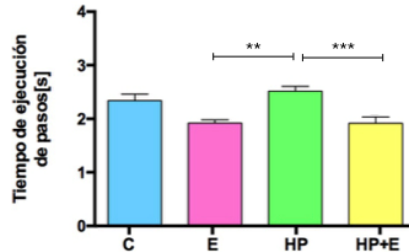


Figura 4.1.4.1.2 Evaluación del tiempo de ejecución de pasos del miembro anterior izquierdo a la izquierda. Resultados expresados como Media  $\pm$  SEM. Grupo C (n=9), E (n=12), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Sin inducción farmacológica los animales HP fueron los que ejecutaron pasos de mayor longitud con el miembro superior izquierdo (I-I) (Figura 4.1.4.1.3).

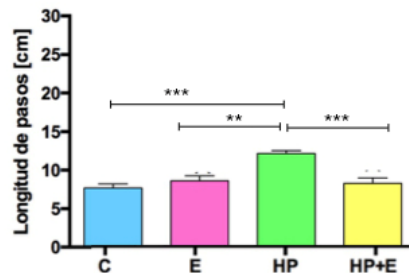


Figura 4.1.4.1.3. Evaluación del tiempo de ejecución de pasos del miembro anterior izquierdo a la izquierda. Resultados

expresados como Media  $\pm$  SEM. Grupo C (n=9), E (n=12), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Para los demás parámetros evaluados no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

#### 4.1.4.2. Con inducción farmacológica: apomorfina

Luego de la administración de Apo, el tiempo de inicio del movimiento del miembro anterior derecho aumentó considerablemente en dirección hacia la derecha (Figura 4.1.4.2.1 A) y se incrementó significativamente hacia la izquierda en los animales HP (Figura 4.1.4.2.1 B). En ambas comparaciones no hubo diferencias estadísticamente significativas para el tiempo de inicio en ninguno de los otros grupos experimentales.

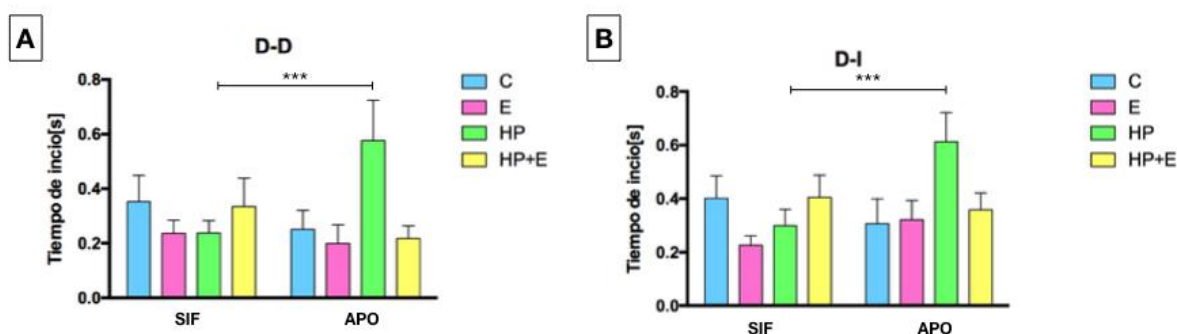


Figura 4.1.4.2.1. Evaluación del tiempo de inicio del miembro anterior. A- Derecho a la derecha, B- derecho a la izquierda. Resultados expresados como Media  $\pm$  SEM. Grupo C (n=9), E (n=12), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística para las comparaciones entre SIF y APO. Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \*\*\* p<0,001.

Estas comparaciones evidenciaron el deterioro motor del lado lesionado y la disminución en la respuesta compensatoria para los animales que no recibieron tratamiento.

Los resultados del tiempo de stepping (Figura 4.1.4.2.2), exponen cómo la apomorfina aumentó la respuesta a la disfunción motora (D-D) para el grupo HP. Asimismo, Apo activó mecanismos compensatorios del lado no lesionado con mayor fuerza para los animales que recibieron tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol (Figura 4.1.4.2.3).

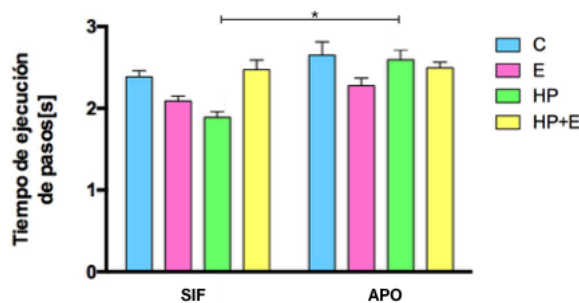


Figura 4.1.4.2.2. Evaluación del tiempo de ejecución de pasos del miembro anterior derecho a la derecha. Resultados expresados como Media  $\pm$  SEM. Grupo C (n=9), E (n=12), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística para las comparaciones entre SIF y APO. Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \* p<0,05.

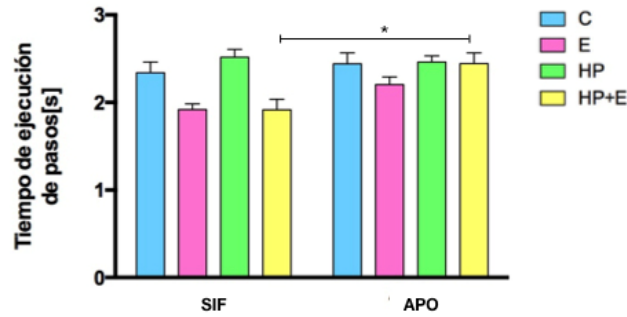


Figura 4.1.4.2.3. Evaluación del tiempo de ejecución de pasos del miembro anterior izquierdo a la izquierda. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=9), E (n=12), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística para las comparaciones entre SIF y APO. Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ .

La disfunción motora del grupo HP en la longitud de pasos con el miembro anterior derecho hacia el lado contralateral (D-I), generó que aumentara significativamente la rigidez en su movimiento. Esta situación se corrigió con el tratamiento de  $17\beta$ -estradiol (Figura 4.1.4.2.4).

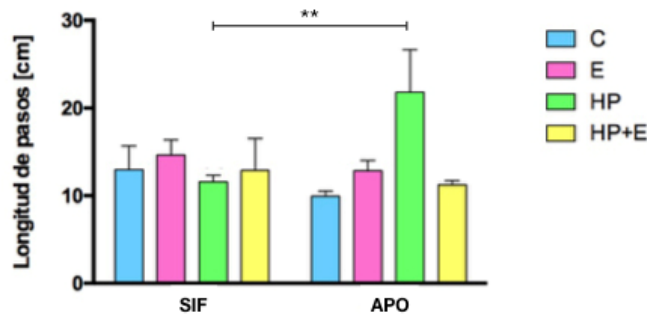


Figura 4.1.4.2.1. Evaluación del tiempo de ejecución de pasos del miembro anterior derecho a la izquierda. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=9), E (n=12), HP (n=12), HP+E (n=12). Estadística para las comparaciones entre SIF y APO. Anova de 2 vías, Tukey post hoc test; \*\*  $p < 0,01$ .

### 4.1.4.3. Desarrollo del software para la evaluación del ST

#### 4.1.4.3.1. Implementación

Como se mencionó anteriormente, los datos fueron obtenidos por medio de Kinovea. Una de las salidas de este software es la que se presenta en la Figura 4.1.4.3.1.1.

Además de la salida de video con la trayectoria marcada, el otro formato de salida de los datos que Kinovea genera es una hoja de datos para cada animal. Este archivo Excel es el que se importa al software como dato de entrada al algoritmo desarrollado para la evaluación del ST.



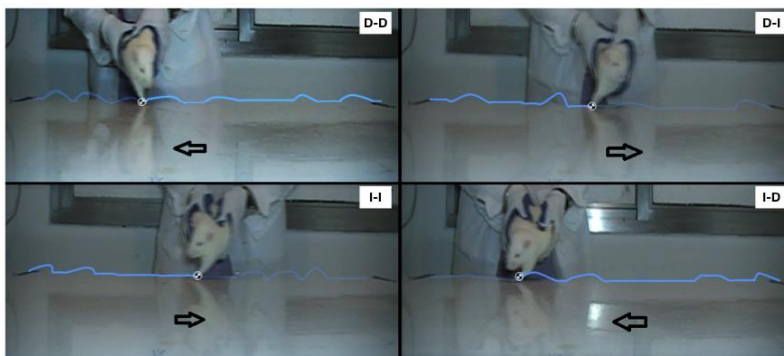


Figura 4.1.4.3.1.1. Capturas de pantalla de un animal realizando el ST. Rastreo de trayectorias en el sentido de la secuencia de testeo usando Kinovea.

Para comenzar la interfaz gráfica de usuario (GUI), el programa necesita la ubicación de la carpeta donde se guardan los datos rastreados de los animales. Una vez indicado este dato, el programa solicita al usuario que especifique el número y la cantidad de animales dentro de cada grupo (Figura 4.1.4.3.1.2). Simplemente, con estos parámetros este bloque comienza a funcionar.

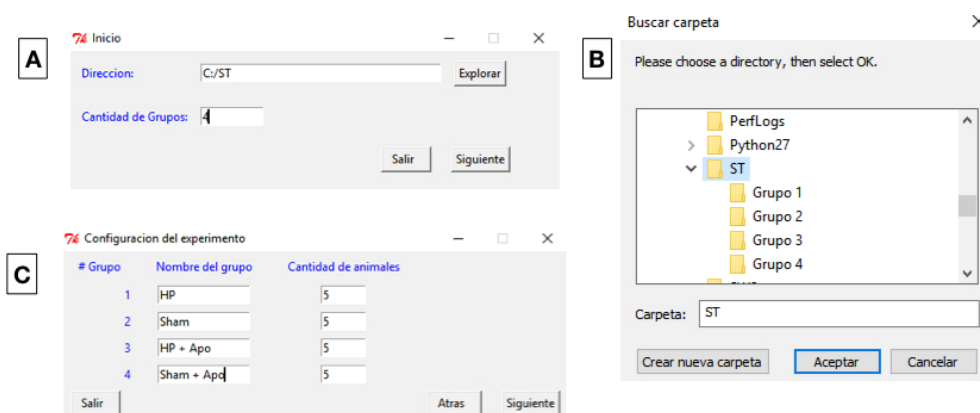


Figura 4.1.4.3.1.2. Configuración de los grupos experimentales. Determinación de la cantidad de animales por grupo y nombre o etiqueta de la condición experimental. A- Exploración de carpetas e indicación del número de grupos experimentales. B- Búsqueda de la carpeta en los archivos del ordenador. C- Etiqueta de cada grupo y cantidad de animales por grupo.

El código inicia los cálculos de los parámetros de modo que primero analiza cada animal y luego los promedios grupales. Posteriormente, inicia el bloque de análisis estadístico donde automáticamente se analiza la naturaleza de la distribución y se toman decisiones para el tratamiento de los valores numéricos.

El bloque comienza a probar si la distribución es normal, dependiendo del resultado, aplica pruebas para medias y varianzas aritméticas iguales o para medianas (alternativa no paramétrica). El diagrama de decisiones se presenta en la Figura 4.1.4.3.1.3. Toda la estadística funciona a un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Para cada valor de  $p$  hay una corrección de Sidak disponible que controla exactamente la tasa de error familiar (FWER).

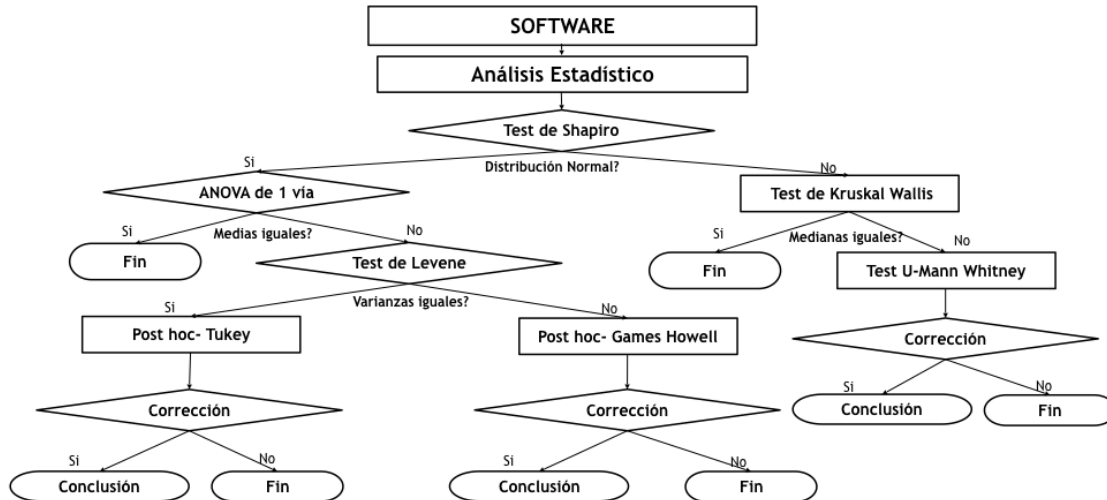


Figura 4.1.4.3.1.3. Configuración de los grupos experimentales. Determinación de la cantidad de animales por grupo y nombre o etiqueta de la condición experimental. A- Exploración de carpetas e indicación del número de grupos experimentales. B- Búsqueda de la carpeta en los archivos del ordenador. C- Etiqueta de cada grupo y cantidad de animales por grupo.

Se diseñó el sistema para que la salida de los datos fuese en forma de gráficos de barras, matrices de datos sin procesar y/o hojas de Excel. Como se muestra en la Figura 4.1.4.3.1.4, el usuario puede seleccionar según su preferencia estas opciones.

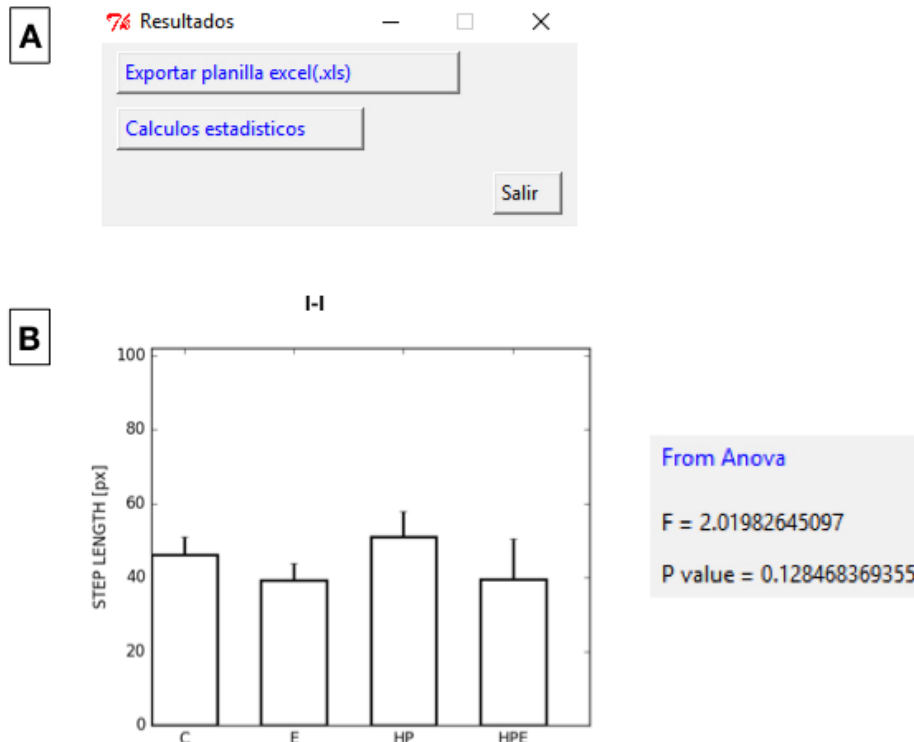


Figura 4.1.4.3.1.4. Salida de la interfaz gráfica. Arriba se ven las dos opciones que el software presenta. A- Formatos de salida. B- La salida si se selecciona el botón de “Cálculos estadísticos”.

La figura 4.1.4.3.1.5 muestra la pantalla que presenta el detalle de los parámetros estadísticos evaluados, además se muestra una salida gráfica que se genera en el caso de que entre los grupos experimentales existan comparaciones múltiples. Como se puede observar, a la gráfica de barras la acompaña el detalle de cada una de las comparaciones entre grupos y sus valores estadísticos.

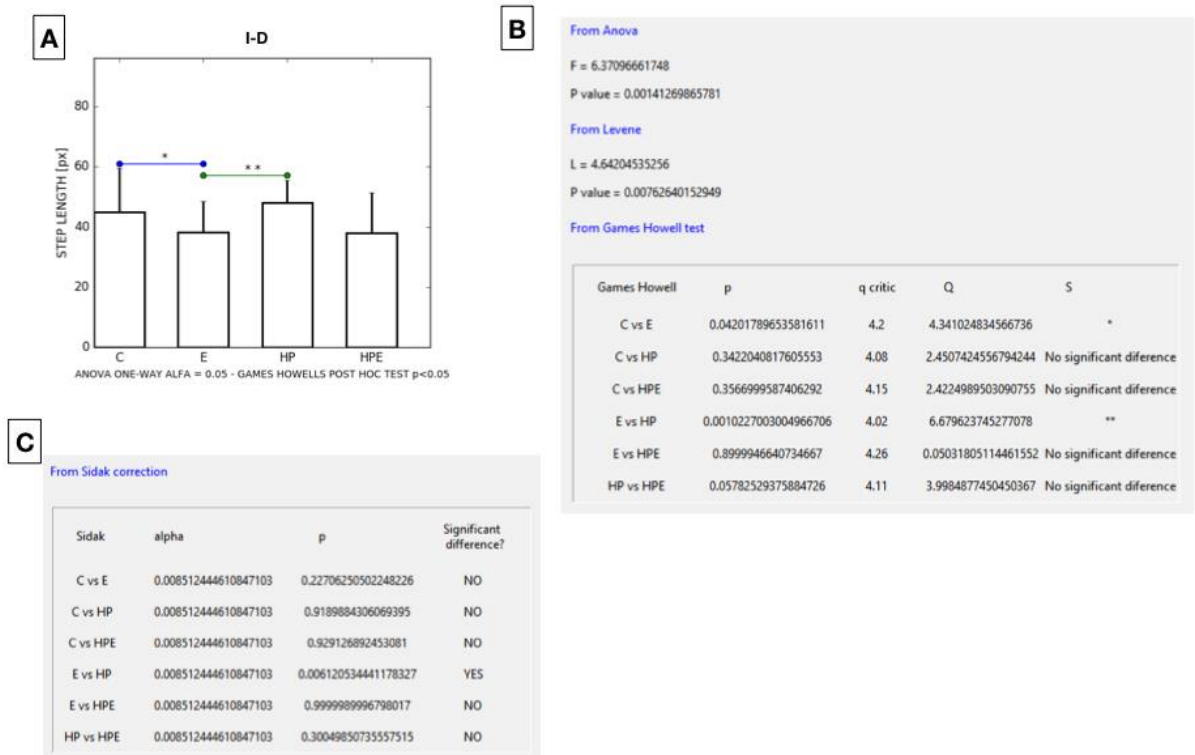


Figura 4.1.4.3.1.5. Salida de la interfaz gráfica. A- Formatos de gráfico de barras, B- Detalle de ANOVA, C- Detalle de corrección de Sidak.

#### 4.1.4.3.2. Validación

Debido a que el parámetro de pasos de ajuste es el único que se puede correlacionar entre los resultados manuales y automatizados, fue que se seleccionó para realizar las validaciones del software. Las correlaciones se realizaron para las evaluaciones SIF, y con Apo.

En la siguiente tabla, se presenta la correlación entre los valores automatizados y manuales. Como se puede observar los datos fueron similares para ambas observaciones ( $p < 0,01$ ).

Grupo	Coefficiente de Correlación	p-valor	Nivel de significancia
C	0,987	0,013	**
E	0,979	0,008	**
HP	0,998	0,002	**
HP+E	0,992	0,008	**

Tabla 4.1.4.3.2.1 Correlación entre el conteo manual y el automatizado del número de pasos en ST (SIF). Grupo C (n=4), E (n=4), HP (n=4), HP+E (n=4). Estadística: Correlación de Pearson; \*\*  $p < 0,01$ .

En la Figura 4.1.4.3.2.1 se presenta este resultado gráficamente. Cabe destacar que los puntos correlacionados son el promedio de las observaciones en cada etapa de la secuencia de testeo y no observaciones únicas.

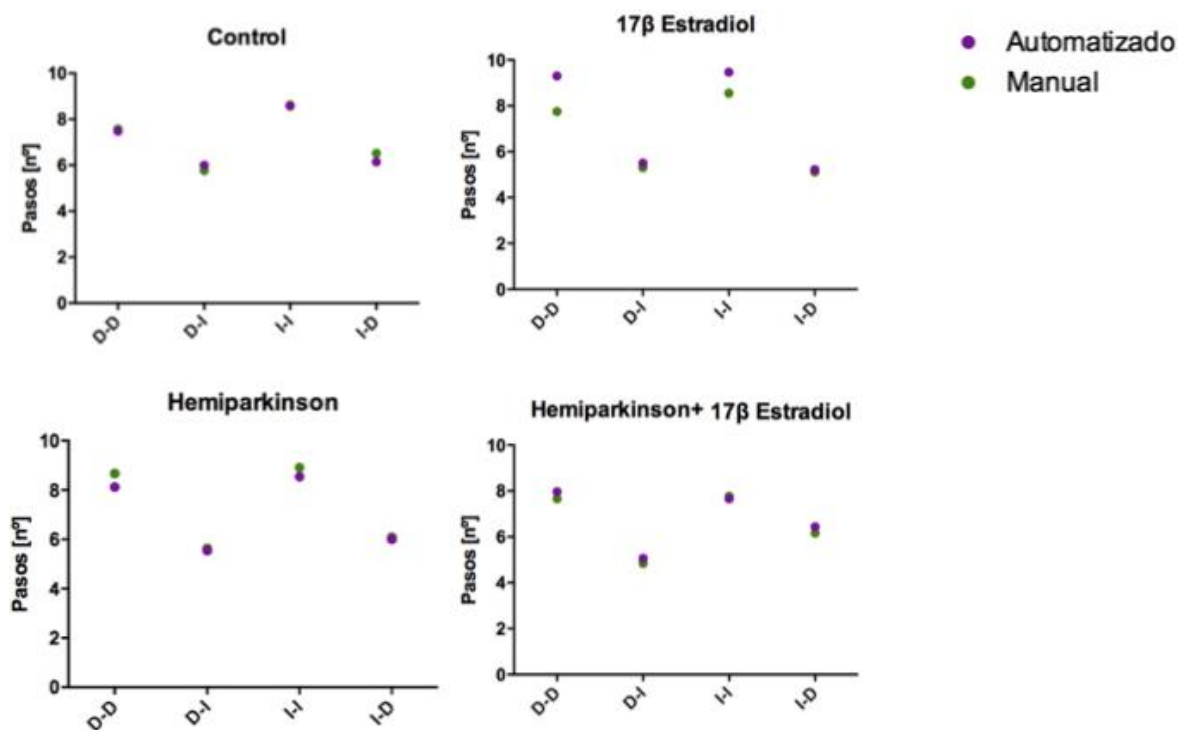


Figura 4.1.4.3.2.1 Correlación entre el conteo manual y el automatizado del número de pasos en ST (SIF). Grupo C (n=4), E (n=4), HP (n=4), HP+E (n=4). Estadística: Correlación de Pearson.

