



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

ESTEROIDES DISMINUYEN PROLIFERACIÓN MICROGLIAL TRAS LESIÓN CEREBRAL SIN INFLUIR SOBRE EL APRENDIZAJE ESPACIAL

Tesis
que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIAS)

presenta
VÍCTOR MANUEL GÓMEZ

Comité tutelar
Dr. Joaquín García Estrada (Director)
Dra. Judith Marcela Dueñas Jiménez
Mtro. Sergio Meneses Ortega

**ESTEROIDES DISMINUYEN PROLIFERACION MICROGLIAL TRAS LESION
CEREBRAL SIN INFLUIR SOBRE EL APRENDIZAJE ESPACIAL.**

Tesis que presenta: VICTOR MANUEL GOMEZ para obtener el grado de Maestría en Ciencias del Comportamiento. Opción Neurociencias.

El trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroendocrinología Celular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el laboratorio de comportamiento del Dpto. de Neurociencias en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud. U. de G., con financiamiento del CONACYT con número 3838P-M9608 bajo la dirección de la Dra. Maria Sonia Luquín de Anda.

COMITE TUTORIAL:

Director de Tesis:

Dr. Joaquín García Estrada.

Investigador del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS.

Profesor del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas del CUCS U. de G.

Dra. Judith Marcela Dueñas Jiménez.

Investigadora y Profesora del Programa de Doctorado en Neurociencias del CUCS U. de G.

Dr. Sergio Meneses Ortega.

Investigador y Profesor del Programa de Doctorado en Ciencias del Comportamiento, Opción Neurociencias, del Instituto de Neurociencias del CUCBA U. de G.

En Guadalajara, Jalisco. Noviembre de 2005.

AGRADECIMIENTOS.

A mi Universidad de Guadalajara por darme la oportunidad de prepararme y cumplir mis metas.

A mi esposa e hijos Omar, Minerva y Lis por su apoyo y comprensión.

A mi tía Estela por su amor por mí.

Al Dr. Joaquín García Estrada por sus conocimientos, dirección, apoyos, consejos, aliento y tolerancia para llevar a cabo este trabajo, igualmente a la Dra. Ma. Sonia Luquín de Anda.

A mis profesores y compañeros del Instituto de Neurociencias, especialmente al Maestro Sergio Meneses Ortega, también a la Dra. Marcela J. Dueñas Jiménez; así como a los miembros de mi jurado de examen.

A mi amigo Pedro Macedonio García López por inducirme a seguir preparándome, por sus consejos y apoyos.

A mis amigos José María y Lourdes por su apoyo para seguir adelante.

Al Dr. Pedro Garzón de la Mora por su ayuda gentil y desinteresada.

A todos mis amigos, especialmente a Oscar y Antonio que confiaron en mí.

A mis compañeros de laboratorio, en especial Rocio, Oscar y Ulises por apoyarme en el desarrollo de este trabajo.

Al IMSS por permitir realizar este trabajo en sus instalaciones.

A mis compañeros de trabajo y amigos Raúl Hernández y Eduardo Flores Carrillo.

INDICE.

	Título.	1
	Resumen.	2
	Agradecimientos	3
	Índice.	4
I.	Introducción.	5
II.	Antecedentes.	7
2.1.	Esteroides periféricos y neuroesteroides.	7
2.2.	Células gliales. Microglia y astrocitos	11
2.3.	Regiones cerebrales lesionadas. Corteza e hipocampo.	15
2.4.	Aprendizaje espacial y memoria.	17
2.5.	Efectos de lesión cerebral penetrante.	18
2.5.1.	Respuesta inmune celular.	20
2.5.2.	Plasticidad y reparación del tejido dañado.	22
2.5.3.	Formación y efectos de la cicatriz.	24
2.6.	Pruebas conductuales.	26
III.	Planteamiento del problema.	28
IV.	Hipótesis.	29
V.	Objetivos generales.	29
VI.	Materiales y métodos.	30
6.1.	Animales de experimentación.	30
6.2.	Procedimiento general.	31
6.3.	Procedimientos quirúrgicos.	32
6.4.	Paradigmas aplicados. MWM y campo abierto.	33
6.5.	Técnicas inmunocitoquímicas.	35
6.6.	Análisis cuantitativo de células de microglia.	37
6.7.	Análisis estadístico.	38
6.8.	Diseño experimental.	39
VII.	Resultados.	40
7.1.	Efectos de la lesión sobre aprendizaje espacial y memoria.	40
7.2.	Efectos de la lesión sobre actividad locomotriz.	48
7.3.	Estudio inmunocitoquímico.	49
VIII.	Discusión.	54
8.1.	Esteroides.	54
8.2.	Lesión.	55
8.3.	Aprendizaje espacial y memoria.	55
8.4.	Aprendizaje reverso.	59
8.5.	Campo abierto.	59
8.6.	Regulación de la activación y proliferación microglial.	60
IX.	Conclusiones.	63
X.	Bibliografía.	64

I. Introducción.

El cerebro y el cuerpo se comunican entre si no sólo a través del sistema nervioso periférico, sino también a través de la sangre, mediante mensajes hormonales. En el sistema nervioso (SN) existen receptores para todas las hormonas esteroides, lo que establece un importante mecanismo en la regulación de los cambios estructurales y la función neural (McEwen, 1999). La actividad en el SN puede ser generada y modulada por esteroides periféricos y por esteroides producidos *de novo* en el SN llamados neuroesteroides (NE) (Akwa y Baulieu, 1999). El cerebro puede sintetizar esteroides a partir del colesterol y metabolizar los esteroides hormonales en derivados que pueden ser potentes neuromoduladores (Veiga y col., 2004).

Los NE pueden ser sintetizados y actuar en neuronas y células gliales (García-Estrada y col., 1993; Zwain y Yen, 1999; Tsutsui y col., 2000). En las neuronas ejercen acciones moduladoras sobre la transmisión nerviosa relacionada funcionalmente con procesos cognitivos, como aprendizaje y memoria, y aspectos conductuales, como depresión o ansiedad (Rupprecht y Holsboer, 1999). Son capaces de modificar transitoriamente la conectividad sináptica en el tejido cerebral adulto de ratas hembras, regulando el número de terminales sinápticas en contacto con los somas neuronales durante el ciclo estral, la disminución en el número de contactos sinápticos podría estar mediada por células gliales, cuyas prolongaciones desplazarían las sinapsis axo-somáticas (Olmos, 1989); por posibles efectos de regulación en la activación y cambios plásticos fisiológicos sobre la morfología y funcionalidad de estas células.

Por otro lado, está establecido que los tejidos corporales ante lesión o daño reaccionan presentando una respuesta inmune celular, que en el tejido nervioso es iniciada por las células de microglia adyacentes a la zona lesionada, que sufren cambios morfológicos y funcionales y pueden actuar como células presentadoras de antígenos o como macrófagos, la microglia más alejada prolifera y migra hacia la zona afectada; además de producir sustancias mediadoras de la respuesta inmune, también participan en la formación de la cicatriz glial. (Streit, 2001).

La microglia activa a los astrocitos, ambas células son las más importantes en la respuesta glial y comparten características inmuno-reactivas que responden al daño neural (Aloisi, Ria y Adorini, 2000); contribuyen a delimitar la zona dañada y a la formación de la cicatriz glial, la cual puede convertirse en el principal obstáculo para el rebrote de neuritas, la reconexión sináptica y la recuperación funcional (Nieto-Sampedro, 1999; Wilhelsson y col., 2004), independientemente de la magnitud del daño (Bovolenta y col., 1992; Gehrmann y col., 1995). En la gliosis reactiva por lesión cerebral, los esteroides pueden participar modulando la activación, proliferación y migración de células gliales (García-Estrada y col., 1993, 1999; García-Segura y col. 1999a).

Ante la posibilidad de que la cicatriz glial pueda convertirse en un obstáculo para la recuperación estructural y funcional del tejido cerebral dañado, es importante evitar que se establezca en una gran extensión. Una forma sería reduciendo la cantidad de células que participan en la estructura y establecimiento de la cicatriz, que pudiera lograrse con la administración de esteroides, como agentes que modulan negativamente la gliosis reactiva al inhibir, de manera importante, los procesos mitóticos y migratorios de células gliales que incluye la respuesta cerebral por la lesión; y en consecuencia generar un medio ambiente que facilite el restablecimiento funcional en la zona lesionada.

Las regiones lesionadas -corteza cerebral parietal e hipocampo dorsal- fueron seleccionadas por estar estrechamente involucradas, especialmente el hipocampo, en los procesos de aprendizaje espacial y memoria (Tees, 1999; Ramos, 2000).

La recuperación cognitiva puede ser valorada usando el laberinto acuático de Morris (MWM), principal herramienta para estudiar el aprendizaje espacial y memoria, la recuperación de la normalidad tras lesión cerebral, y los posibles beneficios de terapias farmacológicas (Morris, 1981,1984;Skelton, 1998; D' Hooge y De Deyn, 2001).

Los resultados favorables podrían ofrecer alternativas terapéuticas en casos de lesiones traumáticas o de otro tipo en el sistema nervioso central (SNC).

II. Antecedentes.

2.1. Esteroides periféricos y neuroesteroides.

Tanto los esteroides como los NE son sintetizados a partir del colesterol, sobre el que actúa la enzima esteroideogénica citocromo P450_{scc} catalizándolo a pregnenolona (PREG), de la que derivan la dehidroepiandrosterona (DHEA) y todas las hormonas esteroides conocidas (Majewska, 1999; Wilkinson, 2005).

La síntesis de esteroides periféricos se realiza en las glándulas esteroideogénicas, principalmente por acciones a través del eje hipotálamo–hipófisis–gonadas–adrenales (Robel y col., 1999); los esteroides estrogénicos son fundamentales durante el desarrollo prenatal del SNC y la vida postnatal inmediata, durante la etapa adulta regulan respuestas conductuales y neuroendocrinas (García-Segura y col., 1999).

Los NE son sintetizados *de novo* por el tejido nervioso; en células gliales, principalmente en oligodendrocitos (PREG) (Hu y col., 1987) y astrocitos (DHEA); y en neuronas, como las células de Purkinje del cerebelo (Tsutsui y col., 2000). La producción de NE es independiente, al menos parcialmente, de la síntesis esteroidea periférica (Robel y Baulieu, 1995).

Los NE son considerados una nueva clase de neuromoduladores, con efectos sobre la excitabilidad neuronal, tanto por sus acciones directas y rápidas sobre receptores de membrana, como regulando la expresión génica a través de receptores intracelulares.

En el SNC de mamíferos están presentes receptores para todas las hormonas esteroides y NE; el cerebro es órgano meta para hormonas esteroides y zona de extenso metabolismo esteroide, y se le puede considerar el principal órgano endocrino del organismo (McEwen, 1999). Los receptores están involucrados en la inducción del feed-back esteroide y muchos efectos conductuales; en la regulación de la síntesis de neurotransmisores y receptores neuromediadores, hormonas y enzimas

para el metabolismo hormonal; durante el desarrollo embrionario y postnatal ejercen efectos sobre la organización de la circuiteria neural que persisten durante la vida adulta (Robel, Schumacher y Baulieu, 1999).

2.1.1. Mecanismos de acción de en el SNC.

Son varios los mecanismos a través de los cuales los esteroides modifican la función nerviosa. Sus acciones son principalmente autocrinas y paracrinas, sus efectos sobre una célula pueden ser transmitidas a otras células cerebrales, incluso distantes, de forma rápida y específica (Kleinrok y Sieklucka, 1994); también actúan sin interactuar con receptores, ya que algunos esteroides, como la DHEA, poseen efectos antioxidantes (Veiga y col., 2004).

Los NE actúan; con acciones rápidas sobre receptores de membrana, como GABA-A, NMDA y sigma 1, entre otros; la mayoría de los receptores ionotrópicos conocidos modifican su función por los esteroides (Rupprecht, 2003); o regulando la expresión génica vía receptores intracelulares (Louw y col., 2000; Puia-Belelli, 2001), los efectos genómicos permiten la unión con el receptor para luego actuar como factores de transcripción para genes específicos para la síntesis de proteínas específicas (Rupprecht y col., 1999).

2.1.2 Funciones de NE.

Los NE están involucrados en la regulación y control de actividades conductuales y procesos cognitivos, como aprendizaje y memoria; funcionan como neuromoduladores, ya que pueden alterar la excitabilidad neuronal, al modular las corrientes en los canales de calcio y ejercer una regulación bimodal específica, positiva o negativa, sobre la actividad de receptores ionotrópicos para neurotransmisores, como el GABA, ACh, glicina y glutamato, resultando un importante mecanismo de comunicación entre el cerebro y el resto del organismo, que facilita numerosos fenómenos psico-fisiológicos (Baulieu, 1991; Majewska y col., 1992; Mayo y col., 1999; Puia-Belelli, 2001).

Los NE y esteroides periféricos son capaces de modificar transitoriamente la conectividad sináptica en el tejido cerebral adulto, el núcleo arcuato hipotalámico de ratas hembra ha sido utilizado como un modelo de plasticidad sináptica fisiológica, debido a que sufre modificación del número de terminales sinápticas que contactan los somas neuronales a través del ciclo estral (Olmos, 1989). La disminución del número de contactos sinápticos podría explicarse por retracción de las terminales sinápticas ó desplazamiento de las sinapsis axo-somáticas o axo-dendríticas por las prolongaciones gliales, que actuarían a manera de una barrera física para modular la densidad sináptica, y la señal neuronal, al permitir, e impedir, el contacto de las terminales sinápticas con la superficie neuronal (Olmos, 1989). Por cierto los NE pueden ser precursores de hormonas sexuales y sus metabolitos (Baulieu y Robel, 1990; Baulieu, 1991, Azcoitia y col. 2003).

2.1.3 Efectos tróficos y respuesta a lesión cerebral.

En el tejido nervioso, en neuronas y células de glia, los NE también ejercen efectos tróficos y protectores que resultan en aumento de la supervivencia y diferenciación neuronal; tras lesión cerebral, la progesterona y su metabolito, alopregnenolona, facilitan la recuperación y disminuyen la pérdida neuronal (He Jun y col., 2004; Djebaili M. y col., 2005). Los NE inducen hipertrofia en células gliales, como ocurre en astrocitos (Bastianetto y col., 1999; Robel, Schumacher y Baulieu, 1999).

Los esteroides y NE son sustancias implicadas en los procesos plásticos de reparación cerebral al participar en la regulación de la respuesta glial a lesión en el tejido nervioso modulando la reactividad y proliferación de microglia y astrocitos (García-Estrada y col. 1999). Estudios *in vitro* han mostrado que PREG y DHEA actúan como factores tróficos para las células gliales (Streit y col., 1999), por lo que podrían contribuir a lograr la recuperación funcional del cerebro lesionado.

2.1.4 Relación de PREG y DHEA con aprendizaje y memoria.

En el SNC los NE incluyen principalmente PREG y DHEA; ellos son progenitores de toda la serie de esteroides, están presentes en altas concentraciones en el cerebro de ratas y humanos, y ejercen efectos multifuncionales sobre el tejido nervioso intacto y lesionado (Baulieu y Robel, 1990; Akwa y Baulieu, 1999).

En muchos experimentos claramente se ha demostrado que los esteroides, particularmente los que actúan como antagonistas a GABA, como PREG y DHEA, tienen propiedades que favorecen el aprendizaje y aumentan la memoria (Mayo y col., 1999; Schumacher, Akwa, Guennoun y col., 2000). La acción inhibitoria del GABA en los procesos de aprendizaje y memoria es evidente, debido a que sus antagonistas facilitan la potenciación hipocampal a largo plazo (LTP) relacionada con procesos cognitivos, como la adquisición y recuperación de una tarea aprendida; la LTP es un proceso sináptico de larga duración, mediado por neurotransmisores excitatorios, como el glutamato (Rupprecht y col., 1999).

Las acciones de modulación en la transmisión sináptica de PREG y DHEA incluyen: inhibición de la actividad en receptores GABA-A, y activación de los receptores NMDA y AMPA a glutamato, que es acompañada por aumentos en la despolarización, la excitación y la plasticidad neuronal (Wolf y Kirschbaum, 1999); sobre receptores nicotínicos facilitan la liberación de acetilcolina en el hipocampo, (Darnaudéry y col., 2000). Adicionalmente; PREG y DHEA, respectivamente, aumentan la duración de las fases IV y la V o MOR (movimientos oculares rápidos) del sueño, que se cree están relacionadas con eventos de consolidación de la memoria del aprendizaje generado durante el período de vigilia (Friess, 1995).

Por sus acciones sobre el SN, PREG y DHEA facilitan el aprendizaje espacial, favorecen la memoria de corto y largo plazo, y consecuentemente mejoran la adquisición, retención y recuperación de tareas aprendidas en roedores, además de revertir trastornos amnésicos (Mayo y col., 1999; Robel y col., 1999). Por otro lado, se ha

demostrado que DHEA tiene propiedades ansiolíticas y antiagresivas (Zwain T., Yen S., 1999).

En este estudio se analizó la capacidad de PREG y DHEA como moduladores negativos de la proliferación de células de microglia en el cerebro adulto de ratas lesionadas por una herida penetrante; los esteroides fueron seleccionados por ser progenitores de toda la serie de hormonas esteroides, estar presentes en altas concentraciones en el cerebro de ratas y humanos y ejercer acciones multifuncionales sobre el SNC. De obtenerse resultados favorables, el uso de estos compuestos brindará una alternativa terapéutica diferente para inhibir la reactividad y proliferación excesiva de microglia y favorecer la recuperación de la normalidad en el tejido cerebral lesionado.

2.2. Células gliales.

Es la población celular del sistema nervioso que no conduce impulsos nerviosos, se distinguen dos tipos básicos; microglia y macroglía, la última compuesta por astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias y células de Schwann (Lawson y col., 1991). El tejido glial ha sido propuesto como mediador de las acciones de esteroides sobre el sistema nervioso, como modulador del microambiente hormonal de las neuronas en cerebro normal y lesionado, y como potenciador del desarrollo y diferenciación sexual del cerebro, plasticidad sináptica, reparación cerebral y vejez, así como en la función inmune cerebral (Jordan, 1999).

2.2.1. Células de microglia.

Estas células son llamadas macrófagos cerebrales y son representantes del sistema inmune intrínseco del cerebro, con capacidad para atacar micro-organismos invasores, retirar detritus celulares, reaccionar ante estímulos antigénicos y promover la reparación tisular (Dihné y col., 2001).

Localización.

En el SNC las células de microglia integran una amplia red presente tanto en la sustancia blanca como en la gris, son más abundantes en la sustancia gris y el espacio perivascular, allí forman parte de una barrera inmune cerebral (Dalmat, 1998); en el cerebro adulto representan entre el 5 y 15% del total de células (Jordan, 1999).

Origen.

Su origen es controvertido, ya que se han propuesto dos orígenes distintos; por un lado, el origen mesodérmico de microglia apoyado por la similitud en las características ultraestructurales, morfológicas, inmunofenotípicas y funcionales de la microglia con los macrófagos y monocitos (Santambrogio y col., 2001; Hess y col., 2004); y por el otro lado se propone un origen ectodérmico considerando que la microglia ya está presente en el SNC durante las etapas embrionarias tempranas de desarrollo neural (Streit, 2001b).

Morfología.

Las células de microglia pueden presentar distintos estados morfológicos y funcionales, ya que poseen la capacidad de reaccionar y adaptarse a diferentes microambientes, en el tejido sano y lesionado (Davis y col., 1994). En el tejido nervioso adulto se han establecido formas ramificadas, ameboides y reactivas (Fig. 1).

Actividades en el tejido sano.

La forma ramificada o en reposo está presente en el tejido sano, son células con soma pequeño de 5-10 μm de diámetro, del que surgen numerosas ramificaciones de superficie rugosa o espinosa, en estas condiciones; la superficie citoplasmática contribuye al mantenimiento de la homeostasis del medio ambiente extracelular mediante eliminación de compuestos solubles y recaptura de neurotransmisores, además de la producción de moléculas neurotróficas (Nakajima y Kohsaka, 2001).

