Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Efectos de la radiación X neonatal sobre el hipocampo de rata. Estrategias de neuroprotección

Caceres, Lucila Guadalupe

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Caceres, Lucila Guadalupe. (2013). Efectos de la radiación X neonatal sobre el hipocampo de rata. Estrategias de neuroprotección. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Caceres, Lucila Guadalupe. "Efectos de la radiación X neonatal sobre el hipocampo de rata. Estrategias de neuroprotección". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efectos de la radiación X neonatal sobre el hipocampo de rata. Estrategias de neuroprotección.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Lic. Lucila Guadalupe Caceres

Director de Tesis: Dra. Laura Ruth Guelman

Consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

1ra Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina (UBA)

Centro de estudios farmacológicos y botánicos (CEFyBO) CONICET

Buenos Aires, 2013

Efectos de la radiación X neonatal sobre el hipocampo de rata. Estrategias de neuroprotección.

La radioterapia es un tratamiento utilizado en humanos como herramienta para eliminar células tumorales mediante el uso de radiaciones ionizantes; sin embargo, éstas también puede dañar tejidos sanos debido a la inducción de estrés oxidativo.

Dada la alta radiosensibilidad del Sistema Nervioso Central en desarrollo, el objetivo del presente trabajo fue profundizar en el estudio de sus efectos sobre el hipocampo de animales jóvenes expuestos en el período neonatal.

Más aún, el esclarecimiento del mecanismo de acción de la radiación ionizante podría permitir proponer intervenciones terapéuticas que prevengan sus efectos, siendo el 17β-estradiol una herramienta ideal por poseer múltiples mecanismos de acción neuroprotectora.

Los resultados encontrados sugieren que los cambios observados en la memoria asociativa a P30 se deberían a modificaciones en el hipocampo a nivel molecular e histológico, siendo el sistema GABAérgico uno de los componentes afectados. Asimismo, la expresión de estas alteraciones en el animal joven ocurriría debido a cambios en la PKCβ1 a P15.

Por otro lado, el tratamiento con estradiol fue capaz de prevenir la mayoría de los cambios inducidos por la radiación, permitiendo postular que ejercería su acción neuroprotectora tanto a través de un mecanismo antioxidante como de uno mediado por receptor. Por consiguiente, la vulnerabilidad del hipocampo frente a las radiaciones ionizantes podría prevenirse mediante el uso de fármacos que actúen mediante mecanismos semejantes al estradiol.

Palabras claves: radiaciones ionizantes, especies reactivas de oxígeno, hipocampo, sistema GABAérgico, PKC, neuroprotección, estradiol.

Effects of the neonatal X radiation on the rat hippocampus. Strategies for neuroprotection.

Radiation therapy is a widely used tool to kill tumor cells in humans through the use of ionizing radiations. Unfortunately, they can also damage healthy tissue by the induction of oxidative stress.

Due to the high radiosensitivity of developing Central Nervous System, the aim of the present work was to search more comprehensively about its effects on the hippocampus of young animals exposed to radiation in the neonatal period.

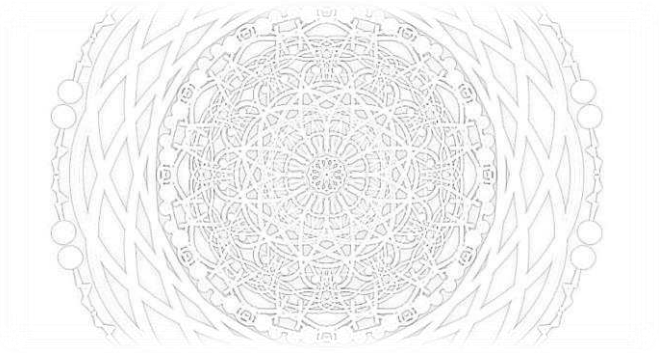
Indeed, the elucidation of the action mechanism of radiation would allow proposing therapeutic interventions to prevent its effects, being 17β -estradiol an ideal tool due to its multiple mechanisms of neuroprotection.

Results obtained in the present work suggest that the changes observed in the associative memory at P30 could be related to hippocampal changes at the molecular and histological level, being the GABAergic system one of the components affected by the radiation. Furthermore, the expression of these alterations in the youth would occur due to changes in the PKCβ1 at P15.

On the other hand, the treatment with estradiol was able to prevent most of the radiation-induced changes, allowing us to postulate that both an antioxidant and a receptor-mediated mechanism might underlie its neuroprotective action.

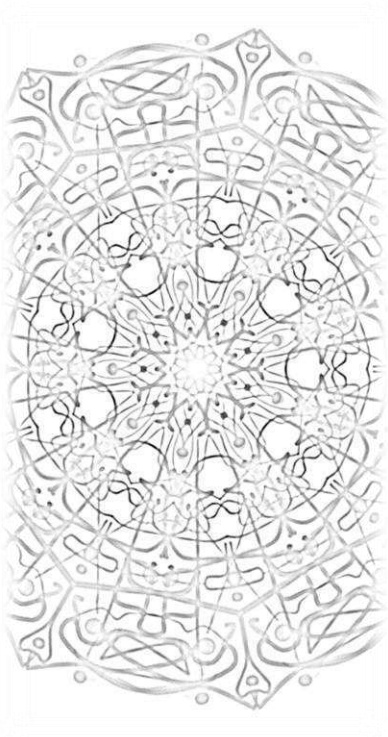
Accordingly, the vulnerability of the hippocampus to ionizing radiation could be prevented by the use of drugs that exert similar neuroprotection mechanisms than 17β-estradiol.

Key words: ionizing radiation, reactive oxygen species, hippocampus, GABAérgic system, PKC, neuroprotection, estradiol.



"La imaginación es más importante que el conocimiento. El conocimiento está limitado a todo lo que ahora conocemos y entendemos, mientras que la imaginación abarca el mundo entero y todo lo que se vaya a conocer y a entender"

Albert Einstein



Al Universo y a todos los seres que permitieron que esto sea posible.