La evaluación se repitió para el examen de ST con Apo. Debido a que es un agonista postsináptico no selectivo del receptor de DA que mejora la diferencia de los pasos de ajuste entre ambos grupos; el propósito de realizar la correlación nuevamente fue para visualizar el desequilibrio evaluado en el primer día de una forma intensificada. Como se presenta en la Tabla 4.1.4.3.2.2, las mediciones manuales y automatizadas bajo esta situación mejorada también se correlacionaron fuertemente y de forma significativa ( $p < 0,05$ ).

Grupo	Coefficiente de Correlación	p-valor	Nivel de significancia
C	0,990	0,010	**
E	0,984	0,016	**
HP	0,982	0,018	**
HP+E	0,998	0,002	**

Tabla 4.1.4.3.2.2 Correlación entre el conteo manual y el automatizado del número de pasos en ST (Apo). Grupo C (n=4), E (n=4), HP (n=4), HP+E (n=4). Estadística: Correlación de Pearson; \*\*  $p < 0,01$ .

Con el mismo criterio que en la figura anterior, se pudo observar una relación lineal fuerte y positiva entre ambos cálculos (Figura 4.1.4.3.2.2).

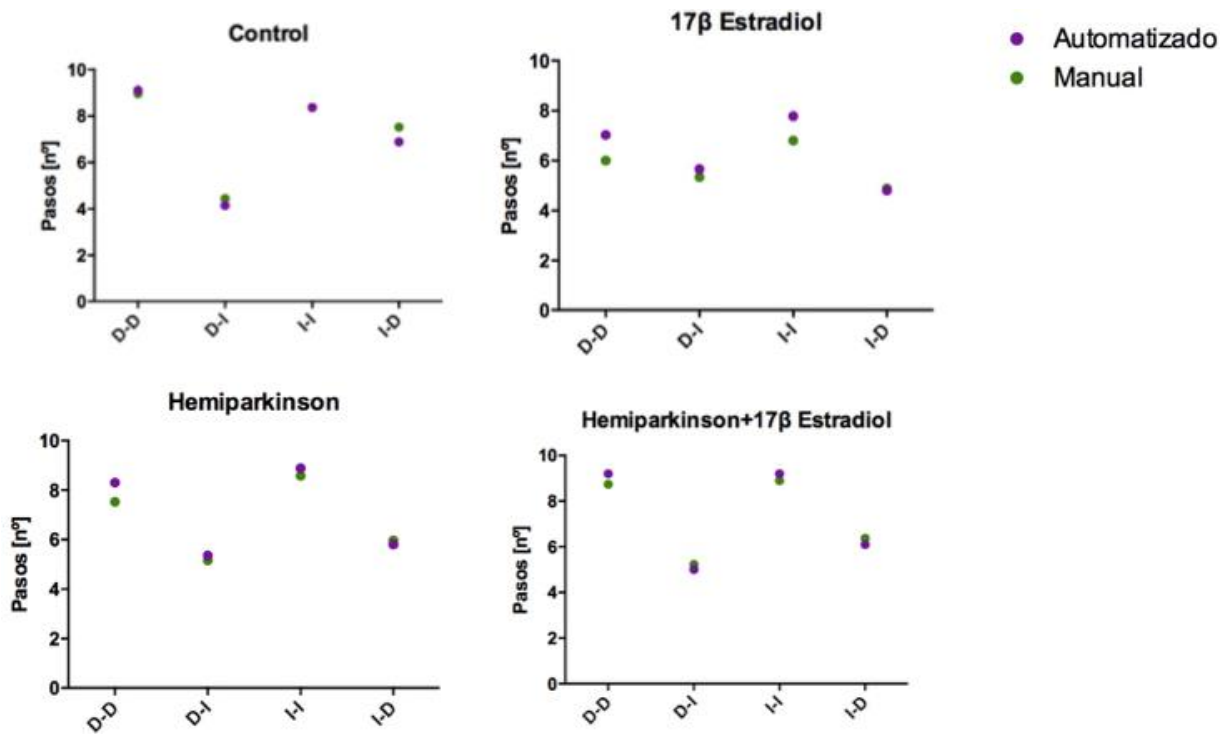


Figura 4.1.4.3.2.2. Correlación entre el conteo manual y el automatizado del número de pasos en ST (Apo). Grupo C (n=4), E (n=4), HP (n=4), HP+E (n=4). Estadística: Correlación de Pearson.

## 4.2. Inmunohistoquímica

### 4.2.1. Tirosina Hidroxilasa

#### 4.2.1.1. Sustancia Nigra

##### 4.2.1.1.1. Adquisición de imágenes

Después de la inmunotinción o marcaje de neuronas TH+, las muestras se examinaron en un microscopio óptico y las secciones se clasificaron según la ubicación dentro de la SN, según planos comparables con los planos 73-79 del atlas de cerebro de rata adulta (Paxinos & Watson, 2005).

Las microfotografías generadas por computadora de los diferentes planos se obtuvieron con una cámara digital (DN100) conectada al microscopio con un objetivo 4X. Las imágenes se ensamblaron en figuras (1178 x 1000 px) para un análisis adicional utilizando un software de desarrollo propio.

En las figuras 4.2.1.1.1.1 y 4.2.1.1.1.2 se presentan los planos 73 y 79 del atlas y muestran imágenes representativas de las tinciones en cada uno de los grupos.

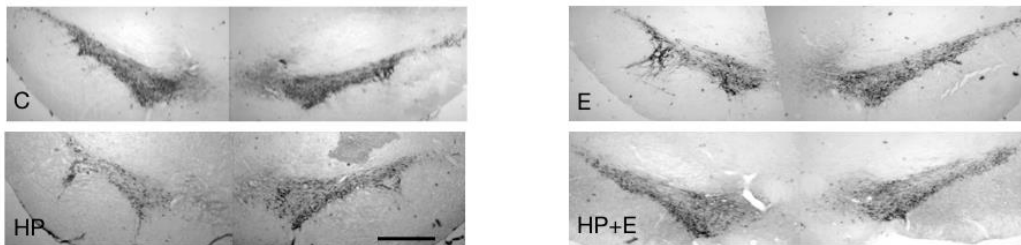
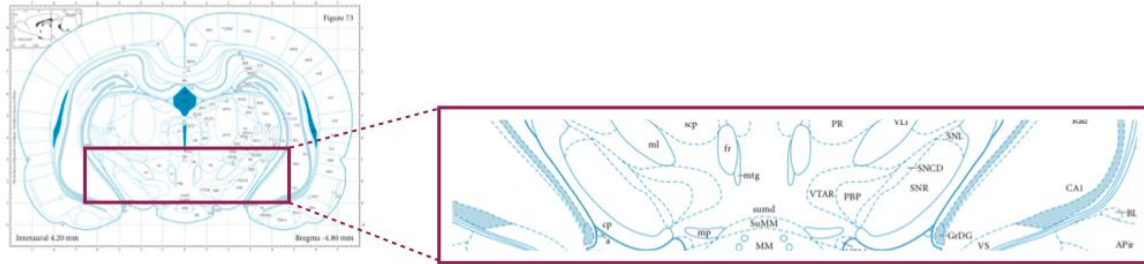


Figura 4.2.1.1.1.1. Representación esquemática de un corte coronal de cerebro donde se muestra el área que contiene la SN donde se realizaron los estudios inmunohistoquímicos de TH. Microfotografías de plano 73, objetivo 4x, escala 400 $\mu$ m. Modificado de Paxinos G. and Watson C. (Paxinos & Watson, 2005).

En la Figura 4.2.1.1.1.2, se evidencia más notoriamente el deterioro de la SN. Es posible observar cómo disminuyó la intensidad de la tinción en la parte rostral de la SN para el grupo HP. Contrariamente, en HP+E persiste tanto la forma original de la estructura como su coloración. Las tinciones obtenidas para HP+E se asemejaron a las de los grupos C y E.

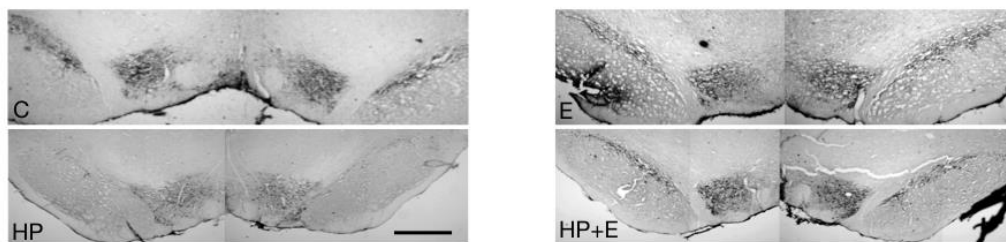
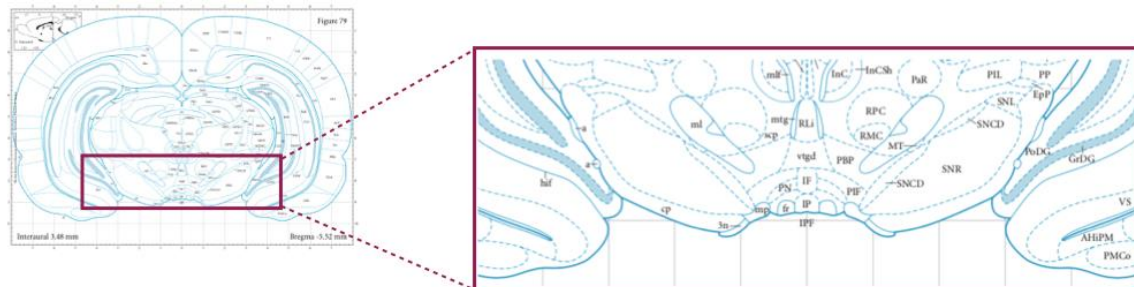


Figura 4.2.1.1.1.2. Representación esquemática de un corte coronal de cerebro donde se muestra el área que contiene la SN donde se realizaron los estudios inmunohistoquímicos de TH. Microfotografías de plano 79, objetivo 4x, escala 400 $\mu$ m. Modificado de Paxinos G. and Watson C. (Paxinos & Watson, 2005)



### 4.2.1.1.2. Parámetros de interés

En los planos seleccionados, se contaron las neuronas TH+ marcadas de color negro azulado en el hemisferio izquierdo. En el apartado A se muestra que los valores medios de cantidad de TH+ fueron menores para el grupo HP en comparación con los demás grupos experimentales ( $p < 0,0001$ ). En B se muestran los resultados de calcular el número total de neuronas TH+ (TNN) (considerando ambos hemisferios). Los valores surgen de restar el nº de neuronas TH+ en el hemisferio derecho con los del hemisferio izquierdo.

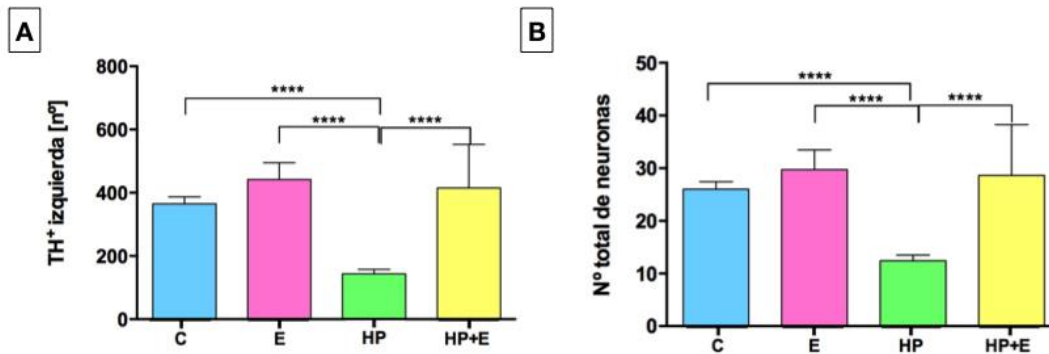


Figura 4.2.1.1.2.1 *Conteo de neuronas, reactivas a TH. A- N° TH+ en el hemisferio izquierdo, B- N° Total de neuronas TH+= Hemisferio derecho- hemisferio izquierdo. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=15), E (n=15), HP (n=18), HP+E (n=18). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .*

La evaluación del TNN en cada corte de la SN, arrojó un valor menor para HP en comparación con los demás grupos experimentales y nuevamente diferencias estadísticamente significativas para las comparaciones entre los grupos ( $p < 0,0001$ ).

### 4.2.1.1.3. Desarrollo del software para la evaluación de neuronas TH+

Las imágenes obtenidas del microscopio son la entrada de un algoritmo desarrollado en Netbeans (v.8.2) para correr en el software FIJI con la finalidad de contar neuronas reactivas a TH (TH+) (Meijering, 2012).

El flujo de trabajo de procesamiento de imágenes diagramado en la Figura 4.2.1.1.3.1, consiste en (i) seleccionar y pre procesar la imagen; (ii) segmentar estructuras de interés y (iii) etiquetar y contar estas segmentaciones. Brevemente, para iniciar el software, se le pide al usuario que seleccione un archivo .tif, permitiéndole explorar los archivos del equipo para buscar una imagen en particular. Después de esta selección (llamada imagen original) el algoritmo comienza a funcionar.

Los métodos de pre procesamiento se aplican para crear una nueva imagen. Esta serie de pasos consiste en convertir el tipo de imagen a 8 bits y medir el área total.

Después, se aplica un filtro para mejorar el contraste local (CLAHE) (Zuiderveld). En la siguiente etapa, se utiliza un detector de bordes Sobel (Sobel & Freeman, 1990) para resaltar los cambios bruscos de intensidad en la imagen activa creando una imagen de bordes; y finalmente se usa una máscara binaria para convertir la imagen en binaria (imagen binaria).

Las imágenes originales y binarias se suman, se les filtra el ruido y luego se binarizan para

aplicar un “opening” que genera una imagen denominada abierta. Esta última imagen se combina con un operador lógico (y) con la imagen de bordes y, finalmente, se le hace otro “opening” para obtener una nueva versión de la imagen original. La imagen resultante es la entrada para el siguiente bloque en la secuencia.

Para medir el área correspondiente a la tinción, la imagen primero se umbraliza y luego se enmascara automáticamente.

El número de recuentos de neuronas TH+ se obtiene utilizando una función diseñada para encontrar la máxima. Esta función opera de modo que determina los máximos locales en la imagen y crea una imagen binaria) del mismo tamaño que la original con las secciones máximas marcadas; o una partícula segmentada por cada máxima encontrada, marcada con puntos.

La nueva imagen se dilata dos veces para hacer que las marcas sean detectables y se realiza un análisis de partículas para obtener el número de conteos.

La salida de este algoritmo es un administrador de región de interés (ROI) que muestra las partículas etiquetadas y la imagen final que contiene los valores numéricos de las cuentas en la imagen original.

Por último, aparece un mensaje en la pantalla para que el usuario sepa que el análisis ha finalizado. Las imágenes generadas durante el curso del algoritmo, así como las hojas de Excel que contienen los parámetros, se guardan en el mismo archivo donde reside la imagen original.

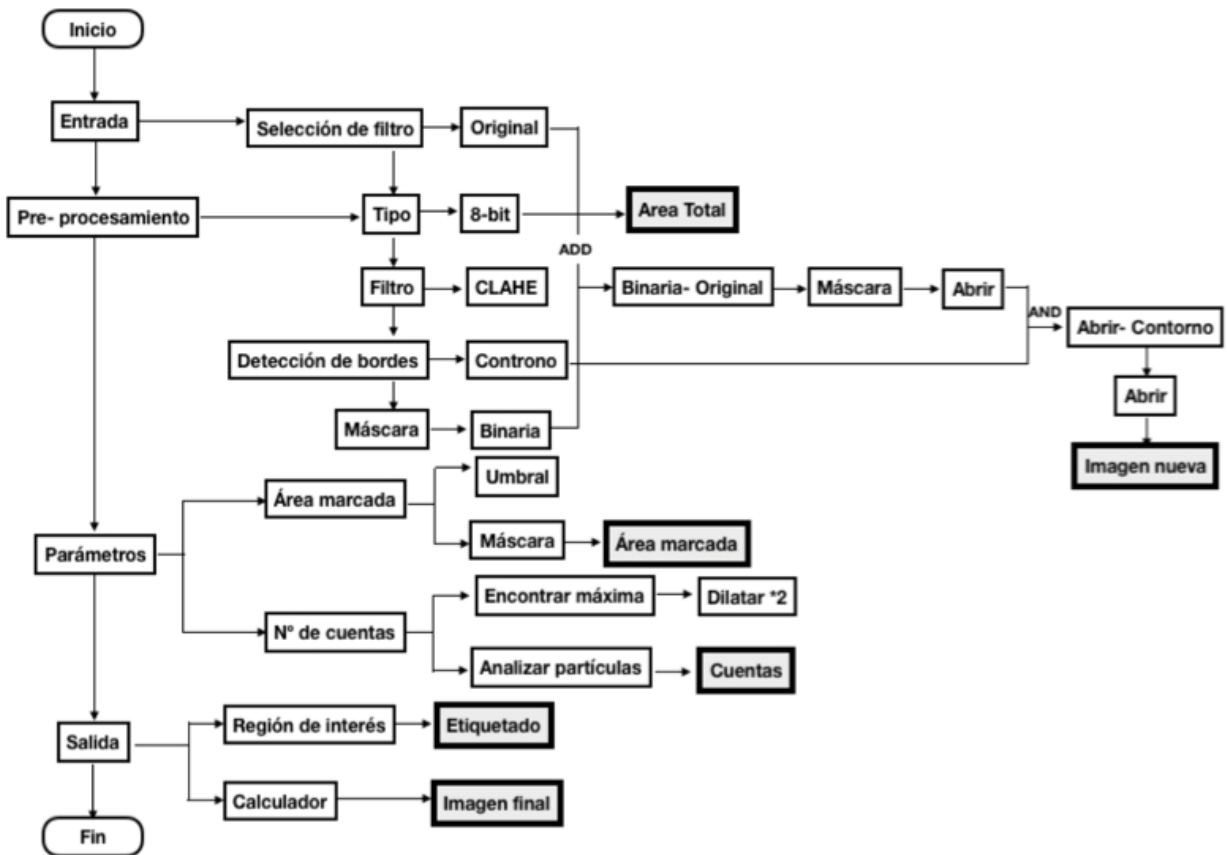
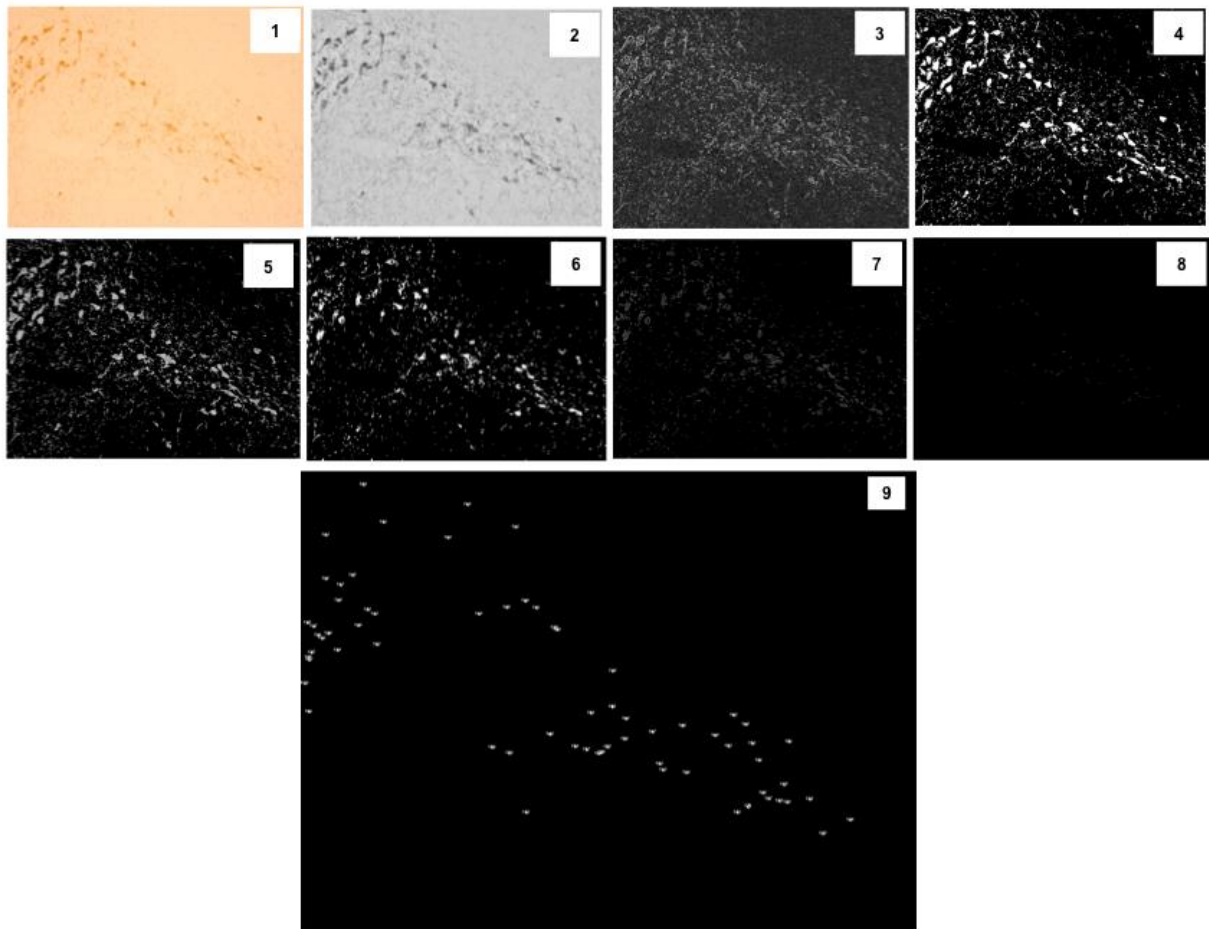


Figura 4.2.1.1.3.1 Diagrama de bloques desarrollado para el conteo automatizado de neuronas reactivas a TH en la SN.



En la siguiente se presentan las imágenes secuenciales resultantes de la aplicación del algoritmo.



*Figura 4.2.1.1.3.2. Diagrama de bloques desarrollado para el conteo automatizado de neuronas reactivas a TH en la SN.*

#### 4.2.1.1.3.1. Validación

Los recuentos de neuronas obtenidos con el software automático se correlacionaron con las estimaciones manuales realizadas por tres observadores independientes que trabajan con neuronas TH+ en diferentes áreas del cerebro. El etiquetado manual también se hizo utilizando FIJI. Brevemente, para esto los usuarios tuvieron que convertir las imágenes a 8 bit y con la herramienta de selección de múltiples puntos, marcaron neuronas TH+ y las agregaron al administrador de ROI.

Todas las figuras de los planos 73, 75 y 79 tanto del hemisferio izquierdo como derecho fueron y utilizadas para la validación del software. El número total de neuronas TH+ en el lado lesionado y no lesionado se comparó entre los recuentos de observadores y los resultados automáticos. Los resultados para ambos grupos experimentales se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson;  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

El análisis comparativo de los recuentos manuales y automáticos presentó un alto coeficiente de correlación entre las observaciones.