Las células de microglia pueden expresar por lo menos 12 diferentes canales iónicos (Eder y DeCoursey, 2001) y una variedad de receptores en su superficie celular, son capaces de recibir información acerca de las condiciones físico-químicas del medio

extracelular, de la integridad del parénquima cerebral y de la viabilidad de las neuronas y otras células, así ellas podrían actuar como “sensores” cerebrales, capaces de detectar y reaccionar ante estímulos nociceptivos que alteran la homeostasis del tejido nervioso (Davis y col., 1994; Streit., 2001a).

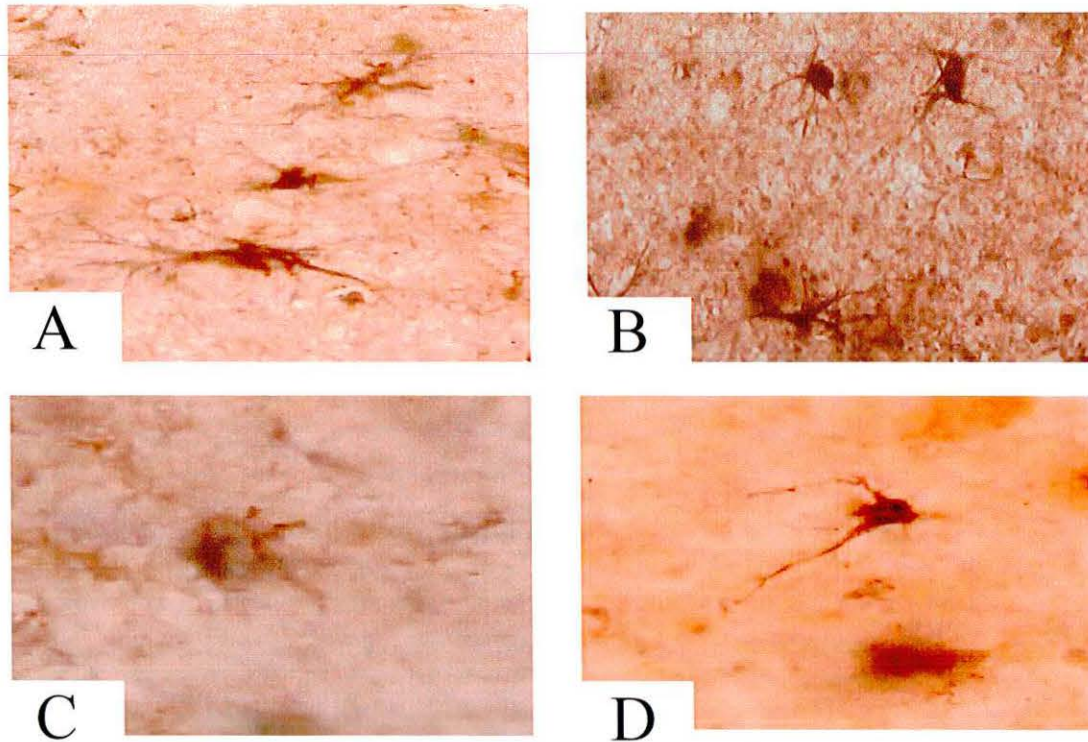


Fig. 1. (A) Microglia en estado de reposo, con largas y numerosas prolongaciones citoplásmicas. Tras lesión del tejido nervioso, (B) la microglia se activa y sufre transformaciones morfológicas, sus ramificaciones se acortan y engruesan haciéndose reactiva. (C-D) Microglia ameboides, con capacidad de macrófago.

Activación.

En reposo pueden transformarse rápidamente en activadas o reactivas, o hasta macrófagos (Streit, 2000); y se ha considerado que existe una activación continua de la microglia (Town, Nikolic, Tan, 2005). El estímulo inicial para la activación podría involucrar la señalización del receptor por moléculas que normalmente no están en el espacio intercelular o aumentos extracelulares de tales moléculas, o la desaparición de una señal constitutiva, por ejemplo la pérdida de una interacción inhibitoria que permite la activación (Hanisch, 2001).

La microglia se activa ante casi cualquier condición patológica que afecte al SN, incluyendo rompimiento de la homeostasis intra y extracelular, lesiones traumáticas, señalización neuronal, enfermedades infecciosas, neurodegenerativas o autoinmunes (Streit, 2001). Los aumentos en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH-II), moléculas de adhesión y el factor inflamatorio alográfico -1 (AIF-1) son signos tempranos de activación microglial en respuesta a daño cerebral (Aloisi y col., 2000; Schwab y col., 2001); *in vitro* se ha observado que la forma ramificada se puede transformar en reactiva y ameboide (Slepko, 1996).

2.2.2. Astrocitos.

Los astrocitos, son las células más abundantes en el cerebro, tienen origen neuroectodérmico, son las células gliales de mayor tamaño, con diámetro de 10-40 μm , de morfología estrellada por sus abundantes prolongaciones citoplásmicas que forman un revestimiento neuronal, en zonas que carecen de cobertura por oligodendrocitos, y sobre capilares sanguíneos (Jordan, 1999). Los astrocitos se acoplan entre ellos por medio de uniones comunicantes que permiten el flujo inter-astrocitario de iones y moléculas pequeñas (Pekny y Nilsson, 2005).

En el tejido cerebral se distinguen dos tipos de astrocitos; los fibrosos, con prolongaciones citoplásmicas de mayor tamaño y más numerosas, localizados en la materia blanca, con funciones principales de sostén; y los protoplásmicos, de estructura más compleja, presentes en la materia gris, son componentes esenciales de la barrera hematoencefálica y participan en la regulación del metabolismo extracelular (Mong y McCarthy, 1999).

Además, los astrocitos participan en la modulación sináptica y actúan como reserva de neurotransmisores (Tapia, 1992, Jordan, 1999). Por su alto contenido de proteína ácida fibrilar en los filamentos intermedios que componen su citoesqueleto, los astrocitos se identifican fácilmente usando anticuerpos dirigidos contra ella (García-Estrada y col., 1995).

Los astrocitos comparten con la microglia características inmunes, ambas son las células gliales más importantes en la respuesta inmune celular y en el proceso de reparación del tejido nervioso dañado (Rabchevsky, 2001). En este estudio la respuesta glial fue resultado de la lesión cerebral penetrante provocada en los sujetos experimentales.

2.3. Regiones cerebrales lesionadas.

La corteza parietal y el hipocampo dorsal principalmente fueron afectados por la lesión; ambas regiones están relacionadas con aprendizaje espacial y se conectan a través de los tractos temporo-amónicos (Delatour y Gisquet, 2000).

2.3.1. Corteza parietal.

Se localiza en la región dorsal del cerebro, posterior a la región frontal y por delante y arriba del lóbulo occipital, lateralmente se relaciona con la corteza temporal. Recibe aferencias de los núcleos lateral-posterior, lateral-dorsal y posterior del tálamo. Mantiene conexiones recíprocas con las cortezas occipital primaria y secundarias medial y lateral; temporal primaria; cíngulo y corteza prefrontal medial (Tees, 1999).

En la rata la actividad principal que la corteza parietal desarrolla es sensorial, es una zona de convergencia multimodal, con neuronas que responden a estímulos visuales y somatosensoriales relacionados espacialmente y con el mantenimiento de la información mnemónica relacionada a la dirección de la cabeza, ya que es responsable del movimiento dirigido en relación al estímulo en el espacio y contribuye a la formación de representaciones espaciales (Tees, 1999).

Estudios electrofisiológicos y en cerebros lesionados experimentalmente, sugieren la participación de la corteza parietal en la formación de representaciones o mapas espaciales. Al lesionarse se afectan la adquisición inicial de la información espacial y el desempeño respecto a ésta -navegación espacial- (Save y Poucet, 2000; Alexinsky, 2001).

2.3.2. Hipocampo.

La formación hipocampal pertenece al sistema límbico, en la rata se localiza en la parte media del lóbulo temporal; está formado por: la corteza entorrinal, el giro dentado, el asta de Amón y el complejo subicular (Andersen, 1995; Storm-Mathisen, 1997).

Las principales aferencias corticales del hipocampo provienen de la corteza entorrinal ipsilateral y de fibras contralaterales; a través del fórnix llegan axones desde el núcleo septal medial, la banda diagonal de Broca y el tallo cerebral (Witter, 1993). El hipocampo proyecta numerosas fibras hacia áreas corticales (entorrinal, perirrinal, retroesplénica y cingulada) y áreas subcorticales (septum, región preóptica, tálamo, hipotálamo, núcleo accumbens, cuerpo mamilar y amígdala) (Jarrard, 1993; Storm, 1997).

La corteza entorrinal contiene fibras corticales aferentes, como los tractos temporo-amónicos que conectan la corteza parietal con el hipocampo, y circuitos corticales mixtos, como las conexiones hipocampales con las cortezas prelímbica e infralímbica en la corteza prefrontal medial (Delatour y Gisquet, 2000).

En esta región cerebral están presentes diversos neurotransmisores; GABA, glutamato, acetilcolina, noradrenalina y serotonina, también existen neuropéptidos como el VIP o la somatostatina, entre otros (Koda y Bloom, 1977; Kosaka y col., 1988).

El hipocampo está implicado en funciones cognitivas como aprendizaje y memoria, en especial se le relaciona con el procesamiento de información espacial (Kandel y Hawkins, 1992; McEwen, 1999). Numerosos estudios han reportado deterioro severo y selectivo en aprendizaje espacial y memoria en animales con daño hipocampal (Morris y col., 1982; Jett y col., 1996; Scheff y col., 1997; Zou y col., 1999).

2.4. Aprendizaje espacial - memoria.

Los mecanismos neurales que generan los procesos de aprendizaje espacial y memoria son poco conocidos. Resultados de investigaciones involucran a varias estructuras encefálicas en estos procesos, incluyendo: hipocampo, estriado, ganglios basales, cerebelo y áreas neocorticales como las prefrontal y parietal, entre otras (Walter y col., 2003; Levin y Hanten, 2005). Para el establecimiento del aprendizaje espacial-memoria se requieren la integridad de la formación hipocampal, la activación de los sistemas glutamatérgico y colinérgico y la inhibición de los sistemas GABAérgicos y opiodérgicos (McNamara y Skelton, 1993). El aprendizaje espacial es la capacidad para aprender y expresar conocimiento de relaciones espaciales entre pistas o un punto de referencia en el medio ambiente.

Estudios en animales proponen que el hipocampo está dedicado a la creación y uso de mapas espaciales o cognitivos, mediante estudios neuropsicológicos y neurofisiológicos se ha demostrado que; el daño al hipocampo o sus conexiones resulta en deterioro del aprendizaje espacial; y la existencia en el hipocampo de neuronas piramidales o granulares que disparan impulsos nerviosos cuando el animal está en una ubicación en particular -células de lugar-, como señalando la ocupación de una coordenada en el mapa espacial (Eichenbaum, 1999a).

Durante el aprendizaje se incrementa la eficiencia sináptica por la asociación de la actividad coincidente PRE y post sináptica entre dos neuronas, generando cambios que fortalecen la sinapsis, como sucede en la potenciación a largo plazo -LTP- (long-term potentiation) hipocampal, una forma de plasticidad sináptica de larga duración propuesta como modelo de formación de aprendizaje y memoria por sus propiedades típicas de memoria; rápida inducción, resistencia a la interrupción y larga duración, esta potenciación es inducida por la correlación entre la activación presináptica y la despolarización post-sináptica; la LTP es mediada por el glutamato, principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso (Trudeau y col. 2004).

La relación LTP-aprendizaje y memoria, se apoya en la alta correspondencia entre su inducción y los patrones endógenos de actividad neural que acompañan al aprendizaje; la LTP es inducida óptimamente por estimulación colinérgica aferente diseñada en frecuencia theta (4-12 Hz), que facilita la depresión de receptores GABA-B de interneuronas inhibitorias, generando la suficiente despolarización y activación de los receptores NMDA -lo que proporciona fuerte soporte para la participación de la LTP en aprendizaje y memoria (Maren y Baudry, 1995); otra evidencia son las manipulaciones farmacológicas o genéticas que deterioran la inducción de LTP y también deterioran la adquisición de la conducta dependiente del hipocampo (Foster, 1999).

La actividad theta hipocampal que ocurre durante el aprendizaje, es generada por interacción de la acetilcolina (ACh) sobre receptores muscarínicos; en aprendizaje espacial las células piramidales en CA-1 exhiben cambios específicos en la expresión de receptores muscarínicos para ACh; el theta colinérgico favorece la habituación y filtración de estímulos insignificantes, simultáneamente las sinapsis hipocampales presentan alto grado de plasticidad y pueden ser modificadas (Brown, Rush y McEwen 1999; Van der Zee y Luiten 1999).

En la rata, las células hipocampales activadas durante el aprendizaje de una tarea exploratoria, presentan los mismos patrones de actividad eléctrica al ejecutar la tarea y durante el sueño de ondas lentas, lo cual sugiere que durante el sueño ocurren en el hipocampo acciones que podrían relacionarse con el procesamiento de la información sensorial -registrada por el cerebro durante la vigilia- y el almacenamiento de la memoria (Rotemberg, 1992; Aranskowsky, 1997).

2.5. Efectos de lesión cerebral penetrante.

La lesión cerebral penetrante provoca una serie de efectos agudos en el tejido lesionado; los efectos inmediatos sobre el tejido nervioso son causados por la penetración del cuerpo extraño, que a través de su trayecto provoca; en las neuronas, ruptura de fibras nerviosas con daño axonal y deafferentación, seguidos por muerte neuronal, que desconecta, al menos parcialmente, la zona dañada del resto de la

conectividad nerviosa y, consecuentemente provoca deterioro funcional en la vasculatura (Bramlett y col., 1997).

La disrupción de los capilares sanguíneos provoca reducción del flujo sanguíneo y del aporte de oxígeno, glucosa y otros elementos, se forman zonas isquémicas, seguidas de muerte neuronal; la barrera hematoencefálica lesionada permite la entrada de proteínas antigénicas y células extracerebrales, con alteraciones microvasculares y edema inflamatorio (Stichel y Müller, 1998).

Las neuronas afectadas se despolarizan, y liberan al espacio extracelular sustancias que pueden generar efectos tóxicos, como aminoácidos excitatorios, Ca^{2+} , radicales de oxígeno o hierro, que generan cambios profundos en la composición del líquido extracelular y rompen la homeostasis (Bramlett y col., 1997). El incremento extracelular de glutamato activa los receptores NMDA y se genera aumento en el flujo intracelular de Ca, cuya acumulación activa eventos degenerativos relacionados con síntesis de enzimas proteolíticas, que finalmente llevan a disfunción y muerte neuronal (Carbonell y Grady, 1999).

Una proporción importante de neuronas muere por apoptosis, mecanismo determinado genéticamente de muerte celular programada, posiblemente inducida por la desconexión sináptica y acumulación extracelular de neurotransmisores excitatorios y Ca^{2+} que deterioran la membrana plasmática y conducen a apoptosis (Hu y col., 2001).

Las neuronas apoptóticas están entremezcladas con neuronas necróticas; en la zona de penumbra la apoptosis se activa durante la primera semana después de la lesión y la pérdida neuronal interrumpe la conectividad sináptica en la zona dañada (Stoll, Jander y Schoeter, 2002). En el tejido lesionado algunas citocinas, como IGF-1, BDNF, sintetizadas y secretadas por microglia y astrocitos, ejercen efectos protectores en el tejido, sin embargo; algunas como el $\text{TNF}\alpha$ pueden inducir apoptosis (Kataoka y col., 2000).

Lesiones en la fimbria-fórnix interrumpen muchas conexiones que pasan por el hipocampo, la transmisión hipocampal-subicular hacia el núcleo accumbens y las proyecciones colinérgicas desde el núcleo del rafe hacia el hipocampo dorsal. A nivel conductual, en estas ratas lesionadas se manifiesta deterioro en la capacidad de adquisición del recuerdo de la posición de una plataforma sumergida en el agua, según el paradigma descrito por Morris, (D'Hooge, De Deyn 2001).

Se considera que el hipocampo tiene un papel central en el procesamiento de información espacial, sin embargo, hay otras estructuras que también participan, en particular se ha sugerido que la corteza parietal asociativa contribuye significativamente a la formación de representaciones espaciales (Save y Poucet, 1999). Por otro lado, se ha reportado que las lesiones hipocampales provocan hipermotricidad de los animales afectados (Fanselow, 2000).

2.5.1. Respuesta inmune celular al daño del tejido nervioso.

Las lesiones traumáticas cerebrales provocan respuestas fisiopatológicas en las neuronas afectadas y células gliales y endoteliales adyacentes; también participan monocitos, linfocitos y mediadores inflamatorios extracerebrales que penetran al parénquima cerebral a través de la disrupción vascular provocada por la lesión, y participan en la generación de la respuesta inmune celular (Salhia, 2000). En el proceso inflamatorio se involucran numerosos linfocitos T localizados principalmente en el espacio perivascular y en los bordes de la lesión, y prevalecen de tres a siete días (Stoll, Jander y Schoeter, 2002).

La reacción glial encabeza la respuesta celular; inicia en el epicentro de la lesión y se extiende hacia la periferia, es inducida por detritus celulares ó compuestos liberados desde las células lesionadas y por la entrada de antígenos extracerebrales hacia la zona de lesión (Streit., 2002).

Las células de microglia, son consideradas componente principal de la respuesta lesión neural (Hausmann y Betsz, 2002); al activarse exhiben cambios característicos

que afectan la morfología y el número de células; las prolongaciones citoplásmicas se acortan y engruesan, mientras el soma se alarga entre 5 y 20 minutos después de la lesión (Stichel y Müller, 1998; Koshinaga y col., 2000; Drew y col., 2003).

En ratas la respuesta microglial es rápida y persiste durante 4 semanas en la zona dañada, la proliferación se presenta de 3 - 4 días después de la lesión; además la microgliosis induce a la activación astrocitaria, que se mantiene durante 3 semanas; después de 72 horas se observó rebrote de fibras nerviosas (Jensen, 1994; Streit y col., 1999).

A nivel molecular cambian los patrones de expresión de moléculas en la superficie celular y de sustancias mediadoras de la respuesta inmune, citocinas y factores tróficos producidos y liberados, como las citocinas interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), que activan la proliferación y aumentan la adhesión celular, pero que también pueden producir radicales libres y citotoxicidad directa en los tejidos vecinos (Levi, 1997; Drew y col., 2003).

Los efectos benéficos o tóxicos de las citocinas liberadas por neuronas y células gliales tras lesión cerebral, podrían determinarse conociendo la concentración de citocinas inflamatorias; las citocinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-12) inducen neurodegeneración, y las citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, NGF, IGF-1) favorecen la supervivencia neuronal (Szelenyi, 2001). La lesión cerebral provoca; en las células gliales la activación de la síntesis del NGF (Factor de Crecimiento Nervioso); y en neuronas la activación de receptores de factores neurotróficos (Lorigados-Pedre y col., 2004; Lee y col., 2005).

Ante estímulos antigénicos las células de microglia se activan y establecen la respuesta inflamatoria en el SNC al actuar por medio del interferón gamma con linfocitos T específicos (Rabchevsky 2001), con la expresión aumentada o *de novo* expresada del CMH II y de moléculas de adhesión (Jensen, 1994; Mor y col., 1999; Aloisi y col., 2000).

Mor y col. (1999), hipotetizaron que los estrógenos modulan la función inmune del cerebro y la conectividad sináptica, al actuar directamente sobre microglia y cambiar su expresión de citocinas, factores de crecimiento y proteínas de su superficie celular (Jordan, 1999).

En la microglia activada aumenta la inmunorreactividad para difosfatasa nucleosídica y secreta Il-1, con lo que participa en la neovascularización y activación de astrocitos (Stollg y Jander, 1999); ambas estirpes celulares desarrollan acciones neuroprotectoras que, ante concentraciones neurotóxicas, permiten la recaptura de glutamato del medio extracelular, evitando el daño oxidativo que podría resultar en muerte neuronal (Nakajima y col., 2001).

2.5.2. Plasticidad y reparación del tejido cerebral lesionado.

La plasticidad cerebral es un proceso continuo que resulta de cambios estructurales y funcionales en el tejido cerebral, provocados por estímulos biológicos, físicos ó químicos generados dentro del organismo o por el medio ambiente; también puede inducirse experimentalmente (Bovolenta y col., 1992; Luquín y col., 1993). Los cambios plásticos tras lesión del SNC hacen posible la restauración de las funciones neurológicas (Gómez-Fernández, 2000). Los esteroides hormonales y NE participan en los procesos plásticos de reparación cerebral regulando la reactividad y proliferación de astrocitos (García-Estrada y col. 1999) y posiblemente microglia.