Namasté

Índice

página

Abreviaturas 9

1. Introducción

1.1. Generalidades 12

1.2. Radiaciones Ionizantes 13

1.2.1. Radioterapia y estrés oxidativo 17

1.3. Hipocampo: aprendizaje y memoria 19

1.3.1. Organización anatómica 20

1.3.2. Desarrollo 22

1.3.3. Procesamiento de la información 23

1.4. Proteína kinasa C (PKC) 24

1.5. Sistema GABAérgico 26

1.5.1. Ansiedad 28

1.6. Neurotrofinas 29

1.7. Neuroprotección 32

1.7.1. Estradiol 33

2. Objetivos 38

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales 42

3.2. Procedimiento de radiación 43

3.3. Test conductuales 44

3.3.1. Evitación inhibitoria 44

3.3.2. Elevates Plus Maze (EPM) 45

3.3.3. Open Field (OF) 46

3.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) 47

3.5. Western Blot 48

3.6. Histología

3.6.1. Procesamiento del tejido 49

3.6.2. Inmunohistoquímica 49

3.6.3. Morfometría 50

3.7. Ensayo de Binding 50

3.8. Tratamientos farmacológicos 51

3.9. Análisis estadístico 52

4. Resultados

Parte 1

Efecto de las radiaciones ionizantes

4.1. Los cambios observados en la memoria asociativa se deben a modificaciones a nivel molecular e histológico 54

4.1.1. El grupo Rx presentó un aumento en los niveles de PKCβ1 y una disminución en los niveles de proBDNF 54

4.1.2. Las radiaciones ionizantes producen alteraciones en la capa CA1 del HP y una disminución de células GFAP+ 56

4.2. Las radiaciones ionizantes producen una disminución en los niveles de ansiedad, con modificaciones en el sistema GABAérgico 60

4.2.1. Los animales irradiados mostraron una menor ansiedad en el test de EPM 61

4.2.2. El binding de receptores $GABA_A$ se encontró aumentado en el HP del grupo Rx 61

4.2.3. Los animales irradiados mostraron un aumento en los niveles de GAD_{65-67} 62

4.3. Los cambios en la memoria asociativa observados a P30 tienen su origen en eventos que ocurren a una edad más temprana del desarrollo 63

4.3.1. Las ROS no presentaron cambios a P15 63

4.3.2. A P15 no se observaron cambios en los niveles de proneurotrofinas en el HP del grupo Rx 63

4.3.3. Los animales irradiados presentan una disminución de PKCβ1 a P15 65

Parte 2

Neuroprotección

4.4. El βE actúa como neuroprotector frente a cambios producidos por las radiaciones ionizantes 66

4.4.1. El βE administrado neonatalmente fue capaz de revertir la mayoría de los cambios a nivel bioquímico y conductual observados a P30 66

4.4.1.1. Niveles de ROS 66

4.4.1.2. Conducta 67

4.4.1.3. PKCβ1 67

4.5. El βE podría ejercer su acción a través de distintos mecanismos 69

5. Discusión

Efectos de las radiaciones ionizantes

5.1. La PKC podría estar favoreciendo la sobrevida de las células hipocampales mediante su acción sobre las neurotrofinas 74

5.2. Los cambios a nivel histológico podrían deberse a un desbalance homeostático 77

5.3. Los cambios en el sistema GABAérgico subyacen los cambios a nivel conductual 79

5.4. El cambio en los niveles de PKCβ1 a P15 sería el origen de las alteraciones observadas a P30 82

Neuroprotección

5.5. El βE estaría mediando su neuroporotección tanto a través de un mecanismo antioxidante como de uno mediado por receptor 83

Conclusiones generales 89

6. Bibliografía 92

Abreviaturas

ANS	Ansiedad
Ae	α estradiol
βE	17 β estradiol
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BND	Binding de receptores GABA
Ctl	Grupo control
DC	Desorganización de la capa
DCX	Doblecortina
DCF	Dicloro –fluoresceína diacetato
DPN	Diarilpropionitrilo
EI	Evitación inhibitoria
EPM	Elevated Plus Maze
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GAD	Ácidil glutámico decarboxilasa
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
Gy	Gray
H-E	Hematoxilina-eosina
HP	Hipocampo
NeuN	Marcador de núcleos neuronales
NGF	Factor de crecimiento nervioso
OF	Open Field
PKC	Proteína kinasa C

PPT	Propilpirazol-triol
Px	Día postnatal x
RE	Receptor de estrógenos
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rx	Grupo irradiado
SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema Nervioso Central
S/C	Sin cambios
S/D	Sin datos
Sv	Sievert

1. Introducción

1.1. Generalidades

En los últimos años, el estudio del Sistema Nervioso Central (SNC) en desarrollo ha adquirido relevancia, permitiendo dilucidar los mecanismos mediante los cuales se desencadenan diferentes enfermedades neurológicas y neurodegenerativas. Más aún, esta información también es importante para el perfeccionamiento de los tratamientos médicos de las mismas. Por ejemplo, la esquizofrenia, una enfermedad que se creía era desencadenada en la pubertad o en la adultez, hoy se sabe que se origina durante el desarrollo, debido a que las vías y conexiones no se formaron correctamente a edades tempranas (Cameron et al., 2012).

En los mamíferos, las etapas tempranas de la vida constituyen un período crítico para la adecuada maduración de las capacidades cognitivas y emocionales de los individuos. La etapa neonatal constituye un período sensible de respuesta a factores ambientales externos. En consecuencia, las injurias inducidas durante la maduración del cerebro pueden conducir a alteraciones neurofisiológicas y conductuales frecuentemente relacionadas con la etiología de trastornos neurológicos y/o psiquiátricos. Por tal motivo, en las últimas décadas se ha propuesto la "hipótesis del neurodesarrollo" para tratar de explicar diferentes trastornos neuropsiquiátricos. Según esta hipótesis, las injurias generadas durante la maduración del cerebro pueden conducir a la activación de circuitos neuronales patológicos en períodos más tardíos de la vida, lo cual podría ser seguido por la aparición de síntomas psicopatológicos en la adolescencia o en la edad adulta joven. Los modelos animales han contribuido en gran medida a la comprensión de los trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos y han proporcionado una prueba más de la "hipótesis del neurodesarrollo” (Llorente et al., 2012).

Es importante resaltar que los mecanismos mediante los cuales el SNC en desarrollo puede resultar afectado parecen ser comunes en las diferentes enfermedades neurodegenerativas, de ahí la gran utilidad del uso de modelos animales de injuria al SNC (Cameron et al., 2012). Además, estos mecanismos pueden ser comunes también a enfermedades neurológicas y neurodegenerativas que no necesariamente tienen un origen en el desarrollo. La esquizofrenia, la hipoxia

perinatal, el envejecimiento, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer tienen en común el aumento de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en distintas estructuras, con un consecuente daño oxidante (Martinez-Sánamo, et al., 2011). Las radiaciones ionizantes constituyen un ejemplo de un agente físico ambiental, capaz de afectar al SNC en desarrollo y de producir un aumento de estrés oxidativo.