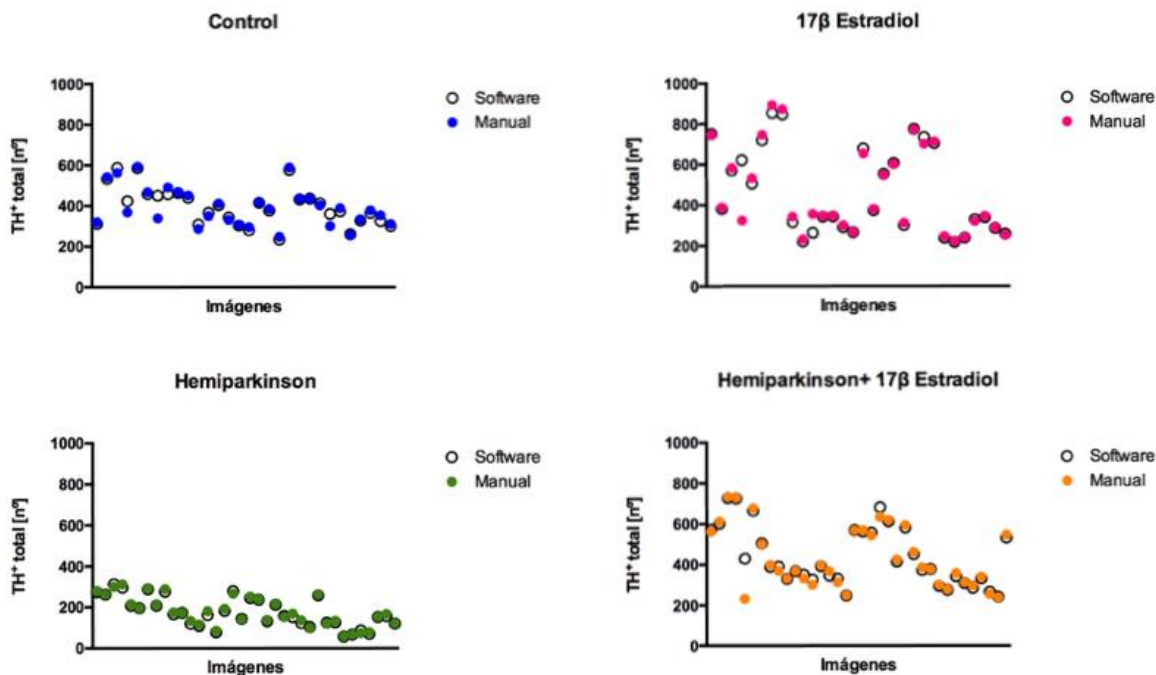


Figura 4.2.1.1.3.1.1 Resultados de la correlación entre el conteo manual y automatizado del número total de neuronas. Grupo C (n=30), E (n=30), HP (n=36), HP+E (n=36). Estadística: Correlación de Pearson.

En la siguiente encuentran los Coeficientes de Correlación de Pearson que muestran una relación entre las estimaciones manuales y automatizadas fuerte y positiva.

Grupo	Coeficiente de Correlación	p-valor
C	0,954	3,803 e <sup>-16</sup>
E	0,960	4,596 e <sup>-17</sup>
HP	0,994	9,511 e <sup>-35</sup>
HP+E	0,960	1,682 e <sup>-22</sup>

Tabla 4.2.1.1.3.1.1 Correlación entre el conteo manual y el automatizado del número total de neuronas reactivas a TH en SN. Grupo C (n=30), E (n=30), HP (n=36), HP+E (n=36). Estadística: Correlación de Pearson; \* p<0,05.

Los coeficientes de correlación fueron desde el 0,954 (grupo C) al 0,994 (grupo HP). Consideramos que los valores resultaron mayores para el grupo HP porque las imágenes de estos animales presentaron menor número de neuronas TH+; entonces ambos métodos pudieron determinarlas con más precisión.

Además de eliminar las subjetividades, el desarrollo automatizado también favoreció el ahorro de tiempo. Si calculamos el tiempo empleado en los recuentos manuales frente a los automáticos, podemos detectar una diferencia de dos órdenes de magnitud superior para el procesamiento manual.

#### 4.2.1.1.3.2. Grado de lesión

Para calcular este parámetro se utilizaron los valores medios de TH+ en ambos hemisferios. La siguiente tabla muestra los valores que resultan si se toman los promedios para TH+ en el grupo C como el estándar de comparación (100%) y se realizan las comparaciones de los demás grupos en base al mismo parámetro.

Grupo	TH+ izq	TH+ der	TH+ total	%
C	365	419,3	54,3	100
E	441,9	486,2	44,3	18,41
HP	143,4	207,6	64,2	-18,23***
HP+E	414,8	458,4	43,6	19,7

Tabla 4.2.1.1.3.2.1 *Estimaciones del grado de lesión [%] sobre el número de neuronas- TH+. Resultados expresados como Medias del TH+. Para cada hemisferio, C (n=15), E (n=15), HP (n=18), HP+E (n=18); para el total, C (n=30), E (n=30), HP (n=36), HP+E (n=36). Estadística: Anova de 1 vía, Dunnett post hoc test (resultados en relación al grupo C); \*\*\* p<0,001.*

El signo negativo que se antepone al valor de HP indica que la situación se exacerbó para las neuronas lesionadas con 6-OHDA. Podemos ver que hubo una mejora en la cantidad de neuronas TH+ para los grupos que recibieron tratamiento con 17β-estradiol. O sea que, en relación al grupo C, los grupos E y HP+E aumentaron alrededor del 20% el número de neuronas TH+ en ambos hemisferios, llevándolo a valores cercanos al C. Contrariamente, en el grupo HP aumentó el grado de la lesión en un 18,23%.

#### 4.2.1.1.3.3. Variables estereológicas

Los resultados del cálculo de los parámetros estereológicos se muestran en la siguiente Tabla

	C	E	HP	HP+E
<b>Coefficiente de error (CE)</b>	0,21	0,46	0,37	0,33
<b>Coefficiente de varianza (CV)</b>	0,05	0,12	0,08	0,08
<b>Variabilidad biológica [1-(CE<sup>2</sup>/CV<sup>2</sup>)]</b>	0,93	0,92	0,94	0,94

Tabla 4.2.1.1.3.3.1 *Estimaciones de variables estereológicas en relación al número total de neuronas TH+. Grupo C (n=30), E (n=30), HP (n=36), HP+E (n=36). Valores truncados al segundo decimal.*

Un estimador sobre la calidad de las mediciones cuantitativas obtenidas de nuestro método automatizado, es el coeficiente de error (CE). Los resultados demostraron que nuestro esquema de muestreo fue apropiado y que el uso de las neuronas totales TH+ fue adecuado para calcular parámetros estereológicos. En particular, el coeficiente de variación (CV) indica el grado de variabilidad en relación con la media de la población. Para los grupos examinados, hubo una variación del 5-12%.

Finalmente, también se calculó la porción de la varianza total atribuible a la variabilidad biológica a través de muestras. Los datos confirmaron que la mayoría de la varianza (93-94%) del total de neuronas TH+ en los grupos se debió a la variabilidad biológica intrínseca de los animales y no a variaciones de los métodos implementados.

#### 4.2.1.1.3.4. Relación entre área ocupada y total de neuronas en cada imagen

Con los conteos automáticos del total de neuronas TH+ en cada figura, se calculó la regresión lineal para el área [mm<sup>2</sup>]. Como muestra la Figura 4.2.1.1.3.4.1, las relaciones resultaron lineales y positivas con una bondad de ajuste (r<sup>2</sup>) superior al 95%.

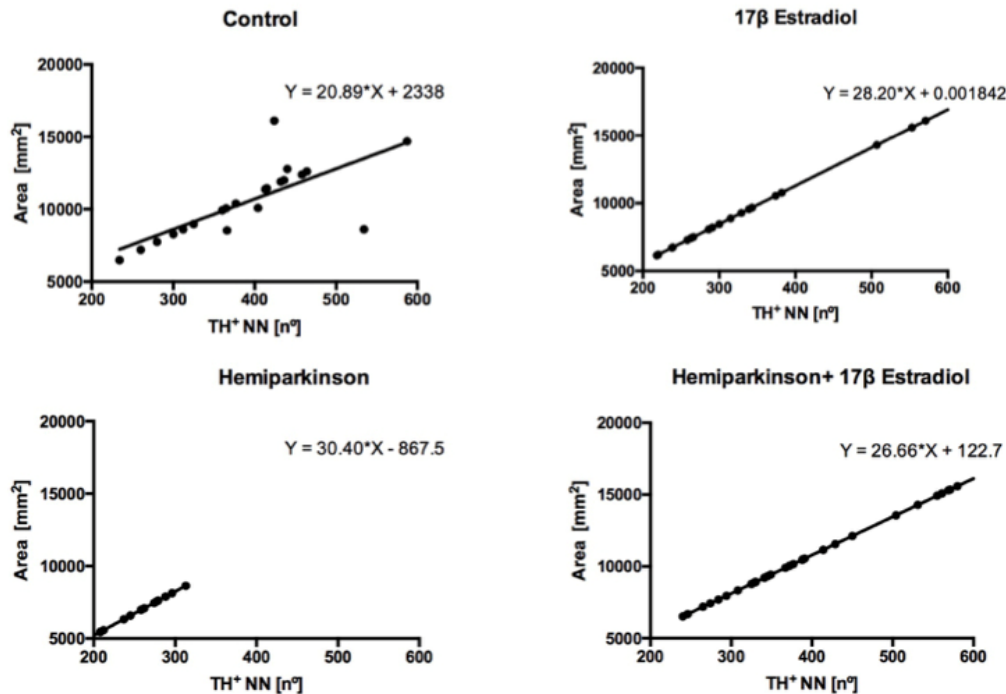


Figura 4.2.1.1.3.4.1 Relación entre el número de neuronas totales y el área ocupada [mm<sup>2</sup>] para cada grupo experimental. Grupo C (n=30), E (n=30), HP (n=36), HP+E (n=36). Imagen 1778x1000 px; 1px =0,23cm. Estadística: Regresiones lineales.

Estos resultados demostraron que, aunque había algunas ambigüedades (dado r<sup>2</sup>, se pueden desestimar), los resultados fueron consistentes y fiables y que la sobreestimación de cuentas o los errores faltantes afectaron a todos los grupos de manera lineal. También se pudo ver que (más allá de las limitaciones del modelo y los límites inferiores y superiores de cada estimación lineal) el número de TH+ que se obtuvo fue un buen predictor para la proporción del área marcada en la imagen.

#### 4.2.1.2. Cuerpo Estriado

##### 4.2.1.2.1. Adquisición de imágenes

De la misma manera que se ejecutó para las muestras de SN, se realizaron los pasos para las determinaciones en CPu. Luego de obtener la totalidad de los cortes para todo el CPu en su extensión, se seleccionaron los planos de las figuras que se muestran a continuación.

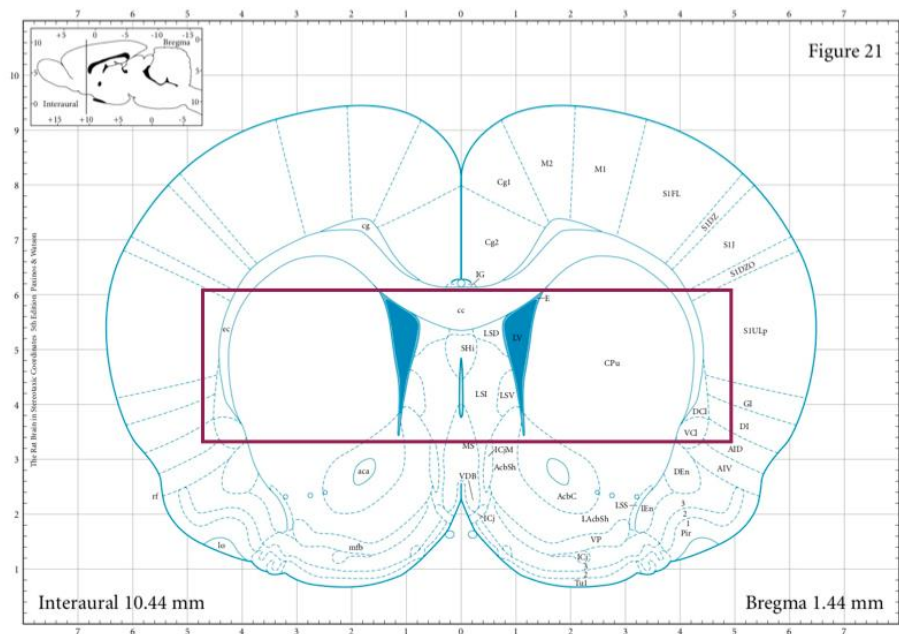


Figura 4.2.1.2.1.1. Representación esquemática de un corte coronal de cerebro donde se muestra el área que contiene al CPu donde se realizaron los estudios inmunohistoquímicos de TH. Plano 21, modificado de Paxinos G. and Watson C. (Paxinos & Watson, 2005).

En la Figura 4.2.1.2.1.2 se muestran las imágenes representativas de cada grupo para los planos 21, 25, 31 y 36 (de izquierda a derecha). Aunque no se pudo cuantificar este resultado, en la imagen evidenció la neurodegeneración que el grupo HP experimentó. La coloración en en los planos más cercanos a la lesión en los animales HP se tornó muy escasa, casi nula. Observamos cómo el 17 $\beta$ -estradiol protegió a las neuronas en su extensión sobre la vía dopaminérgica nigroestriada en el CPu, denotado porque las tinciones incrementaron la intensidad y distribución en el tejido.

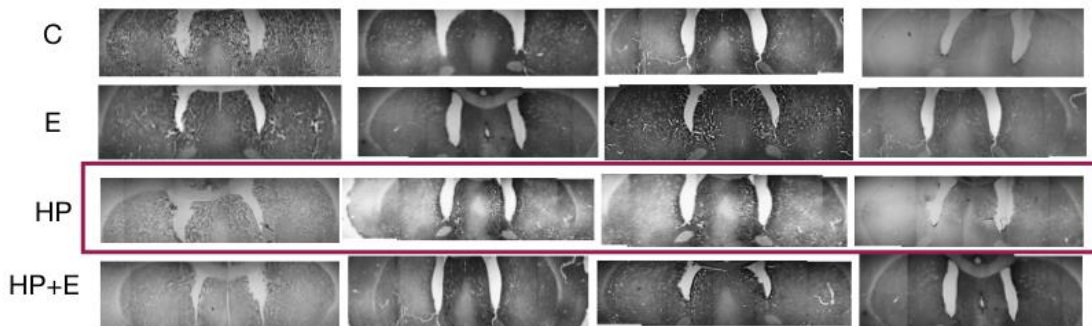


Figura 4.2.1.2.1.2. Representación esquemática de un corte coronal de cerebro donde se muestra el área que contiene la CPu donde se realizaron los estudios inmunohistoquímicos de TH. De izquierda a derecha, las microfotografías de planos 21, 25, 31 y 36; objetivo 4x, escala 1000 $\mu$ m. Modificado de Paxinos G. and Watson C. (Paxinos & Watson, 2005).



## 4.2.2. Proteína Ácida Fibrilar de la Glia

### 4.2.2.1. Sustancia Nigra

#### 4.2.2.1.1. Adquisición de imágenes

Después de la inmunotinción o marcaje de los astrocitos GFAP+, las muestras se examinaron en un microscopio óptico y las secciones se clasificaron según la ubicación dentro de la SN, según planos comparables con los planos 73-79 del atlas de cerebro de rata adulta (Paxinos & Watson, 2005).

Las microfotografías generadas por computadora de los diferentes planos se obtuvieron con una cámara digital (DN100) conectada al microscopio con un objetivo 10X y 4X. Las imágenes se ensamblaron en figuras (1178 x 1000 px) para análisis posteriores.

En las Figura 4.2.2.1.1.1 se presenta un plano del atlas de donde se obtuvieron las imágenes representativas de las tinciones GFAP+ en cada uno de los grupos experimentales.

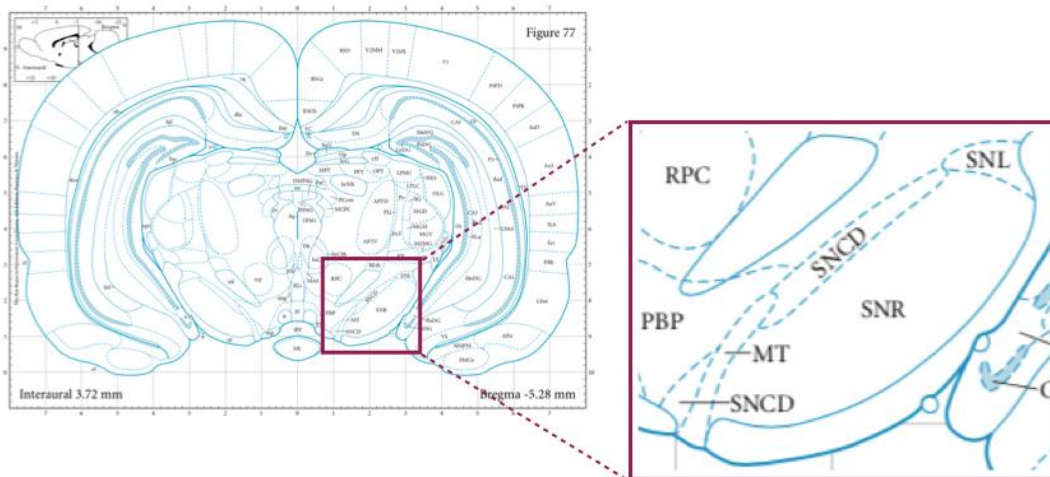


Figura 4.2.2.1.1.1.1 Representación esquemática de un corte coronal de cerebro donde se muestra el área que contiene al SN donde se realizaron los estudios inmunohistoquímicos de GFAP. Plano 77, modificado de Paxinos G. and Watson C. (Paxinos & Watson, 2005).

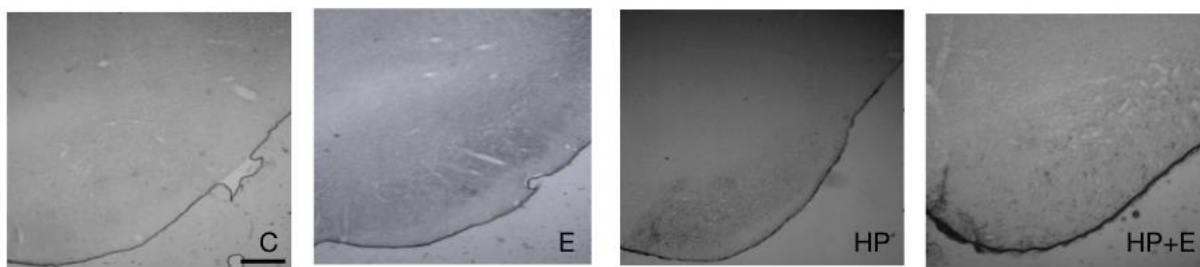


Figura 4.2.2.1.1.1.1. Tinciones con GFAP en la SN para todos los grupos experimentales. Selección de imágenes representativas de cada grupo experimental. Microfotografías de plano 77, objetivo 4x, escala 200µm.

La cantidad de astrocitos en la SN aumentó en mayor proporción para los animales hemiparkinsonianos. Hubo una disminución en la marcación para los que recibieron tratamiento con 17β-estradiol. Las células GFAP+ se posicionaron en el borde la estructura.

Esta situación fue común para todos los grupos. Igualmente, los animales HP presentaron más ramificaciones que en comparación con los demás grupos.

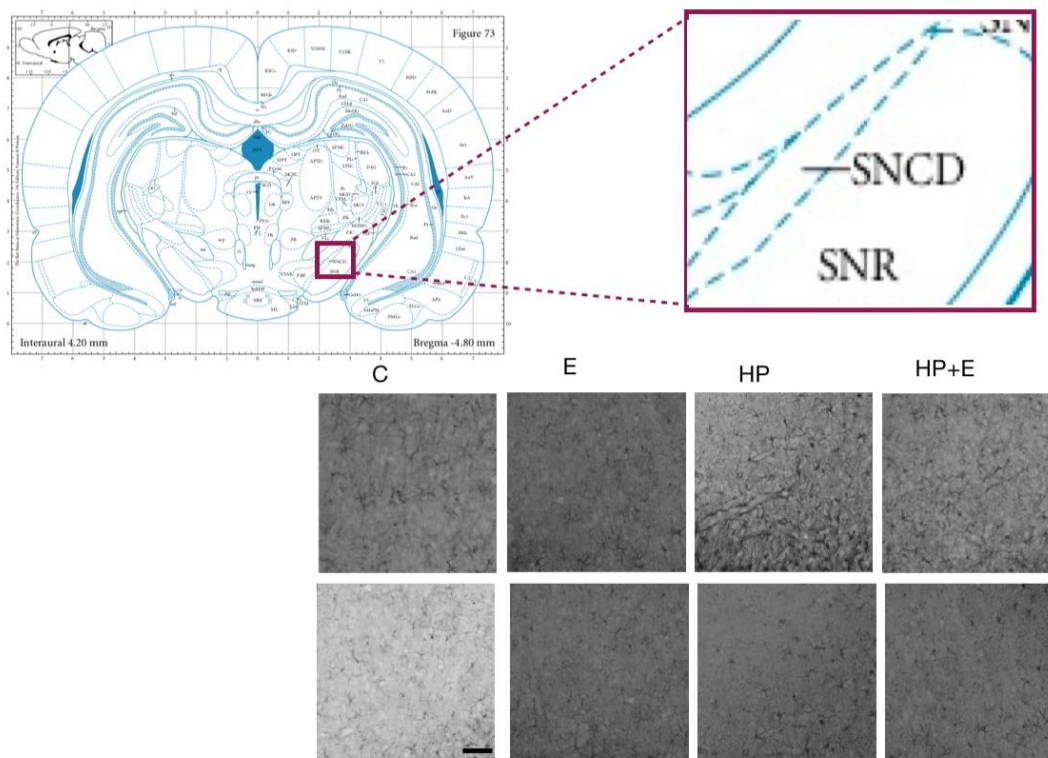


Figura 4.2.2.1.1.2. Tinciones con GFAP en la SN para todos los grupos experimentales. Arriba figura plano 73, modificado de Paxinos G. and Watson C. (Paxinos & Watson, 2005) y abajo se presentan microfotografías del lado izquierdo para cada grupo experimental. Planos 73 (arriba) y 80 (abajo), objetivo 10x, escala 500  $\mu$ m.

#### 4.2.2.1.1.1. Parámetros de interés

Como muestra en la Figura 4.2.2.1.1.1 A, en los dos grupos de animales lesionados con 6-OHDA, HP y HP+E, aumentó la cantidad de astrocitos a niveles estadísticamente significativos en relación con los grupos C y E ( $p < 0,0001$ ); siendo este parámetro aún de mayor magnitud para los animales que no recibieron tratamiento con  $17\beta$ -estradiol.

En los bloques B y C se puede ver que, si bien los valores totales en ambos hemisferios de los grupos lesionados con 6-OHDA tuvieron una reactividad astrocitaria estadísticamente mayor que los grupos que fueron lesionados con vehículo, el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol disminuyó significativamente el ratio. En relación al ratio de astrocitos GFAP+ en la SN, los animales HP evidenciaron los valores más elevados, estadísticamente significativos en relación a los grupos C y E.