Tras lesión cerebral traumática se genera de forma inmediata la activación microglial, el reclutamiento de macrófagos y la limpieza de detritus celulares (Stollg y Jander, 1999). La remodelación sináptica, dendrítica, axonal y glial son resultado potencial de lesión cerebral, para que ocurran estos cambios se requiere de diversas proteínas, cuya síntesis es generada por la actuación de receptores intracelulares. Parte del proceso de restauración es la neoangiogénesis y la regeneración de la lámina basal que acompaña a la astrogliosis reactiva, la cual inicia a los dos días después de lesión cerebral en roedores (Salhia y col., 2000).

Por otro lado, los cambios morfológicos resultantes después de lesión cerebral parecen ser muy similares a aquellos vistos después del aprendizaje, lo que sugiere que los mecanismos básicos del cambio sináptico cerebral pueden ser utilizados en ambas funciones (Ivanco y Greenough, 2000). El concepto de plasticidad sináptica se refiere a modificaciones en la conectividad sináptica orientada a mejorar la eficiencia sináptica y la respuesta neuronal. En casi todos los casos de plasticidad sináptica se involucra un aumento en el calcio intracelular (Foster, 1999).

La plasticidad del hipocampo es altamente influenciada por esteroides y se refleja principalmente por cambios en la densidad de las espinas dendríticas (McEwen, 1999). Los esteroides modulan la gliosis reactiva después de lesión cerebral traumática, esto sugiere la participación de células gliales en la respuesta restaurativa cerebral (García-Estrada y col., 1999; García-Segura y col. 1999).

A diferencia de las neuronas, la activación glial es una respuesta graduada, estereotípica, observada después de trauma directo y lesión axonal, en isquemia, enfermedades neurodegenerativas, infecciosas o autoinmunes; esta similitud de la respuesta glial ante diversos agentes etiológicos sugiere que esos cambios celulares reflejan un programa, conservado a través de la evolución, de gran importancia para la protección y reparación del sistema nervioso lesionado (Raivich, 1999).

La respuesta glial es fundamental en los mecanismos de reparación del tejido nervioso lesionado; en los primeros estadios, las células gliales delimitan la extensión del daño y permiten formar una envoltura hemostática que excluye la entrada de células y citotoxinas al parénquima cerebral, restablecen la barrera hemato-encefálica y algunos circuitos neurales dañados (Hozumi y col., 1990), contribuyen a estabilizar la zona afectada mediante acciones tróficas y protectoras que favorecen la regeneración de fibras neurales y vasos sanguíneos, y la supervivencia neuronal (Hortega y Penfield, 1927; Reir, 1986; Cortez y col., 1989; Mucke y col. 1991; Logan y col., 1992).

Los productos liberados durante la gliosis reactiva son cruciales para generar las respuestas celulares que permitan restablecer la integridad del tejido y la

subsiguiente reparación, tales como iniciar, guiar y coordinar la infiltración de células inmunes en el tejido cerebral o inducir la síntesis y secreción de proteínas de matriz celular que favorecen la restauración tisular (Gehrmann y col., 1995; Hanish, 2002).

La microglia y los astrocitos participan en la reparación del tejido dañado produciendo factores neurotróficos (Kitamura y col., 2005) como el TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante β 1), con efectos de gran importancia que promueven la neoangiogénesis y activan; la migración y proliferación celular, la producción de moléculas de matriz extracelular, la quimiotaxis y la formación de la cicatriz glial (Rabchevsky, 2001; Zhang y col. 2003). Los astrocitos expresan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) un potente y específico factor de crecimiento angiogénico (Salhia y col., 2000).

Las proteínas de matriz extracelular proporcionan un andamiaje para la reorganización del parénquima cerebral, regulan el micro ambiente cerebral y mantienen la barrera hematoencefálica. En el tejido nervioso lesionado se expresan niveles aumentados de proteasas para remodelar la matriz extracelular, y disponer de los sustratos necesarios para el proceso de reorganización del tejido (Kataoka y col., 2000).

2.5.3. Formación y efectos de la cicatriz glial.

El daño al SNC desencadena una serie de eventos celulares y moleculares durante varios días, la reacción glial conduce a la formación de una cicatriz; que es una estructura envolvente, con diferentes células arribando y participando en tiempos diferentes. En trauma cerebral las primeras células en llegar al sitio de lesión son microglia y macrófagos periféricos, de 3-5 días post-lesión arriban precursores de oligodendrocitos, astrocitos y células meníngeas (Tatsumi y col., 2005).

La cicatriz puede generar efectos físico-químicos adversos que frecuentemente inhiben el rebrote de neuritas, el medio ambiente glial es la causa principal de falla en la regeneración axonal, la reconexión sináptica y la remielinización (Nieto-Sampedro, 1999). La cicatriz (Fig. 2) puede convertirse en una barrera física que impida el

crecimiento, el paso o la reconexión de fibras nerviosas (Wilhelsson y col., 2004) o, por otro lado; debido a los efectos inhibitorios sobre la regeneración neuronal que tienen algunas moléculas, como tenascina, brevican, neurocan, óxido nítrico o radicales libres producidas por las células que forman parte de la cicatriz (Fawcett y Asher, 1999).

La regeneración axonal depende de la capacidad del axón, y de la permisividad del medio ambiente que resulta principalmente de la presencia de numerosas células gliales en el sitio de lesión y del balance entre las moléculas que promueven el crecimiento y aquellas que lo inhiben, producidas y liberadas por estas células (Fawcett y Asher, 1999).



Fig. 2. La imagen muestra la cicatriz a nivel de la corteza cerebral (flechas) y el cuerpo calloso (*). La cicatriz glial es parte del proceso de reparación del tejido lesionado.

Una estrategia para promover la regeneración axonal podría ser la remoción de células participantes en la cicatriz, además de evitar la síntesis o degradar las moléculas inhibitorias. Por esta razón, resulta importante evitar que la cicatriz alcance

una gran extensión, que pudiera deteriorar la recuperación funcional de la zona afectada.

2.6. Pruebas conductuales.

Paradigma de Morris.

El laberinto acuático de Morris (MWM) es una prueba usada para estudiar procesos cognitivos, investigar los mecanismos implicados durante la recuperación funcional tras lesión cerebral, y conocer los posibles efectos benéficos de terapias neurocognitivas (Skelton, 1998; D' Hooge y De Deyn, 2001); permite evaluar la integridad de los circuitos corticales e hipocampales, relacionados con aprendizaje espacial, no espacial y memoria (Morris, 1981,1984).

Para que se produzca aprendizaje en este paradigma es necesaria la asociación de procesos cognitivos que almacenen y recuperen información espacial y permitan planificar las estrategias de navegación (Stewart y Morris., 1993). Las alteraciones en la capacidad de aprendizaje espacial indican trastornos funcionales del hipocampo y su circuitaria (Olton y col., 1978; Jarrard, 1993).

La lesión se provocó para analizar los efectos de PREG y DHEA sobre la proliferación microglial, y determinar las alteraciones cognoscitivas por efecto de la lesión y del tratamiento posterior con los esteroides mencionados.

Actividad locomotriz en campo abierto.

El fundamento de esta prueba está basado en que, al introducir a la rata a un ambiente nuevo se propician dos conductas instintivas: la curiosidad, que induce a explorar su entorno y el temor a desplazarse en un ambiente que resulta desconocido. Del balance en el estado psiconeural de la rata, resultará su elección por alguna de las dos opciones. Por otro lado, se ha reportado que en ratas las lesiones del hipocampo, provocan hiperactividad que promueve la actividad exploratoria (Fanselow, 1999). La prueba se aplicó con el fin de verificar si la lesión no afectó la capacidad de locomoción en las ratas de experimentación.

Por otro lado, la activación y proliferación microglial excesivas favorecen, directamente el aumento en el tamaño la cicatriz, e indirectamente por que regula la proliferación astrogliar; los astrocitos son las células más abundantes en la cicatriz, la cual puede deteriorar la recuperación funcional de la zona lesionada (Wilhelsson y col., 2004), por lo que la inhibición microglial podría generar un medio ambiente más propicio para la regeneración estructural y funcional del tejido lesionado.

Debido a que los esteroides poseen efectos inhibitorios sobre proliferación y transformación de astrocitos, en este estudio nos propusimos determinar si los esteroides también inhiben la proliferación en células de microglia, y si la inhibición genera efectos que favorezcan el aprendizaje y memoria en los animales lesionados, al disminuir el tamaño de la cicatriz y la concentración de sustancias tóxicas en el sitio de lesión.

III. Planteamiento del problema.

En el tejido cerebral lesionado las células de microglia inician la respuesta inmune celular, presentan cambios morfológicos seguidos de proliferación y migración que son benéficos en los primeros estadios post-lesión, sin embargo; su activación y proliferación excesivas pueden deteriorar el proceso de reparación del tejido nervioso lesionado. El modelo de lesión bilateral de la corteza cerebral parietal y el hipocampo dorsal se seleccionó debido a la alta sensibilidad de estas regiones a los efectos de esteroides y por su importante participación en el aprendizaje espacial y memoria. La hipótesis propuesta está basada en los efectos inhibitorios de los neuroesteroides sobre la astrogliosis (García-Estrada y col. 1999; García-Segura y col. 1999^a). Por lo tanto, una vez realizada la lesión cerebral penetrante y administrar los esteroides PREG ó DHEA, se modulará a la baja la proliferación microglial, reduciendo el tamaño de la cicatriz y la concentración de sustancias inhibitorias de la regeneración neuronal, propiciando un medio ambiente más favorable para la reparación del tejido lesionado y la reconexión sináptica, cuyas manifestaciones funcionales serán estudiadas aplicando pruebas cognitivas de aprendizaje espacial y memoria. Además se valorará la actividad locomotriz para asegurarnos que la lesión no causó trastornos motores que pudieran alterar el rendimiento durante las pruebas de aprendizaje espacial y memoria.

IV. Hipótesis.

Los esteroides PREG y DHEA inhiben la proliferación de células de microglia tras lesión penetrante de la corteza cerebral y el hipocampo dorsal de ratas machos adultos, y reducen la severidad de los déficit cognoscitivos resultantes.

V. Objetivos generales.

- 1 Determinar los efectos de PREG o DHEA sobre reactividad y proliferación microglial, tras lesión penetrante de la corteza cerebral y el hipocampo dorsal de ratas machos adultas castradas.
- 2 Estudiar los efectos de la lesión y la influencia de los esteroides sobre aprendizaje espacial, memoria y actividad locomotriz.

VI. Materiales y métodos.

6.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron 21 ratas *Swiss-Wistar* machos, adultos jóvenes de 300 g de peso, procedentes del bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO-IMSS) que fueron alojadas en jaulas transparentes de policarbonato de 40 cm de largo, 25 cm de ancho y 15 cm de altura. Durante todo el experimento los animales se mantuvieron a $20 \pm 2^\circ$ C de temperatura, humedad relativa del ambiente entre 50 y 55 %, ciclos de luz-oscuridad de 12:00 horas y alimentados con dieta balanceada para roedores (Ralston-Rations USA) y agua potable "ad libitum".

Los animales fueron castrados y lesionados bilateralmente en corteza cerebral e hipocampo, y separados en tres grupos (n = 7) para recibir el tratamiento por inyección subcutánea:

1. Control-vehículo, 0.5 ml de vehículo durante 5 días post-lesión.

Tratamiento con esteroides.

2. PREG, 2 mg/ 0.5 ml de vehículo durante 5 días post-lesión, para un total de 10 mg.

3. DHEA, 2 mg/ 0.5 ml de vehículo durante 5 días post-lesión, para un total de 10 mg.

4. Control Intacto. Para comparar y valorar los resultados experimentales se utilizaron como referencia los resultados obtenidos en las mismas pruebas por ratas intactas en experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio.

El vehículo utilizado fue una mezcla compuesta de 40% de aceite de sésamo, 40% de glicerol y 10% de agar.

6.2. Procedimiento general.

- 1- Castración. Ratas de 4 semanas de edad, con peso de 100 gr.
- 2- Lesión cerebral. Día (D) 1. Ratas de 2.5 meses, con peso de 250-300 gr.
- 3- Administración de:
 - a) Esteroides-vehículo, 2 mg-0.5 ml/rata, D 1- 5
 - b) BrdU, 12.5 mg/rata, D 1- 4.
- 4- Pruebas conductuales:
 - a) MWM. Aprendizaje espacial, D 10- 16.
 - b) Campo abierto. Actividad locomotriz, D 18- 20.
 - c) MWM. Aprendizaje reverso, D 22- 24.
- 5- Técnicas inmunocitoquímicas:
 - 1- Desenmascaramiento electroquímico.
 - 2- Doble inmunohistoquímica para detección de de microglia y BrdU.
 - 3- Montaje en portaobjetos de cortes histológicos de 50 μ del tejido lesionado.
- 6- Análisis cuantitativo de células de microglia.
Microscópio de luz a 40X (0.78 mm²/campo visual).
- 7- Análisis estadístico:
 - a) Prueba de ANOVA
 - b) Prueba de Tukey

$p < 0.05$.

6.3. Procedimientos quirúrgicos.

Castración.

Los animales fueron anestesiados por vía ip con pentobarbital sódico (50 mg/kg), para luego ser colocados en decúbito dorsal; en la piel del escroto, a nivel de los conductos deferentes, se hizo una incisión lineal de 1 cm, para expulsar el testículo de su bolsa escrotal, se liberó el epidídimo y se localizó el paquete vascular. Mediante hemostasia por trombosis se separó cada testículo y se cerró la herida con 2 puntos separados en la superficie escrotal utilizando seda trenzada de 3 ceros.

Lesión estereotáxica.

La corteza cerebral parietal y el hipocampo dorsal de ambos hemisferios fueron lesionados con una cánula sólida de acero inoxidable con punta cónica y diámetro máximo de 1 mm.

Los animales fueron anestesiados por vía ip con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso), se inmovilizaron en un aparato estereotáxico (David-Kopff), con la barra de incisivos en posición dorso-ventral de -3.3 mm. La lesión del hipocampo izquierdo correspondió a las coordenadas (expresadas en mm), para el orificio anterior, 1.3 mediolateral, 7.0 anterior a lambda y -4.5 dorsoventral (profundidad) y para el orificio posterior 2.8 mediolateral, 4.0 anterior a lambda y -4.5 dorsoventral (lesión diagonal). Las mismas coordenadas se utilizaron para producir la lesión en el hipocampo derecho, pero los valores mediolaterales son negativos (Paxinos y Watson, 1982).

Una vez completada la trepanación craneal se introdujo la cánula metálica en el tejido cerebral y se realizó el trayecto diagonal en dirección anterior hasta alcanzar el primer orificio (anterior), posteriormente se cubrió sólo con piel toda la extensión lesionada, mediante suturas de puntos separados con aguja traumática recta y seda trenzada fina de 3/0.

Al completar la lesión y durante los siguientes 4 días, las ratas recibieron por vía ip 12.5 mg de BrdU/día hasta completar 50 mg/rata. La BrdU es un marcador de

proliferación celular, análogo de la timidina, que se incorpora a la cadena de ADN sintetizada durante la fase "S" del ciclo celular, se visualiza usando anticuerpos dirigidos contra ella (tinción nuclear). La región afectada se observa en la Fig. 3.

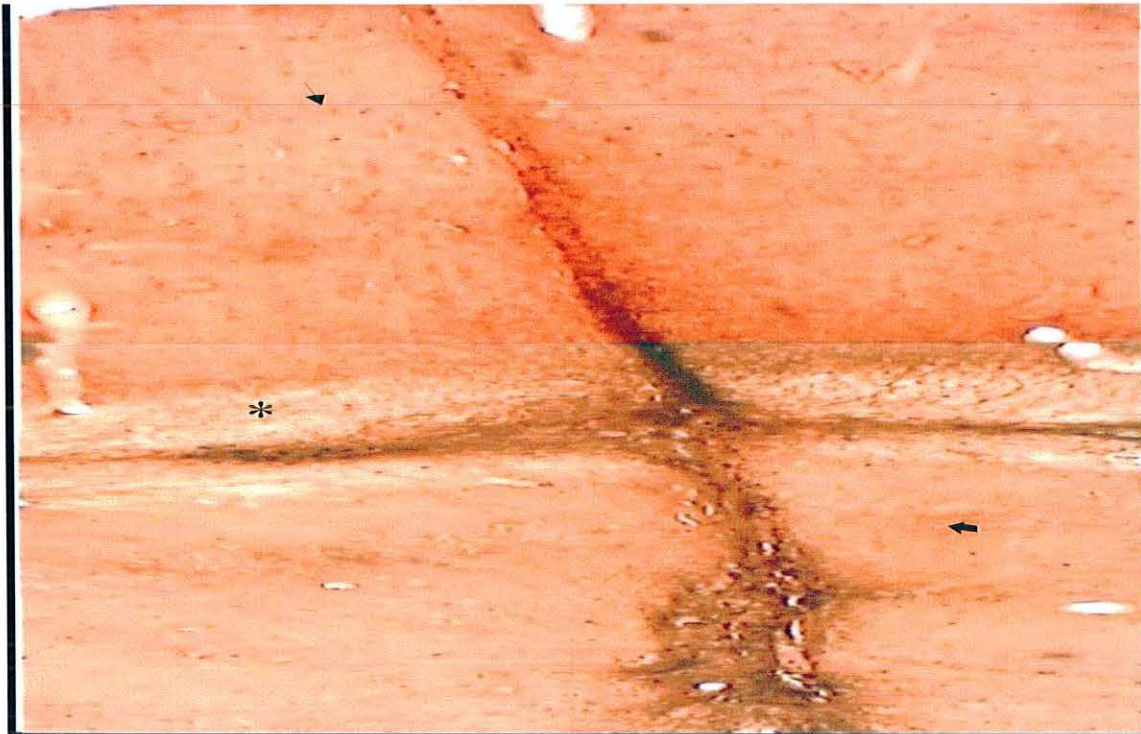


Fig. 3. Corte coronal del cerebro lesionado: la corteza cerebral (región superior- flecha vertical); el cuerpo calloso (zona intermedia-asterisco) y el hipocampo dorsal (región inferior- flecha horizontal). La profundidad de la lesión fue de 4.5 mm.

6.4. Paradigmas aplicados.

Laberinto acuático de Morris (MWM).

Este paradigma fue utilizado para determinar las alteraciones cognitivas provocadas por la lesión y el tratamiento con los esteroides, con las siguientes características:

Es una piscina circular de fibra de vidrio de 180 cm de diámetro, de color interior negro con 40 cm de profundidad, durante los experimentos se llenó a una altura de 25 cm, con agua a una temperatura que se mantuvo en 25 °C; después de cada sesión experimental se cambió el agua y se hizo limpieza de la piscina. Esta fue dividida en

cuatro cuadrantes imaginarios (I-IV) siguiendo las manecillas del reloj, y en el borde de la piscina correspondiente al centro de cada cuadrante se colocó una marca con cinta de color blanco (orientadores internos) para señalar los sitios de partida de los animales. Adicionalmente, cada cuadrante fue dividido mediante una matriz de puntos imaginarios en nueve cuadros con longitud equivalente a 30 cm/lado que fueron dibujados sobre un acetato colocado sobre la pantalla de un televisor conectado a una cámara de vídeo instalada a 180 cm de la superficie del agua, ajustada para que la imagen de la piscina ocupe toda la pantalla. Se filmó todo el tiempo que las ratas permanecieron en la piscina.

En el interior de la piscina, en el centro de uno de los cuadrantes se colocó una plataforma de material plástico sólido, con forma cilíndrica, de 24 cm de altura y 10 cm de diámetro pintada de color negro para que el animal no pudiera distinguirla, ya que permaneció sumergida 1 cm por debajo de la superficie del agua (plataforma de escape) y en la misma posición durante todo el estudio. Un día antes de iniciar los experimentos se realizó una sesión de habituación al agua con duración de 90 s, con ausencia de la plataforma de escape.