1.2. Radiaciones ionizantes

La radiación es una forma de energía que se transmite por el aire. Existen distintos tipo de radiación con los cuales podemos encontrarnos en la vida diaria. Algunos tipos de radiación tienen la habilidad de penetrar la materia y causar un proceso llamado "ionización", en el cual se originan partículas con carga eléctrica (Altman y Anderson, 1971; Benés y Gadea Carrera, 2002; Fushiki, 2013, Fig. 1.1). Las radiaciones que causan este efecto son las que mayormente se denominan "radiaciones ionizantes".

La fuente de radiación puede provenir tanto de generadores fabricados por el hombre como de materiales radioactivos. El origen es siempre atómico, pudiéndose producir tanto en el núcleo del átomo como en los orbitales y pudiendo ser de naturaleza corpuscular (partículas subatómicas) o electromagnética (rayos X, rayos gamma) (Benés y Gadea Carrera, 2002).

Los términos Gray (Gy) y Sievert (Sv) son los empleados para indicar una medida de la dosis de radiación recibida. Gy es la unidad física (dosis absorbida), mientras que Sv es la unidad para expresar los efectos de la radiación sobre el cuerpo (dosis efectiva), ya que los efectos biológicos por unidad de dosis absorbida difieren con el tipo de radiación y la parte del cuerpo expuesta. La unidad empleada para ambos es Joules por kilogramo de tejido (Benés y Gadea Carrera, 2002; Fushiki, 2013).

Existen básicamente dos maneras por las cuales las personas pueden resultar expuestas a la radiación: externamente, por estar cerca de una fuente de radiación, o

internamente, a través de un material radioactivo que ingresa al cuerpo (Altman y Anderson, 1971; Fushiki, 2013).

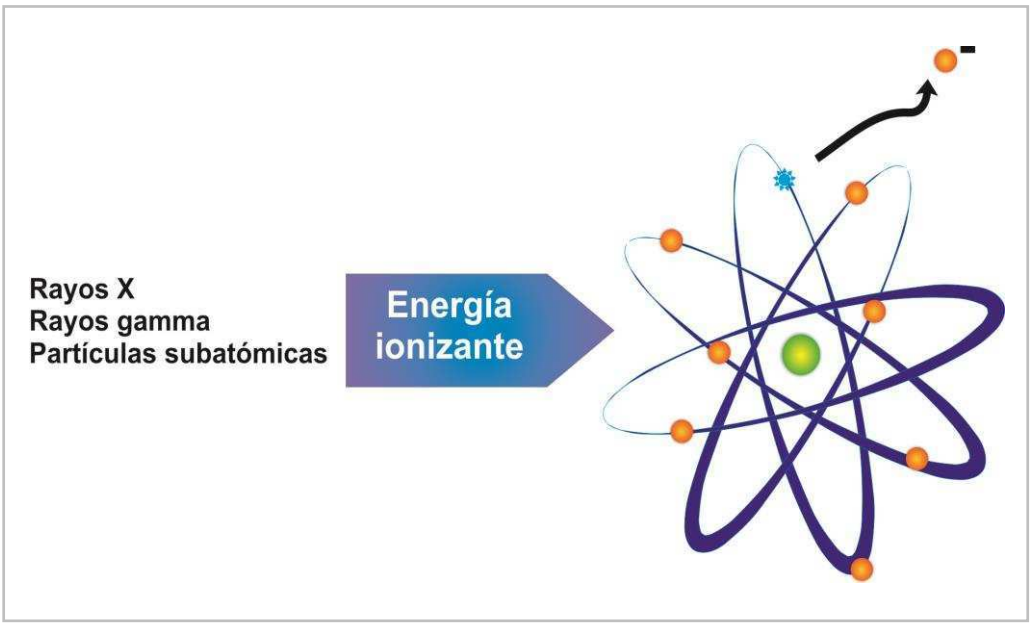


Fig. 1.1. Ionización de la materia debido a la radiación

Todos los organismos vivientes están continuamente expuestos a las radiaciones ionizantes como los rayos gamma cósmicos y terrestres, la ingestión de potasio-40 (^{40}K) y la exposición a radón (Little, 2003, Fig. 1.2). Las radiaciones cósmicas provenientes del sol y del espacio exterior están continuamente penetrando la atmósfera terrestre; la Tierra en sí misma está compuesta por minerales que contienen compuestos de origen radioactivo de forma natural, como el uranio y el torio. El radón, gas radioactivo inerte creado a partir del uranio y el torio en los suelos, se filtra y se concentra en el aire del interior de los edificios, en especial en los sótanos, lugares en los cuales es importante tener un medidor de radón. Pequeñas cantidades de otros materiales radiactivos naturales (como ^{40}K) están presentes en los alimentos y el agua, los cuales contribuyen a una exposición interna. En consecuencia, todos los organismos vivientes estamos expuestos a una radiación de base, siendo la dosis promedio en el mundo de 2.4 mSv por año.

Además de la dosis de radiación recibida de fuentes naturales, ciertas actividades humanas aumentan la exposición: el vuelo a grandes altitudes, los usos

médicos y dentales de la radiación, la generación de energía nuclear y el empleo de la radiación en la ciencia y la industria, así como el uso de materiales radiactivos y las aplicaciones pacíficas y militares de la energía atómica. Debido a ello, el estudio de los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes ha recibido un impulso permanente (Altman y Anderson, 1971; UNSCEAR 1993; Fushiki, 2013).