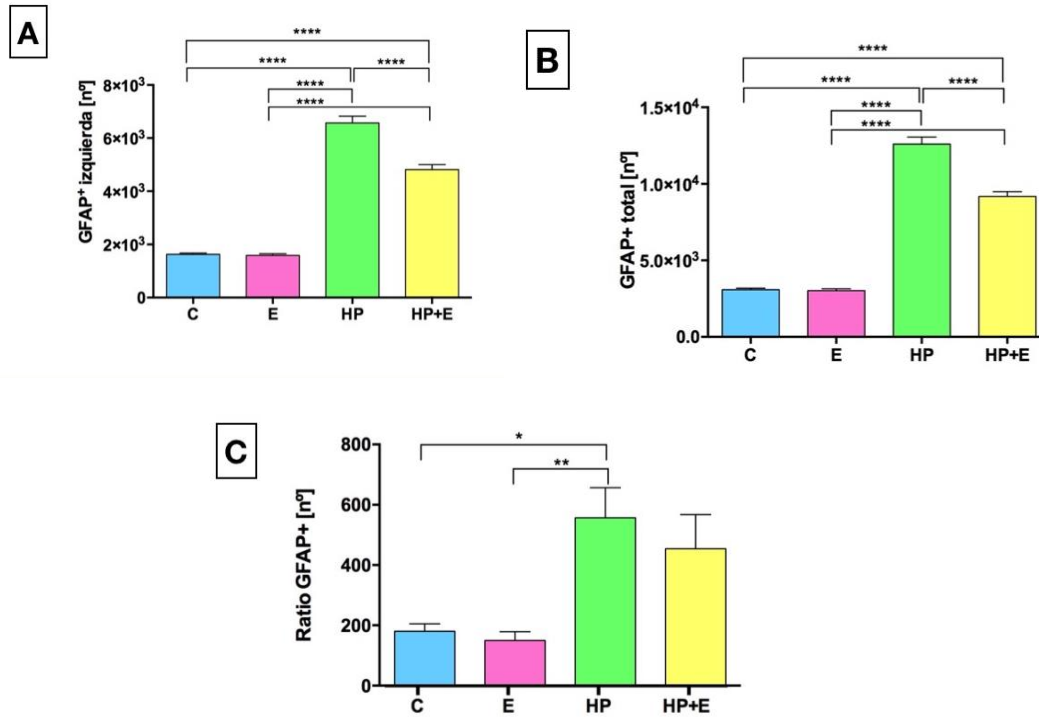


Figura 4.2.2.1.1.1.1 *Conteo de astrocitos, reactivos a GFAP en SN. A- N° GFAP+ en el hemisferio izquierdo, B- N° Total de astrocitos GFAP+= Hemisferio derecho+ hemisferio izquierdo. C-Ratio GFAP+= Hemisferio izquierdo-hemisferio derecho. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Para A- Grupo C (n=30), E (n=30), HP (n=36), HP+E (n=36); para B y C: Grupo C (n=15), E (n=15), HP (n=18), HP+E (n=18). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,0001.*

## 4.2.2.1.2. Cuerpo Estriado

### 4.2.2.1.2.1. Adquisición de imágenes

La Figura 4.2.2.1.2.1.1 muestra el área en una figura representativa del atlas de la que se sacaron muestras. Abajo, en las microfotografías, claramente aumentó la inmunoreactividad astrocitaria en CPu en la condición de EP con y sin tratamiento.



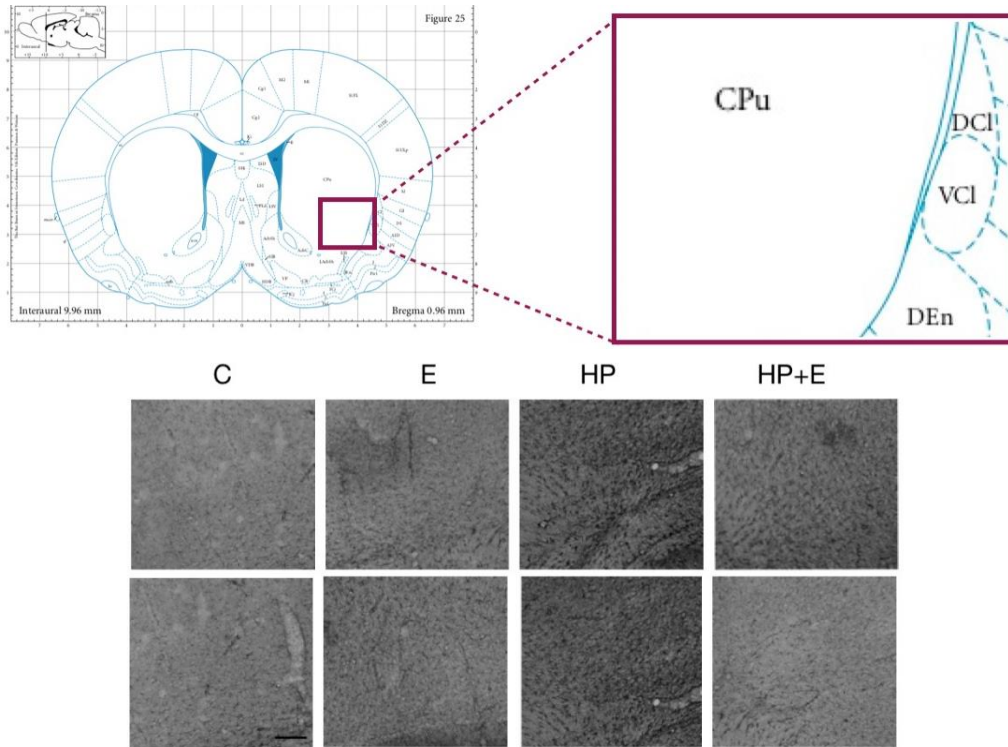


Figura 4.2.2.1.2.1.1 Representación esquemática de un corte coronal de cerebro donde se muestra el área que contiene la CPu donde se realizaron los estudios inmunohistoquímicos de GFAP. Arriba, plano 25 modificado de Paxinos G. and Watson C. (Paxinos & Watson, 2005). Abajo, microfotografías de los planos 25 (superior) y 36 (inferior), objetivo 4x, escala 2000 $\mu$ m.

En los planos del atlas cercanos al sitio de lesión, los grupos HP y HP+E presentaron reactividad por la inyección (cicatriz glial). En los animales del grupo HP se observó un marcado desorden en el mismo sitio con un aumento en la cantidad de marcación GFAP+ (Figura 4.2.2.1.2.1.2.2).

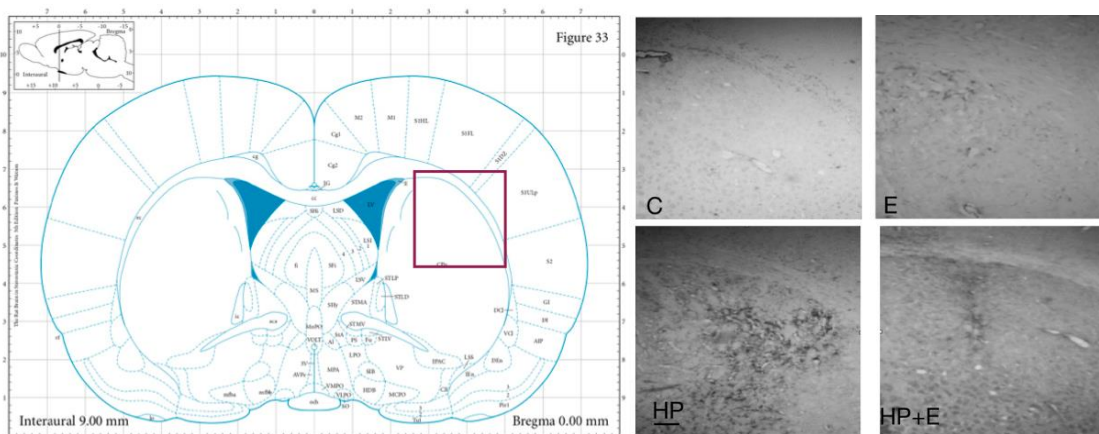


Figura 4.2.2.1.2.1.2.2 Representación esquemática de un corte coronal de cerebro donde se muestra el área que contiene la CPu donde se realizaron los estudios inmunohistoquímicos de GFAP. A la izquierda, plano 33, modificado de Paxinos G. and Watson C. (Paxinos & Watson, 2005). A la derecha, microfotografías del plano 33, objetivo 10x, escala 500 $\mu$ m.

#### 4.2.2.1.2.2. Parámetros de interés

Ambos grupos HP presentaron mayores cantidades de astrocitos reactivos a GFAP en comparación con los demás grupos (C y E) (Figura 4.2.2.1.2.2.1 A).

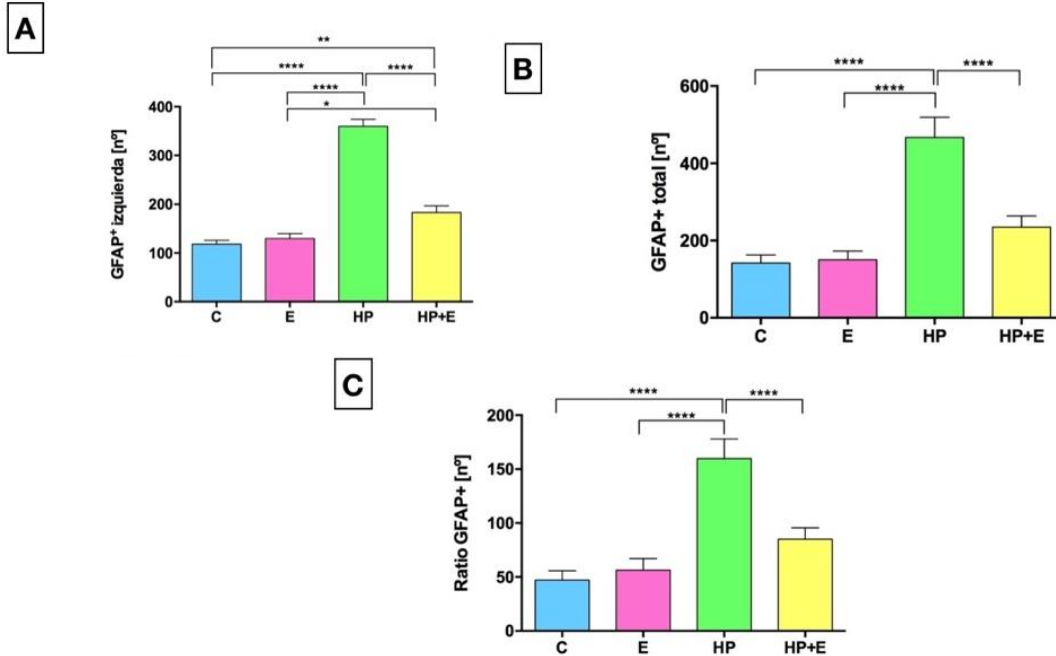


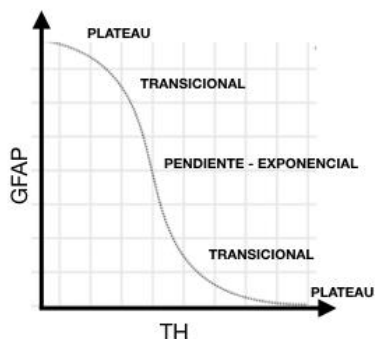
Figura 4.2.2.1.2.2.1. **Conteo de astrocitos, reactivos a GFAP en CPu.** A- N° GFAP+ en el hemisferio izquierdo, B- N° Total de astrocitos GFAP+= Hemisferio derecho+ hemisferio izquierdo. C-Ratio GFAP+= Hemisferio izquierdo-hemisferio derecho. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Para A- Grupo C (n=30), E (n=30), HP (n=36), HP+E (n=36); para B y C: Grupo C (n=15), E (n=15), HP (n=18), HP+E (n=18). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Los valores totales en ambos hemisferios de los grupos lesionados con 6-OHDA se encontraron aumentados y el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol disminuyó el ratio de reactividad astrocitaria (Figura 4.2.2.1.2.2.1 B y C).

#### 4.2.3. Relación TH-GFAP

En la Figura 4.2.3.1 se observa la relación entre neuronas TH+ y astrocitos GFAP+ que caracterizó a cada uno de los grupos en la SN. Matemáticamente la relación que mejor describía las distribuciones de los datos fue la sigmoidal.

### A Distribución Sigmoidal



### B

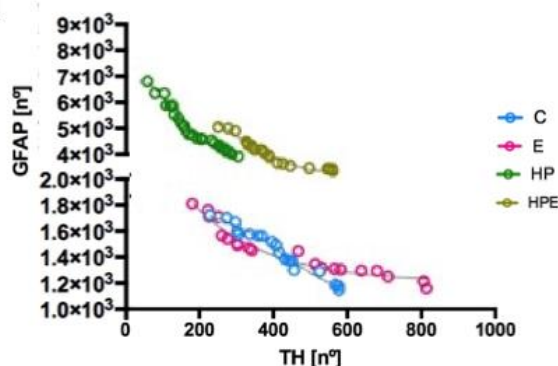


Figura 4.2.3.1 Relación entre las células reactivas a TH y a GFAP para cada uno de los grupos experimentales. Grupo C (n=30), E (n=30), HP (n=36), HP+E (n=36). Estadística: Regresión no lineal- sigmoidal<sup>4</sup>.

La relación numérica generó altos valores de coeficientes de determinación para todos los grupos (Tabla 4.2.3.1)

Grupo	Coficiente de Determinación	Suma absoluta de cuadrados	Sx.y
C	0,9688	24819	39,39
E	0,9471	49740	55,76
HP	0,9797	531404	143
HP+E	0,9812	244649	97

Tabla 4.2.3.1 Parámetros que definen la relación no lineal entre las dos variables (nº TH y nº GFAP) para cada grupo experimental en la SN.

Este resultado permitió que, con los valores obtenidos, se pudiese trabajar sobre un modelo predictivo no lineal- sigmoidal para la relación entre neuronas reactivas a TH+ y astrocitos reactivos a GFAP+ para la SN de los distintos grupos de estudio.

## 4.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

### 4.3.1. Determinación de la concentración de Dopamina y DOPAC

#### 4.3.1.1. Sustancia Nigra

Las comparaciones de dopamina, su metabolito y el ratio DOPAC/DA no presentaron diferencias significativas para la evaluación de los valores agrupados en las estructuras derecha, izquierda ni en ambas juntas.

<sup>4</sup> Estos valores sólo pudieron analizarse en la SN ya que en el CPu no fue posible contabilizar los valores de TH+.

Se realizó la comparación de parámetros por medio de la correlación entre izquierda y derecha como se muestra en la Tabla 4.3.1.1.1. El grupo HP+E tuvo alta correlación de la liberación de dopamina entre los hemisferios. La relación de liberación de dopamina y DOPAC fue muy fuerte y estadísticamente significativa para el grupo HP+E.

En el caso de HP ambas liberaciones exhibieron una muy débil correlación entre los hemisferios. Para los grupos C y E se vio que los valores de liberación de dopamina no alcanzaban a ser fuertes, pero tuvieron una tendencia a alcanzar magnitudes semejantes. Los grupos C y E en relación a DOPAC, mostraron una correlación fuerte y estadísticamente significativa.

Los resultados de la relación DOPAC/DA indicaron que en los animales a los que se les administró el neurotóxico presentaron un desequilibrio en la relación inter hemisférica. Para los animales del grupo HP+E esta disparidad fue menor que para HP, evidenciando un efecto de corrección por el tratamiento con 17β-estradiol.

	C	E	HP	HP+E
DA [pg/mg tejido]	0,306	0,459	0,167	0,846**
DOPAC [pg/mg tejido]	0,822**	0,909*	0,214	0,739*
DOPAC/DA	0,203	0,369	-0,511	-0,218

Tabla 4.3.1.1.1 **Correlación de las concentraciones de DA, DOPAC y DOPAC/DA entre el hemisferio izquierdo y derecho del SNpc de cada uno de los grupos de estudio. Resultados expresados como Media ±SEM. Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=6), HP+E (n=6). Estadística: Correlación de Pearson; \*p<0,05, \*\*p<0,01.**

En la Figura 4.3.1.1.1 se muestran los resultados de la correlación entre los hemisferios derecho (D) e izquierdo (I) para los valores de DOPAC/DA de todos los grupos experimentales.

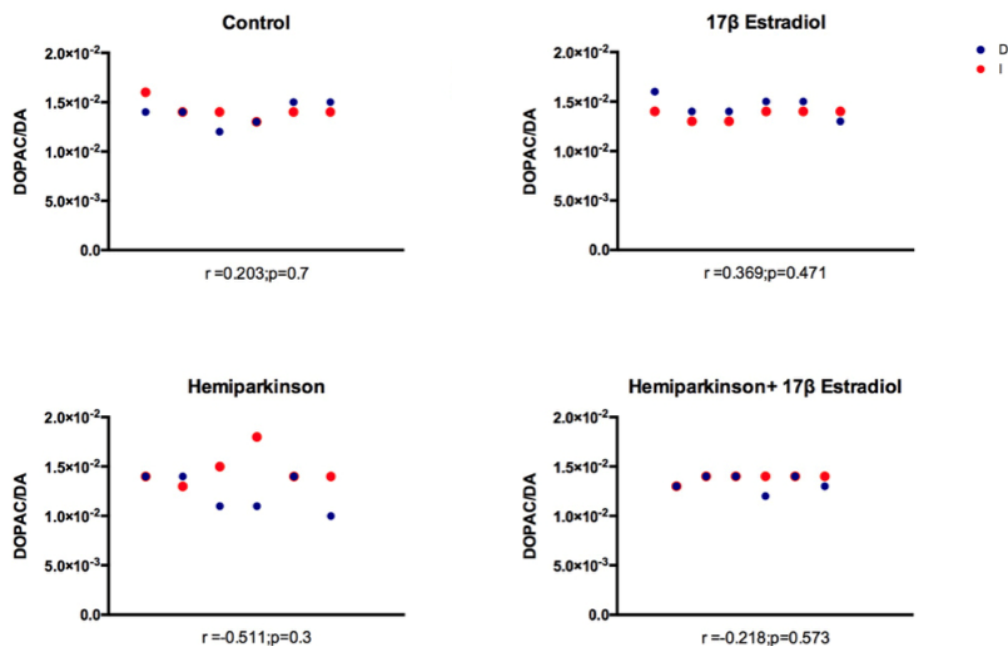


Figura 4.3.1.1.1 **Resultados de la correlación de las concentraciones de DOPAC/DA entre el hemisferio derecho (D) e izquierdo (I) de la SNpc de cada uno de los grupos de estudio. Grupo C (n=6), E (n=6), HP (n=6), HP+E (n=6). Estadística: Correlación de Pearson; \*p<0,05, \*\*p<0,01. El eje de las abscisas no presenta numeración porque corresponde a distintos animales en el grupo experimental correspondiente.**

Como se observa en la Figura 4.3.1.1.2, la dinámica de funcionalidad dopaminérgica en los animales HP presentó una notoria diferencia entre los hemisferios derecho (D) e izquierdo (I).

El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol tendió a normalizar esta diferencia, corrigiendo este desbalance e indicando el efecto neuroprotector.

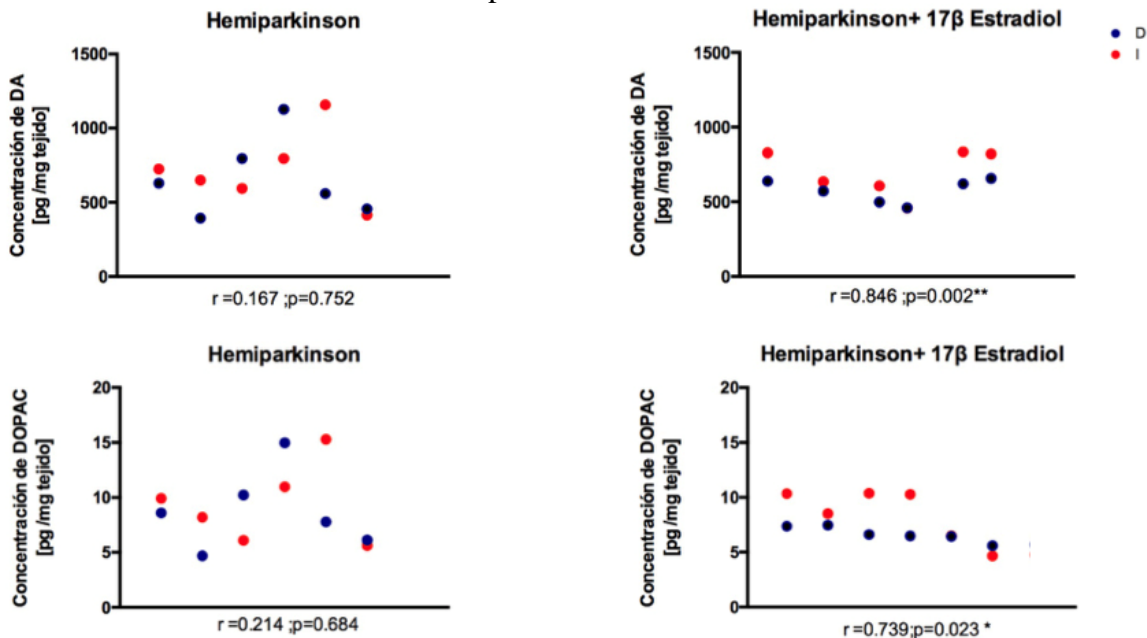


Figura 4.3.1.1.2. Resultados de la correlación de las concentraciones de DA, DOPAC entre el hemisferio derecho (D, en azul) e izquierdo (I, en rojo) de la SNpc del grupo HP (n=6) y HP+E (n=6). Estadística: Correlación de Pearson; \*p<0,05, \*\*p<0,01. El eje de las abscisas no presenta numeración porque corresponde a distintos animales en el grupo experimental correspondiente.

### 4.3.1.2. Cuerpo estriado

En las estructuras del CPu se estudió la funcionalidad dopaminérgica a través de los indicadores de liberación de DOPAC, dopamina y el ratio entre ambos.

Se evaluó la correlación entre los valores dopamina, DOPAC y del ratio DOPAC/DA entre los hemisferios para cada grupo experimental. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

	C	E	HP	HP+E
DA [pg/mg tejido]	0,537*	0,652	0,248	0,712****
DOPAC [pg/mg tejido]	0,883*	0,641	0,170	0,642**
DOPAC/DA	0,51*	0,63	0,61	0,88****

Tabla 4.3.1.2.1 Correlación de las concentraciones de DA, DOPAC y DOPAC/DA entre el hemisferio izquierdo y derecho del CPu de cada uno de los grupos de estudio. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=16), E (n=9), HP (n=12), HP+E (n=15). Estadística: Correlación de Pearson; \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*\*\*p<0,00001.

Como se muestra en la Figura 4.3.1.2.1, el aumento de los valores DOPAC/DA en los

animales HP mostró una caída de la funcionalidad del sistema dopaminérgico. La comparación de dopamina, su metabolito y el ratio DOPAC/DA no presentó diferencias significativas para la evaluación de los datos agrupados en el hemisferio derecho. Evidentemente, el desarreglo principal ocurrió en el hemisferio izquierdo, donde se produjo la lesión y liberación del neurotóxico.