En la fase experimental cada sesión consistió de 4 ensayos diarios con un tiempo inter-ensayo de 10-12 minutos, durante 7 días hasta completar 28 ensayos/rata, cada uno se inició cuando el animal fue depositado en el agua y se consideró terminado cuando éste subió a la plataforma de escape; el límite para cada ensayo fue de 90 segundos, cuando la rata no localizó la plataforma de escape, se le colocó sobre la plataforma, esto sólo durante el primer día de la prueba y únicamente en los dos primeros ensayos.

Al inicio de cada ensayo se liberó la rata con la cabeza dirigida contra la pared de la piscina siguiendo un orden sucesivo de los sitios de inicio según las manecillas del reloj, para que al final de cada día haya sido liberada del centro de cada uno de los cuadrantes. En el campo visual de la rata se colocaron cuatro orientadores espaciales con formas geométricas claramente diferentes que permanecieron invariables a través del estudio. La luz fue blanca homogéneamente difusa y atenuada.

Los parámetros utilizados para la interpretación de los resultados fueron los siguientes:

- 1) Latencia de escape. Tiempo que transcurre desde que se deposita la rata en el agua hasta que localiza la plataforma de escape.

2) Longitud de la trayectoria. Distancia recorrida durante la permanencia en el agua (cm/s).

3) Velocidad. Es función de distancia/tiempo.

4) Porcentaje de permanencia en el cuadrante con la plataforma. Indicativa del progreso del animal para mejorar su orientación respecto al cuadrante donde se localiza la plataforma, debe resultar una curva inversa a la del tiempo de latencia.

Aplicada de la misma forma que la primera, la segunda fase de la prueba en el MWM se realizó por tres días (D 22-24), y sólo se cambió de lugar, al cuadrante contrario, la plataforma de escape, con el propósito de estudiar la capacidad de las ratas para aprender una nueva localización (aprendizaje en reverso).

Actividad locomotriz en campo abierto.

Durante los D 18-20, se evaluó la capacidad locomotriz. Se utilizó una plataforma de 60 x 60 cm, rodeada por paredes de acrílico transparente de 15 cm de altura. En la pantalla del monitor se dividió el área total en cuadros de 10 cm/lado, para análisis de la videofilmación. La prueba se realizó con un ensayo/día/rata de 5 minutos de duración, las ratas fueron inicialmente colocadas en el centro de la plataforma y mediante videofilmación se evaluó la actividad locomotriz. La distancia recorrida fue registrada, con base en la cuantificación del número de cuadros (imaginariamente dibujados en la arena) que cruzó la rata durante el ensayo.

6.5. Técnicas inmunocitoquímicas.

Al concluir las pruebas conductuales (26 días después de la lesión), se sacrificaron las ratas mediante perfusión intracardiaca con el fin de fijar sus cerebros, para ello se aplicó una inyección ip de pentobarbital sódico (50 mg/kg), en los animales anestesiados se realizó toracotomía para exponer el corazón, pinzando la arteria aorta descendente a nivel torácico, se introdujo la cánula roma del número 14 en el ventrículo izquierdo hasta alcanzar la arteria aorta cardiaca, se seccionó la aurícula derecha para permitir el drenaje de sangre y soluciones, durante 3 minutos se hicieron pasar 150 ml de solución lavadora (0.9% NaCl, con 10,000 UI de heparina y 0.1% de procaína), seguida de 250 ml de solución fijadora al 4% de paraformaldehído amortiguado en fosfato 0.1 M a pH 7.3.

Finalizada la perfusión, mediante craneotomía fue extraído el cerebro que se fijó adicionalmente por inmersión durante 8 h a temperatura ambiente en la misma solución fijadora, posteriormente, con tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 7.3 se hicieron 2 cambios de 12 h c/u, durante los cuales se mantuvieron en agitación suave. Los cerebros fijados fueron sumergidos en una solución crioprotectora compuesta por 8% de sacarosa y 1% de goma arábica disueltas en PBS 0.1 M, hasta su hundimiento total (48 h), del cerebro crioprotegido se hicieron cortes coronales de 50 μm de espesor de toda la zona de lesión que fueron recogidos consecutivamente para los diferentes estudios a realizar. Todos los cerebros estudiados presentaron herida bilateral de características similares. La incisión cruzó la corteza cerebral parietal, CA1 y el giro dentado. Las secciones analizadas fueron cortadas de - 3.3 a - 3.8 mm de bregma.

Desenmascaramiento electroquímico. Se realizó con el fin de incrementar la sensibilidad de epitopes.

Se utilizó una cámara de plástico con capacidad de 1.5 dm^3 , en su interior fueron sumergidos los cortes contenidos en frascos de vidrio, flotando en tampón PBS 0.1 M, esta misma solución estuvo presente en la cámara. Mediante electrodos de carbón mineral se hizo pasar corriente eléctrica alterna (110-115 voltios) hasta alcanzar 6 amperios y 60 °C de temperatura, fueron repetidos 2 ciclos sucesivos de 15 min y los cortes fueron lavados en PBS.0.1 M a temperatura ambiente (dos cambios de 15 min). Se inactivaron peroxidasas endógenas mediante incubación de los cortes en 10% de metanol disuelto en PBS con 0.3% de H_2O_2 durante 20 min, a temperatura ambiente.

Doble inmunohistoquímica para detección de microglia y BrdU.

Todos los anticuerpos (ac) fueron disueltos en una solución tampón de fosfato salino (PBS) esta misma solución se utilizó para los lavados del tejido que se harán después de cada etapa de incubación. Para la identificación de microglia se utilizó Isolectina-B4 (*griffonia simplicifolia*) marcada con peroxidasa, en dilución de 10^{-4} mg/ml, disuelta en PBS. Se inactivaron peroxidasas endógenas mediante incubación de los cortes en 10% de metanol disuelto en PBS con 0.3% de H_2H_2 durante 20 min a temperatura ambiente, luego los tejidos fueron lavados 2 x 5 min con PBS. Después se

incubaron durante 10 min en una solución tampón catiónica (cloruro de calcio 0.1 mM, cloruro de magnesio 0.1 mM y cloruro de manganeso 0.1 mM).

Los tejidos fueron incubados con Isolectina-B4 durante 16-20 h a 4 °C con movimientos suaves y en la oscuridad. Al finalizar la incubación las preparaciones fueron lavadas en PBS (3x15 min). El revelado de la reacción se hizo mediante incubación de los cortes en una solución compuesta por 0.07% de 3´3-diaminobencidina (DAB) y 0.1% de H₂O₂, durante 10-15 min para formar un precipitado visible de color marrón. Al finalizar esta reacción los tejidos fueron nuevamente lavados en agua destilada y PBS (3x10 min) para continuar con el proceso para BrdU.

Se utilizó un ac primario monoclonal anti-BrdU (NCL-BrdU Novocastra), generado en ratón, en dilución 1:50, los tejidos fueron incubados en este durante una noche en cuarto frío, el ac secundario consistió de IgG biotinizadas generadas en caballo contra IgG de ratón (Vector BA-2001), en dilución 1:200, la incubación se realizó a temperatura ambiente durante 2.5 h, a continuación los cortes fueron incubados en el complejo de avidina-biotina (ABC) como lo indica el fabricante (Vectastain PK-4000) y la reacción se reveló con una solución de sulfato amónico de níquel al 0.1%, pH 8.5 en Tris de HCl con DAB-H₂O₂ como cromógeno.

Al finalizar el revelado los tejidos fueron lavados con PBS 0.1M (2x10 min) y montados en portaobjetos para su estudio al microscopio. La penetración de los Ac en las células de microglia se realiza cuando el Ac reconoce y se une a los epítopes del antígeno (Ag), es una interreacción reversible.

6.6. Análisis cuantitativo de células de microglia.

Como resultado del doble procedimiento inmunocitoquímico; las células de microglia no proliferativa aparecieron con citoplasma de color marrón (Isolectina-B4), mientras que la microglia proliferativa presentó citoplasma marrón y núcleo púrpura (Isolectina-B4 + BrdU). La cuantificación celular se realizó en microscopía de luz a 40X.

Mediante análisis de imágenes se obtuvo el índice de microglia proliferante, dividiendo la población de células de microglia doblemente marcadas respecto a la población total de células de microglia x 100, presentes en la zona alrededor de la lesión, en áreas de 0.78 mm² a partir de los bordes de ambas heridas en la corteza cerebral y el hipocampo.

6.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de ANOVA, seguida de la prueba de Tukey para comparar los valores de medias y se estableció una probabilidad $P < 0.05$ como criterio para definir como significativas las diferencias de la comparación entre grupos.

6.8. Diseño experimental.

Variables independientes:

- 1.- Tratamiento sistémico constante mediante administración subcutánea de esteroides disueltos en vehículo oleoso para prolongar su liberación.

Variables dependientes:

A) Histoquímicas:

- 1- Población total de microglia.
- 2- Índice proliferativo de células de microglia.

B) Conductuales:

- 3- Aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris.

Parámetros:

- a) Latencia de escape.
 - b) Longitud de trayectoria.
 - c) Velocidad.
 - d) Permanencia en el cuadrante con la plataforma.
- 4- Actividad locomotriz en campo abierto.

Criterios de inclusión:

- 1.- Ratas que hayan tolerado la manipulación quirúrgica con recuperación satisfactoria.

Criterios de exclusión:

- 1.- Complicaciones postoperatorias.
- 2.- Animales que revelen una localización errónea de la zona de lesión al momento de realizar los cortes histológicos cerebrales.

VII. Resultados.

7.1. Efectos de la lesión y de PREG y DHEA sobre aprendizaje espacial y memoria.

Al valorar el desempeño en el WMW de las ratas lesionadas y compararlo al de ratas intactas, los efectos por la lesión bilateral de corteza cerebral y el hipocampo dorsal fueron evidentes; el aprendizaje y la memoria resultaron deteriorados. Las ratas lesionadas tuvieron dificultad para localizar la plataforma de escape, a pesar de disponer de pista visuales proximales y distales, que permanecieron en la misma posición durante todo el tiempo del experimento.

Las ratas tratadas con PREG o DHEA alcanzaron mejores registros en los parámetros estudiados, superando al grupo C-V; sin embargo, todas las ratas lesionadas mejoraron progresivamente su capacidad para localizar la plataforma de escape a través del estudio para, finalmente, aprender la tarea.

En latencia de escape las ratas tratadas con esteroides localizaron la plataforma de escape más rápidamente; el grupo PREG registró los tiempos más cortos, resultando con diferencias significativas con el grupo C-V, y sin diferencias con el grupo C-I. No obstante, es notorio el deterioro provocado por la lesión, al comparar estos valores con los registrados por las ratas intactas; el grupo C-I fue el mejor, con diferencias con los grupos C-V y DHEA (Fig. 4).

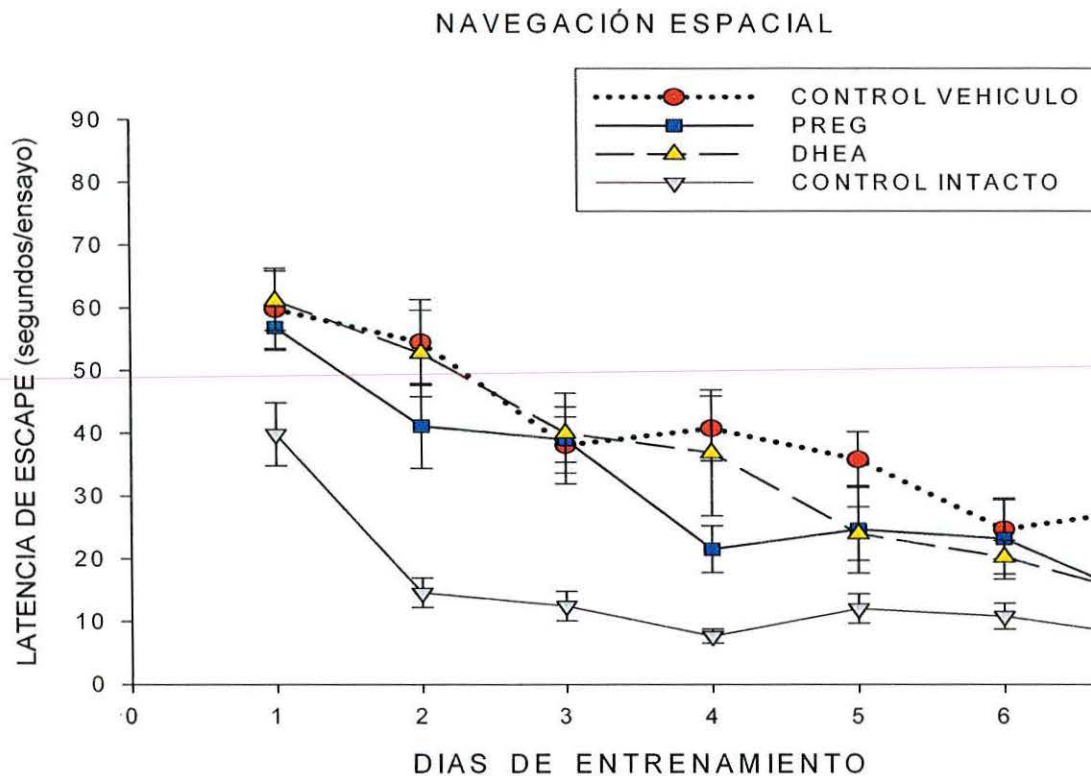


Fig. 4. Las ratas intactas localizaron la plataforma en menos tiempo que las lesionadas; las que recibieron esteroides superaron a las que sólo recibieron el vehículo; hubo diferencias significativas entre los grupos CI-CV, CI-DHEA, PREG-CV ($P < 0.01$).

Al estudiar la distancia recorrida por la rata para localizar la plataforma de escape, el efecto desorientador por la lesión es evidente, provocando que las ratas lesionadas recorran mayores distancias que las ratas intactas para localizar la plataforma (Fig. 5).

Para este parámetro no se manifestaron diferencias entre los tres grupos de ratas lesionadas que invariablemente recorrieron una mayor distancia que las ratas intactas, las cuales, sólo al primer día de la prueba, recorrieron mayor distancia, bajando notablemente el tiempo empleado durante los siguientes días de la prueba. Al final los animales lesionados mejoraron su trayectoria de navegación sin alcanzar los valores del grupo de animales intactos.

DISTANCIA RECORRIDA PARA LOCALIZAR LA PLATAFORMA DE ESCAPE.

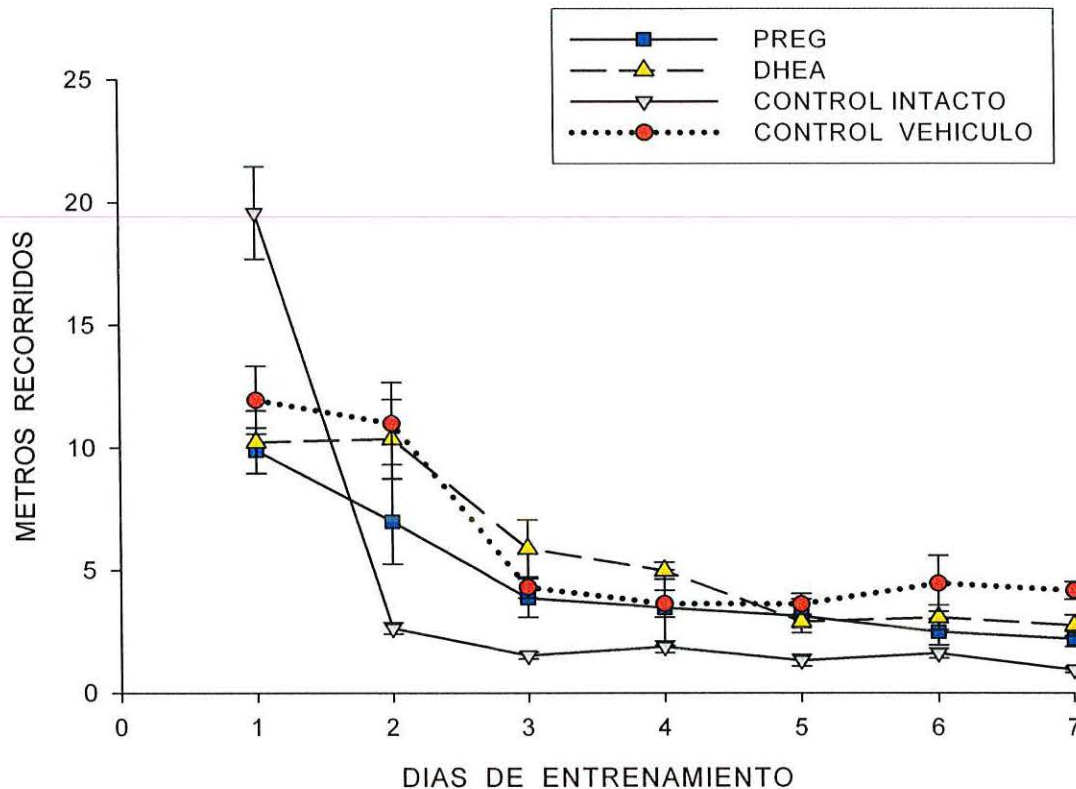


Fig. 5. Las ratas lesionadas recorrieron mayor distancia para localizar la plataforma; las ratas intactas sólo el primer día de entrenamiento recorrieron la mayor distancia y los días posteriores realizaron recorridos cortos, resultando con diferencias significativas con las ratas lesionadas. $P < 0.01$

Los animales tratados con DHEA mostraron mayor velocidad de navegación que los grupos PREG ó V, que podría estar relacionado con la naturaleza excitatoria de DHEA. Por otro lado, se ha reportado que la lesión hipocampal promueve el incremento en la actividad locomotriz y exploratoria (Fanselow, 1999), posiblemente por interrupción de eferencias glutamatérgicas hacia el núcleo accumbens (Oddie y Bland, 1998).

Los resultados en este parámetro muestran diferencias significativas entre los 3 grupos lesionados y el grupo intacto, los animales lesionados nadaron a mayor velocidad (Fig. 6); mientras que la menor velocidad correspondió al grupo de ratas intactas, indicativo de la rápida localización de la plataforma; los animales lesionados presentaron variaciones en su velocidad de navegación a través del estudio.

VELOCIDAD DE NAVEGACION

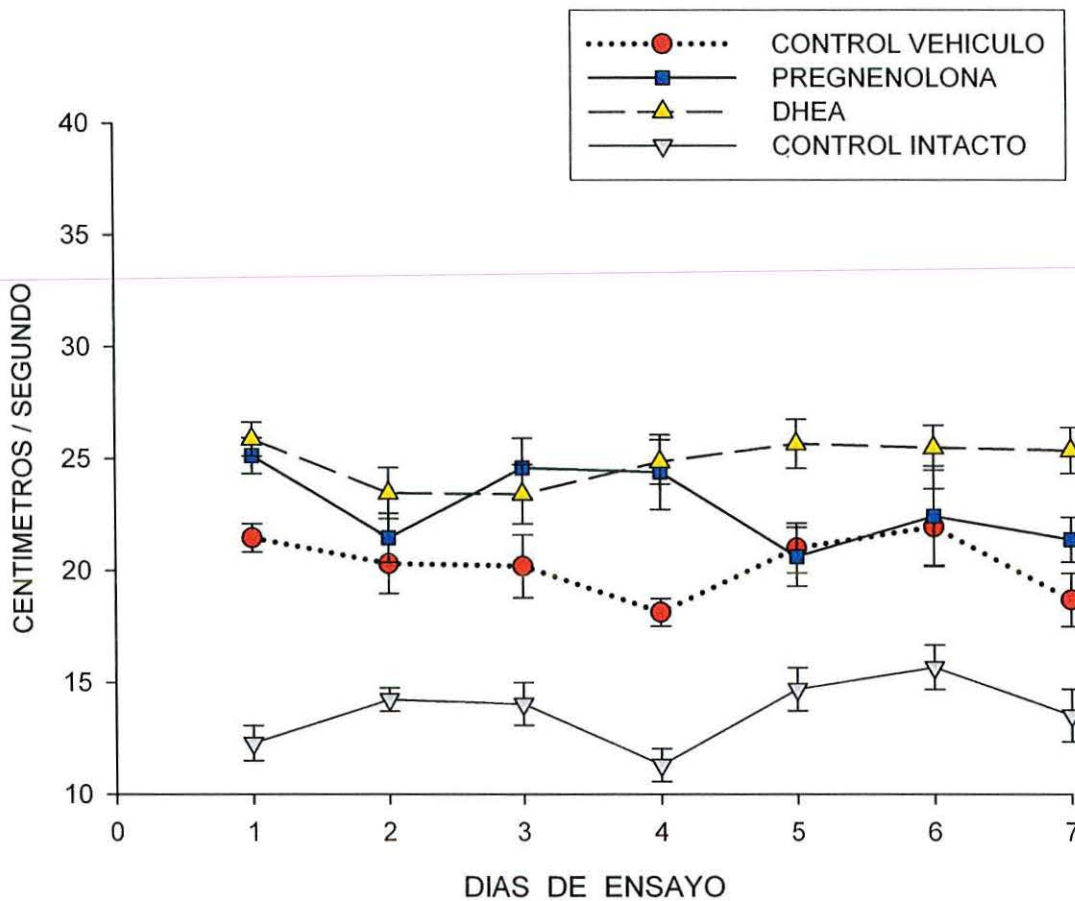


Fig. 6. Los animales lesionados navegaron a mayor velocidad que los intactos, con diferencias significativas entre estos dos tipos; el grupo DHEA desarrolló la mayor velocidad, $P < 0.01$

Otro parámetro estudiado fue el tiempo de permanencia en el cuadrante con la plataforma, su análisis nos revela la capacidad de orientación de los animales para buscar la plataforma en el cuadrante correcto. El aumento de permanencia en el cuadrante correcto es indicativa de la formación de un mapa espacial (memoria de referencia), (Fig. 7).