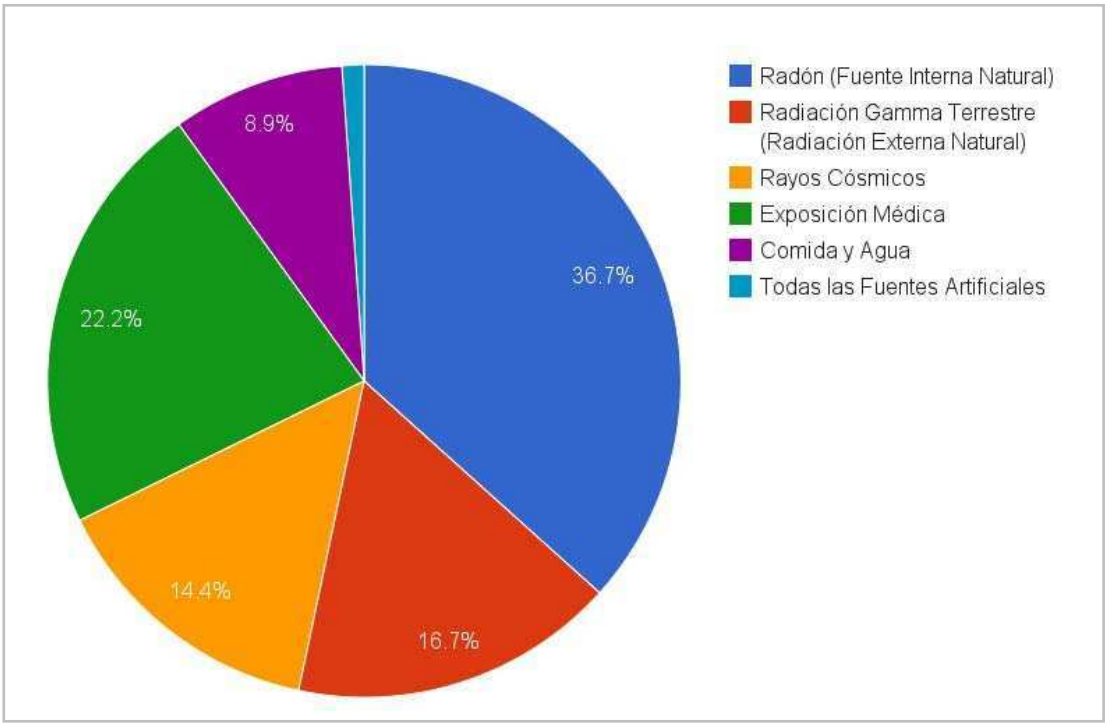


Fig. 1.2: Exposición a las radiaciones ionizantes en humanos.

Existen dos categorías de efectos de las radiaciones ionizantes sobre la salud: los llamados efectos estocásticos y los efectos determinísticos (no-estocásticos). A dosis más bajas, los riesgos de la radiación de generar daño son principalmente estocásticos (es decir, aleatorios, no dependientes de la dosis), los cuales incluyen cáncer (efectos somáticos) y efectos hereditarios. Los efectos determinísticos son caracterizados por una relación dosis-respuesta no lineal, con un umbral de dosis por encima del cual los efectos son observables. Los efectos determinísticos se considera que conducen a la muerte celular de un gran número de células en el tejido afectado pocos días o semanas luego de la exposición. Sin embargo, ciertos efectos determinísticos, como las cataratas o el hipotiroidismo, son manifestados solo luego de varios años. Los efectos estocásticos son los efectos que más impactan sobre la

salud y que se espera que ocurran en las poblaciones expuestas a la radiación. En lo que se refiere a los efectos somáticos y genéticos, se considera que la probabilidad de ocurrencia, pero no de la severidad, depende de la dosis de radiación (UNSCEAR, 1993; Little, 2003; Fushiki, 2013).

En principio, cualquier parte de la célula puede ser alterada por acción de la radiación ionizante. Sin embargo, el ADN es el blanco biológico más crítico debido a la información genética que contiene, pudiendo generar daños irreversibles que conduzcan a la muerte celular (Altman, 1971; Benés y Gadea Carrera, 2002). De hecho, existen riesgos relacionados con la radiación durante el embarazo, los cuales están relacionados con el tiempo de embarazo y la dosis absorbida.

Los riesgos son más significativos durante la organogénesis y el período fetal temprano. Estudios en animales han confirmado una sensibilidad del embrión a los efectos letales de la radiación en el período de pre-implantación del embrión. Con respecto a la inducción de malformaciones, hay patrones dependientes de la edad de gestación y la radiosensibilidad del útero, observándose una máxima sensibilidad durante el período de mayor organogénesis, con una dosis umbral para la inducción de malformaciones de alrededor de 100 mGy (Fushiki, 2013).

En el ser humano, durante las semanas 8-25 post-concepción el SNC es particularmente sensible a la radiación; dosis que excedan los 100 mGy en el feto pueden resultar en la reducción del coeficiente intelectual (IQ). Dosis fetales en el rango de 1000 mGy (1 Gy) pueden resultar en un retardo mental severo y microcefalia, particularmente durante el periodo entre las semanas 8 a 15 y en menor medida durante las semanas 16 a 25 post-concepción. Schull y colaboradores (1991) reportaron que los sobrevivientes de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki que fueron expuestos a la radiación *in útero* durante las semanas 8 a 15 post-concepción exhibieron retardo mental, disminución del tamaño cefálico, convulsiones, bajo rendimiento escolar y displasia cortical (heterotopía) (Schull et al., 1988, 1991; UNSCEAR, 1993; Fushiki, 2013).

1.2.1. Radioterapia y estrés oxidativo

Si bien la radioterapia es ampliamente utilizada en humanos como herramienta para eliminar células tumorales, ésta puede producir daño sobre tejidos sanos que se encuentran cerca de la zona tumoral (Sezen et al., 2008). Por lo tanto, el estudio de los efectos de la radiación sobre tejido normal en modelos experimentales provee de datos útiles a la hora de una administración racional de la dosis.

Distintos grupos de investigación, incluyendo el nuestro, han demostrado que la exposición a radiaciones ionizantes gatilla la producción de estrés oxidativo en los tejidos (Riley, 1994; Guelman et al., 2003, 2004, 2005; Limoli et al., 2004; Di Toro et al., 2007). El estrés oxidativo se origina por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS) y la capacidad antioxidante de la célula (Martinez- Sánamo et al., 2011, Fig. 1.3). El cerebro posee un elevado metabolismo oxidativo y un alto contenido de moléculas susceptibles de ser dañadas por especies reactivas, además de una baja capacidad antioxidante comparada con otros tejidos. Por lo tanto, las ROS y RNS producidas en cantidades abundantes en el cerebro lo hacen más susceptible al daño oxidativo.

El estrés oxidativo ha mostrado ser uno de los factores que predisponen para la neurodegeneración (Brown y Ransom, 2007; Martinez- Sánamo et al., 2011). Dado que ha sido implicado en varios trastornos neurodegenerativos (Cassarino y Bennett, 1999) así como también en modelos de neurotoxicidad (Goodlett y Horn, 2001), el uso de este modelo de radiaciones ionizantes podría permitir también dilucidar los mecanismos fisiopatológicos de diferentes enfermedades del SNC.

Por otro lado, la progresión de la mayoría de los desórdenes en el SNC es determinada por la habilidad de la neuroglia de mantener la homeostasis bajo condiciones de estrés (Giaume et al., 2007). Los astrocitos constituyen un sistema de defensa debido a las moléculas homeostáticas expresadas en la astroglía. Usando estas moléculas, los astrocitos soportan el daño y sostienen la supervivencia de la neurona a través del mantenimiento de la homeostasis del SNC, tal como ocurre luego de

procesos de isquemia, condición en la cual también se observa un aumento del estrés oxidativo luego de producida la injuria (Brown y Ransom, 2007).