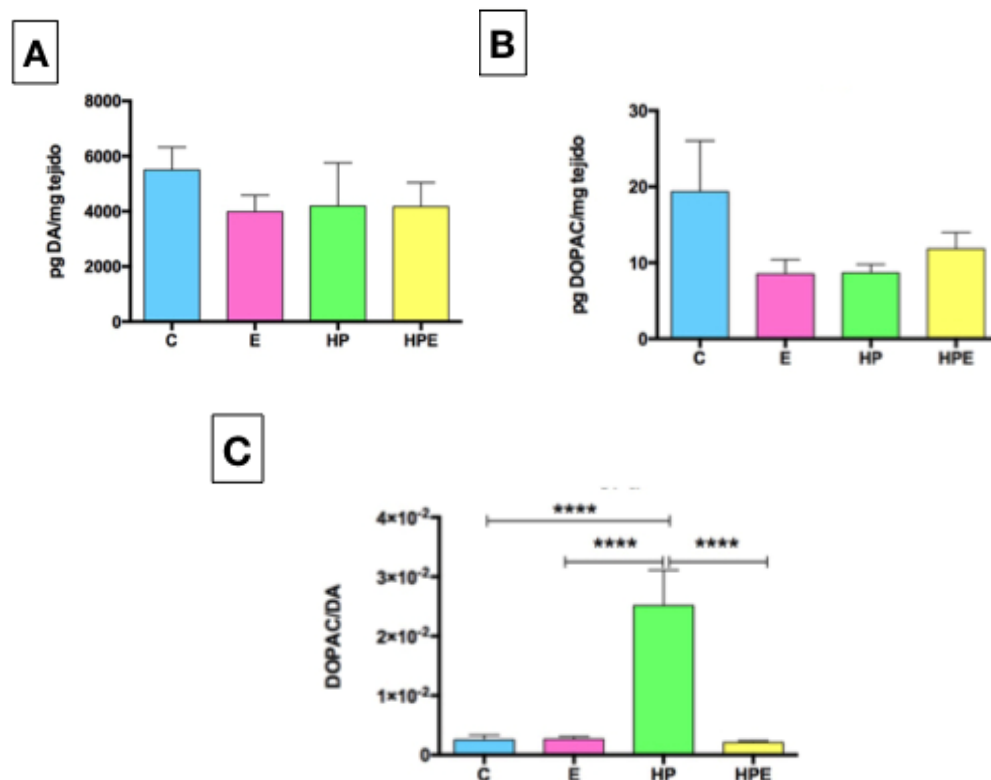


Figura 4.3.1.2.1 Evaluación de las concentraciones por HPLC en el CPu de todos los animales de estudio. A- Dopamina (DA), B- DOPAC y C- Relación DOPAC/DA. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo C (n=16), E (n=9), HP (n=12), HP+E (n=15). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*\*\*\*p<0,0001.

La figura muestra que los animales del grupo HP tenían la reactividad metabólica dopaminérgica disminuida en ambos hemisferios. A su vez, el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol generó, en los animales HP+E, que la concentración de DA alcanzara valores semejantes en los hemisferios, normalizando la funcionalidad dopaminérgica.

Mientras que los valores de correlación del grupo C, E y HP+E fueron fuertes, los del grupo HP fueron muy bajos. Este hecho demostró que el desorden y la disparidad de los metabolitos en los hemisferios se corrigió con el tratamiento. Gráficamente se presentan estas correlaciones para DOPAC/DA en la Figura 4.3.1.2.2.

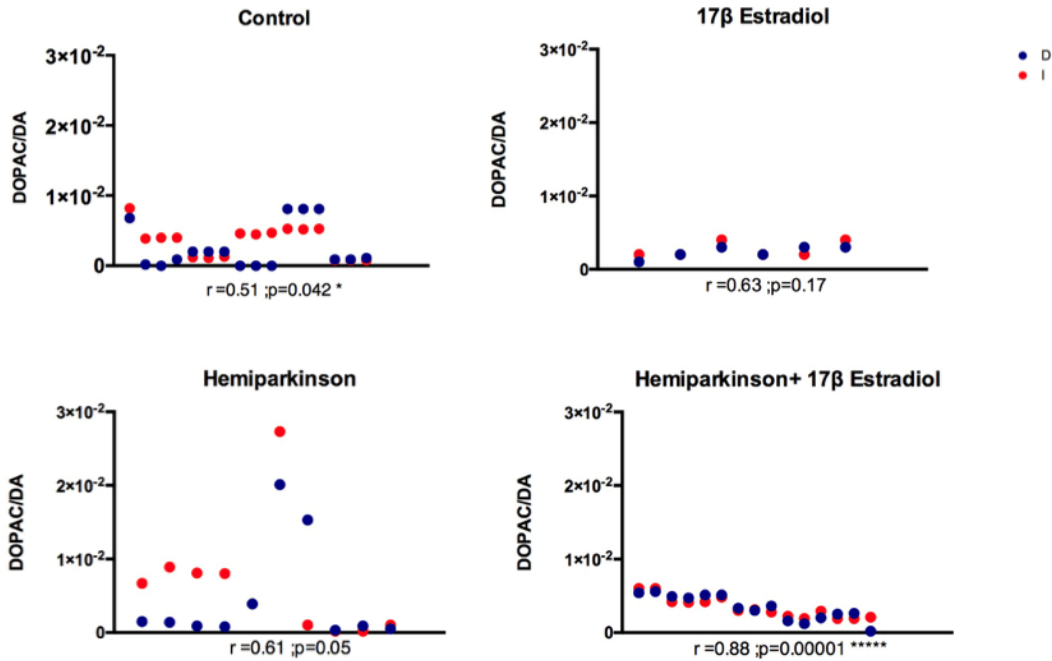


Figura 4.3.1.2.2 Evaluación de las concentraciones por HPLC en el CPu de todos los animales de estudio. Relación DOPAC/DA. El hemisferio derecho se indica como en azul como (D) y el izquierdo en rojo como (I). Resultados expresados como Media  $\pm$  SEM. Grupo C (n=16), E (n=9), HP (n=12), HP+E (n=15). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*\*\* $p < 0,0001$ . El eje de las abscisas no presenta numeración porque corresponde a distintos animales en el grupo experimental correspondiente.

## 4.4. Cultivos primarios de células gliales

### 4.4.1. Astrocitos

En la Figura 4.5.1.1 se muestran los resultados efecto del tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol (e) sobre la expresión de los receptores de dopamina D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> en cultivos primarios de células gliales de ratas neonatales machos (m) y hembras (h).

Los valores del grupo macho control (mc) resultaron ser estadísticamente mayores que para el resto de los grupos experimentales. El grupo me el tratamiento disminuyó la expresión de los receptores a valores similares a los de las hembras. En cambio, no se observó ningún efecto significativo del 17 $\beta$ -estradiol en hembras.



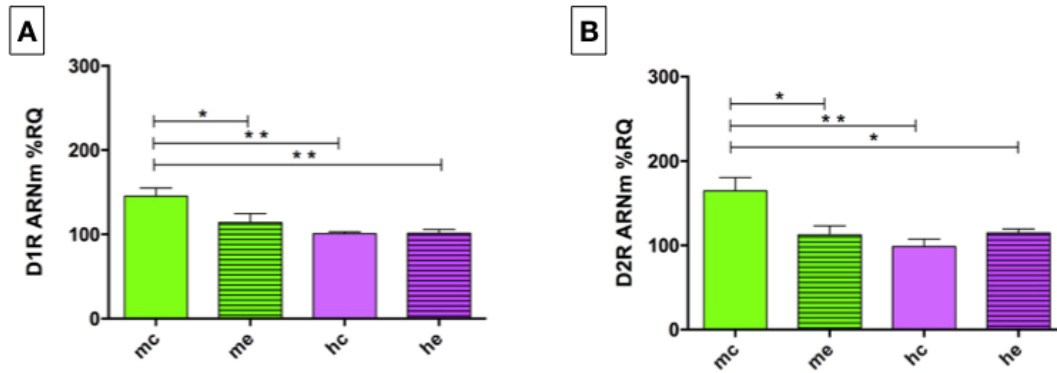


Figura 4.4.1.1 Resultados de la expresión de receptores de dopamina en cultivo primario de astrocitos. A- Receptor D<sub>1</sub> y B- receptor D<sub>2</sub>. Resultados expresados como Media ±SEM. Grupo mc (n=5), me (n=5), hc (n=5), he (n=5). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \* p<0,05; \*\*p<0,01.

La evaluación del transportador de dopamina (DAT) en cultivo primario de astrocitos de rata no arrojó ningún resultado. Las lecturas de la amplificación tanto como las de la curva de *melting* resultaron inconclusas para este primer.

#### 4.4.2. Microglia

En este apartado se muestran los resultados de la acción del 17β-estradiol sobre la expresión de marcadores indicativos de inflamación en cultivo primario de microglia de ratas neonatales machos (m) y hembras (h). La Figura 4.5.2.1 exhibe la expresión de los marcadores de inflamación.



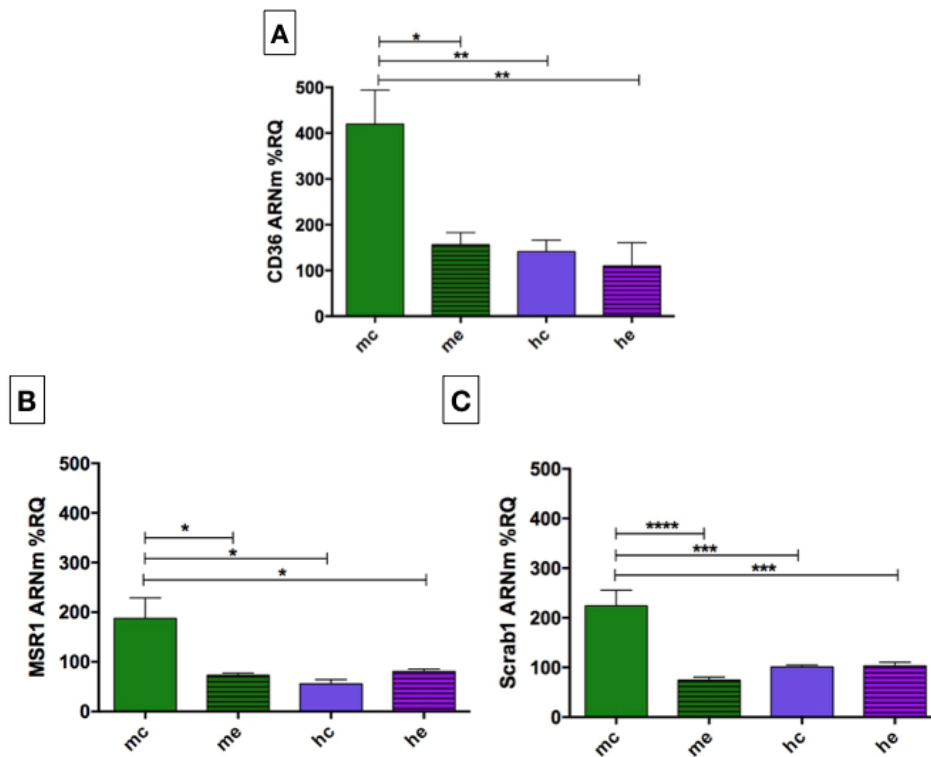


Figura 4.4.2.1 Resultados de la expresión de receptores pro inflamatorios en cultivo primario de microglia. A- CD36, B- MSR1, C- Scrab1. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo mc (n=5), me (n=5), hc (n=5), he (n=5). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Para los marcadores estudiados, los resultados arrojaron diferencias significativas entre los sexos en relación al tratamiento.

Las células de la microglia de los animales macho control expresaron en mayor medida los marcadores pro inflamatorios, pero no así los cultivos de machos que recibieron el tratamiento. Este grupo (me) obtuvo valores similares a los de las hembras dados por el efecto del tratamiento con  $17\beta$ -estradiol. En cambio, no se observó efecto del estradiol en los cultivos de hembras.

En la figura 4.5.2.2 se muestra la expresión de los marcadores antiinflamatorios para cada grupo experimental.

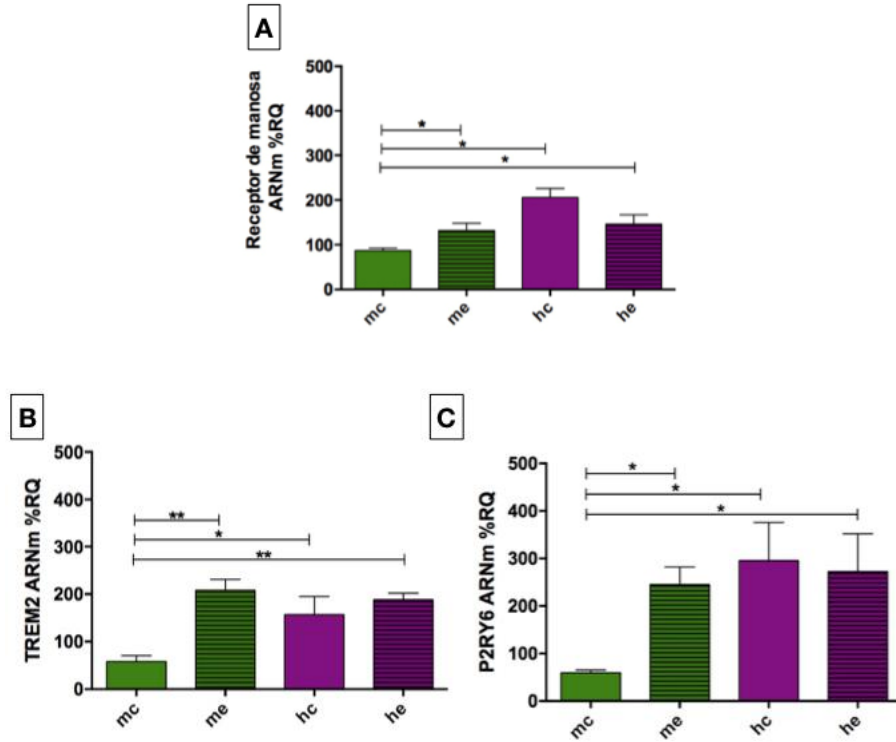


Figura 4.5.2.2 Resultados de la expresión de receptores anti inflamatorios en cultivo primario de microglia. A-TREM2, B- Mannose receptor, C-P2RY6. Resultados expresados como Media  $\pm$ SEM. Grupo mc (n=5), me (n=5), hc (n=5), he (n=5). Estadística: Anova de 1 vía, Tukey post hoc test para Mannose Receptor y TREM2, Kruskal Wallis con Dunn post hoc test para P2RY6; \*  $p < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Dado que los marcadores seleccionados están relacionados con mecanismos microgliales que regulan la fagocitosis, en base a los resultados se observó que las células de la microglia de los animales macho control expresaron en menor medida los marcadores antiinflamatorios. Esta situación es opuesta a los resultados obtenidos en el apartado anterior. El tratamiento con  $17\beta$ -estradiol en machos (me) aumentó los valores a niveles similares a los de las hembras, que en este estudio fueron estadísticamente superiores a la expresión de marcadores en mc. Nuevamente, el tratamiento no tuvo efecto en las hembras.

## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis doctoral hemos utilizado un modelo animal de hemiparkinsonismo en ratas macho, generado por la administración intraestriatal del neurotóxico 6-OHDA, y posteriormente un tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol para investigar sus efectos neuroprotectores en la funcionalidad de la vía dopaminérgica nigroestriatal.

En 1968 se estableció que la inyección de 6-OHDA en la vía nigroestriatal de las ratas generaba la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el SNpc, acompañada de una marcada lateralidad postural y una conducta rotatoria asimétrica hacia el lado de la lesión (Ungerstedt, 1968). Desde entonces, esta neurotoxina ha sido el modelo de EP más utilizado en roedores, en gran parte gracias a su sencilla automatización y reproducibilidad, como también a que puede modularse por la variación en la dosis inyectada (Lindgren y cols., 2012).

La dosis del neurotóxico administrado en CPu, permite evaluar la enfermedad en diferentes etapas según la degeneración de la vía nigroestriatal y la disminución de niveles de DA. Es sabido que cuando se pierde aproximadamente el 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SN y el agotamiento de DA estriatal ha disminuido en un 80% la disfunción motora comienza a hacerse evidente (Kirik y cols., 1998; Deumens y cols., 2002; Lindgren y cols., 2012). Dado que uno de nuestros objetivos fue el estudio del comportamiento motor y locomotor en los animales, se seleccionó una dosis de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de 6-OHDA, la cual nos permitió estudiar el comienzo de los síntomas de la EP y las respuestas comportamentales compensatorias a la lesión luego de la administración del tratamiento de 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2 = 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , durante diez días).

Se ha demostrado que el estrógeno puede afectar la presentación clínica de las mujeres con EP. Por lo general, la literatura más antigua de este campo señala al estrógeno como un agente anti dopaminérgico o de limitada eficacia en el tratamiento de disquinesias (Koller y cols., 1982; Quinn & Marsden, 1986). Sin embargo, existen informes más recientes que señalan que el estrógeno mejora los síntomas motores de la EP incluso después de solo 8 semanas de tratamiento. En general, estas investigaciones sugieren que las mujeres (especialmente las jóvenes en edad fértil) tienen un número inicial más alto de neuronas dopaminérgicas (Tsang y cols., 2000). Esto resulta relevante para la EP, ya que en la que la pérdida de neuronas lleva gradualmente a síntomas clínicos sólo después de una pérdida del 80% de neuronas DA. Si las mujeres tienen una mayor reserva de neuronas dopaminérgicas, esto puede explicar por qué desarrollan síntomas clínicos más tarde que los hombres (Smith & Dahodwala, 2014). Otros estudios, sugieren que las diferencias sexuales regulan genes implicados en la homeostasis celular y la función mitocondrial, aumentándolos en los hombres en comparación con las mujeres, y que estas diferencias se traducen en una tasa metabólica más alta que acelera el envejecimiento y la muerte celular en los hombres (Simunovic y cols., 2010).

Existe una amplia evidencia de que el estrógeno previene la depleción neuronal dopaminérgica inducida por neurotoxinas en modelos animales de EP, y que explican su efecto neuroprotector (Shulman & Bhat, 2003; Smith & Dahodwala, 2014). Los efectos neuroprotectores se han mostrado más consistentemente para el 17 $\beta$ -estradiol. Este estereoisómero tiene mayor afinidad por el receptor de estrógeno, lo que sugiere que los efectos neuroprotectores son mediados por este mecanismo (Kuiper & Gustafsson, 1997).

En nuestros experimentos, la dosis de  $17\beta$ -estradiol de  $0,1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  administrada durante 10 días se encuentra dentro de los rangos fisiológicos de un ciclo estral regular compatible con los niveles ascendentes en el proestro temprano en ratas hembras (Caligaris y cols., 1972; Schiaffini y cols., 1974). La selección de una dosis adecuada es de suma importancia a la hora de examinar la seguridad y tolerancia de los estrógenos como posibles herramientas farmacológicas para mejorar los síntomas motores neurodegenerativos (POETRY, 2011). En cuanto al tiempo de administración, Smith y colaboradores realizaron un estudio en el que los animales fueron tratados con compuestos de estrógeno en diferentes momentos, incluyendo antes, simultáneamente y después del tratamiento con toxinas. Sus resultados demostraron que el tratamiento debe preceder a la administración de toxinas para observar un efecto neuroprotector (Smith & Dahodwala, 2014). Si bien esta investigación contrasta con nuestros resultados, coincidimos con ellos en que el tratamiento después del daño neurotóxico no puede revertir la lesión, por lo que su efecto es neuroprotector y no neuroreparador.

Para confirmar que la administración de 6-OHDA en cuerpo estriado desencadena los síntomas motores característicos de la enfermedad, desarrollamos una batería de test comportamentales tanto espontáneos como inducidos farmacológicamente realizados en diferentes etapas. Los resultados revelaron que los signos motores de neurodegeneración propios de la EP pueden estar influenciados por la administración del  $17\beta$ -estradiol. La evaluación del comportamiento es una herramienta poderosa para los modelos animales in vivo. Por citar algunas ventajas, permite establecer criterios de inclusión/exclusión, demostrar la eficacia de los tratamientos, identificar influencias sedantes, estimulantes o tóxicas de diferentes sustancias, entre otras. Sin embargo, los efectos del experimentador son responsables de una proporción significativa en la investigación del comportamiento. El operador requiere paciencia, experiencia y habilidades de manipulación y sujeción animal. Aunque es un desempeño potencialmente estresante para el animal, estandarizar las condiciones de la prueba en la medida de lo posible en el ambiente, el manejo, el entrenamiento y la prueba en sí misma es la manera de adquirir resultados consistentes (Bonaccorso Marinelli y cols., 2017).

El estudio del campo abierto demostró que, con la administración de los agonistas dopaminérgicos (Anf y Apo) e incluso sin ninguna inducción farmacológica existen diferencias en la respuesta de los roedores de los diferentes grupos al encontrarse con una situación novedosa. Durante tres períodos distintos, se evaluó la exploración, locomoción de los animales y la actividad no ambulatoria y se observó que la administración unilateral estriatal de 6-OHDA produce déficits en las actividades motoras observadas y que los animales lesionados que no recibieron tratamiento con  $17\beta$ -estradiol (HP) tuvieron menores episodios y tiempos de desplazamiento que, tras cada evaluación, se tornan más robustos y evidentes. En un modelo de hemiparkinsonismo evaluado anteriormente en nuestro laboratorio (Casas y cols., 2013) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio (lesionados con 6-OHDA, controles y lesionados tratados con P4). Estimamos que la diferencia principal con estos resultados radica en el programa utilizado para medir el comportamiento, debido a que ellos trabajaron con Etholog (Ottoni, 2000), donde los parámetros medidos fueron limitados (en cantidad y precisión) en comparación con nuestra forma de evaluar.

Los resultados obtenidos con OFT fueron coincidentes a los que observamos en comportamiento rotacional con RT. Es sabido que, en el comportamiento rotacional, la magnitud de la rotación es proporcional a la degeneración del sistema dopaminérgico, por lo

que es utilizado como un indicador del grado de lesión. La literatura es contradictoria en cuanto a la cantidad de vueltas que se corresponden con déficits dopaminérgicos estriatales superiores. Algunos autores indican que un número mayor o igual a 200 vueltas por hora, en roedores, se corresponde con una depleción mayor del 90% de la DA estriatal (Hudson y cols., 1993; Barnéoud y cols., 1995); mientras que otros autores evidencian una pérdida cercana al 80% dada por una cantidad de 100 vueltas por hora aproximadamente (Da Cunha y cols., 2008; Casas y cols., 2013). Da Cunha y cols. observaron que los animales con pérdida de DA parcial en el cerebro medio giraban en dirección ipsilateral a lesión y aquellos que perdieron casi todas las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio presentaron comportamiento de giro contralateral. Al igual que en nuestros resultados, tanto con Anf como con Apo, es posible ver que los animales manifiestan una marcada lateralidad en las vueltas y que esta magnitud es diferencial para HP en comparación con los demás grupos de estudio. El grado de lesión y el grupo experimental de los animales influye sobre la cantidad de vueltas que se realizan; pero también observamos cómo estas condiciones afectan al tiempo de giro en relación a la duración máxima y duración total de las vueltas. Por lo que consideramos que, también hay que analizar comparativamente estos parámetros en relación a la cantidad de vueltas y al tiempo, para hablar de lateralidad.

Para medir la actividad motora de nado (FST) y la acinesia del miembro anterior (ST) desarrollamos e implementamos softwares. El uso de automatizaciones elimina variables subjetivas a la hora de realizar las pruebas y permite adaptarlas a otros estudios comportamentales (Bonaccorso Marinelli y cols., 2017). Si cambiamos algunos ajustes de dimensiones y zonas que caracterizan al tanque del FST, podemos convertirlo en un laberinto diferente donde en cada zona se pueda detectar la actividad, el tiempo de permanencia y la velocidad. Con este enfoque, podemos extender el uso del programa a otras pruebas comportamentales que evalúen aprendizaje, memoria y parámetros asociados con signos no motores. El ST automatizado es una herramienta válida para implementar en otros modelos animales que presenten déficits motores tales como temblores, bradicinesia y rigidez muscular. Los dos softwares están diseñados para detectar y medir parámetros de comportamiento imposibles de evaluar con el registro manual por observación directa (principalmente aquellos relacionados con tiempos) con precisión y durante períodos de tiempo variables. Gracias al aumento en cantidad y calidad de los parámetros, se obtuvo una mejor perspectiva de cómo funciona el sistema nigroestriatal en condiciones normales, patológicas y del resultado de la aplicación del tratamiento. Ambos desarrollos se han logrado mediante el uso de código abierto y están disponibles gratuitamente para la comunidad académica y de investigación.