Los resultados de este parámetro nuevamente hacen evidente el deterioro funcional del tejido cerebral por efectos de la lesión.

MEMORIA DE REFERENCIA.

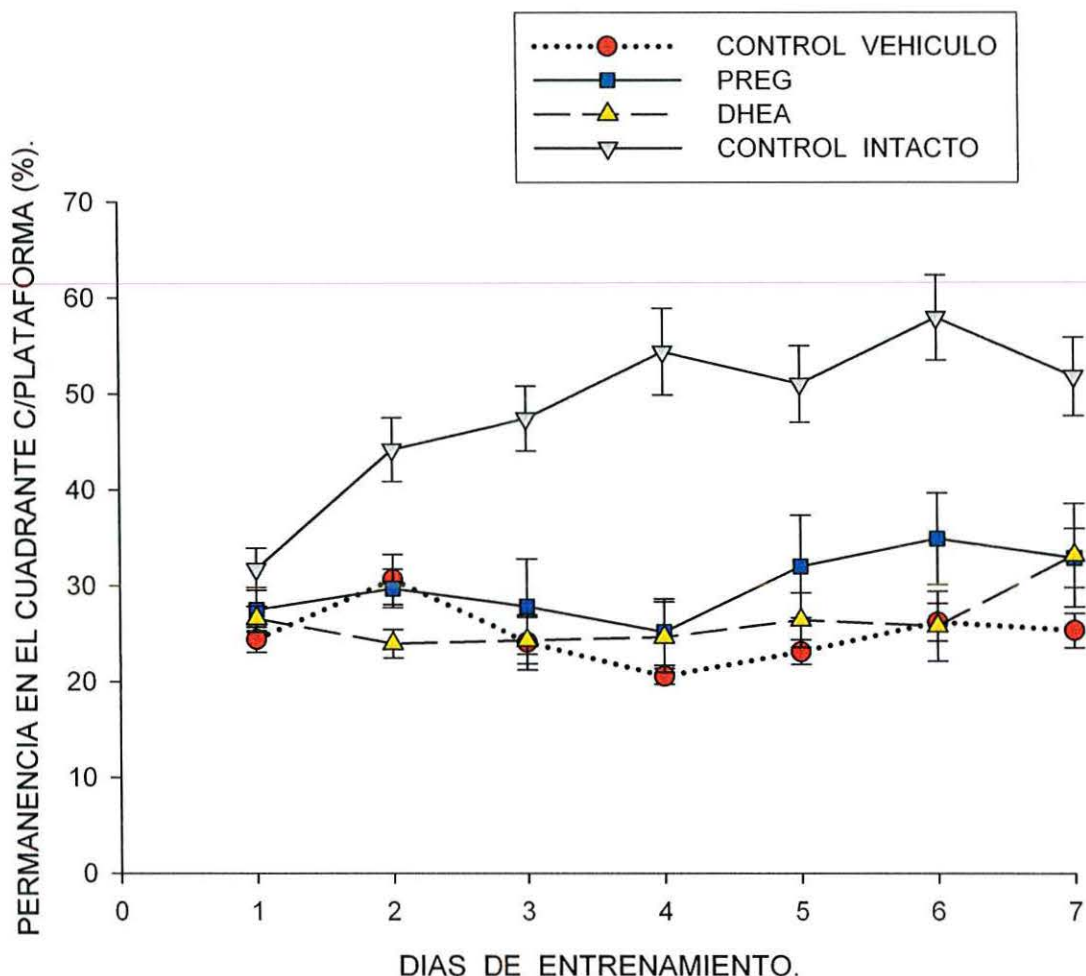


Fig. 7. Las ratas lesionadas permanecieron menos tiempo en el cuadrante con la plataforma que el grupo intacto, el cual aumentó progresivamente su permanencia en el cuadrante correcto (30-60%); resultaron diferencias significativas entre las ratas intactas y lesionadas. $P < 0.01$.

En las ratas lesionadas se observó desorientación, navegaron dentro del cuadrante correcto entre el 20% y 30% del tiempo total, contra el 30% y casi 60% de las ratas intactas. Estos valores indican que el deterioro en la memoria de referencia fue un resultado directo de la lesión penetrante. Las diferencias fueron significativas entre los animales lesionados y los intactos, sin embargo; entre los tres grupos lesionados no hubo diferencias significativas.

La segunda etapa de aprendizaje espacial en el MWM (aprendizaje reverso), tuvo una duración de 3 días (22-24 post-lesión). En esta prueba no se incluyó grupo

control-intacto, por carecer en nuestro laboratorio de esos datos, recordando que el experimento se realizó sólo con ratas lesionadas.

En relación con la primera prueba; el desempeño de los tres grupos mejoró en los parámetros estudiados y fueron capaces de localizar la plataforma sumergida en menos tiempo, recorrieron distancias menores y permanecieron más tiempo en el cuadrante con la plataforma de escape, sin presentar diferencias significativas entre los grupos C-V, DHEA y PREG.

La latencia de escape (Fig. 8) disminuyó gradualmente, formando una curva de aprendizaje, al tercer día se alcanzaron valores similares a los de las ratas intactas en el último día de la primera etapa de la prueba.

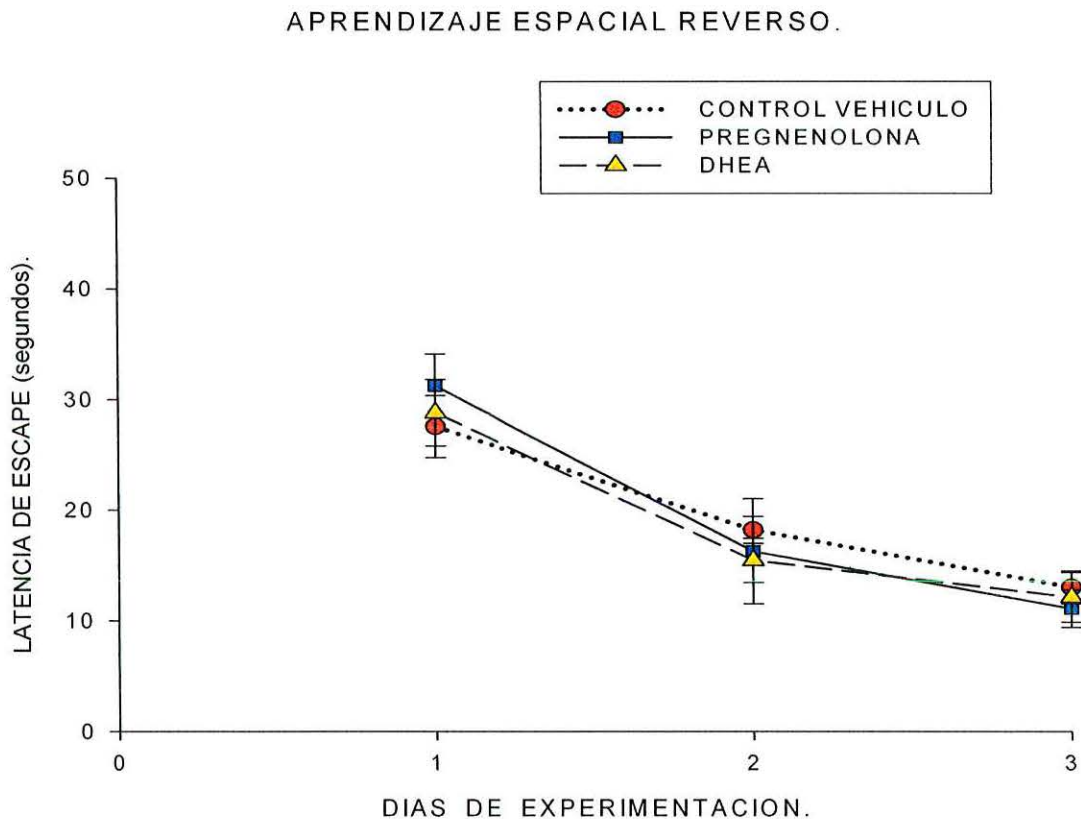


Fig. 8. Las ratas de los tres grupos fueron capaces de aprender rápidamente la nueva localización de la plataforma, formando una curva de aprendizaje (de 30 a 10 segundos) durante la prueba. No hubo diferencias significativas $P > 0.05$.

En todas las ratas mejoró su capacidad de orientación, manifestada por un tiempo de latencia menor, -indicativo de una trayectoria más directa hacia la nueva ubicación de la plataforma de escape, cuya localización fue reconocida rápidamente y consecuentemente disminuyó la distancia recorrida (Fig. 9).

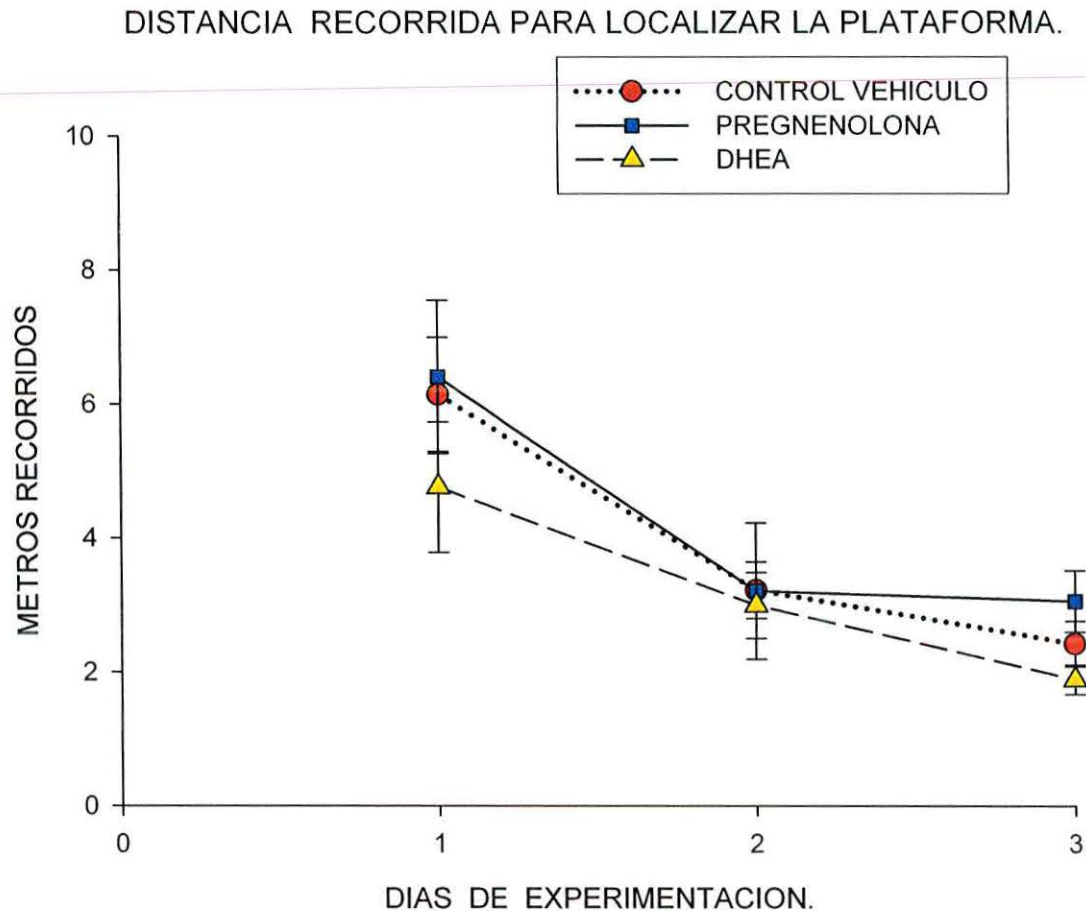


Fig. 9. Al segundo día todos los grupos disminuyeron la distancia para alcanzar la plataforma de escape, el tercer día de la prueba la distancia se redujo todavía más, aunque de forma menos importante. $P < 0.05$.

La velocidad desarrollada por las ratas de los tres grupos fue menor y variable durante los tres días de la prueba, sin embargo al tercer día se alcanzaron valores semejantes entre ellos, el grupo DHEA contrariamente a lo ocurrido en la etapa previa en la que alcanzó la mayor velocidad, se mantuvo estable y al tercer día desarrolló la más baja velocidad (Fig. 10).

VELOCIDAD DE NAVEGACION.

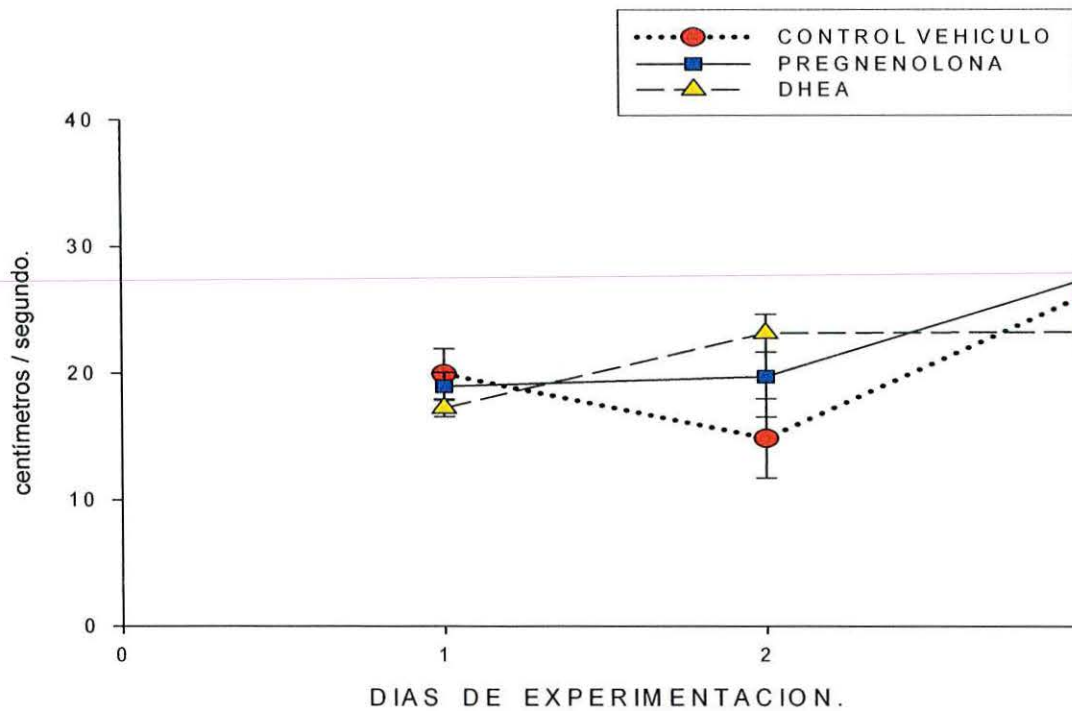


Fig. 10. En todos los casos la velocidad fue notablemente menor que la que mostraron los animales durante los primeros tres días de la primera etapa de aprendizaje espacial. $P < 0.01$

Para el siguiente parámetro, las ratas mostraron una clara tendencia progresiva a permanecer más tiempo en el cuadrante con la plataforma, resultando una curva inversa a la de latencia de escape, la nueva posición de la plataforma de escape fue recocida rápidamente por las ratas lesionadas sin diferencias significativas entre los grupos; el grupo DHEA permaneció más tiempo (8-32%) en el cuadrante con la plataforma que los grupos C-V (12-26%) y PREG (10-25%), sin haber diferencias significativas entre ellos (Fig. 11).

MEMORIA DE REFERENCIA.

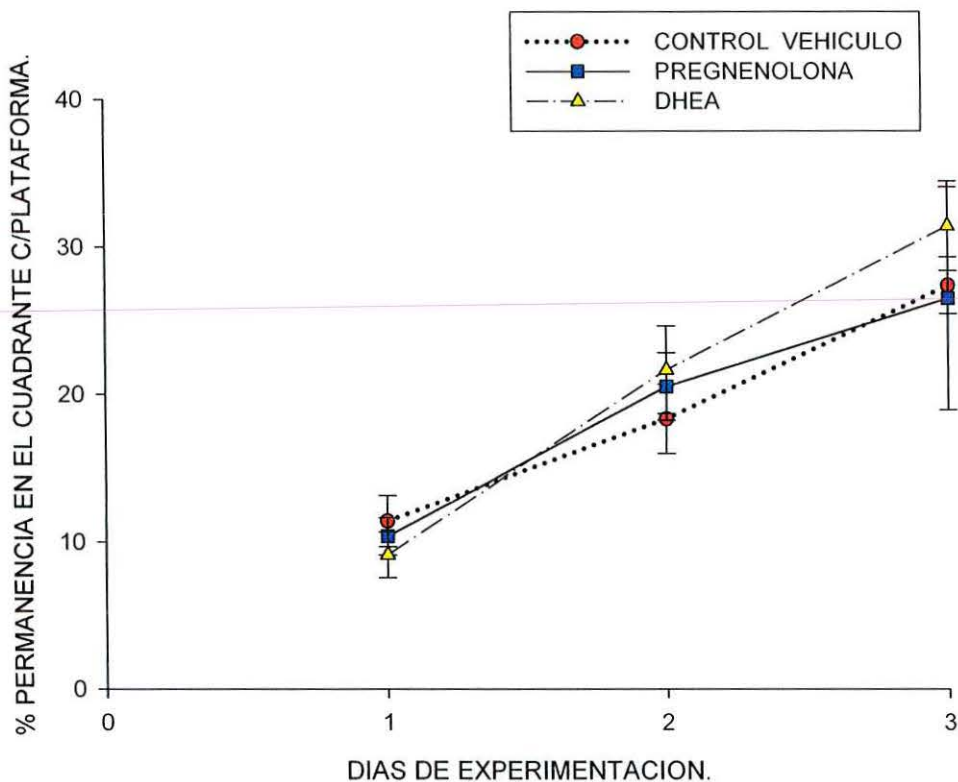


Fig. 11. El grupo DHEA aumentó progresivamente su permanencia (8-32%) en el cuadrante con la plataforma; lo mismo ocurrió con los grupos C-V (12-26%) y PREG (10-25%), sin haber diferencias entre los tres grupos. $P > 0.05$.

7.2. Actividad locomotriz.

Para conocer si la lesión cerebral afectó la capacidad de movimiento y consecuentemente la habilidad para nadar, se aplicó la prueba de actividad locomotriz en campo abierto los días 18-20 post-lesión. El primer día de la prueba todas las ratas mostraron una actividad de locomoción similar; el grupo intacto recorrió mayores distancias (12 m) que las lesionadas (9-7 m); en las ratas tratadas con DHEA se observó una tendencia de disminución de la actividad locomotora (11-7 m); el grupo PREG mantuvo casi invariable su actividad, igualmente el grupo C-V sólo disminuyó más su actividad al segundo día para terminar igual al grupo PREG (Fig. 12).