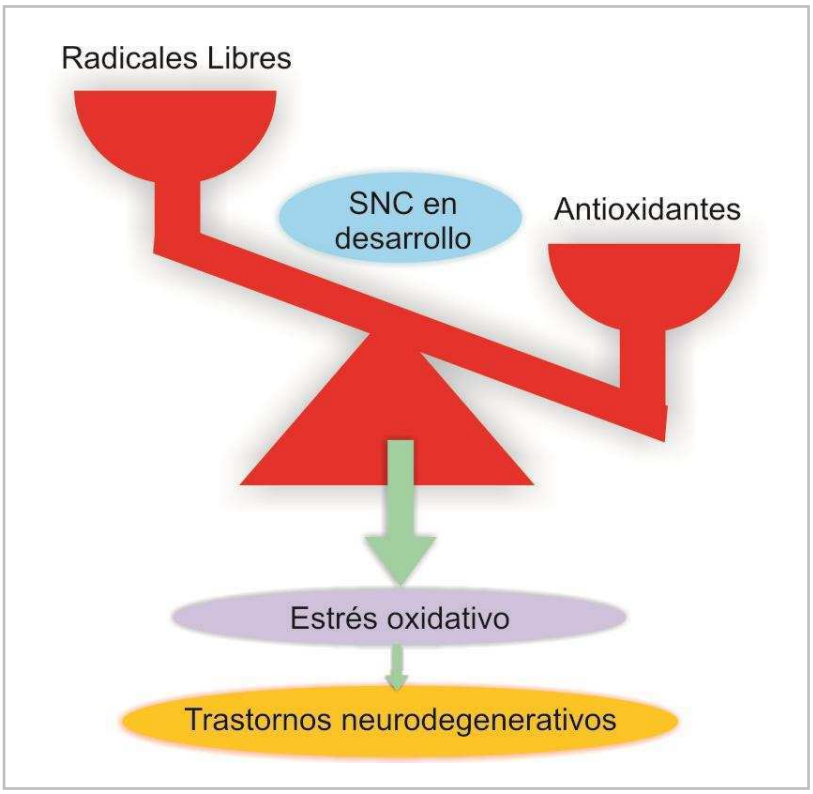


Fig. 1.3. El desbalance entre radicales libres y defensas antioxidantes, puede gatillar la producción de estrés oxidativo originando trastornos neurodegenerativos.

Los efectos más sobresalientes concernientes a la radiación ionizante perinatal están asociados al cerebro en desarrollo (BeirV, 1990; Fushiki, 2013). En consecuencia, en nuestro modelo de irradiación neonatal se espera que los daños producidos por las radiaciones ionizantes sean mayores que los que diferentes autores reportaron luego de la irradiación de animales adultos (Raber et al., 2004; Erkal et al., 2006; Sezen et al., 2008), así como fue observado con nuestro modelo de irradiación en el cerebelo en desarrollo (Caceres et. al., 2009).

La dosis de radiación administrada en nuestro modelo es superior a la dosis usada terapéuticamente en humanos al momento de desarrollo equivalente a la edad de la rata recién nacida (las 24-48 hs de vida en una rata equivalen a la semana 24 a 40 del desarrollo fetal en humanos, tercer trimestre del embarazo o bebé prematuro).

Más aún, se elige la quimioterapia (y no la radioterapia) en niños menores a 3 años de edad por el gran impacto que una dosis elevada pueda producir en un niño (Baranov et al., 1995). Varios autores observaron una relación dosis dependiente con el aumento en la severidad del retardo mental de los individuos expuestos *in útero* a la radiación generada luego de las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki, indicándose un umbral en la región de 0.1-0.3 Gy (Little, 2003). Por lo tanto, no se debería descartar la posibilidad de una irradiación accidental de una mujer embarazada o de un bebé prematuro, lo cual podría conducir a una disminución en las funciones cognitivas (Kisková y Šmajda, 2008). Se han reportado lesiones en el SNC de niños expuestos a la radiación en los eventos de las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki como así también en el transcurso de los accidentes de Chernobyl y Fukushima (UNSCEAR 1993; Kimler, 1998; Palgi et al., 2012; Fushiki, 2013). En consecuencia, la irradiación del SNC, en particular el hipocampo (HP) de ratas neonatas resulta clínicamente relevante (Monje y Palmer, 2003; Fukuda et al., 2004; Naylor et al., 2008).

Las radiaciones ionizantes son capaces de inducir la producción de ROS, las cuales tienen la capacidad tanto de generar toxicidad como de funcionar como moléculas de señalización, capaces de modificar los procesos de memoria. En consecuencia, éstas podrían ser consideradas beneficiosas o neurotóxicas. En efecto, Rola et al. (2004) encontraron un empeoramiento en la performance en el test de evitación inhibitoria (EI) de ratones jóvenes irradiados con 10 Gy de radiaciones ionizantes, sugiriendo un rol neurotóxico de las ROS. Por el contrario, el cambio (mejora en la performance) en la memoria asociativa observada a corto plazo en nuestro modelo en animales irradiados con 5 Gy (Caceres et al., 2010) podría estar relacionada con un efecto “beneficioso” de las ROS, apoyando los resultados de Thiels et al. (2000).

1.3. Hipocampo: aprendizaje y memoria

El SNC posee la habilidad de modificar las conexiones neuronales, lo que le permite afrontar nuevos desafíos del entorno. Poco a poco se comienzan a descubrir las bases moleculares de este proceso, llamado plasticidad, revelando los mecanismos

que subyacen a los procesos de memoria y aprendizaje y cómo pueden ser revertidas sus disfunciones. Una de las estructuras involucradas en estos procesos y que resulta afectada por las radiaciones ionizantes es el HP (Cameron et al., 2012).

1.3.1. Organización anatómica

El HP es una estructura cortical que ocupa una porción sustancial en el cerebro de la rata y que se encuentra a cada uno de los lados del cerebro. La mayor conexión del HP es la corteza entorrinal, que se localiza en la parte posterior de la estructura y la conecta con otras áreas corticales. La segunda mayor conexión del HP es el fornix, el cual lo conecta con profundas estructuras del cerebro.

A las principales subdivisiones del HP se las denomina áreas CA1, CA2 y CA3. Existe también un arreglo regular de neuronas en una estructura asociada, el giro dentado (GD), el cual posee un tipo de células llamadas células granulares (Carew, 2000, Fig. 1.4).