En el FST, el algoritmo de detección demostró una buena tolerancia para detectar y medir parámetros motores de natación, y se observó que la 6-OHDA indujo marcados déficits en los patrones de natación. Hubieron varias diferencias en las entradas a las zonas y en el tiempo que los animales pasaban en ellas en función de la condición experimental (Nieto y cols., 2020). Los animales del grupo C exhibieron un patrón de nado delimitado, donde la mayor parte del tiempo flotaron y se sumergieron. En contraste, los animales HP realizaron patrones aleatorios, con aumento del buceo y el salto. Estas observaciones sugieren que los animales HP, además de los déficits motores, están teniendo un comportamiento tipo depresivo (Porsolt y cols., 1978,1997) similar al que han reportado otros investigadores (Branchi y cols., 2008; Tadaiesky y cols., 2008), el cual se ve mejorado con el tratamiento de 17 $\beta$ -estradiol. Dicha mejoría se hace evidente en la mayoría de los parámetros de movilidad evaluados; lo cual nos hace considerar efectos del 17 $\beta$ -estradiol como

antidepresivo. Los esteroides neuroactivos presentan efectos antidepresivos que disminuyen conductas anhedónicas y que los estrógenos pueden requerir progestágenos y/o andrógenos para producir resultados positivos en el estado de ánimo, la ansiedad y la depresión a lo largo de la vida (Frye, 2009; Casas y cols., 2011), nuestros resultados alientan a la realización de estudios futuros tanto en el campo de la depresión y la neuroprotección también como el uso del desarrollo informático para la evaluación de manifestaciones no motoras como estados depresivos o de ansiedad.

El ST, nos permitió analizar déficits en las extremidades anteriores de los animales, y realizar analogías de los resultados con la acinesia de extremidades y problemas de locomoción que se presentan la EP humana (Olsson y cols., 1995; Winkler cols., 2002). Tal como reporta el trabajo de Olsson, la lesión con 6-OHDA indujo déficits marcados y de larga duración en el uso del miembro anterior contralateral al lado de lesión (Olsson y cols., 1995), mientras que los cambios en el lado ipsilateral fueron más sutiles. Los animales del grupo HP mostraron acinesia, bradicinesia e hipocinesia es decir, ausencia o enlentecimiento y disminución progresiva de movimientos (Schallert y cols., 1992) y, bajo la acción de Apo las deficiencias se incrementaron. Estas evidencias sugieren que las neuronas dopaminérgicas de la SN están desreguladas debido a la lesión neurotóxica (Blume y cols., 2009; Bonaccorso Marinelli y cols., 2018). Sumado a esto, el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol demostró efectos beneficiosos en la movilidad del miembro anterior, restaurando el equilibrio, la velocidad y también disminuyendo la bradicinesia en un estadio avanzado de la enfermedad (Bonaccorso Marinelli, y cols., 2017). El hecho de que los animales HP+E mantuviesen altas magnitudes de movimiento (longitud de pasos) y que los animales HP mostrasen un promedio de potencia más bajo o hipolocomoción, también podría ser interpretado como otro mecanismo de compensación.

Basados en el conjunto de estas observaciones, podemos evidenciar el efecto neuroprotector del  $17\beta$ -estradiol sobre la progresión de la lesión. La inducción de hemiparkinsonismo por 6-OHDA conforme transcurrieron las semanas, ocasionó un deterioro de la actividad locomotora y exploratoria (Campos y cols., 2013). Los parámetros motores evaluados con los diversos test, disminuyeron en los animales que recibieron  $17\beta$ -estradiol; sugiriendo un rol neuroprotector del esteroide neuroactivo en este modelo *in vivo* de la EP.

Gran cantidad de estudios realizan comparaciones entre los resultados de los test comportamentales y la pérdida de la cantidad de neuronas TH+ o de DA en la vía dopaminérgica nigroestriatal (Przedborski y cols., 1995; Barnéoud y cols., 1995; Henderson y cols., 2003; Fang y cols., 2006). Por tanto, teniendo en cuenta la información disponible sobre los diferentes efectos neuroprotectores de los neuroesteroides en enfermedades neurodegenerativas, hemos investigado los efectos del  $17\beta$ -estradiol en la EP a nivel celular en relación a la síntesis y el metabolismo de DA.

Primeramente, nos focalizamos en la síntesis de DA y estudiamos como la expresión de TH se modificaba en la vía dopaminérgica. Para esto, ideamos un desarrollo de software con el fin de analizar y cuantificar automáticamente la cantidad de neuronas dopaminérgicas TH+ en el SN después de una lesión neurotóxica. También, como en los desarrollos anteriores, implementamos la cuantificación de parámetros, aumentando la cantidad y calidad de los resultados obtenidos.

Los parámetros primarios comúnmente utilizados para este tipo de método de inmunotinción, describen el daño neurotóxico mediante la estimación del número total de neuronas en ambos hemisferios de diferentes grupos experimentales (Ohira, 2019; Soaje y cols., 2006). Nosotros elegimos calcular otros parámetros como el área marcada, el tamaño de la lesión, la regresión

lineal y los coeficientes de error, de varianza y biológico para aumentar la información, ampliar el espectro de conocimientos sobre la respuesta de los tejidos y, al mismo tiempo, mejorar el desarrollo y funcionamiento de los métodos de muestreo.

Un desafío considerable fue evaluar la proveniencia de variabilidad. Afortunadamente, la estimación legítima que la varianza de las muestras fue biológica. Este parámetro debe ser examinado cuidadosamente y al comienzo de las evaluaciones, porque si hubiera indicado lo contrario, la fuente de la varianza sería el error de muestreo y el método completo debería haber sido reformulado desde el principio.

Coelho y cols. han informado el procesamiento de imagen necesario para analizar los datos todavía depende en gran medida del trabajo manual. Estos autores consideran que la optimización de parámetros para las propiedades de una colección de imágenes dada es una carga aceptable para el operador humano, mientras que realizarlo para imágenes individuales no lo es (Coelho y cols., 2009). En las etapas de pre procesamiento de nuestro algoritmo, los mismos filtros se aplican indistintamente para cualquier imagen. Esta generalización excluye el juicio humano a las ambigüedades que surgen debido a los ajustes subjetivos sobre las imágenes. Además, los resultados se normalizan mediante el cálculo de parámetros promedio, cubriendo la necesidad de que los cambios afecten a todas las muestras por igual. Una ventaja de este enfoque es que la sobreestimación o los errores que faltan afectan a todas las muestras en el mismo grado.

Como otros métodos automatizados que detectan estructuras (Gundersen & Jensen, 1987; Narro y cols., 2007; Kaynig y cols., 2010) el menú trabaja lo suficientemente rápido, tiene robustez, consistencia y buen desempeño para contar y etiquetar neuronas. Al igual que en los demás softwares de nuestra autoría (Bonaccorso Marinelli y cols., 2017, 2018; Nieto y cols., 2020), esta técnica automatizada está desarrollada con software libre y puede ser compartida con los usuarios a través de un sistema de actualización integrado (Longair y cols., 2012). Aunque la comparación entre los métodos (validación presentada en los resultados) es fiable; a futuro se deben hacer comparaciones adicionales para distinguir entre nuestro desarrollo y otros algoritmos automatizados (Ong y cols., 2017; Ayala y cols., 2019). Es importante señalar que el desarrollo está a disposición del público y, con modificaciones, puede aplicarse para ampliar el alcance y la utilidad de otras estrategias de etiquetado. En futuras adaptaciones del software, se debe prestar especial atención al hecho de que las estructuras a menudo sólo son reconocibles por su textura en su contexto local (Coelho y cols., 2009). Para superar este problema, será necesario contar con datos a mayor escala para aplicar este algoritmo. Para generalizarlo, se podrán incorporar diferentes patrones de agrupación, tamaños y tipos considerando adaptarlo a técnicas como cultivo celular y otros protocolos de tinción.

Este desarrollo se suma como una herramienta más para estimar los efectos del  $17\beta$ -estradiol en neuronas TH+ de la SN. Los resultados obtenidos, concuerdan con lo esperable: la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado izquierdo deterioró las fibras inmunorreactivas a TH en CPu y esta disminución se vio acompañada por la pérdida de neuronas en la SN (Deumens y cols., 2002). La topografía de estas microfotografías de los animales hemiparkinsonianos reprodujo los patrones de denervación típicos de la EP (Winkler y cols., 2002); y hasta ocurrió que algunos animales, la pérdida en SN fue tal que llegó al punto donde la marcación se consideró ausente (Henderson y cols., 2003). Además, pudimos observar cómo el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol mejoró los indicadores de lesión en relación con la síntesis de DA. Estos resultados evidencian que las deficiencias comportamentales observadas fueron consistentes (Deumens y cols., 2002; Henderson y cols., 2003; Warraich

y cols., 2009) y sugieren que el  $17\beta$ -estradiol está actuando a nivel de las neuronas en relación a la síntesis de DA mejorando las anomalías que se presentan en los animales lesionados.

Por ello, basados en estos resultados, indagamos en la actividad metabólica de la vía dopaminérgica nigroestriatal. La literatura indica que en un modelo en el que hay pérdida de neuronas dopaminérgicas, debería haber una disminución en la actividad metabólica del cuerpo estriado (García y cols., 2012). Ya que no habíamos podido cuantificar la pérdida de DA en el cuerpo estriado, empleando la técnica de HPLC, observamos que la inyección de 6-OHDA en el CPu izquierdo redujo los niveles del neurotransmisor de dopamina (Dauer & Przedborski, 2003), corroborando la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la estructura lesionada. Además, pudimos estimar que la liberación de DA estaba cercana al 80% de agotamiento para el grupo HP. Cuando los niveles de agotamiento de DA son tan altos, los mecanismos compensatorios se tornan inadecuados o insuficientes, ocasionando que se manifiesten las deficiencias motoras (Deumens y cols., 2002) que evidenciamos en los estudios de comportamiento. Los resultados indican que, en el caso de los animales HP+E, se activan procesos celulares capaces de balancear ese agotamiento. Los porcentajes de liberación fueron revertidos hasta el nivel del grupo C por medio de la administración con  $17\beta$ -estradiol; datos que refuerzan aún más el posible efecto neuroprotector de las hormonas esteroidales (Dluzen, 2000; Schulman, 2002).

Los mecanismos compensatorios son complejos y no se comprenden completamente, pero es probable que impliquen adaptaciones dentro de las células dopaminérgicas supervivientes, como el aumento de la síntesis, el metabolismo y la liberación de DA, para compensar la pérdida celular; en particular se menciona en la literatura un aumento de la liberación en los terminales neuronales dopaminérgicos, así como cambios expresión y supersensibilización en los receptores de DA (Gillies y cols., 2014).

Debido a que no encontramos diferencias significativas en relación a la liberación de DA en la SNpc, estimamos que la mayor actividad metabólica está ocurriendo en el CPu. Es sabido que la degeneración del 85% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc es el evento fisiopatológico inicial para la aparición de las manifestaciones motoras de la EP (Gerlach & Riederer, 1996). Sin embargo, las neuronas remanentes, compensan la función de las neuronas perdidas. Una vez superado este porcentaje de muerte neuronal, la disponibilidad de DA estriatal es tan baja que el sistema se torna incompetente de realizar sus funciones regulatorias. Es a partir de este momento, en el que aparecen mecanismos de plasticidad cerebral que se activan con la finalidad de mantener la homeostasis del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Entre ellos se encuentran mecanismos en la astrogliá modulados por  $17\beta$ -estradiol en respuesta a la injuria (Morale y cols., 2006), la desregulación del sistema glutamatérgico corticoestriatal y del sistema GABAérgico estriatal, un aumento de la expresión de los receptores estriatales dopaminérgicos (Peinado y cols., 2004). Estas evidencias, nos llevaron a estudiar el rol del  $17\beta$ -estradiol en la actividad de células gliales; particularmente estudiamos la presencia de astrocitos en SN y CPu; así como la expresión de sus receptores dopaminérgicos en cultivo primario.

Los astrocitos desempeñan un papel crítico y cooperativo en el mantenimiento de la neurotransmisión y la homeostasis del SNC, así como en el aumento de las respuestas inmunitarias innatas destinadas a proteger el cerebro contra insultos como la neurodegeneración (Klegeris y cols., 2007; Halassa & Haydon, 2010). Estas células han sido estudiadas extensamente en las neuronas diencefálicas y límbicas del sistema nervioso y en



menor medida en las neuronas de la corteza, CPu y cuerpo calloso (Brocca & García Segura, 2018).

En relación al tratamiento con  $17\beta$ -estradiol, los datos disponibles son contradictorios, con pruebas de efectos protectores y perjudiciales, dependiendo del tipo de lesión, entre otros factores (Arévalo y cols., 2013). La protección, reparación y el mantenimiento de la homeostasis están estrechamente vinculados a la acción de la enzima P450arom y la acción de esta enzima está regulada por dopamina y glutamato (Azcoitia y cols., 2010, 2011; Brocca & García Segura, 2018). En condiciones patológicas, P450arom aumenta su actividad y expresión génica incrementando los niveles de  $17\beta$ -estradiol (Brocca & García Segura, 2018). El  $17\beta$ -estradiol liberado por los astrocitos actúa como un factor trófico para las neuronas dañadas y puede participar en mecanismos restauradores compensatorios del tejido nervioso lesionado (García Segura y cols., 1999). En particular los astrocitos son capaces de sintetizar  $17\beta$ -estradiol produciendo cambios en la morfología, número, inmunoreactividad y proliferación de las células GFAP+ en respuesta a la lesión (Morale y cols., 2006).

Nuestros resultados coinciden con los observados por otros grupos de investigación quienes describen que, en respuesta a la reactividad, la población de astrocitos, adquiere una configuración estrellada y que tiene el citoplasma hipertrofiado presentando una configuración llamada *end feet* porque se ubican en la superficie de los capilares (García Segura y cols., 1999, Sofroniew, 2015). Además, indican que, si bien la mayor cantidad de células se ubica cercana al sitio de lesión, algunas de ellas están en regiones alejadas y hasta han migrado al hemisferio contralateral (García Segura y cols., 1999, Zhan y cols., 2017). El análisis microscópico mostró una localización de las células GFAP+ cercanas al borde de las estructuras y destaca el hecho de que los animales HP presentaron más ramificaciones y el mayor tamaño del citoplasma que en comparación con los demás grupos. Otra observación importante fue la evidencia de la cicatriz glial (Sofroniew, 2015) en el tejido del CPu para los animales lesionados con 6-OHDA y su mejoría en tamaño para los animales del grupo HP+E.

Tanto en SN como en CPu, la injuria con 6-OHDA ocasionó un marcado aumento de la población astrocitaria en los animales hemiparkinsonianos y tratamiento con  $17\beta$ -estradiol disminuyó significativamente el ratio. La administración sistémica de  $17\beta$ -estradiol alcanza la BHE y, en las estructuras, aminora el tamaño de la lesión. En consecuencia, disminuye la neurodegeneración. Posiblemente este resultado ocurre por la inhibición de las vías de señalización apoptóticas (Brocca & García Segura, 2018).

Resultados de otros grupos de investigación indican que respuesta a la lesión, la expresión de la aromatasas se induce *de novo* en los astrocitos, permitiendo que niveles relativamente altos de estradiol sean sintetizados localmente y ejerzan una variedad de efectos protectores sobre las neuronas vulnerables (Azcoitia y cols., 2010). Aunque esta respuesta ocurre tanto en hombres como en mujeres, la evidencia reciente sugiere que ocurre más rápida y vigorosamente en las mujeres (Liu y cols., 2007; Mirzaton y cols., 2010), sugiriendo además un mecanismo que podría explicar el menor tamaño de la lesión y la recuperación más rápida en las mujeres, lo que caracteriza a muchos tipos de lesiones cerebrales, incluida la EP.

Pudimos observar que los animales lesionados presentaban conjuntamente una pérdida de neuronas dopaminérgicas y un aumento de la reactividad astrocitaria en la vía nigroestriatal. Esto nos dio el pie para pensar en vincular ambos datos resultantes de las inmunohistoquímicas y establecer qué tipo de relación de dependencia tenían entre ellos. Indagamos acerca de la relación entre las células TH+ y GFAP+; conforme a la condición experimental de cada grupo de estudio. La función sigmoidal resultante es no lineal y se

caracteriza por presentar valores asintóticos a los ejes cartesianos. Observamos que la mayor parte de los datos de los grupos experimentales se ubica en los estados transicionales de la curva, lo cual nos permite tener modelos matemáticos para la toma de decisiones en base a estas dos variables conjuntas; nos hacen pensar que la pérdida de neuronas TH+ no fue total (por más grande que fuese el grado de lesión) y que los valores de GFAP+ no superaron un máximo (aunque tendieron a la más alta reactividad, no hubo generación de nuevos astrocitos). La evidencia sugiere que las células seguramente responden a fenómenos plásticos compensatorios que actúan bidireccionalmente por interacciones neurona-glia; y que el tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol está promoviendo la supervivencia celular, la recuperación y la reparación (Morale y cols., 2006).

En general, la evidencia disponible apoya la opinión de que los astrocitos son objetivos importantes para los estrógenos circulantes, lo que podría contribuir a las diferencias de sexo en la EP. Aunque las implicaciones funcionales requieren mayor estudio, los datos sugieren que en los machos los astrocitos pueden generar una mayor respuesta neuroinflamatoria potencialmente dañina, mientras que en las hembras los astrocitos contribuyen a compensar y promover la supervivencia (Gilles, 2014).

Las evidencias actuales proporcionan un apoyo mínimo para las diferencias sexuales en la expresión de los RE en la vía dopaminérgica nigroestriatal. Estudios informaron que ERb estaba ausente la SNpc de machos (Shughrue, 2004), pero débilmente expresado en el SNpc hembra (Mitra y cols., 2003; Merchenthaler y cols., 2004); y que el CPu parecía no expresar ERb (Shughrue, 2004). Además, no se encontró ERa en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y su expresión en el CPu es baja, aunque posiblemente más alta en hembras que en machos (Rodríguez-Navarro y cols., 2008). Estos resultados apoyan la información de que los estrógenos pueden actuar indirectamente o a través de mecanismos independientes de los receptores nucleares de estrógenos para influir en las neuronas dopaminérgicas (Gillies y cols., 2014). En relación a esto último, nuestros resultados indican que el 17 $\beta$ -estradiol modificó la expresión de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> de astrocitos en cultivo primario, por lo que estimamos que su actividad está siendo independiente de la unión a ligandos (Vrtačnik y cols., 2014). Observamos que el neurotransmisor DA también afecta a los astrocitos y que la transducción de señales mediada por estos receptores dopaminérgicos ocurre también en estas células (Miyazaki y cols., 2004). Por lo que podemos indicar, que el tratamiento (al modular la expresión de los receptores) está influyendo en la síntesis, liberación y metabolismo de la dopamina (García Segura y cols., 2001).

En relación a los polimorfismos en los genes asociados con el 17 $\beta$ -estradiol y la EP, se conoce que los perfiles de expresión génica en la vía dopaminérgica nigroestriatal son específicos del sexo y sugieren un sesgo en los hombres que puede subyacer a la predisposición a desarrollar EP. Los hallazgos preclínicos corroboran los estudios clínicos que sugieren que las mujeres pueden ser más capaces de resistir la aparición y/o progresión de lesiones neurodegenerativas (Simunovic y cols., 2010).

Además, se conoce que la potencial respuesta celular al tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol también puede ser específica del sexo (Yanguas Casás y cols., 2017). Lo que, es más, los astrocitos se diferencian sexualmente en la edad adulta en términos de su complejidad morfológica, mecanismos de señalización celular, plasticidad y capacidad de respuesta de las hormonas, especialmente al estradiol (Kuo y cols., 2010).

Estas evidencias coinciden con nuestros resultados, donde observamos que la expresión de D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> fue diferente entre machos y hembras. El aumento diferencial en la expresión lo tuvo

el grupo mc, en tanto en el grupo de los machos que recibieron tratamiento (me), la expresión de los receptores fue cercana a los valores de hembras.

El comportamiento de los animales es otro factor que difiere según la genética de cada sexo (Kuo y cols., 2010). Sabemos que la modulación de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> puede alterar la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado, estimulando o inhibiendo la actividad motora (Da Cunha y cols., 2008); por lo cual sería interesante evaluar la expresión de los receptores dopaminérgicos en el cultivo de células gliales mesencefálicas que han experimentado una lesión neurotóxica y un tratamiento con 17β-estradiol. Siempre considerando que estas diferencias de sexo están presentes sólo después de lesiones parciales realizadas con concentraciones moderadas de 6-OHDA de la vía dopaminérgica nigroestriatal y que, cuando la lesión aumenta, ya no son evidentes (Gillies y cols., 2004; Gillies & McArthur, 2010).

Finalmente, también nos resultó muy interesante estudiar los efectos del 17β-estradiol en la expresión de factores pro y anti inflamatorios en células de la microglia.

Los datos sobre las diferencias en la microglia en el cerebro adulto son escasos, pero los estudios sobre el desarrollo sugieren que pueden ser profundos, con importancia para los trastornos cerebrales (Lucas y cols., 2006; Yanguas Casás y cols., 2017). Al igual que ocurre en los astrocitos, los esteroides gonadales son poderosos reguladores del número y la actividad de las células de la microglia (Arévalo y cols., 2013).

Comúnmente, su respuesta se divide en dos fases. En la fase inicial ocurre la activación de la respuesta inmunitaria innata; es cuando la microglia (y en menor medida, los astrocitos) producen mediadores oxidativos y pro inflamatorios (potencialmente dañinos). Esta situación desencadena la fase posterior, llamada de resolución de la respuesta inmunitaria, que incluye la producción de factores antiinflamatorios (protectores), así como la inducción de la microglia fagocítica, un fenotipo esencial para el barrido de las células muertas y la finalización de la respuesta inflamatoria (Minghetti, 2005; Lucas y cols., 2006; Farina y cols., 2007). Nuestros resultados nos muestran que las células de la microglia de los animales macho control (mc) expresaron, en relación con los demás grupos experimentales, en mayor medida los marcadores pro inflamatorios y en una cantidad significativamente menor los antiinflamatorios. Esto, sugiere que la respuesta medida por la microglia en mc es un estado crónico mediado por factores proinflamatorios. Se ha reportado que en este período crónico el no resolver la respuesta neuroinflamatoria puede llegar a ser perjudicial y, en caso de existir una enfermedad en curso como la EP, puede exacerbar los procesos (Rogers y cols., 2007; McGeer & McGeer, 2008; Barres, 2008). Por otro lado, la administración del tratamiento con 17β-estradiol revirtió este resultado, generando en los cultivos (me) niveles similares que los que expresaron a los de las hembras, permitiendo pasar de una fase inicial a una posterior con efectos protectores tal como indica la literatura.

En los estudios que utilizan modelos genéticos animales de la EP, las diferencias de sexo en la microglía han recibido hasta ahora poca atención y son temas de controversia. Mientras que algunos autores dudan acerca de que la diferenciación sexual de las células de la microglia en la vía dopaminérgica nigroestriatal contribuya a las diferencias de sexo en la EP (Gillies y cols., 2014); otros reclaman que la respuesta neuroinmune central es sexualmente dimórfica (Schwarz & Bilbo, 2012; Santos-Galindo y cols., 2011) y que, por lo tanto, las células gliales deben ser consideradas como factores que contribuyen a las diferencias de sexo en la EP. Esta última evidencia concuerda con nuestros resultados. Aunque estos temas son aún objeto de discusión, investigaciones recientes alientan a utilizar la activación microglial y la neuroinflamación como un biomarcador temprano de la enfermedad (Chung

y cols., 2009; Lundblad y cols., 2012) considerando que el control de la actividad glial es, por tanto, un objetivo atractivo para las nuevas estrategias neuroprotectoras. En conjunto, todas estas aproximaciones nos brindaron una amplia variedad de resultados los cuales nos permitieron clarificar el entendimiento sobre la función neuroprotectora del  $17\beta$ -estradiol en las las células neurogliales de la vía dopaminérgica nigroestriatal bajo condiciones fisiopatológicas.