ACTIVIDAD DE LOCOMOCION

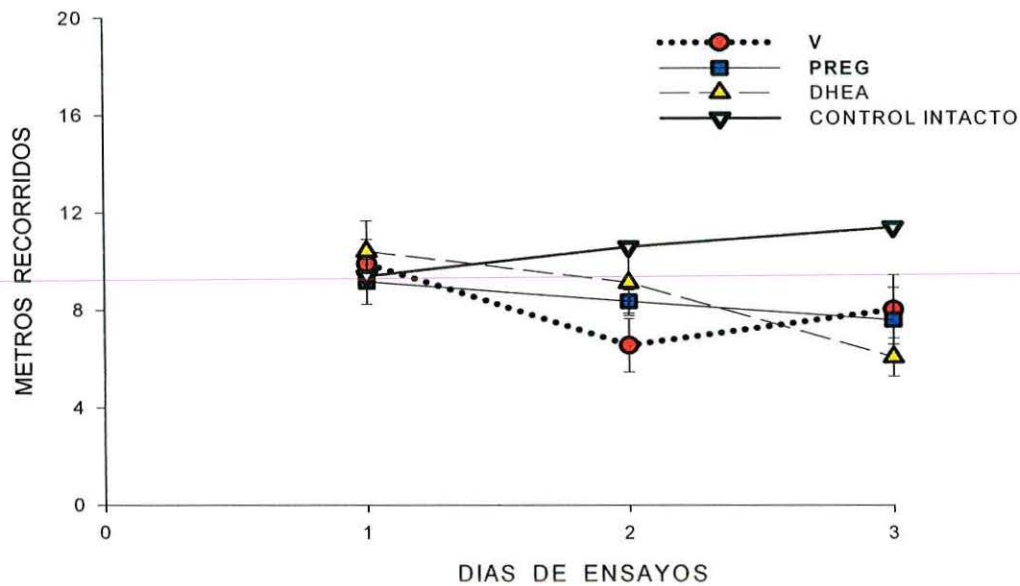


Fig. 12. El grupo intacto recorrió mayor distancia que las ratas lesionadas; el grupo DHEA redujo progresivamente su actividad locomotora, mientras que el grupo PREG mantuvo estable su actividad. Entre los grupos lesionados no hubo diferencias significativas, pero si las hubo entre éstos y el grupo intacto. $P > 0.05$.

Aparentemente la lesión no afectó la capacidad de movimientos ni la habilidad para nadar.

7.3. Estudio inmunocitoquímico.

Después del proceso inmunocitoquímico al que se sometieron los cortes histológicos de los cerebros de las ratas lesionadas, se realizó el análisis con microscopía de luz con el objetivo 40X, en esta amplificación la superficie examinada en cada campo correspondió a 0.78 mm^2 , y respecto a esta superficie se refirieron los valores que resultaron de la cuantificación de las células de microglia con una o con dos marcas.

Considerando que la lesión fue bilateral, la cuantificación se realizó en ambos hemisferios cerebrales, y se remitió al espacio circundante a los bordes de la herida. En cada hemisferio se hicieron registros en una extensión de 6.24 mm^2 de la zona lesionada, de esta superficie correspondió el 50% a la corteza cerebral y 50% al hipocampo; en cada corte se analizaron 16 campos (12.48 mm^2), siendo 8 para cada

hemisferio. El registro de células fue simultáneo, anotando separadamente las células de microglia positivas sólo a Isolectina-B4 y las positivas a Isolectina-B4 + BrdU (Fig. 13).

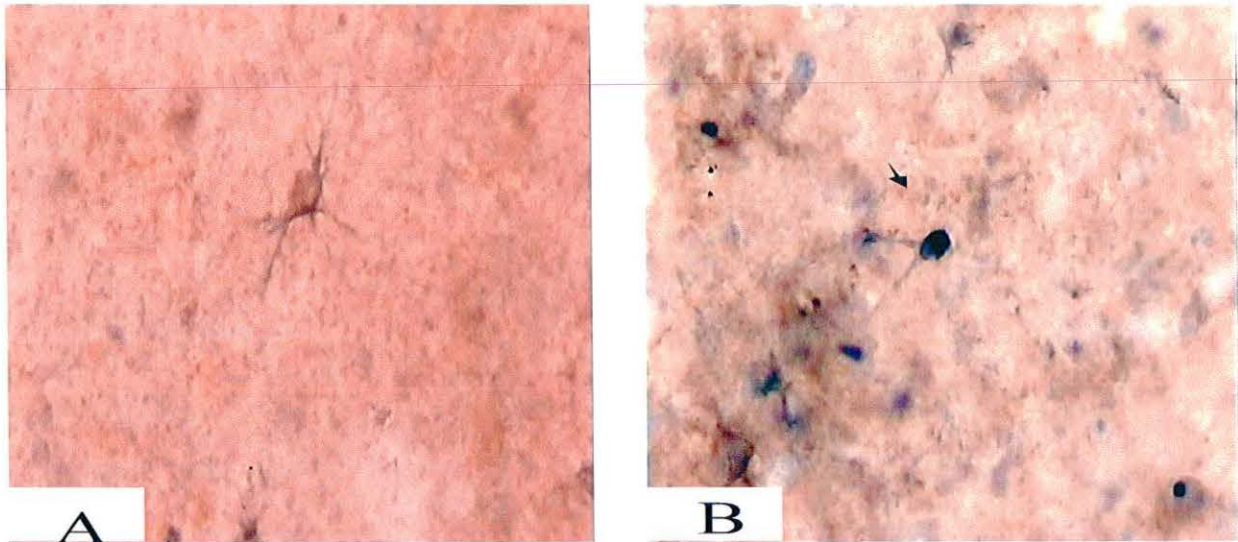


Fig. 13. Células de microglia en el tejido lesionado. A, microglia con membrana citoplásmica marrón (una marca); B, microglia con citoplasma marrón y núcleo púrpura (dos marcas); ambas marcas fueron consideradas para la cuantificación.

Los resultados de la cuantificación de células de microglia muestran el efecto inhibitor de los esteroides sobre la microglia proliferativa, siendo el más potente el de DHEA, resultando: DHEA 12.37 células/0.78 mm²; PREG 61.91; y C-V 111.4 (Fig. 14).

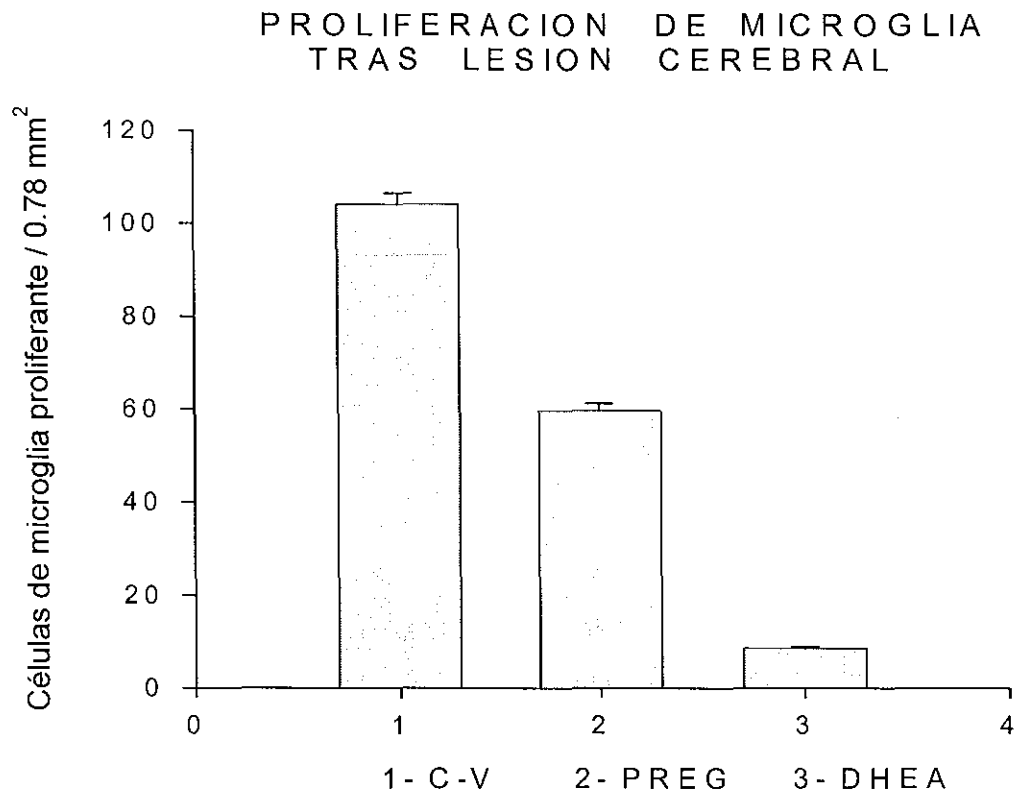


Fig. 14. La gráfica muestra el efecto inhibitor de los esteroides sobre la proliferación microglial; la DHEA provocó los efectos más potentes; la PREG con efectos menos potentes. Cantidad de células/0.78 mm²: DHEA 12.37; PREG 61.91; y C-V 111.4.

Igualmente, en la población microglial total en corteza e hipocampo, se observa el efecto de modulación negativa por PREG y DHEA sobre la microglia, resultando: DHEA 13.53 células/0.78 mm²; PREG 33.89; y C-V 59.1. (Fig. 15).

Esta estirpe celular tiende a concentrarse alrededor de los bordes de la herida, a partir de la cual se produce un efecto de dispersión en relación con su eje, razón por la cual el estudio estuvo centrado en esta zona.

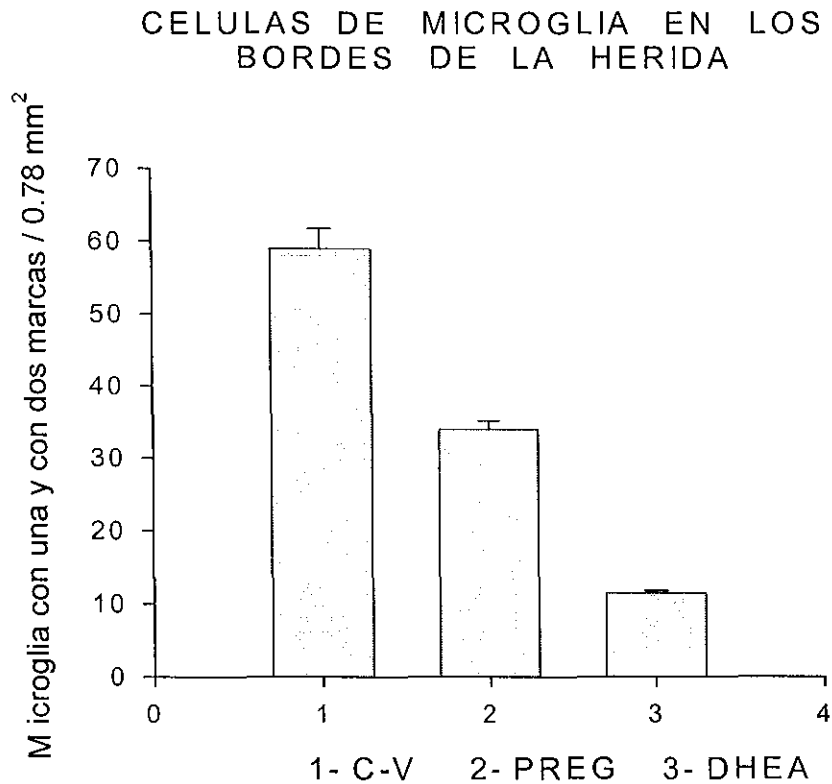


Fig. 15. La gráfica muestra la población promedio de microglia, con una y dos marcas, en una superficie de 0.78 mm² a lo largo de los bordes de la herida. El grupo C-V mostró mayor densidad microglial (59.1) que los tratados con esteroides; PREG (33.89), y DHEA, con los efectos inhibitorios más potentes (13.53).

Contrariamente a su efecto inhibitor sobre la proliferación, la DHEA aumentó la reactividad de células de microglia (Fig. 16).

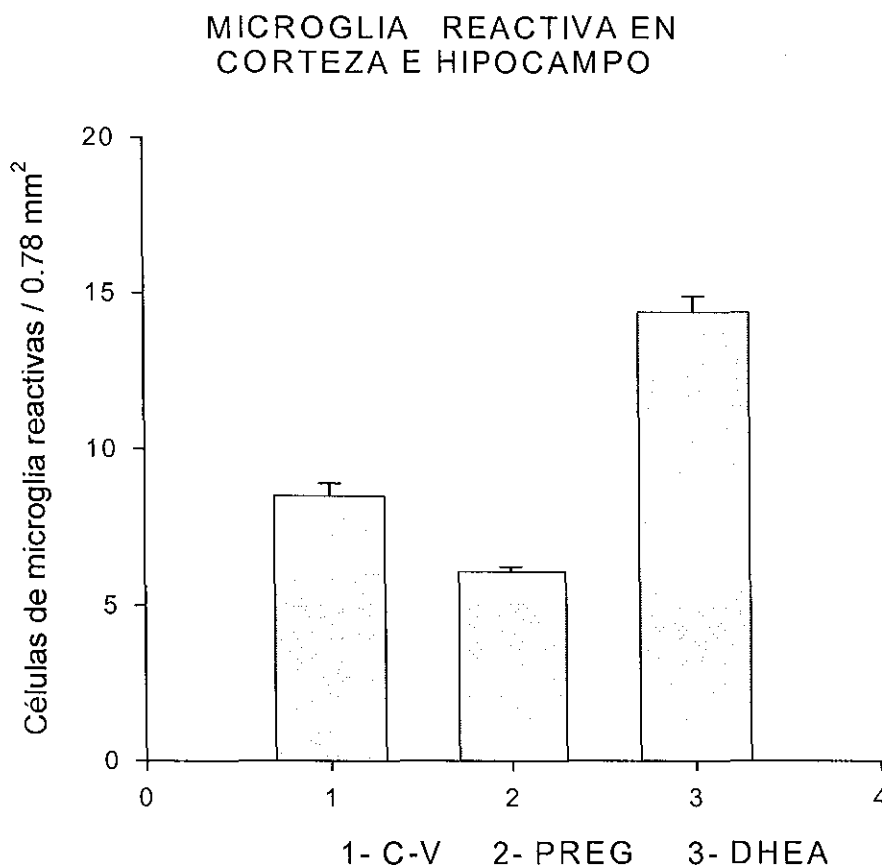


Fig. 16. La grafica muestra que en los cortes cerebrales del grupo DHEA, la reactividad microglial fue mayor, contrariamente a su efecto inhibitor sobre la proliferación

El índice proliferativo se obtuvo considerando las células de microglia presentes alrededor de los bordes de la herida, se dividió el número de células de microglia con dos marcas entre el total de microglia con una marca, que se encontraron en la corteza cerebral y el hipocampo.

El índice proliferativo registrado en las ratas de los grupos V y PREG, nos indica que, de cada 10 células de microglia activadas tras lesión, 9 fueron mitóticas y por su concentración en la zona de daño, aumentaron la población microglial presente alrededor de la herida. La potente acción inhibitoria de DHEA (43.40%) sobre la proliferación microglial, tomando como referencia el grupo C-V, no provocó una mejoría significativa sobre la capacidad de aprendizaje espacial.

VIII. Discusión.

8.1. Esteroides.

Por su efecto en los sistemas neurotransmisores involucrados, que incluyen ACh, glutamato y GABA, los esteroides PREG o DHEA favorecen el aprendizaje espacial y la memoria (Baulieu y Robel, 1996), especialmente al administrarse después de la fase de adquisición y durante la consolidación del aprendizaje, posterior a la realización de la tarea (Darnaudery y col., 2000). Nosotros administramos esteroides para disminuir la proliferación de microglia y, consecuentemente, el tamaño de la cicatriz.

Los resultados de las pruebas en el MWM indican que el desempeño de las ratas que recibieron PREG o DHEA fue mejor al de las ratas que recibieron sólo el vehículo, posiblemente por sus difusos efectos tróficos, protectores o moduladores sobre la integridad y actividad del tejido nervioso.

La explicación tentativa de los efectos de PREG y DHEA sobre aprendizaje y memoria sería: La administración de esteroides después del entrenamiento ha resultado más eficaz que antes del mismo (Frye C., Sturgis J., 1995; Rupprecht, 1999, Wolf, Kirschbaum, 1999), posiblemente por que, a diferencia de los efectos genómicos que requieren de minutos a horas, los efectos moduladores de esteroides sobre receptores de membrana ocurren rápidamente, en milisegundos a segundos (Roberts, 1999), sin embargo administrados algunas horas o minutos antes del entrenamiento también han inducido efectos benéficos (Mayo, 1999). Ambos esteroides tienen efecto preferencial sobre los procesos de consolidación y recuperación (Darnaudéry, 2000). La vía icv (intra cerebro ventricular) es la más utilizada por directa y selectiva, y principalmente se han utilizado animales intactos (Robel, 1995; Baulieu y Robel, 1996).

En este experimento, la última dosis (2 mg) de esteroides se administró a las ratas por vía sc 96 h antes de iniciar el entrenamiento, considerando la corta vida de esteroides en circulación, que es de minutos a pocas horas (Wolf y Kirschbaum, 1999), suponemos que los esteroides no tuvieron efectos directos sobre aprendizaje y

memoria, sino que su presencia en el cerebro favoreció los procesos restaurativos del tejido lesionado por sus efectos neuroprotectores y neurotróficos que pueden ser útiles para atenuar el daño por lesión cerebral traumática (Robel, Shumacher y Baulieu 1999; Zwain y Yen, 1999, Veiga y col., 2003).

8.2. Lesión.

Las técnicas de lesión fueron los primeros métodos utilizados para conocer la relación entre la actividad neuronal en regiones cerebrales específicas y las funciones conductuales (Stein, 1994). Al hipocampo, entre otras estructuras cerebrales, como la corteza parietal (Alexinsky, 2001), se le ha implicado en los procesos de aprendizaje y memoria, particularmente aprendizaje espacial (Eijkenboom y van der Staay, 1999), y ha sido lesionado con técnicas diversas para demostrar su participación en dichos eventos (Stein y Lewis, 1975; Morris, 1982; Jarrard, 1993; Bramlett y col., 1997; Scheff y col., 1997). Es posible que la lesión haya provocado destrucción celular y daño vascular leves, con efecto nocivo local tras seccionar numerosas fibras nerviosas, que resultó en interrupción de la transmisión de señales en la zona lesionada desde sus aferencias y proyecciones eferentes hacia otras zonas del mismo hipocampo y otras regiones cerebrales.

8.3. Aprendizaje espacial y memoria. Prueba 1 en el MWM.

El aprendizaje de esta tarea involucra el almacenamiento y recuperación de información espacial y la planeación de estrategias de navegación (D' Hooge, De Deyn, 2001), el hipocampo es señalado como estructura crucial para el desarrollo de estas funciones (Jett, Kuhlmann y Guilarte, 1996; Budson y Price, 2005). Los mecanismos moleculares y celulares que subyacen al aprendizaje espacial y memoria no están clarificados, sin embargo está establecido que dependen de la integridad estructural y funcional de las zonas cerebrales involucradas, especialmente el hipocampo, para realizar estas funciones (Olton, Walter y Gage, 1978).

En esta prueba se manifestó un déficit como resultado de la lesión ya que todas las ratas mostraron dificultad para aprender a localizar la plataforma de escape oculta bajo

el agua, sin embargo al parecer la lesión no provocó otras manifestaciones evidentes en el comportamiento cotidiano de los animales, no se hizo visible ninguna conducta anómala o trastornos sensitivo-motores.

La lesión afectó tanto la memoria de trabajo como la de referencia, los animales se observaron desorientados para realizar esta tarea, normalmente se esperaría de una rata no lesionada, que establezca una ruta hacia la plataforma tomando en cuenta los orientadores espaciales externos al laberinto o un punto de referencia en el medio ambiente, que se refleja por el tiempo que la rata permanece navegando en el cuadrante con la plataforma.

Es posible que la lesión haya producido; principalmente seccionamiento o deafferentación de fibras nerviosas, que interrumpió parcialmente la neurotransmisión en la zona cortical afectada y el circuito trisináptico intrínseco del hipocampo y sus interconexiones, incluyendo las de las principales neuronas hipocámpales, piramidales y granulares, llamadas "células de lugar", cuyo funcionamiento permite el aprendizaje espacial, la habilidad para crear, almacenar y utilizar mapas aloécnicos del medio ambiente para implementar una representación de la localización espacial del animal (Eichenbaum, 1999a; 1999b); y en menor porcentaje a muerte neuronal directa o retardada.