Las principales neuronas en la región de CA1 son llamadas neuronas piramidales, las cuales comprometen alrededor del 90% de todas las neuronas de las regiones CA del HP. Las neuronas de salida (*output*) son las neuronas piramidales de CA1, cuya información es enviada a través de sus axones glutamatérgicos. Estos axones proyectan hacia la corteza entorrinal así como hacia otras estructuras. El HP también recibe una serie de proyecciones modulatorias desde diferentes áreas (Swcatt, 2010).

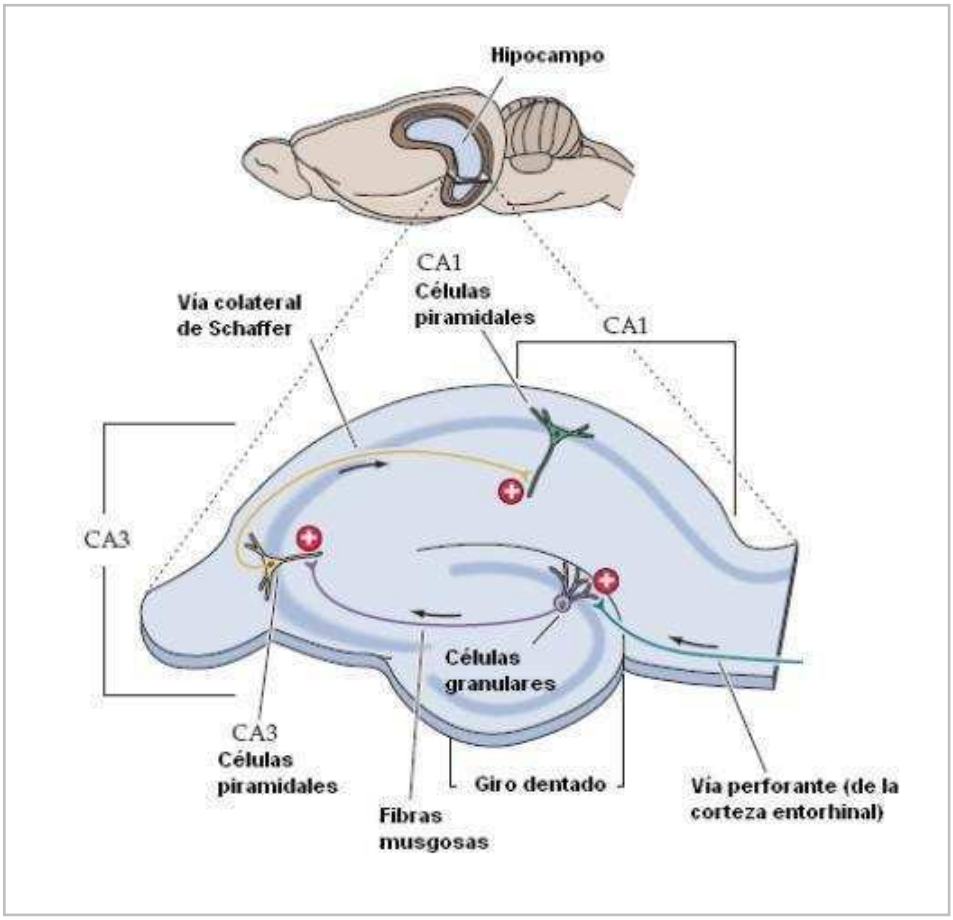


Fig.1.4. Diagrama de un hipocampo de rata que muestra las principales conexiones, vías excitatorias y conexiones sinápticas. Modificado de Purves, 2004.

En los roedores, las áreas en las que se subdivide el HP propiamente dicho definen capas o estratos bien marcados. La capa más superficial es el *Alveus*, que contiene los axones de las neuronas piramidales. Por debajo, se encuentra el *Stratum oriens*, formado por los cuerpos celulares de las células en cesto inhibitorias y de células trilaminares horizontales (sus axones inervan tres *Strata: oriens, piramidal,* y *radiatum*) y las dendritas basales de las neuronas piramidales. Los cuerpos celulares de las neuronas piramidales, principales neuronas excitatorias del HP, se encuentran en el *Stratum piramidal*. El área CA3 del *Stratum* contiene las sinapsis de las fibras musgosas con los cuerpos celulares de las interneuronas, las células biestratificadas y las células radiales trilaminares. El *Stratum radiatum*, al igual que el *Stratum oriens*, contiene las fibras del septo, de las comisuras y las fibras colaterales de Schaffer. También se pueden encontrar algunas interneuronas, entre las que se incluyen células en cesto, biestratificadas y trilaminares radiales. El complejo *Stratum lacunosum-moleculare*

contiene fibras colaterales de Schaffer y fibras de la vía perforante proveniente de la corteza entorrinal, formando sinapsis con las dendritas apicales y distales de las células piramidales (Paxinos y Franklin, 2004).

1.3.2. Desarrollo

La formación de las células piramidales ocurre en la segunda mitad del período de gestación de la rata, comenzando aproximadamente en el día 15 prenatal y culminando al día 19 prenatal (dos días antes del nacimiento). La formación de las células granulares comienza a los 18 días prenatal y llega a aproximadamente un 85% en el período postnatal (alrededor de un mes de vida), continuando su proliferación durante toda la vida. La diferenciación y sinaptogénesis de las células piramidales en la zona proximal de la CA3 se logra al mes de vida postnatal, comenzando en el día postnatal 9 (P9) y logrando una maduración alrededor del P21. Las espinas pedunculadas de las células piramidales de la zona distal del CA3 comienzan a formarse hacia el P9, logrando la maduración al P21 (Avishai-Eliner et al., 2002).

Las primeras neuronas granulares en el GD se producen durante la embriogénesis tardía y el primer período de neurogénesis de células granulares en la segunda semana postnatal. Al P1 de la rata, las neuronas granulares más antiguas son visibles en la hoja suprapiramidal y exhiben dendritas rudimentarias que se extienden por la capa molecular. Las primeras neuronas de adulto están presentes en el P7 y algunas ya son funcionales a esta altura. Estos datos sugieren que el GD podría ser incorporado al circuito hipocampal recién al final de la primera semana de vida. El árbol dendrítico de las células granulares, sin embargo, continua aumentando en tamaño hasta el P14. Luego de este tiempo, el árbol dendrítico de las neuronas granulares más antiguas es esculpido y refinado (Rahimi y Claiborne, 2007).