## 6. CONCLUSIONES

\*La lesión induce cambios en las respuestas motoras y locomotoras que pueden ser evaluadas in vivo mediante diferentes evaluaciones comportamentales. El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol es capaz de disminuir los signos neurodegenerativos y de restaurar el movimiento. Los mecanismos compensatorios y neuroprotectores se observan a corto y largo plazo.

\*Los desarrollos de sistemas informáticos para la automatización de las observaciones, la adquisición de datos, el cálculo y el análisis de los patrones cinéticos en FST y ST aumentan el número de parámetros evaluados y posibilitan tener una mejor imagen de cómo funciona el sistema nigroestriatal en condiciones normales y patológicas. Estos desarrollos permiten evaluar problemas musculares, rigidez, distonia, corea, temblores, deterioro de la postura y el equilibrio asociado no solo a la EP, sino otras enfermedades motoras neurodegenerativas.

\*El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol mejora el grado de lesión generado por la 6-OHDA y protege a las neuronas TH+ de la vía dopaminérgica nigroestriatal. La automatización de su evaluación permite distinguir y contabilizar las células inmunorreactivas TH+ e inferir con más datos acerca de la situación del tejido en particular.

\*Tanto la neurotoxina como la lesión mecánica aumentan la reactividad de la astroglia. El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol disminuye el número de astrocitos reactivos en los animales lesionados. Además, aminora el cambio en la astroglia reactiva en relación al daño mecánico, disminuyendo el tamaño de la cicatriz glial y la proliferación de los astrocitos.

\*La relación entre neuronas (TH+) y astrocitos (GFAP+) para todos los grupos sigue una distribución sigmoideal que permite analizar variables como el comportamiento de la lesión, la respuesta al daño y la evolución de cada proceso para cada grupo en particular.

\*El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol en los animales lesionados permite activar mecanismos compensatorios sobre la síntesis y liberación de DA en SNpc y CPu. Se produce un cambio en la dinámica de funcionalidad dopaminérgica donde los valores de la actividad metabólica tienden a restaurarse a niveles fisiológicos.

\*En cultivo de astrocitos de machos, la administración de 17 $\beta$ -estradiol tiende a normalizar la expresión de los genes D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> a valores cercanos a los de hembras. Por otra parte, el tratamiento genera la disminución de la expresión de factores pro inflamatorios y el aumento de la expresión de factores antiinflamatorios en microglia de los animales machos, llevando los valores a niveles similares a los de hembras. Estos datos sugieren que 17 $\beta$ -estradiol participa en la regulación de activación de las vías dopaminérgicas a través de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en cultivos de astrocitos y en la modulación de factores pro y anti inflamatorios en cultivos de microglia.

*Los datos presentes muestran la potencialidad terapéutica del tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol tras la lesión con 6-OHDA; en el que este esteroide neuroactivo podría desempeñar un papel importante en el restablecimiento de las propiedades fisiológicas y morfológicas de las neuronas dopaminérgicas y células de la glía lesionadas, así como mejorar las sinapsis y la liberación a través de los receptores específicos de DA. Por lo expuesto, se estima que el tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol podría ser una terapia beneficiosa para patologías donde se vea afectada la síntesis, el transporte y la liberación de dopamina en el SNC.*







## BIBLIOGRAFÍA

- Aderem, A, Underhill, DM. «Mechanisms of phagocytosis in macrophages.» *Annual Review of Immunology* 17 (1999): 593–623.
- Alheid, GF, Heimer, L, Switzer, RC. «Basal Ganglia.» *The Human Nervous System* (1990): 483-582.
- Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF. «Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both?» *Neurol. Res.* 27(2) ( 2005): 206-208.
- Arévalo, MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. «The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors.» *Neuroscience* 16(1) (2015): 17-29.
- Arévalo, MA, Ruiz-Palmero, I, Scerbo MJ, Acáz-Fonseca E, Cambiasso MJ, Garcia-Segura LM. «Molecular mechanisms involved in the regulation of neuritogenesis by estradiol: Recent advances.» *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 131(1-2) (2012): 52-56.
- Arévalo, MA, Santos-Galindo, M, Acáz-Fonseca, E, Azcoitia, I, Garcia-Segura, LM. «Gonadal hormones and the control of reactive gliosis.» *Horm. Behav.* 63 (2013): 216–221.
- Asanuma, M, Miyazaki, I, Murakami, S, Diaz Corrales, F, Ogawa, N. «Striatal astrocytes act as a reservoir for L-DOPA.» *PLoS ONE* (2014): 9.
- Ayala, C, Pennacchio, GE, Soaje, M, Bittencourt, JC, Celis, ME, Jahn, JA, Valdez, SR, Seltzer, AM. «Different effects of hypo and hyperthyroidism in remodeling contacts between neurons expressing the neuropeptide EI and tyrosine hydroxylase in hypothalamic areas of the male rat.» *Peptides* 113 (2019): 1–10.
- Azcoitia, I, Arévalo, MA, De Nicola, AF, García Segura, LM. «Neuroprotective actions of estradiol revisited.» *Trends in Endocrinology and Metabolism* 22(12) (2011): 467-473.
- Azcoitia, I, Santos-Galindo, M, Arevalo, MA, Garcia-Segura, LM. «Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol.» *Eur. J. Neurosci.* 32 (2010): 1995–2002.
- Bahena Trujillo, R, Flores, G, Arias Montaña, JA. «Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central.» *Rev. Biomed.* 11 (2000): 39-60.
- Bal, A, Bachelot, T, Savasta, M, Manier, M, Verna, J, Benabid, A, Feuerstin, C. «Evidence for dopamine D2 receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies.» *Molecular Brain Research* 23 (1994): 201-212.

- Barnéoud, P, Parmentier, S, Mazadier, M, Miquet, JM, Boireau, A, Dubédát, P, Blanchard, JC. «Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat.» *Neuroscience* 67(4) (1995): 837-848.
- Barres, BA. «The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease.» *Neuron* 60 (2008): 430-440.
- Barreto, G, Veiga, S, Azcoitia, I, Garcia-Segura, LM, Garcia-Ovejero, D. «Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites oestradiol and dihydrotestosterone.» *Eur. J. Neurosci.* 25 (2007): 3039–3046.
- Baulieu, EE. «Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system.» *Recent Prog. Horm.* 52 (1997): 1-32.
- Baulieu, EE. «Steroid hormones in the brain: several mechanisms?» *Steroid hormone regulation of the brain* (1981): 3-14.
- Beaulieu, JM, Gainetdinov, RR. «The physiology, signaling and pharmacology of dopamine receptors.» *Pharmacol. Rev.* 63 (2011): 182-217.
- Behl, C. «Oestrogen as a neuroprotective hormone.» *Neuroscience* 3.6 (2002): 433–442.
- Bethlem, J, Den Hartog Jager, WA. «The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans.» *J. Neurol. Neurosurgery Psychiatry* 23 (1960): 283-290.
- Birkmayer, W, Hornykiewicz, O. «Weitere experimentelle untersuchungen über L-DOPA beim Parkinson-syndrom und reserpine-parkinsonismus.» *Arch. Psychiat.* 206 (1964): 367-381.
- Björnström, L, Sjöberg, M. «Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes.» *Molecular Endocrinology* 19(4) (2005): 833-842.
- Blume, SR, Cass, DK, Tseng, KY. «Stepping test in mice: a reliable approach in determining forelimb akinesia in MPTP-induced Parkinsonism.» *Exp. Neurol.* 219(1) (2009): 208-211.
- Bonaccorso Marinelli, MP, Ledesma, M, Grimalt, F, Cabrera, R. «Video tracking analysis system for forelimb akinesia test in the rat parkinson model.» *IFMBE Proceedings* 60 (2017): 745–748.
- Bonaccorso Marinelli, MP, Ledesma, MJ, Nieto Grimalt, FE, Cabrera, R. «Forelimb stepping test software development for nigrostriatal dopamine system functionality assessment and motor parameter evaluation.» *Rev. Arg. Bioingeniería* 2(3) (2018): 65-69.
- Bourque, M, Dluzen, DE, Di Paolo, T. «Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease.» *Front. Neuroendocrinol* 30(2) (2009): 142-147.
- Branchi, I, D'Andrea, I, Armida, M, Cassano, T, Pèzzola, A, Potenza, R, Morgese, MG, Popoli, P, Alleva, E. «Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model.» *J. Neurosci. Res.* 86 (2008): 2050–2061.

- Brocca, ME, Garcia Segura, LM. «Non-reproductive functions of aromatase in the Central Nervous System under physiological and pathological conditions.» *Cell. Mol. Neurobiol.* 39(4) (2019): 473-481.
- Buosi, AS, Matias, I, Araujo, APB, Batista, C, Gomes, FCA. «Heterogeneity in synaptogenic profile of astrocytes from different brain regions.» *Mol. Neurobiol.* 1 (2017): 1–12.
- Cabrera, RJ, Bregonzio, C, Laconi, M, Mampel, A. «Allopregnanolone increase in striatal N-methyl-D-aspartic acid evoked [3H] dopamine release is estrogen and progesterone dependent.» *Cell. Mol. Neurobiol.* 22 (2002): 445-454.
- Cabrera, RJ, Bregonzio, C. «Turnover rate and stimulus evoked release of dopamine by progesterone and N-methyl-D-aspartic acid in rat striatum during pregnancy.» *European J. of Pharmacology* 317 (1996): 55-59.
- Cabrera, RJ, Navarro, CE. «Progesterone in vitro increases NMDA- evoked [3H] Dopamine induced Release from striatal slices in Proestrus rats.» *Neuropharmacology* 35 (1996): 175-178.
- Calabresi, P, Gubellini, P, Centronze, D, Picconi, B, Bernardi, G, Chergui, K, Svenningsson P, Fienberg AA, Greengard P. « Dopamine and CaMP regulated phosphoprotein 32kDA controls both striatal long term depression and long term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity.» *J. Neurosci.* 20 (2000): 8443-8451.
- Caligaris, L, Astrada, JJ, Taleisnik, S. «Influence of age on the release of luteinizing hormone induced by estrogen and progesterone in immature rats.» *J. Endocrinol.* 55 (1972): 97-103.
- Campos, FL, Carvalho, MM, Cristovao, AC, Je, G, Baltazar, G, Salgado, AJ, Kim, YS, Sousa, N. «Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology.» *Front. Behav. Neurosci.* 7 (2013): 175.
- Carlsson, A. «The occurrence distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system.» *Pharmac. Rev.* 225 (1959): 1-29.
- Carlsson, A, Linqvist, M, Magnusson, T. «3-4-dihydroxyphenylalanin and 5-hydroxytryptophan as reserpine agonists.» *Nature* ( 1957): 180-200.
- Carpenter, MB. «Cap 11: Cuerpo estriado y núcleos relacionados.» *Neuroanatomía (fundamentos)*. Ed. Editorial Médica. 4. Panamericana, 1994. 311-343.
- Casas, S, García, S, Cabrera, R, Nanfaro, F, Escudero, C, Yunes, R. «Progesterone prevents depression-like behavior in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in male rats.» *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99(8) (2011): 614- 661.
- Casas, S, Giuliani, F, Cremaschi, F, Yunes, R, Cabrera, R. «Neuromodulatory effect of progesterone on the dopaminergic, glutamatergic and GABAergic activities in a male rat model of Parkinson's disease.» *Neurol. Res.* 243 (2013): 64-75.
- Cenci, MA, Lee, CS, Bjorklund, A. «L-DOPA induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin and glutamic acid decarboxylase m RNA.» *European Journal of Neuroscience* 10 (1998): 2694-2076.

- Charcot, JM. *Leçons sur les maladies du système nerveux faites à Salpêtrière*. Paris: The Journal of Mental Science (1892).
- Charcot, JM, Vulpian, AA. «Cinquième leçon: De la Paralyse Agitante.» *Bouneville, Delahaye* (1872).
- Chung, CY, Koprach, JB, Siddiqi, H, Isacson, O. «Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy.» *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 29 (2009): 3365–3373.
- Ciriza, I, Carrero, P, Azcoitia, I, Lundeen, SG, Garcia-Segura, LM. «Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol.» *J. Neurobiol.* 61 (2004): 209–221.
- Coelho, LP, Shariff, A, Murphy, RF. «Nuclear segmentation in microscope cell images: a hand-segmented dataset and comparison of algorithms.» *Proc. IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging* (2009): 518–521.
- Compagnone, NA, Mellon, SH. «Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators.» *Front. Neuroendocrinol.* 21 (2000): 1-56.
- Cotzias, GC, Van Woert, MH, Schiffer, LM. «Aromatic amino acids and modification of Parkinsonism.» *N. Engl. J. Med.* 276 (1967): 347-349.
- Cragolini, AB, Montenegro, G, Friedman, WJ, Mascó, DH. «Brain-region specific responses of astrocytes to an in vitro injury and neurotrophins.» *Molecular and Cellular Neuroscience* 88 (2018): 240-248 .
- Creese, I, Leff, SE . «Dopamine receptors: A classification.» *J. Clin. Psychopharmacol.* 2(5) (1982): 329-335.
- Da Cunha, C, Wietzikoskia, CE, Machado Ferro, M, Martinez, MA, Barbato Frazao, V, Hipolide, D, Tufick, S, Canteras, NS. « Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission.» *Beh. Brain Research* 189(2-4) (2008): 364–372.
- Dahlman-Wright, K, Cavailles, V, Fuqua, SA, Jordan, VC, Katzenellenbogen, JA, Korach, KS, Maggi, A, Muramatsu, M, Parker, MG, Gustafsson, J. «Estrogen receptors.» *Pharmacological Reviews. International Union of Pharmacology. LXIV.* 58.4 (2006): 773-781.
- Dahlstorm, A, Fuxe, K. «Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. Demonstration of monoamines in cell bodies of the brain stem neurons.» *Acta Physiol. Scand.* 62 (1964): 1-55.
- Dauer, W, Przedborski, S. « Parkinson's disease: mechanisms and models.» *Neuron* 889 (2003): 909-939.
- Decressac M, Mattsson B, Bjorklund A. «Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and alpha-synuclein rat models of Parkinson's disease.» *Experimental Neurology* 237(1) (2012): 306-315.

- Deumens, R, Blokland, A, Prickaerts, J. «Modeling Parkinson's disease in rats An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway.» *Experimental Neurology* 175 (2002): 303-317.
- Dhandapani, KM, Wade, FM, Mahesh, VB , Brann, DW. «Astrocyte-derived transforming growth factor- $\beta$  mediates the neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways.» *Endocrinology* 146 (2005): 2749–2759.
- Diaz, MB, Mascitti, TA. «Anatomía de los núcleos de la base y estructuras relacionadas.» F, Micheli. *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados*. 2. Médica Panamericana, 2006. 11-23.
- Diaz-Aparicio, I, Beccari, S, Abiega, O, Sierra, A. «Clearing the corpses: Regulatory mechanisms, novel tools, and therapeutic potential of harnessing microglial phagocytosis in the diseased brain.» *Neural Regeneration Research* 11(10) (2016): 1533–1539.
- Diniz, DG, De Oliveira, MA, De Lima, CM, Fôro, CAR, Sosthenes, MCK, Bento- Torres, J, Da Costa Vasconcelos, PF, Anthony, DC, Diniz, CWP,. « Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAP-immunolabeled astrocytes.» *Behav. Brain Funct.* 12 (2016).
- Dluzen, DE. «Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system.» 29 (2000): 387-399.
- Dluzen, DE, McDermott, JL. «Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system: implications for Parkinson's disease.» *J. Gender Specific Med.* 3 (2000): 36-42.
- Do Rego, JL, Seong, JY, Burel, D, Leprince, J, Luu-The, V, Tsutsui, K, Tonon, MC, Pelletier, G, Vaudry, H. «Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides.» *Frontiers in Neuroendocrinology* 30 (2009): 259-301.
- Don Carlos, LL, Azcoitia, I, García Segura, LM. «Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators.» *Psychoneuroendocrinology* 34S (2009): S113-S122.
- Ehringer, J, Hornykiewicz, O. «Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytryptamin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems.» *Klin Wochenschr* 38 (1960): 1236-1239.
- Fang, X, Sugiyama, K, Akamine, S, Namba, H. «The stepping test and its learning process in different degrees of unilateral striatal lesions by 6-hydroxydopamine in rats.» *Neuroscience Research* 55(4) (2006): 403-409 .
- Farina, C, Aloisi, F, Meinl, E. «Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.» *Trends Immunol.* 28 ( 2007): 138–145.
- Fernández Pardal, MM, Gatto, EM, Halfon, MJ. «Bioquímica de los ganglios basales. Cap 2: Núcleos de la base.» F, Micheli. *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados*. 2. Ed. Médica Panamericana, 2006. 11-23.
- Finkelstein, D, Stanic, D, Parish, C, Tomas, D, Dickson, K, Horne, M. «Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra.» *The Journal of Neuroscience* (1995): 3863–3875.

- Fitting, S, Zou, S, Chen, W, Vo, P, Hauser, KF, Knapp, PE. «Regional heterogeneity and diversity in cytokine and chemokine production by astroglia: differential responses to HIV-1 tat, gp120, and morphine revealed by multiplex analysis.» *J. Proteome Res.* 9 (2010): 1795–1804.
- Frye, C. «Steroids, reproductive endocrine function and affect.» *Minerva Ginecol.* 61 (2009): 541–562.
- Fujisawa, H, Okuno, S. «Regulation of the activity of tyrosine hydroxylase in the central nervous system.» *Adv. Enzyme Regul.* 28 (1989): 93-110.
- Gao, V, Vitaterna, M, Turek, F. «Validation of video motion. Detection scoring of forced swim test in mice.» *Journal of neuroscience methods* 235 (2014): 59-64.
- García, S, Nanfaro, F, Casas, S, Cabrera, R, Yunes, R. «Experimental models of neurodegenerative diseases: a simple method to check both viability of neural tissue and cannulae location after stereotaxic surgeries.» *Amer. J. Neuroprot. and Neurodeg.* 4 (2012): 1-5.
- García Segura, LM, Azcoitia, I, Don Carlos, LL. «Neuroprotection by estradiol.» *Progress in Neurobiology* 63(1) (2001): 29-60.
- García Segura, LM, Wozniak, A, Azcoitia, I, Rodríguez Sánchez, JR, Hutchison, RE, Hutchison, JB. «Aromatase expression by astrocytes after brain injury: Implications for local estrogen formation in brain repair.» *Neuroscience* 89 (1999): 567-578.
- Geissmann, Q. «OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects.» *PLoS One* (2013).
- Gerlach, M, Riederer, P. «Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man.» *J. Neurol. Transm.* 103 (1996): 987-1041.
- Gillies, GE, McArthur, S. «Independent influences of sex steroids of systemic and central origin in a rat model of Parkinson's disease: a contribution to sex-specific neuroprotection by estrogens.» *Horm. Behav.* 57 (2010): 23–34.
- Gillies, GE, Murray, HE, Dexter, D, McArthur, S. «Sex dimorphisms in the neuroprotective effects of estrogen in an animal model of Parkinson's disease.» *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78 (2004): 513–522.
- Gillies, GE, Pienaar, IS, Vohra, S, Qamahwi, Z. «Sex differences in Parkinson's disease.» *Front. Neuroendocrinol.* 35 (2014): 370- 384.
- Giros, B, El Mestikawy, S, Gordinot, N, Zheng, K, Han, H, Yang-Fen, T, Caron, MG. «Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of human dopamine transporter.» *Mol. Pharmacol.* 42 (1992): 383-390.
- Giuliani, FA, Escudero, C, Casas, S, Bazzocchini, V, Yunes, R, Laconi, M, Cabrera, R. «Allopregnanolone and puberty: modulatory effect on glutamate and GABA release and expression of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreductase in the hypothalamus of female rats.» *Neuroscience* 243 (2013): 64-75.

- Giuliani, FA, Yunes, R, Mohn, CE, Laconi, M, Rettori, V, Cabrera, R. «Allopregnanolone induces LHRH and Glutamate release through NMDA receptor modulation.» *Endocrine* 40 (2011): 21-26.
- Gould TE, Dao DT, Kovacsics CE. «The Open Field Test.» *Neuromethods* 42 (2009): 1-20.
- Gowers, WR. «A manual of diseases of the nervous system.» J. & A. Churchill, 2007. 1886-1888.
- Green, PS, Gridley, KE, Simpkins, JW. «Nuclear estrogen receptor-independent neuroprotection by estratrienes: a novel interaction with glutathione.» *Neuroscience* 84 (1998): 7-10.
- Greenamyre, JT, Hastings, TG. «Parkinson's-divergent causes, convergent mechanisms.» *Biomedicine* 304 (5674) (2004): 1120-1122.
- Greiner, M, Paredes, A, Rey-Ares, V, Saller, S, Mayerhofer, A, Lara, H. «Catecholamine Uptake, Storage, and Regulated Release by Ovarian Granulosa Cells.» *Endocrinology* 149(10) (2008): 4988 – 4996.
- Guastella, J, Nelson, N, Nelson, H, Czyzyk, L, Keyman, S, Mierdel, MC, Davidson, N, Lester, HA, Kanner, BI. «Cloning expression of a rat GABA transporter.» *Science* 350 (1990): 350-354.
- Guldbergn, HC, Marsden, DA. «Catechol-O-methyl transferase: Pharmacological aspects and physiological role.» *Pharmac. Rev.* 27 (1975): 135-206.
- Gundersen, HJG, Jensen, EB. «The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction.» *ImageJ at <https://imagej.net/ImageJ/>* 147 (1987): 229–263.
- Halassa, MM, Haydon, PG. «Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior.» *Annu. Rev. Physiol.* 72 ( 2010): 335–355.
- Hall, M. *On the diseases and derangements of the nervous system.* London: Bailliere, 1841.
- Hanamsagar, R, Alter, MD, Block, CS, Sullivan, H, Bolton, JL, Bilbo, SD. «Generation of a microglial developmental index in mice and in humans reveals a sex difference in maturation and immune reactivity .» *Glia* 65(9) (2017): 1504–1520.
- Haycock, JW, Haycock, DA. «Tyrosine Hydroxylase in rat brain dopaminergic terminals.» *J. Biol. Chem.* 265 (1990): 5657-5660.
- Hayes, M, Fung, V, Kimber, T, O'Suivillan, J. «Current concepts in the management of Parkinson disease.» *Med. J. Aust.* 192(3) ( 2010): 144-149.
- Heberden, C. «Sex steroids and neurogenesis.» *Biochemical Pharmacology* 141 (2017): 56-62.
- Heldring, N, Pike, A, Andersson, S, Matthews, J, Cheng, G, Hartman, J, Tujague, M, Ström, A, Treuter, E, Warner, M, Gustafsson, J, Held, A. «Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets.» *Physiological Reviews* 87(3) (2007): 905-931.
- Henderson, JM, Watson, S, Halliday, GM, Heinemann, T, Gerlach, M. «Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat.» *Behavioural Brain Research* 139(1–2) (2003): 105-113.