En ambos casos con el consecuente deterioro de eventos que acompañan al aprendizaje y memoria, como la LTP y el ritmo theta hipocámpales; por cierto, el deterioro de la LTP induce trastornos de procesos conductuales dependientes del hipocampo (Foster, 1999).

La desorientación podría deberse principalmente a la lesión del hipocampo, evidenciada por la incapacidad de usar las pistas externas, y por la dificultad de estos animales para integrar un mapa espacial específico para localizar la plataforma. El deterioro de la capacidad de orientación se reflejó en los parámetros estudiados, con aumentos en tiempo y distancia recorrida para localizar la plataforma escondida, y disminución en el tiempo de navegación en el cuadrante con la plataforma.

La capacidad locomotora no se afectó por la lesión, además del posible aumento en la locomoción por la lesión hipocampal (Fanselow, 1999) y los esteroides excitatorios, especialmente DHEA (Majewska, 1999).

El mayor déficit se observó al inicio de las pruebas y se hizo menos notable a través del estudio, hasta que las ratas lesionadas aprendieron a localizar la plataforma en un tiempo cercano al de los animales intactos que sirvieron como controles de referencia. Los resultados sugieren la participación de las estructuras lesionadas en el aprendizaje espacial, -que sin embargo finalmente se alcanzó-.

Para que las ratas aprendieran la tarea es posible que hayan concurrido varios factores:

Tipo de lesión. Posiblemente las ratas lesionadas aprendieron la tarea debido a que no se afectó una masa importante de tejido, como sucede en el caso de isquemia por embolismo de la arteria cerebral media o con otros modelos de lesión por aspiración y de impacto mecánico que pueden provocar mayor pérdida de neuronas corticales e hipocampales que la lesión provocada en este experimento (Hamm y col., 1996; Scheff y col., 1997; Alexinsky, 2001; D'Hooge y De Deyn 2001), ya que la destrucción neuronal directa por la cánula solo afectó a una población neuronal discreta, estableciendo una relación significativa entre el tipo de lesión y la recuperación funcional (Kolb y Cioe, 2000).

Circuitaria. Al dañarse el tejido cerebral de forma columnar, la circuitaria horizontal pudo haber sido una ruta importante, que aunado con el entrenamiento o repetición consecutiva de la tarea de búsqueda de la plataforma escondida mejora el resultado funcional (Ivanco y Greenough, 2000).

Compensación-Adaptación. Posterior a la lesión, posiblemente se activaron mecanismos compensatorios y de adaptación principalmente mediante procesos plásticos cerebrales como el rebrote de prolongaciones nerviosas o reorganización sináptica de las regiones vecinas, como las cortezas perirhinal y entorhinal, (Mumby y Glenn, 2000), estos mecanismos incluyen síntesis de proteínas específicas para ser utilizadas para el rebrote de neuritas o para la formación de receptores NMDA,

directamente involucrados en varios tipos de plasticidad sináptica, incluyendo la LTP en el hipocampo (Zou y col., 1999); además de la posible participación de otras estructuras cerebrales intactas relacionadas con aprendizaje espacial, como son la corteza prefrontal, el cerebelo, el cerebro basal anterior, el estriado y otras áreas neocorticales (D' Hooge y De Deyn, 2001; Walter y col., 2003).

Neurogénesis. La neurogénesis pudiera ser un mecanismo endógeno de reparación cerebral que contribuya a reestablecer la funcionalidad del tejido dañado, en el hipocampo se ha observado este proceso (Nadareishvili y Hallenbeck, 2003).

Células gliales. Su activación tras lesión induce a la liberación de sustancias, como citocinas que favorecen la restauración del tejido dañado, como factores de crecimiento y otras moléculas proregenerativas necesarias para el rescate neuronal (Raivich, 2001).

El tiempo transcurrido desde que se provocó la lesión (9-15) y la edad de las ratas (3 meses) también fueron factores que, junto a los ya mencionados, seguramente influyeron para que finalmente los animales aprendieran la tarea en el MWM (Wyss y col., 2000).

El desempeño de todos ellos mejoró gradualmente con el entrenamiento repetido a través del experimento, esta mejoría progresiva se reflejó en curvas de aprendizaje, caracterizadas por disminución gradual de la latencia de escape y de la distancia recorrida, mientras la rata navegaba en busca de la plataforma sumergida. Aprendizaje, memoria y lesión son eventos relacionados con la plasticidad sináptica y con esteroides y neuroesteroides (Vázquez y col., 1995; López y col., 1996; Robel y col., 1999), en los que tienen una gran influencia los estímulos que genera la repetición de la tarea, que podría inducir el reforzamiento sináptico por la "ruta o senda" neuronal que recorre el estímulo para su procesamiento cerebral, que favorece la generación de trazos de memoria.

En este estudio fueron 28 ensayos/rata, con bloques de 4 ensayos/día durante 7 días, esto pudo haber favorecido la reconexión o reforzamiento sináptico; además del tiempo transcurrido después de haber provocado la lesión, -suficiente para que el tejido

alcanzara cierto grado de restauración tras el daño. Obviamente la recuperación se refleja con mayor claridad en la segunda fase (aprendizaje reverso).

8.4. Aprendizaje reverso en el MWM (22-24 dpj).

El desempeño de los animales fue mejor en la segunda prueba en el MWM, a pesar de haber cambiado la plataforma escondida al cuadrante opuesto al original. Se recuperó la capacidad de orientación, reflejada por disminución en tiempo y distancia recorrida para llegar a la plataforma, y aumento en el tiempo de navegación en el cuadrante con la plataforma (memoria de referencia), representado por la curva ascendente, inversa a latencia de escape. No hubo diferencias significativas en el desempeño entre los grupos sin embargo, el grupo DHEA fue ligeramente mejor en los cuatro parámetros estudiados.

La adquisición de la localización de la plataforma a una tasa y precisión comparable a los controles intactos de la primera prueba, podría indicar que el desempeño recuperado resultó principalmente por la restauración del tejido lesionado y consecuentemente de la capacidad cognitiva espacial (Hannesson y Skelton, 1998; Skelton, 1998); además del conocimiento previo y repetición de la tarea, por lo que haber cambiado la localización de la plataforma sumergida sólo les implicó un breve tiempo para reorientar su estrategia de navegación, lo cual refleja la recuperación funcional de la zona lesionada.

8.5. Campo abierto.

La velocidad desarrollada en el MWM y los resultados en esta prueba, confirman que la lesión no afectó la capacidad locomotriz y en consecuencia tampoco la habilidad para nadar, motivo principal de su aplicación. La ausencia de deterioro en la capacidad de locomoción podría ser consecuencia de que la lesión no afectó dominios motores, en la corteza la lesión afectó una zona principalmente sensorial, de convergencia y asociación de estímulos visuales, auditivos y somatosensoriales relacionados con el espacio (Tees, 1999).

La adaptación a un nuevo medio ambiente es más rápida en los animales intactos que en los lesionados, debido posiblemente a que el hipocampo normalmente forma y almacena la memoria contextual, que se altera cuando es lesionado, perturbando la exploración del contexto en el medio ambiente (Fanselow, 2000) con disminución de la actividad y exploración, como lo muestra la Fig. 12. Por cierto está reportado que lesiones en la corteza parietal no afectan la actividad locomotriz, pero si inducen menores índices de exploración (Hogg y col., 1998), lo cual pudiera explicar la conducta de los animales lesionados.

8.6. Regulación de la activación y proliferación microglial.

La DHEA tuvo los efectos inhibitorios más potentes sobre la proliferación microglial en la zona lesionada (50% aproximadamente en comparación con los grupos V y PREG). En el cerebro la acción de la DHEA es multifuncional (Mathis y col., 1999), incluyendo efectos moduladores sobre el funcionamiento neuronal y glial; en los astrocitos puede actuar como modulador negativo de la reactividad y proliferación que resulta de una herida cerebral de características similares a la que se provocó en este estudio (García Estrada. y col., 1993; García Estrada y col., 1999).

En la explicación del efecto inhibitorio de la DHEA sobre la proliferación de microglia en el tejido lesionado, podría proponerse que participaron mecanismos semejantes a los responsables de la inhibición de astrogliosis en las ratas tratadas con DHEA, tomando en cuenta que las células de microglia son la primera línea celular que responde frente a una lesión de esta severidad, la inhibición mitótica microglial pudiera tener relación, al menos en parte, con la subsecuente inhibición astrocitaria.

Es posible que haya sucedido una segunda influencia desde los astrocitos hacia las células de microglia, ya que el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es un mitógeno microglial, producido principalmente por los astrocitos, tras ser estimulados por la IL-1 y TNF- α de origen microglial (Mor y col., 1999), que son procesos de interregulación y retroalimentación entre microglia y astrocitos en la respuesta glial a lesión, posiblemente mediados por señalización neuronal-glial (Streit, 1998), mediante mecanismos recíprocos de activación, reactividad y proliferación entre

los dos tipos celulares, a través de la expresión y secreción de diversas sustancias como citocinas y factores de crecimiento ó neurotróficos, por ejemplo; en el tejido cerebral lesionado la secreción microglial de IL-1 y TNF- α regula la proliferación astrogial y la subsecuente formación de la cicatriz glial, además de estimular la neovascularización en la zona afectada (Rabchevsky, 2001).

Por otro lado, es posible que el efecto inhibitorio haya sido generado por efectos directos de DHEA sobre células de microglia, que favorecen la activación, pero inhiben el crecimiento celular e inducen apoptosis en células BV-2 en la rata (Nakamura, 2002), las células BV-2 corresponden a una línea celular derivada de microglia (Eder, DeCoursey, 2001); en nuestro experimento, la cuantificación de células de microglia con una marca (Isolectina-B4) y dos marcas (Isolectina-B4 + BrdU) reflejan esos dos efectos selectivos, separados en el tiempo, de DHEA sobre las células de microglia, que aumentan la activación y disminuyen la proliferación.

Posiblemente otros factores también participaron en el proceso, y deben considerarse; p.e. está reportado que la DHEA en ratones machos castrados reduce la concentración cerebral de PREG (Robel y Baulieu, 1995), lo que también pudo ocurrir en nuestros animales experimentales (ratas machos castrados); la dosis administrada a las ratas fue la misma para los dos esteroides (10 mg), sin embargo difieren en concentración cerebral (ng/g), PREG: 9.5 ± 2.7 , y DHEA: 0.24 ± 0.33 (Robel, Shumacher y Baulieu 1999) , resultando mayor la dosis de DHEA en relación a su concentración cerebral, lo que ayudaría a explicar su potente efecto inhibitorio de la proliferación microglial.

Estos efectos inhibitorios fueron selectivos sobre la proliferación de microglia, sin que resultara afectada su activación y, posiblemente, tampoco su actividad específica, presentación de antígenos y/o de macrófagos, en respuesta a la lesión, así; es posible proponer que esta proliferación disminuida resultaría favorable para facilitar la estabilización y la posterior reparación del tejido.

Sin embargo no se hizo evidente ninguna manifestación clara de este efecto que favoreciera el aprendizaje espacial. La ausencia de efectos favorecedores claros por la

inhibición proliferativa microglial sobre aprendizaje espacial, pudo deberse a la naturaleza misma de la lesión que provocó daño neuronal y tisular mínimo que generó un espacio estrecho para ser ocupado por la cicatriz glial o que al establecerse los mecanismos reguladores entre microglia y astrocitos en respuesta a lesión, se generó que favorecieran el desempeño en la tarea.

IX. Conclusiones.

- 1- La lesión retardó la adquisición del aprendizaje y memoria.
- 2- La DHEA generó los efectos más potentes sobre la respuesta microglial tras lesión; aumento en la activación; y disminución de la proliferación.
- 3- La disminución de microglia proliferativa no mejoró significativamente el aprendizaje y memoria.
- 4- Las ratas que recibieron esteroides superaron a las del grupo C-V; en latencia de escape el grupo PREG superó al grupo C V, resultando sin diferencias significativas con el grupo intacto, que superó a los grupos lesionados.
- 5- Al finalizar el estudio todos los animales fueron capaces de aprender la tarea en el MWM, hayan o no recibido esteroides.
- 6- La lesión provocó incremento de la locomoción, observada durante la primera prueba en el MWM; sin embargo, en la prueba de campo abierto, el grupo C-I desarrolló mayor actividad que los lesionados. La capacidad para el nado no resultó afectada

X. Bibliografía.

Aloisi F., Ria F., Adorini L. (2000). Regulation of T-cells responses by CNS antigen-presenting cells : different roles for microglia and astrocytes. *Review Immunology Today*, 21, 3, 141-147.

Akwa Y., Baulieu E. E. (1999). Neurosteroids : behavioral aspects and physiological implications. *J. Soc. Biol.* 193, 3293-3298.

Andersen P. (1975). Organization of hippocampal neurons and their interconnections. *The hippocampus* 1, 155-175. N. Y. Press.

Anderson D., Means E. (1983). Free radical-induced lipid peroxidation in spinal cord: FeCl₂ induction and protection with antioxidants. *Neurochem. Pathol.* 1, 249-264.

Aranskowsky G. (1997). Las funciones del sueño. *Medicina del sueño. Aspectos básicos y clínicos*, 95-123.

Azcoitia I., Sierra A., Veiga S., García-Segura L. M. (2003). Aromatase expresión by reactive astroglia is neuroprotective. *Ann NY Acad Sci* 1007, 298-305

Bastianetto S., Ramassamy C., Poirier J., Quirion R. (1999). Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. *Mol Brain Res.* 66, 35-41.

Baulieu E.E., Robel P. (1990). Neurosteroids: a new brain function?. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 395-403.

Baulieu E.E.(1991). Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol. Cell.* 71, 3-10.

Baulieu E.E. y Robel P: (1996). Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. *J. Endocrinology* 150, S221-S239.

Baulieu E.E. Schumacher M., Koenig H., Jung-Testas I., Akwa Y. (1996). PREGesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cell Mol. Neurobiol.* 2, 143-154.

Benveniste E.N. (1993). *Astrocyte-microglia interactions*. Academic Press, 355-382.

Berkenbosch F. (1992). Macrophages and astroglial interactions in repair to brain injury. *N. Y. Am. Asoc. Science.* 650, 186-190.

Betz A., Coster H. (1990). Effects of steroid therapy on ischemic brain and blood to brain sodium transportation. *Act Neurochem. Suppl. W.* 51, 256-258.

Bignami A., Eng. L. F., Dahl D., Uyeda C. T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43, 429-435.

Bovolenta P., Wandosell F., Nieto-Sanpedro M. (1992). CNS glia scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Glia* 94, 367-379.

- Boya J., Calvo J., García-Mauriño E. (1986). Nature of macrophages in rat brain. A histochemical study. *Acta Anat.* 127, 142-145.
- Brow M. S., Kovanen P.T., Goldstein J.L. (1979). Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroids synthesis in the adrenal cortex. *Recent. Prog. Hormon. Res.* 35, 215.
- Brown E. S., Rush A. J., McEwen B. S. (1999). Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorder. *Neuropsychopharmacology.* 21-4, 473-484.
- Budson Andrew E. and Price Bruce H. (2005). Memory dysfunction. *The New England Journal of Medicine,* 352, 692-699.
- Carbonell W.S., Grady M.S. (1999). Evidence disputing the importance of excitotoxicity in hippocampal neuron death after experimental traumatic brain injury. *Ann NY Acad Sci.* 890, 287-298.
- Connor T., Leonard B. y Merali Z. (1998). An assessment of the effects of central interleukin-1 beta,-2,-6, and tumor necrosis factor alpha administration on some behavioral, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience* 84, 923-933.
- Cortéz S., McIntosh T. y Noble L. (1989). Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res.* 482, 271-282.
- Cuadros Miguel A. y Navascués Julio (1998). The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog. Neurobiol.* 56, 173-189.
- Dalmau I., Finsen B., Zimmer J., González B. y Castellano B. (1997). Expression of LFA-1 alpha and ICAM-1 in the developing rat brain: a potential mechanism for the recruitment of microglia cell precursors. *Brain Res.* 103: 2, 163-170.
- Dalmau I., Finsen B., Zimmer J., González B. y Castellano B. (1998). Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 8: 5, 458-474.
- Darnaudéry M., Koehl M., Piazza P., Le Moal M., Mayo W. (2000). PREGnenolone increases hippocampal acetylcholine release and spatial recognition. *Brain Res.* 852, 173-179.
- David S., Bouchard C., Tsatas O., Giftochistos N. (1990). Macrophages can modify the non permissive nature of the adult mammalian CNS. *Neuron* 5, 463-469.
- Davis E., Foster T., Thomas W. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* 34, 73-78.
- Delatour B. y Gisquet-Verrier P. (2000). Functional rol of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behav. Brain Res.* 109, 113-128.
- Dihné M., Block F., Korr H., Töpfer R. (2001). Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. *Brain Res.* 902, 178-189.
- Djebaili M, Guo Q., Pettus E. H., Hoffman S. W., Stein D. G. (2005). The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J. of Neurotrauma* 22,1, 106-118.

- Drew Paul D., Chavis Janet A. and Bhatt Renu (2003). Sex steroid regulation of microglial cell activation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1007, 329-334.
- Duvdevani R., Roof R., Fulop Z., Hoffman S., Stein D. (1995). Blood-brain barrier breakdown and edema formation following frontal cortical contusion: Does hormonal status play a role?. *J Neurotrauma.* 12: 1, 65-75.
- Eder C., DeCoursey Th. E. (2001). Voltage-gated proton channels in microglia. *Progress in Neurobiology* 64, 277-305.
- Eichenbaum H. (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav. Brain Res.* 103:2, 123-133.
- Eichenbaum H. (1999). *Neurobiology: The topography of memory.* Nature. McMillan Magazines Ltd. 402, 597-599.
- Eijkenboom M. y Van Der Staay F.J. (1999). Spatial learning deficits in rats after injection of vincristine into the dorsal hippocampus. *Neuroscience* 91: 4, 1299-1313.
- Estabrook R. W., Milewich L. y Prough R. A. (1990). Cytochrome P-450s as toxigenic catalysts: the influence of DHEA. *Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Found.* 21, 33-44.
- Eveling P., Koivisto V. (1994). Physiological importance of DHEA. *Lancet* 343, 1479-1481.
- Fanselow M. S. (1999). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav. Brain Res.* 73-81.
- Fawcett J. W. y Asher R. A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 49: 6, 377-391.
- Foster T. C. (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in aged-related memory decline. *Brain Res. Rew.* 30, 236-249.
- Frautschy S., Walicke P., Baird A. (1991). Localization of basic fibroblastic growth factor and its mRNA after CNS injury. *Brain Res.* 553, 291-299.
- Friess E. (1995). Dehydroepiandrosterone increases REM sleep EEG power in the spindle range. *Am. J. Physiol.* 268, 107-113.
- Fuster J. (1989). *The prefrontal cortex: Anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe.* Raven Press. N.Y.
- García Estrada J., Navarro Ruiz A., Bañuelos Pineda J., Gómez V. Albarran Rodríguez E., Garzón P. Inhalación de solventes orgánicos durante el último tercio del embarazo de ratas Sprague Dawley. Consecuencias somatométricas y cerebelosas en neonatos. *Arch. Invest. Med.* 21: 3, 2-33, 1990.
- García-Estrada J., del Río J.A., Luquín S., Soriano E., García-Segura L.M. (1993). Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res.* 628, 271-278.