1.3.3. Procesamiento de la información

Uno de los principales roles del HP y las áreas corticales asociadas es el procesamiento de una amplia variedad de información sensorial. Esta información es luego descargada en la corteza para un almacenamiento de largo término.

Los tipos de información codificados por esta estructura podrían dividirse, a grandes rasgos, en tres categorías (Swcatt, 2010):

- Espacial: el animal aprende que un espacio es aversivo, como en el condicionamiento al miedo contextual (*contextual fear conditioning*). Un tipo celular que es altamente representado a lo largo de las neuronas hipocampales son las neuronas de lugar (*place cells*) las cuales tienen un patrón de disparo específico cuando un animal percibe que está en un lugar en particular. Estas células están involucradas en la representación del espacio en el SNC.
- Temporal: el animal asocia dos estímulos separados en el tiempo, como en el condicionamiento asociativo. El HP participa en la codificación de la memoria episódica, que es la memoria relacionada con una secuencia de eventos y episodios particulares. Además, participa en la codificación del tiempo de los intervalos entre eventos, lo que permite representar el tiempo de asociación entre dos estímulos.
- Asociaciones complejas: el animal puede predecir si un compartimiento tendrá o no recompensa basado en una experiencia previa. El HP es el integrador de diversos estímulos de entrada y el que codifica la relación existente entre estos estímulos.

El ejemplo más estudiado que tiene en cuenta el rol del HP en el procesamiento de información dependiente del tiempo es el condicionamiento asociativo, como lo es la tarea de EI. El test de EI involucra la represión específica de la tendencia natural de la rata a explorar lugares oscuros (Caceres et al., 2010). Esta prueba gatilla en el HP del animal eventos bioquímicos necesarios para la retención del aprendizaje. Estos eventos son similares, en cierta forma, a los que se describen para diferentes tipos de potenciación a largo término (LTP) y otras formas de plasticidad neuronal (Bliss y

Collingridge, 1993; Izquierdo y Medina, 1995). Dentro de los mecanismos responsables de la retención de este tipo de aprendizaje se podría incluir la activación de receptores de glutamato y la participación de al menos cuatro diferentes cascadas de señalización lideradas por distintas proteínas kinasas, como la proteína kinasa C (PKC) (Bernabeu et al., 1995).

1.4. Proteína Kinasa C (PKC)

Las distintas isoformas de la PKC están involucradas en la maduración del crecimiento de neuritas, la plasticidad neuronal, el metabolismo, la proliferación neuronal, la regulación de la expresión génica, la neurodegeneración y el comportamiento, incluyendo los procesos de memoria y aprendizaje. Algunos autores postulan que cascadas anormales de señalización mediadas por la PKC podrían ser la base de la patogénesis en algunos trastornos (Sun y Alkon, 2010). Por otro lado, la PKC podría ser capaz de modular la viabilidad celular, dando como resultado la protección de distintas células neuronales (Staaket al., 1995). En un modelo de isquemia, la activación de PKC ha mostrado producir cambios bioquímicos pre y post sinápticos en los niveles de neurotrofinas y otras proteínas, incluyendo sinaptofisina y BDNF, previniendo la pérdida sináptica e induciendo sinaptogénesis y efectos antiapoptóticos. También ha mostrado aumentar la sobrevida celular y la actividad del BDNF en la región CA1 del HP (Sun et al., 2009).

Según la homología y sensibilidad a los activadores, las 12 isoformas de mamífero de la PKC se dividen en 3 subfamilias: *clásicas*, *nuevas* y *atípicas*. Entre las *clásicas*, se encuentran las isoformas α, β1, β2, y γ (Sun y Alkon, 2010).

Las isoformas *clásicas* son reguladas por calcio, en conjunto con diacilglicerol y fosfolípidos de membrana. Tanto la subfamilia *nueva* como la *atípica* son homólogas estructurales pero pueden ser independientes de la regulación por calcio.

La contribución específica de cada una de las isoformas en los procesos de memoria y aprendizaje no está bien establecida aún (Weeber et al., 2000, Volk et al., 2013). Abeliovich et al. (1993) demostraron que un knock-out para la isoforma

específica de PKCγ resultó en modestos cambios en la memoria, sugiriendo que podrían ser varias las isoformas que estarían participando en estos procesos.

La regulación de la actividad de la PKC ha sido implicada en la plasticidad sináptica y juega un rol esencial en varios tipos de memoria y aprendizaje en diferentes especies. Más aún, su actividad ha sido relacionada con la performance en diferentes tests conductuales (Sun y Akon, 2010), entre los cuales se encuentra el test de EI en ratas (Jerusalinsky et al., 1994). Por ejemplo, inyecciones intracerebroventriculares de inhibidores de la PKC mostraron causar un déficit en el ensayo de EI y en el laberinto de agua (watermaze) (Takashima et al., 1991).

Ha sido reportado que las ROS son capaces de inducir la activación de PKC (Knapp y Klann, 2002; Jung et al., 2004) y que existe una interacción de retroalimentación positiva entre la PKC y las ROS, en la cual la activación de PKC induce la producción de ROS y las ROS también pueden activar la vía de la PKC (Inoguchi et al., 2000; Dai et al., 2006; Adiga y Nair, 2008). En consecuencia, el hallazgo de un aumento de ROS paralelo a un aumento de PKC en el HP de ratas irradiadas al nacimiento sugiere que el incremento en la actividad de PKC inducido por la radiación ionizante podría ser el responsable del subsiguiente incremento en los niveles de ROS (Caceres et al., 2010). Más aún, se ha postulado que la isoforma PKCβ1 podría ser regulada positivamente por ROS (Alzamora y Harvey, 2008; Almeida et al., 2010). En consecuencia, la expresión de la PKCβ1 podría estar aumentada en el HP irradiado y la exposición a la radiación en etapas tempranas del desarrollo podría también interferir con la translocación/activación de dicha isoforma durante el proceso de aprendizaje.

La translocación y activación de la PKC que deviene de un proceso de aprendizaje fue descripta durante la adquisición del condicionamiento de la membrana nictitante en conejos. La activación de la PKC hipocampal es un paso crítico en los eventos neuronales tempranos que median la adquisición y la consolidación de un aprendizaje de EI (Paratcha et al., 2000). Por otro lado, la PKC regula la síntesis, llenado de vesículas y liberación de un gran número de neurotransmisores, incluyendo el ácido gamma aminobutírico (GABA) y el glutamato, ambos neurotransmisores modulatorios de distintos tipos de memoria.