- Hudson, JL, Van Horne, CG, Strömberg, I, Brock, S, Clayton, J, Masserano, J, Hoffer, BJ, Gerhardt, GA. «Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats.» *Brain Res.* 626(1-2) (1993): 167-174.
- Husemann, J, Loike, JD, Anankov, R, Febbraio, M, Silverstein, SC. «Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: Their role on microglia and other cells of the nervous system.» *Glia* 40(2) (2002): 195–205.
- Kalaria, RN, Mitchell MJ,, Harik, SI. «Monoamine oxidases of the human brain and liver.» *Brain* 111(1441) (1988): 24-50.
- Kandel, E, Schwartz, J, Jessell, T. *Principios de neurociencia.* : 4. McGraw-Hill Interamericana, 2001.
- Kaynig, V, Fuchs, T, Buhmann, JM. «Neuron geometry extraction by perceptual grouping in ssTEM images.» *Proc. IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* (2010): 2902–2909.
- Kempster, PA. «Michael J. Fox and his Parkinson's disease.» *Mov. Disord.* 19.1 (2004): 105-106.
- Kirik, D, Rosenbland, C, Bjorklund, A. «Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopaminergic system induced by intrastriatal 6-OHDA in the rat.» *Experimental Neurology* 152 (1998): 259-277.
- Klegeris, A, McGeer, EG, McGeer, PL. «Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease.» *Curr. Opin. Neurol.* 20 (2007): 351–357.
- Koller, WC, Barr, A, Biary, N. «Estrogen treatment of dyskinetic disorders.» *Neurology* 5 (1982): 32.
- Konradi, C, Svoma, E, Jellinger, K, Riederer, P, Denney, R, Thibault, J. « Topographic immunocytochemical mapping of monoamine oxidase A, monoamine oxidase B and tyrosine hydroxylase in humans post mortem brain stem.» *Neuroscience* 26 (1988): 791-802.
- Kraus, PH, Klotz, P, Przuntek, H. «Sex differences for dopaminergic therapy in Parkinson's disease.» *Parkinsonism Related Disorders* 5 (1999): 77-88.
- Kuiper, G, Gustafsson, JÅ. «The novel estrogen receptor- $\beta$ subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens.» *FEBS Letters* 410(1) (1997): 87-90.
- Kuo, J, Hamid, N, Bondar, G, Dewing, P, Clarkson, J, Micevych, P. «Sex differences in hypothalamic astrocyte response to estradiol stimulation. .» *Biol. Sex. Differ.* 1 ( 2010): 1-7.
- Kyohei K, Takao Y, Mashahiro K, Isao D. «Animal models of Parkinson's disease research: trends in the 2000s.» *Int. J. Mol. Sci.* 20(21) (2019): 5402.
- Laconi, M, Reggiani, P, Penissi, A, Yunes, R, Cabrera, R. «Allopregnanolone modulates striatal dopaminergic activity of rats under different gonadal hormones conditions.» *Neurol. Res.* 29(6) (2007): 622-627.



- Laconi, MR, Cabrera, RJ. « Effect of centrally injected allopregnanolone on sexual receptivity, luteinizing hormone release, hypothalamic dopamine turnover, and release in female rats.» *Endocrine* 17 (2003): 77-83.
- Larramendy, C, Taravini, I, Saborido, M, Ferrario, J, Murer, M, Gershanik, O. «Cabergoline and rramipexole fail to modify already established dyskinesias in an animal model of parkinsonism.» *Behavioral Brain Research* 194 (2008): 44-51.
- Lavoie, B, Smith, Y, Parent, KA. «Dopaminergic innervation of the basal ganglia in squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry.» *J. Comp. Neurol.* 288 (1989): 36-52.
- Lee, KY, Tang, D, Goldstein, M. «Antibodies to a synthetic peptide corresponding to Ser-40 containing segment of tyrosine hydroxylase.» *J. Neurochem.* 53 (1989): 1238-1244.
- Lewy, FH. «Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans.» *Dtsch. Z. Nervenheilk* 50 (1912): 50-55.
- Lindgren AS, Lelos MJ, Dunnett SB. «Do alpha-synuclein vector injections provide a better model of Parkinson's disease than the classic 6-hydroxydopamine model?» *Experimental Neurology* 237 (2012): 36-42.
- Liu, M, Hurn, PD, Roselli, CE, Alkayed, NJ. « Role of P450 aromatase in sex- specific astrocytic cell death.» *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27 (2007): 135-141.
- Ljungdahl, A, Hökfelt, T, Golgstein, M, Park, D. «Retrograde peroxidase tracing of neurons combined with transmitter histochemistry.» *Brain Res.* 84 (1975): 313-319.
- Longair, M, Pietzsch, T, Preibisch, S, Ruedem, C, Saalfeld, S, Schmidt, B, Tinevez, JY, White, DJ, Hartenstein, V, Eliceiri, K, Tomancak, P, Cardona, A. «Fiji- an open source platform for biological image analysis.» *Nat. Methods* 9 (2012): 7.
- Lucas, SM, Rothwell, NJ, Gibson, RM. «The role of inflammation in CNS injury and disease.» *Br. J. Pharmacol.* 147(Suppl. 1): (2006): S232–S240.
- Lucin, KM, Wyss-Coray, T. «Immune activation in brain aging and neurodegeneration: Too much or too little?» *Neuron* 64(1) (2009): 110– 122.
- Lundblad, M, Decressac, M, Mattsson, B, Bjorklund, A. «Impaired neurotransmission caused by overexpression of alpha-synuclein in nigral dopamine neurons.» *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012): 3213–3219.
- MacLusky, NJ, Naftolin, F. «Sexual differentiation of the central nervous system.» *Science* 211(4488) (1981): 1294-1303.
- Manyan, BV. «Paralysis agitans and levodopa in Ayurveda: Ancient indian medical treatise .» *Mov. Disord.* 1 (1990): 47-48.
- Marin, O. «Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders.» *Nature Medicine* 22(11) (2016): 1229– 1238.

- Marsden, C, Obeso, JA. «The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease.» *Brain* 117 (1994): 877-897.
- Mathai, A, Smith, YT. «The corticostriatal and corticosubthalamic pathways: two entries, one target. So what?» *Front. Syst. Neurosci.* 1(5) (2011): 64.
- Mayeux, R, Denaro, J, Hemenegildo, N, Marder, K, Tang, MX, Cote, LJ, Stern, Y. «A population based investigation of Parkinson's disease with and without dementia. Relationship to age and gender.» *Arch. Neurol.* 49 (1992): 492-497.
- McEwen, BS. «Estrogen actions in the central nervous system.» *Endocrinol. Rev.* 20 (1999): 279–307.
- McGeer, PL, McGeer, EG. «Glial reactions in Parkinson's disease.» *Mov. Disord.* 23 (2008): 474–483.
- Mecha, M, 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* 218 (2011).
- Meijering, E. «Cell segmentation:50 years down the road .» *IEEE Signal Processing Magazine* 29(5) (2012): 140–145.
- Merchenthaler, I, Lane, MV, Numan, S, Dellovade, TL. «Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses.» *J. Comp. Neurol.* 473 (2004): 270–291.
- Micevych, P, Bondar, G, Kuo, J. «Estrogen actions on neuroendocrine glia.» *Neuroendocrinology* 91 (2010): 211–222.
- Minghetti, L. «Role of inflammation in neurodegenerative diseases.» *Curr. Opin. Neurol.* 18 (2005): 315–321.
- Mirzaton, A, Spence, RD, Naranjo, KC, Saldanha, CJ, Schlinger, BA. «Injury- induced regulation of steroidogenic gene expression in the cerebellum.» *J. Neurotrauma* 27 ( 2010): 1875–1882.
- Mitra, SW, Hoskin, E, Yudkovitz, J, Pear, L, Wilkinson, HA, Hayashi, S, Pfaff, DW, Ogawa, S, Rohrer, SP, Schaeffer, JM, McEwen, BS, Alves, SE. «Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha.» *Endocrinology* 144 (2003): 2055–2067.
- Miyazaki, I, Asanuma, M, Diaz-Corrales, FJ, Miyoshi, K, Ogawa, N. «Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia.» *Brain Research* 1029 (2004): 120–123 .
- Morale, MC, Serra, PA, L'episcopo, F, Tirolo, C, Caniglia, S, Testa, N, Gennuso, F, Giaquinta, G, Rocchitta, G, Desole, MS, Miele, E, Marchetti, B. «Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration.» *Neuroscience* 138(3) (2006): 869-878.

- Morky, J. «Experimental Models and Behavioural Tests Used in the Study of Parkinson's Disease.» *Physiol. Res.* 44 (1995): 143–150.
- Morris, RGM. «Spatial localization does not require the presence of local cues.» *Learn. Motiv.* 12 (1981): 219-260.
- Mouradian, MM, Juncos, JL, Fabbrini, G, Schlegel, J, Barto, JJ, Chase, TN. «Motor fluctuations in Parkinson's disease: Central pathophysiological mechanisms .» *Ann. Neurol.* 24 (1988): 372-378.
- Murer, MG, Dziejczapolski, G, Menalled, L, García, MC, Agid, Y, Gershanik, O. «Chronic Levodopa is not toxic for remaining dopaminergic neuron, but instead promotes their recovery in rats with moderate nigrostriatal lesions.» *Ann. Neurol.* 43 (1998): 561-575.
- Murray, HE, Pillai, AV, McArthur, SR, Razvi, N, Datta, KP, Dexter, DT, Gillies, GE. «Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females.» *Neuroscience* 116 (2003): 213–222.
- Narro, ML, Yang, F, Kraft, R, Wenk, C, Efrat, A, Restifo, LL. «NeuronMetrics: Software for semi-automated processing of cultured neuron images.» *Brain Research* 1138 (2007): 57–75.
- National Research Council Institute of Laboratory Animal Resources. *Guide for the care and use of laboratory animals.* 8. USA: National Academies, 2011.
- Nelson, LH, Warden, S, Lenz, KM. «Sex differences in micro- glial phagocytosis in the neonatal hippocampus.» *Brain, Behavior, and Immunity* 64 (2017): 11-22.
- Nicoletti, A, Arabia, G, Pugliese, P, Nicoletti, G, Torchia, G, Condino, F, Morgante, L, Quattrone, A, Zappia, M. «Hormonal replacement therapy in women with Parkinson disease and levodopa-induced dyskinesia: a crossover trial.» *Clin. Neuropharmacol.* 30(5) (2007): 276-280.
- Nieto, FE, Bonaccorso Marinelli, MP, Cabrera, RC. «Software development and implementation for swimming activity analysis in an animal model of hemiparkinsonism.» *Rev. Arg. de Bioingeniería:en prensa* (2020).
- Nolte, J. *El cerebro humano.* 3. Mosby/Doyma Libros , 1994.
- Ohira, K. «Dopamine stimulates differentiation and migration of cortical interneurons.» *Biochemical and Biophysical Research Communication: en prensa* (2019).
- Olanow, CW. « Melvin David Yahr, MD (1917-2004).» *Neurology* 62(11) (2004): 1932-1933.
- Olsson, M, Bentlage, C, Bjorklund, A. «Forelimb akinesia in the rat parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test.» *The Journal of Neuroscience* 15(2) (1995): 3863-3875.
- Ong, LK, Zhao, Z, Kluge, M, TeBay, C, Zalewska, K, Dickson, PW, Jhonson, SJ, Nilsson, M, Walke, FR. «Reconsidering the role of glial cells in chronic stress induced dopaminergic neuron loss

- within substantia nigra? Friend or foe?» *Brain, Behaviour and Immunity* 60 (2017): 117–125.
- Onn, SP, West, AR, Grace, AA. «Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions.» *Trends Neurosci.* 23 (2000): 48-56.
- Otto, D, Unsicker, K. «FGF-2 in the MPTP model of Parkinson's disease: effects on astroglial cells.» *Glia* 11 (1994): 47-56.
- Otoni, EB. «Etholog 2.2: a tool for transcription and timing of behaviour observation sessions.» *Behav. RES. Methods Instrum. Comput.* 32 (2000): 446-449.
- Parent, A, Hazrati, LN. «Functional anatomy of the basal ganglia I. The corticobasal ganglia thalamocortical loop.» *Brain Res. Rev.* 20 (1995): 91-127.
- Parkinson, J. «An essay on the shaking palsy.» Sherwood, Neely, and Jones (1817).
- Paxinos, G, Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Elsevier Academic Press, 2005.
- Peinado, V, González, JC, Leret, ML. «Effect of 17- $\beta$ -estradiol on dopamine, serotonin and GABA striatal levels in 6-hydroxydopamine-treated rats.» *Toxicology* 204 (2004): 155-160.
- Perea, G, Navarrete, M, Araque, A. «Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information.» *Trends Neurosci.* 32 (2009): 421– 431.
- Perier, C, Marin, C, Jimenez, A, Bonastre, M, Tolosa, ES, Hirsch, EC. «Effect of subthalamic nucleus or entopeduncular nucleus lesion on levodopa-induced neurochemical changes within the basal ganglia and on levodopa-induced motor alterations in 6-OHDA-lesioned rats.» *J. Neurochem.* 86 (2003): 1328-1337.
- Pfaffl, M. «A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.» *Nucleic Acid Res.* 29(9) (2011): 2002-2007.
- Pfaffl, M, Tichopad, A, Prgomet, C, Neuvians, T. «Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations.» *Biotechnology Letters* 26 (2004): 509-515.
- POETRY, Investigators- The Parkinson Study Group. «A randomized pilot trial of estrogen replacement therapy in post-menopausal women with Parkinson's disease.» *Parkinsonism and Related Disorders.* 2011. 757-760.
- Porsolt, RD, Le Pichon, M, Jalfre, M. «Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.» *Nature* 2 (1997): 730-732.
- Porsolt, R, Bertin, A, Jalfre, M. «Behavioral despair in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine.» *Eur. J. Pharmacol.* 51 (1978): 291-294.
- Przedborski, S, Levivier, M, Jiang, H, Ferreira, M, Jackson-Lewis, V, Donaldson, D, Togasaki, DM. «Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine.» *Neuroscience* 67 (1995): 631-647.

- Quillfeldt, J. « Behavioral methods to study learning and memory in rats. *Rodent model as tools in ethical biomedical research.* » Ed. ML, Tufik, S Andersen. Springer International Publishing, Cham, 2016. 101-136.
- Quinn, NP, Marsden, CD. «Menstrual-related fluctuations in Parkinson's disease.» *Mov. Disord* 1 (1986): 85–87 .
- Robel, P, Schumacher, M, Baulieu, EE. *Neurosteroids: From definition and biochemistry to physiopathologic function.* Humana Press, 1999.
- Rodriguez Oroz, MC, Obeso, JA. « Bioquímica de los ganglios basales. Cap 5: Organización anatomofuncional y fisiopatológica de los ganglios basales: implicaciones terapéuticas.» *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados.* Ed. Micheli F. 2. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2006. 75-84.
- Rodriguez-Navarro, JA, Solano, RM, Casarejos, MJ, Gomez, A, Perucho, J, De Yebenes, JG, Mena, MA. «Gender differences and estrogen effects in parkin null mice.» *J. Neurochem.* 106 (2008): 2143–2157.
- Rogers, J, Mastroeni, D, Leonard, B, Joyce, J, Grover, A. « Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder?» *Int. Rev. Neurobiol.* 82 (2007): 235–246.
- Rupprecht, R, Fries, E, Holsboer, A. «*The neuropsychopharmacological potential of neurosteroids.*» Humana Press, 1999.
- Santos-Galindo, M, Acaz-Fonseca, E, Bellini, MJ, Garcia-Segura, LM. «Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide.» *Biol. Sex. Differ.* 2 (2011): 8.
- Saravanan K, Mohanakumar, K. «Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease.» *Brain Research* (2005): 55-147.
- Savica, R, Rocca, W, Ahlskog, J. «When does Parkinson disease start?» *Arch. Neurol.* 798 (2010): 801-867.
- Sawada, H, Ibi, M, Kihara, T, Urushitani, M, Akaike, A, Shimohama, S. «Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death.» *J. Neurosci. Res.* 54 (1998): 707-719.
- Schallert, T, Norton, D, Jones, T. « A clinically relevant unilateral rat model of Parkinsonian akinesia.» *J. Neural Transpl. Plast.* 3 (1992): 332-333.
- Schiaffini, O, Patterson, AM, Martin, B. «Sexual cycle and metabolism of the hipophysiotropic and septal areas, caudad nucleus, adenohipophysis and cerebral cortex.» *Reproduction* 1 (1974): 361-366.

- Schwarz, JM, Bilbo, SD. «Sex, glia, and development: interactions in health and disease.» *Horm. Behav.* 62 (2012): 243-253.
- Semenko, F, Cuello, A, Goldstein, K, Lee, Y, Sidebottom, E. «Monoclonal antibody against tyrosine hydroxylase: application in light and electron microscopy.» *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 34 (1986): 817–821.
- Shughrue, PJ. «Estrogen attenuates the MPTP-induced loss of dopamine neurons from the mouse SNc despite a lack of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta).» *Exp. Neurol.* 190 (2004): 468–477.
- Shulman, LM, Bhat, V. «Gender disparities in Parkinson's disease.» *Exp. Rev. Neurother.* 6.3 (2003): 407-416.
- Simon, RP, Geenberg, DA, Aminoff, MJ. *Neurología Clínica. 7.* Mc Graw Hill Education, 2008.
- Simunovic, F, Yi, M, Wang, Y, Stephens, R, Sonntag, KC. «Evidence for gender-specific transcriptional profiles of nigral dopamine neurons in Parkinson disease.» *PLoS ONE* 5(1) (2010): e8856.
- Skirboll, LR, Grace, AA, Bunney, BS. «Dopamine auto and postsynaptic receptors: electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists.» *Science* 206 (1979): 80.
- Smith, KM, Dahodwala, N. «Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders.» *Exp. Neurol.* 259 (2014): 44-56.
- Soaje, M, Valdez, S, Bregonzio, C, Penissi, A, Deis, RP. «Dopaminergic mechanisms involved in prolactin release after mifepristone and naloxone treatment during late pregnancy in the rat.» *Neuroendocrinology* 84 (2006): 58–67.
- Sobel, I, Freeman, H. *An isotropic 3x3 gradient operator, machine vision for three dimensional scenes.* Nueva York: Academic Pres, 1990.
- Sofroniew, MV. «Astrogliosis.» *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015): a020420.
- Sohrabji, F, Miranda, RC. « Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain derived neurotrophic factor.» *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995): 11110-11114.
- Streit, WJ. «Microglial senescence: Does the brain's immune system have an expiration date?» *Trends in Neurosciences* 29 (2006): 506-510.
- Sunahara, RK, Guan, HC, O'Dowd, BF, Seeman, P, Laurier, LG, George, SR, Torchia, J, Van Tol, HHM, Niznik, HB. «Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1.» *Nature* 347 (1991): 80-83.
- Surmeier, DJ, Reiner, A, Levine, MS, Ariano, MA. «Neostriatal dopamine receptors.» *Trends Neurosc.* 17 (1994): 4-5.

- Tadaiesky, M, Dombrowski, P, Figueiredo, C, Cargnin-Ferreira, E, Cunha, C, Takahashi, R. «Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model Parkinson's disease.» *Neuroscience* 156 (2008): 830–840.
- Tetriakoff, C. *Contribution à l'étude de l'anatomie pathologie du locus niger de Somemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson*. Paris: Thèse, 1919.
- Torres-Aleman, I, Rejas, MT, Pons, S, Garcia-Segura, LM. «Estradiol promotes cell shape changes and glial fibrillary acidic protein redistribution in hypothalamic astrocytes in vitro: a neuronal-mediated effect.» *Glia* 6 (1992): 180–187.
- Tripanichkul, W, Sripanichkulchai, K, Finkelstein, DI. «Estrogen down-regulates glial activation in male mice following 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication.» *Brain Res.* 1064 (2006): 28–37.
- Trousseau, A. «Senile trembling and paralysis agitans.» *Lectures on clinical medicine delivered at the Hôtel-Dieu Paris*. London: New Sydenham Society (1868). 440-450.
- Tsang, KL, Ho, SL, Lo, SK. «Estrogen improves motor disability in parkinsonian postmenopausal women with motor fluctuations.» *Neurology* 54(12) (2000): 2292–2298.
- Tsutsui, K, Haraguchi, S. *Neurosteroids*. Elsevier Inc., 2015.
- Ungerstedt, U. «Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system.» *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367 (1971): 69-93.
- Ungerstedt, U. «6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons.» *Eur. J. Pharmacol.* 5 (1968): 107-110.
- Valdez, S, Penissi, A, Deis, R, Jahn, G. «Hormonal profile and reproductive performance in lactation deficient (ofa hr/ hr) and normal (sprague dawley) female rats.» *Reproduction* 133 (2007): 827–840.
- Vila, M, Przedborski, S. «Genetic clues to pathogenesis of Parkinson's disease.» *Nat. Med.* 10 (2004): 58-62.
- Vrtačnik, P, Ostanek, B, Mencej-Bedrač, S, Marc, J. «The many faces of estrogen signaling.» *Biochemia Medica* 24(3) (2014): 329-342.
- Warraich, ST, Allbutt, HN, Billing, R, Radford, J, Coster, MJ, Kassiou, M, Henderson, JM. «Evaluation of behavioural effects of a selective NMDA NR1A/2B receptor antagonist in the unilateral 6-OHDA lesion rat model.» *Brain Res. Bulletin* 78 (2009): 85-90.
- West, MJ, Slomianka, L, Gundersen, HJG. «Unbiased stereological estimation of the total number of neurons of the rat hippocampus using the optical fractionator.» *Anat. Rec.* 231 (1991): 482–497.
- Wichmann, T, DeLong, MR. «Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease.» *Adv. Neurol.* 91 (2003): 9-18.

- Wichmann, T, DeLong, MR. *Movement Disorders*. McGraw Hill, 1997.
- Williams, PL, Warwick, R. *Gray's anatomy*. 38. Churchill Livingstone, 1995.
- Winkler, C, Kirik, D, Björklund, A, Cenci, MA. «l-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-Hydroxydopamine model of Parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function.» *Neurobiology of Disease* 10(2) (2002): 165-186.
- Wright, CE, Sisson, TL, Ichhpurani, AK, Peters, GR. «Steady-state pharmacokinetic properties of pramipexole in healthy volunteers.» *J.Clin. Pharmacol.* 37 (1997): 520-525.
- Yanguas Casás, N, Crespo Castillo, A, De Ceballos, ML, Chowen, JA, Azcoitia, I, Arévalo, MA, García Segura, LM. «Sex difference in phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid.» *Glia* 00 (2017): 1-16.
- Yunes, R, Casas, S, Gaglio, E, Cabrera, R. «Progesterone exerts a neuromodulatory effect on turning behavior of hemiparkinsonian male rats: expression of 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Oxidoreductase and Allopregnanolone as suggestive of GABAA receptors involvement.» *Parkinsons Dis.* (2015).
- Zhan, JS, Gao, K, Chai, RC, Jia, XH, Luo, DP, Ge, G, Jiang, YW, Fung, Y wan W, Li, L, Yu, ACH. «Astrocytes in migration.» *Neurochem. Res.* 42 (2017): 272–282.
- Zhang, L, Li, B, Zhao, W, Chang, YH, Ma, W, Dragan, M, Barker, JL, Hu, Q, Rubinow, DR. « Sex-related differences in MAPKs activation in rat astrocytes: effects of estrogen on cell death.» *Brain Res. Mol. Brain Res.* 103 (2002): 1–11.
- Zuiderveld, K. «Contrast limited adaptive histogram equalization.» *Graphicgems IV* (1994): 474–485.