- García-Estrada J., Luquín S., Fernández A., García-Segura L.M. (1999). Dehydroepiandrosterone, Pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int. J. Neurosci.* 17: 2, 145-151.
- García-Segura L., Luquín S., Parducz A., Naftolin F. (1994). Gonadal hormones regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 10, 59-69.
- García-Segura L.M., Naftolin F., Hutchison J., Azcoitia I., Chowen J. (1999). Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J. Neurobiol.* 40, 574-584.
- García-Segura L. M., Chowen J., Naftolin F., Torres-Alemán I. (1999). Steroid effects on brain plasticity. *Cont. Endocrinology: Neurosteroids: A new regulatory function in the Nervous System.* Humana Press. N. J., 255-268.
- Gehmann J., Matsumoto Y., Kreutzberg G. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* 20, 269-287.
- Giulian D. (1987). Ameboid microglia as effectors of inflammation in the CNS. *J. Neurosci Res.* 18, 171-185.
- Gómez-Fernández L. (2000). Plasticidad cortical y restauración de funciones neurológicas: una actualización sobre el tema. *Rev Neurol* 31, 749-756.
- Hamm R. J., Temple M. D., Pike B. R., O'Dell D. M., Buck D. L., Lyeth B. G. (1966). Working memory deficits following traumatic brain injury in the rat. *J. Neurotrauma* 13, 317-323.
- Hanisch Uwe-Karsten. (2001). Microglia as a source and target of cytokine activities in the brain. *Microglia in the regenerating and degenerating Central Nervous System.* Wolfgang J. Streit Ed., 79-124.
- Hausmann R., Betz P., (2002). The course of MIB-1 expression by cerebral macrophages following human brain injury. *Legal Medicine.* Artículo en prensa . Institute of legal medicine, Universitätsstrasse 22, D-91054 Erlangen, Germany.
- He Jun, Hoffman Stuart W., Stein Donald G. (2004). Allopregnanolone, a progesterone metabolite, enhances behavioural recovery and decreases neuronal loss after traumatic brain injury. *Restorative neurology and neuroscience* 22, 19-31.
- Hess D. C., Abe T., Hill W., Studdard A. M., Carothers J., Masuya M., Fleming P. A., Drake Ch. J. y Ogawa M. (2004). Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Experimental Neurology* 186, 134-144.
- Hortega P., Penfield W. (1927). Cerebral cicatrix. The reaction of neuroglia and microglia to brain wounds. *Bull. Hopkins Hospital* 31, 278-303.
- Hozumi I., Chiu F., Norton W. (1990). Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res.* 524, 64-71.
- Hu Z., Bourreau E., Jung-Testas I., Robel P., Baulieu E. (1987). Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to PREGnenolone. *P. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84, 8215-8219.

- Hu S., Sheng W. S., Lokensgard J. R., Peterson P. K. (2001). Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology*. Artículo en prensa.
- Jarrard L. E. (1993). On role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. and Neural Biology*. 60, 9-26.
- Jensen M., González B., Castellano B., Zimmer J. (1994). Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration. *Exp. Brain Res*. 98, 245-260.
- Jett D., Kulhmann A., Guilarte T. (1996). Intrahippocampal administration of lead (Pb) impairs performance of rats in the Morris water maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 263-269.
- Jung-Testas I., Hu Z.Y., Baulieu E. E., Robel P. (1989). Steroid synthesis in rat brain cell cultures. *J. Steroid. Biochem.* 34, 115-119.
- Kabbadj K., El-Etr M., Baulieu E. E., Robel P. (1993). PREGnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes. *Glia* 7, 170-175.
- Kalhe W., Leonhardt H., Platzer W. (1988). *Atlas de anatomía*. Editorial Omega, 214-223.
- Kandel E.R., Hawkins R.D. (1992). *Bases biológicas del aprendizaje y de la individualidad*. Investigación y Ciencia, Noviembre-92, 49-57.
- Kitamura Y., Yanagisawa D., Inden M., Takata K., Tsuchiya D., Kawasaki T., Taniguchi T., y Shimohama S. (2005). Recovery of focal brain ischemia-induced behavioral dysfunction by intracerebroventricular injection of microglia. *J. Pharmacol Sci* 97, 289-293.
- Koenig H. L., Schumacer M., Ferzaz B., Do Thi A. N., Ressouches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y., Baulieu E. E. (1995). Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*, 268, 1500-1503.
- Kupferman I. (1991). Localization of higher cognitive and affective functions: the association cortices. *Principles of neural sciences (Kandel)* N. Y. Appleton Lange, 823-838.
- Ladurelle N., Eychenne B., Denton D., Blair-West J., Schumacher M., Robel P., Baulieu E.E. (2000). Prolonged intracerebroventricular infusion of neurosteroids affects cognitive performances in the mouse. *Brain Res*.858, 371-379.
- Lamberts S., Van del Bell, A. W., Lely A. (1997). The endocrinology of aging. *Science* 278, 419-424.
- Le Goascogne C., Robel P., Sananes N., Baulieu E. E. y Waterman M. (1987). Neurosteroids: Cytocromo P-450scc in rat brain. *Science* 237, 1212-1215.
- Lee N., Neitzel K. L., Di Marco A., Laufer R., MacLennan (2005). Penetrating brain injury leads to activation of ciliary neurotrophic factor receptors. *Neuroscience Letters*374, 161-164.
- Levi Giulio (1997). *Role of microglia in CNS injury*. Instit. Sup. Di Sanita, Rome, Italy.
- Levin H. S. y Hanten G. (2005). Executive functions after traumatic brain injury in childrens. *Pediatr. Neurol.* 33, 79-93.

Logan A., Frautschy S., González A., Sporn M. y Baird A. (1992). Enhances expression of transforming growth factor Beta 1 in the rat brain after a localized cerebral injury. *Brain Res.* 587, 216-22.

Lorigados-Pedre L., Bergardo-Rosado J. (2004). El factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorestaurador. *Rev Neurol* 38, 957-971.

Louw A., Bailey D., Fisher S., Genade T., Grindlay D., Malherbe C., Myburgh E. (2000) The mechanism of neurotransmission: a Student's review, Chapter 12. Department of biochemistry, University of Stellenbosch, Stellenbosch, 7602, Republic of South Africa.

Luquín S., Naftolin F., García-Segura L. M. (1993). Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 24, 913-924.

MacLusky N.J., Philip A., Hurlburt C., Naftolin F. (1984). Estrogen metabolism in neuroendocrine structures. In: Cellotti F., Naftolin F., Martini L. eds. *Metabolism of hormonal steroids in the neuroendocrine structures.* Raven, New York, 103-116.

McEwen B. S. (1999). Gonadal hormone regulation of synaptic plasticity in the brain. What is the mechanism?. De *Contemporary Endocrinology: Neurosteroids: A new regulatory function in the Nervous System.* Humana Press. Totowa, N.J., 233-253.

McNamara R. y Skelton R. (1993). The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res. Brain Rev.* 18:1, 33-49.

Majewska D. M. (1999). Neurosteroid antagonists of the GABA-A receptors. *Contemp. Endocrinol.: Neurosteroids: A new regulatory function in the nervous system.* Human Press. N.J., 155-166.

Majewska y col. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptors. *Science* 232, 1004-1007.

Majewska y col. (1992). Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA receptors. *Prog. Neurobiol* 38, 379-395.

Maren S., Baudry M (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiology of learning and memory.* 63, 1-18.

Marty S., Dussart I., Peschanski M. (1991). Glial changes following excitotoxic lesion in the CNS. *Neuroscience* 45: 3, 529-539.

Mathis C., Meziane H., Ungerer A. (1999). Models for the study of memory and neurosteroids. *J. Soc. Biol.* 193, 3299-3306.

Matsumoto Y., Fujiwara M. (1987). In situ detection of class I and II major histocompatibility complex antigens in the rat CNS during experiment. Allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 12, 265-277.

Mayo W., Vallée M., Darnaudéry M., Le Moal M. (1999). Neurosteroids. *Behavioral Studies. De: Contemp. Endocrinology: Neurosteroids: A new regulatory function in the CNS.* Humana Press. N. J., 317-335.

- McEwen B. S. (1999). Gonadal hormone regulation of synaptic plasticity in the brain. What is the mechanism?. *Contemporary Endocrinology: Neurosteroids: A new regulatory function in the Nervous System*. Humana Press. Totowa, N. J., 233-253.
- McNamara R., Skelton R. (1993). The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res. Brain Rev.* 18: 1, 33-49.
- Mellon S. H., Compagnone N.A. (1999). Molecular biology and developmental regulation of the enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of neurosteroids. *Contemp. Endocrinol: Neurosteroids: Anew regulatory function in the nervous system*. Humana Press, Totowa, N. J., 27-48.
- Mong J. A. y McCarthy M. M. (1999). Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes : Implications for synaptic patterning. Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland.© 1999 John Wiley & Sons, Inc. 602-619.
- Mor G., Nilsen J., Horvath T., Bechmann I., Brown S., García-Segura L.M., Naftolin F. (1999). Estrogen and microglia: A regulatory system that affects the brain. *J. Neurobiol.* 40: 4, 484-496.
- Morfin R., Young J., Corpechot C., Egesrad B., Sjøvall J., Baulieu E. (1992). Neurosteroids: PREGnenolone in human sciatic nerves. *P. Natl. Acad. Scien. (USA)* 89, 6790-6793.
- Morris R.G.M. (1984). Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci Meth.* 11, 47-60.
- Morris R.G.M., Garrud P., Rawlins J. P. y O' Keefe J. (1982). Place navegation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Mucke L., Oldstone M., Morris N. (1991). Rapid activation of astrocytes specific expression of GFAP- ac Z transgene by focal injury. *New Biol.* 3, 465-474.
- Nadareishvili Z., Hallenbeck J. (2003). Neuronal regeneration after stroke. *N. Engl. J. Med.* 348, 23.
- Nakajima K., Tohyama Y., Kohsaka S., Kurihara T. (2001). Ability of rat microglia to uptake extracellular glutamate. *Neurosci Lett.* 307, 171-174.
- Nakajima K., Kohsaka S. (2001). Neuroprotective roles of microglia in the Central Nervous System. *Microglia in the regenerating and degenerating Central Nervous System*. Wolfgang J. Streit Ed., 188-208.
- Oddie Scott D., Bland Brian H. (1998). Hippocampal formation theta activity and movement selection. *Neurosci Biobehav. R.* 22, 221-231.
- O'Dell D., Gibson C., Wilson M., DeFord M., Hamm R. (2000). Positive and negative modulation of the GABA-A receptor and outcome after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* 861, 325-332.
- Olmos G., Aguilera P., Tranque P., Naftolin F., García-Segura L.M. (1987). Estrogen induced synaptic remodeling in adult rat brain is accompanied by the reorganization of neuronal membranes. *Brain Res.* 425,57-64.

- Olmos G., Naftolin F., Tranque P., García-Segura L.M. (1989). Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrus cycle. *Neuroscience* 32, 663-667.
- Olton D.S. (1977). Spatial memory. *Scient. Am. Special Issue*, 171-181. N. Y. Freeman Press.
- Olton D. y Walker J. (1983). Memory functions and the hippocampus. *Neurobiology of the hippocampus*. 335-374. NY. Academic Press.
- Olton D.S., Walker J., Gage F. (1978). Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res.* 139, 295-308.
- Otha H., Nisshikawa H., Kimura H., Anayama H., Miyamoto M. (1997). Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience* 79: 4, 1039-1050.
- Paxinos G., Watson C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. N. Y. Academic Press.
- Pekny M., Nilsson M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427-434.
- Perez J., Luquin S., Naftolin F., García-Segura L.M. (1993). The role of estradiol and progesterone in phased synaptic remodelling of the rat arcuate nucleus. *Brain Res.* 608, 38-44.
- Perry V.H., Andersson P., Gordon S. (1993). Macrophages and inflammation in the CNS. *Neuroscience* 16, 268-273.
- Pffaf D. W., Keiner M. (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 151, 121-157.
- Puia G., Santi M., Vinici S., Printchett D., Purdy R., Paul S., Seeburg P., Costa E. (1990). Neurosteroids act on recombinant GABA-A receptors. *Neuron.* 4, 759-765.
- Rabchevsky A.G. (2001). Influences of activated microglia/brain macrophages on spinal cord injury and regeneration. *Microglia in the regenerating and degenerating Central Nervous System*. Wolfgang J. Streit Ed. 209 – 226.
- Raivich G., Bohatscheck M., Kloss Ch., Werner A., Jones L., Kreutzberg G. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* 30, 77-105.
- Raivich G. (2001). Microglial response in the axotomized facial motor nucleus. *Microglia in the regenerating and degenerating Central Nervous System*. Wolfgang J. Streit Ed. 166-187.
- Ramos Juan M. J. (2000). Retention of spatial information in hippocampally damaged rats overtrained on a cartographic task. *Brain Res.* 879, 200-203.
- Reier P., Houle J. (1988). *The glial scar. Functional recovery in neurological disease*. N. Y. Raven Press, 87-138.
- Riva Deputy I., Farden C., Marini J., Bouchard C. (1994). Contribution of peripheral macrophages and microglia to the cellular reaction after mechanical or neurotoxin-induced lesions of the rat brain. *Exp. Neurol.* 128, 77-87.

- Robel P., Young J., Corpéchet C., Mayo W., Perché F., Haug M., Simon H., Baulieu E.E. (1995). Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: Functional correlates. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53: 1-6, 335-360.
- Robel P., Akwa Y., Baulieu E. (1995). Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268 (5216), 1500-1503.
- Robel P., Baulieu E. (1997). Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a neuroactive neurosteroid. *Ann. NY. Acad. Sci.* 82-110.
- Robel P., Shumacher M., Baulieu E. E. (1999). Neurosteroids: From definition and biochemistry to physiopathologic function. *Contemp. Endocrinology: A new regulatory function in the Nervous System.* Humana Press, N.J., 1-25.
- Roof R., Duvdevani R., Braswell L., Stein D. (1994). Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats. *Exp. Neurol.* 129, 64-69.
- Rotemberg V. (1992). Sleep and memory: The influence of different sleep stages on memory. *Neurosci. Biobehav. R.* 16, 497-502.
- Rupprecht R., Friess E., Holsboer F. (1999). The neuropsychopharmacological potential of the neurosteroids. De: *Neurosteroids a new regulatory function in the Nervous System.* Humana Press. Totowa N.J., 349-364.
- Rupprecht R., Holsboer F. (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends in Neurosciences.* 22,9, 410-416.
- Rupprecht R. (2003). Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology* 28, 139-168.
- Santambrogio L., Belyanskaya S., Fischer F., Cipriano B., Brosnan C., Ricciardi P., Stern L., Strominger J., Riese R. (2001). Developmental plasticity of CNS microglia. *P. Natl. Acad. Scien. (USA)* 98: 11, 6295-6300.
- Scheff S., Baldwin S., Brown R., Kraemer P. (1997). Morris water maze deficits in rats following traumatic brain injury: lateral controlled cortical impact. *J. Neurotraum* 14, 615-627.
- Schumacher M., Akwa I., Guennoun R., Robert F., Labombarda Fl., Désarnaud F., Robel P., De Nicola A. y Baulieu E. (2000). Steroid síntesis and metabolism in the nervous system: Trophic and protective effects. *J. of Neurocytology* 29, 307-326.
- Schwab J. M., Klausman I., Schnell L., Schwab M. E., Schluesener H. J. (2001). AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglial/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. *J. of Neuroimmunology* 119, 214-222.
- Skelton R.W. (1998). Modelling recovery of cognitive function after traumatic brain injury: spatial navigation in the Morris water maze after complete or partial transections of the perforated path in rats. *Behav. Brain Res.* 96, 13-35.
- Slepko N., Levi G. (1996). Progressive activation of adult microglia cells in vitro. *Glia* 16:3 241-246.

- Staubli U., Roger G., Lynch G. (1994). Facilitation of glutamate receptors enhances memory. P. Natl. Acad. Sci. (USA). 91, 777-781.
- Stewart C.A., Good M.A., Morris R. G. (1991). The watermaze. Soc. Neurosci. Abs., 17, 130.
- Stein D.G., Lewis M.E. (1975). Functional recovery after brain damage in adult organisms. INSERM 43, 203-228.
- Stein D.G. (1994). Brain damage and recovery. Prog. Brain Res. 100, 203-211.
- Storm-Mathisen (1997). Localization of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model. Prog. Neurobiol. 8, 119-181.
- Streit W.J., Graeber M., Kreutzberg G. (1988). Functional plasticity of microglia. Glia 1, 301-307.
- Streit W., Kincaid-Colton S. (1995). The brain's immune system. Sci. Am 147, 38-43.
- Streit W., Walter S., Pennell N. (1999). Reactive microgliosis. Prog. Neurobiol. 57, 563-581.
- Streit W.J. (2001a). Physiology and pathophysiology of microglial cell function. Microglia in the regenerating and degenerating Central Nervous System. Wolfgang J. Streit Ed., 1-14.
- Streit W. J. (2001b). Microglia and macrophages in the developing CNS. Neurotoxicology 22, 619-624.
- Stumpf W.E., Sar M. (1981). Steroid hormones sites of action in the brain. Steroid hormones regulation of the brain. K. Fuxe Eds. Pergamon Press. New York.
- Suzumura A., Sawada M., Yamamoto H. (1990). Effects of colony stimulating factors on isolates microglia in vitro. J. Neuroimmunol. 30, 111-120.
- Svenningsen A.F., Känge M. (1999). Estrogen and Progesterone stimulate Schwann cell proliferation in a sex- and age- dependent manner. J. Neurosci. Res. 57, 124-130
- Swanson L.W. (1978). The anatomical organization of septo-hippocampal projections. CIBA Found. Symp. 58, 25-48. Elsevier Press.
- Tatsumi Kouko, Haga Satomi, Matsuyoshi Hiroko, Inoue Masahide, Manabe Takayuki, Makinodan Manabu, Wanaka Akio (2005). Characterization of cells with proliferative activity after a brain injury. Neurochemistry International 46, 381-389.
- Tees Richard C. (1999). The effects of posterior parietal and posterior temporal cortical lesions on multimodal spatial and nonspatial competencies in rats. Behav. Brain Res. 106, 53-73.
- Thomas W. (1992). Brain macrophages: Evaluation of microglia and their functions. Brain Res. Rev. 17, 61-74.
- Town T., Nikolic V., Tan Jun (2005). The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. J. of Neuroinflammation 2:24.
- Trudeau Francois, Gagnon Sylvain, Massicotte Guy. (2004). Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation : influences of diabetes mellitus. European Journal of Pharmacology 490, 177-186.

- Vallée M., Mayo W., Darnaudéry M., Corpechot C., Young J., Koehl M. (1997). Neurosteroids: Deficient cognitive performance in aged rats depends on low PREGnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 94: 26, 14865-14870.
- Van der Zee E.A., Luiten P.G.M. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog. Neurobiol.* 58, 409-471.
- Vázquez P.F., Rivas A.S., Loeza A., Schneider R.S. (1995) Modulation of short term memory by steroid sexual hormones. *Life Sci.* 56, 255-260.
- Veiga S., García-Segura L. M., Azcoitia I. (2003). Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase. *J. Neurobiol* 56, 398-406.
- Veiga S., García-Segura L. M., Azcoitia I. (2004). Propiedades neuroprotectoras de los esteroides sexuales y los neuroesteroides. *Rev Neurol* 39, 1043-1051.
- Walter H., Bretschneider V., Gron G., Zurowski B., Wunderlich A. P., Tomczak R., y Spitzer M. (2003). Evidence for quantitative domain for verbal and spatial working memory in frontal and parietal cortex. *Cortex* 39, 897-911.
- Watanabe Y., Himi T., Saito H., Abe K. (1992). Involvement of glycine site associated with the receptor in hippocampal long-term potentiation and acquisition of spacial memory in rats. *Brain Res.* 582, 58-64.
- Wilhelsson U., Li L., Pekna M., Berthold Cl-H., Blom S., Eliasson C., Renner O., Bushong E., Ellisman M., Morgan T. E., y Pekny M. (2004). Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *The J. of Neuroscience* 24 (21) 5016-5021.
- Wilkinson Grant R. (2005). Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N. Engl. J. Med.* 352, 2211-2221.
- Witter M.P. (1989). Connectivity of the rat hippocampus. *The Hippocampus. New Vistas.* N. Y. 53-70.
- Witter M.P. (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* 3: 3, 33-44.
- Wolf O. T., Kirschbaum C. (1999). Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animal and humans. *Brain Res. Rev.* 30, 264-288.
- Zhang G., Ohawa Y., Kametapa S., Shibata M., Waguri S., Uchiyama Y. (2003). Regulation of FLRG expression in rat primary astroglial cells and injured brain tissue by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1). *J. of Neuroscience Res.* 72, 33-45.
- Zielasek J., Hartung H. (1996). Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv. Neuroimmunol.* 6:2, 191-220.
- Zou L. Yamada K., Sasa M., Nabeshima T. (1999). Two phases of behavioral plasticity in rats following unilateral excitotoxic lesion of the hippocampus. *Neuroscience* 92, 819-826.

Zwain I., Yen S. (1999). Dehidroepiandrosterone: Biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology* 140-2, 880-887.