Las isoformas de la PKC son capaces de fosforilar diferentes subunidades del receptor GABA, cambiando su función y modulándolo alostéricamente. Estudios utilizando agentes selectivos para las distintas isoformas de la PKC y ratones modificados genéticamente ayudaron a identificar roles críticos para las isoenzimas PKCβ2, PKCε y PKCγ en varios aspectos de la regulación del receptor $GABA_A$ (Song y Messing, 2004). Se ha observado que la activación de la PKC disminuye la actividad del receptor GABA en ciertos casos (Filippova et al., 2000) y aumenta las corrientes de GABA en otros (Poisbeau et al., 1999). Estos efectos sobre el sistema GABAérgico dependen de la composición de las subunidades y de factores celulares específicos (Sun y Alkon, 2010).

1.5. Sistema GABAérgico

La excitación e inhibición son los mecanismos de modulación fundamentales de la señalización en el SNC. Si bien existen muchos neurotransmisores en el sistema nervioso, el glutamato y el GABA son los dos neurotransmisores que median la mayoría de las señales excitatorias e inhibitorias dentro del SNC, respectivamente. Las neuronas excitatorias garantizan la transmisión de señales a través de varios estados de procesamiento y las neuronas inhibitorias controlan esta transferencia de información (Fishell y Rudy, 2011).

Las neuronas GABAérgicas son la fuente principal de GABA y responsables de la inhibición en el SNC de mamífero. Dependiendo de la región cerebral, constituyen entre un 10% -25% del número total de neuronas corticales, las cuales juegan un papel fundamental controlando y orquestando la actividad de las neuronas piramidales.

Una característica importante del sistema GABAérgico es la prolongada duración del tiempo de desarrollo. La inmunoreactividad a GABA se presenta en el día embrionario 14 en la placa cortical pero exhibe las características de una neurona madura solo postnatalmente. Para los P16– P21, el patrón de inmunoreactividad de GABA es similar al del cerebro adulto.

Durante la maduración, las interneuronas GABAérgicas cumplen diferentes roles: en un primer momento el GABA es despolarizante, por lo cual promueve la proliferación y la migración, favorece la maduración sináptica y la sincronización de redes inmaduras. Conforme las interneuronas van madurando, el GABA gradualmente se convierte en hiperpolarizante y comienza un cambio en todo el sistema GABAérgico. Esto involucra la maduración del patrón de disparo y la liberación y recaptura de GABA. En consecuencia, la transmisión GABAérgica es esencial para la plasticidad de circuitos inmaduros durante períodos críticos en el neurodesarrollo (Le Magueresse y Monyer, 2013).

Las respuestas GABAérgicas rápidas están dadas por los receptores $GABA_A$, los cuales son canales pentaméricos permeables a cloro compuestos por el ensamble de subunidades de 8 clases diferentes ($\alpha_{1–6}$, $\beta_{1–3}$, $\gamma_{1–3}$, δ, ε, q, p, y $\rho_{1–3}$). Aunque la composición del receptor difiere entre los distintos tipos neuronales, el ensamblaje se produce en su mayoría con una estequiometria $2\alpha:2\beta:\gamma$. Los receptores $GABA_B$ están acoplados a proteína G y regulan la corriente de entrada de los canales de potasio y sodio (Kaupmann et al., 1998).

En el HP existe abundancia de receptores GABAérgicos, principalmente en el área CA1, CA3 y en el subículo. Está establecido que existe una relación directa entre el número de receptores GABA en la superficie celular y la fuerza de la inhibición (Abramian et al., 2010).

El GABA es sintetizado por dos isoformas de la acidil glutámico decarboxilasa (GAD), GAD65 y GAD67. Se ha sugerido que GAD67 sintetiza preferencialmente el GABA citoplasmático, mientras que GAD65 sintetizaría el GABA para la liberación vesicular (Soghomonian y Martin, 1998).

Ha sido reportado que la generación de disrupciones en distintos puntos del circuito GABAérgico podrían contribuir a desordenes del neurodesarrollo (Le Magueresse y Monyer, 2013). Por ejemplo, déficits en la señalización de GABA han sido implicados en patologías como el autismo, el cual surge en edades tempranas pero se diagnostica más tardíamente, en el momento de mayor remodelado cortical. La expresión de GAD65 y GAD67 así como la expresión de receptores $GABA_A$ y $GABA_B$

(Fatemi et al., 2010; Yip et al., 2007) están disminuidos en la corteza de pacientes postmortem con autismo.

Diversos autores encontraron que además de la influencia de la PKC sobre el sistema GABAérgico, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) promueve la sinaptogénesis de GABA así como también, induce rápidos cambios en la función del receptor $GABA_A$ (Rose et al., 2004; Carrasco et al., 2007). Sin embargo, la acción del BDNF sobre la señalización de $GABA_A$ es diversa: los efectos pueden ser facilitadores, inhibitorios o bifásicos y también dependen del estado de desarrollo de las neuronas. El rol del BDNF sobre la transmisión GABAérgica no sólo es complejo y diverso, sino que los mecanismos involucrados tampoco han sido completamente dilucidados (Huang et al., 2012).

1.5.1. Ansiedad

La relación entre ansiedad y actividad hipocampal ha sido tema de investigación por varios años. Muchas de las investigaciones fueron realizadas en roedores, ya que la ansiedad es un estado emocional antiguo en la historia filogenética observada a través de las especies de mamíferos.

Si bien el HP fue tradicionalmente considerado como el área de la memoria, esta estructura comenzó a surgir como un integrador emocional y cognitivo del SNC (Femenia et al., 2012). Se ha postulado que el HP puede interactuar con otras estructuras cerebrales, como la amígdala, para formar memorias emocionales (Phelps, 2004), demostrándose la participación del HP en el desarrollo de conductas de ansiedad mediante lesiones y estudios farmacológicos (Fuss et al., 2010).

La ansiedad es básicamente una emoción suscitada por amenazas potenciales o ambiguas y situaciones no totalmente evaluables. Un estado de ansiedad es caracterizado por un conflicto evitación/acercamiento a una situación adversa difusa e incondicionada. A pesar de que las manifestaciones de ansiedad son un ingrediente esencial de la vida, puede extenderse a distintas formas de psicopatología.

La participación del HP en procesos de ansiedad conduce a la hipótesis de la existencia de una relación entre ansiedad y memoria. Los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad $\alpha5$ son altamente expresados en el HP y la corteza. En los últimos años, varios estudios se enfocaron en el uso de un agonista inverso selectivo para $\alpha5$ como agente terapéutico para el deterioro cognitivo. En efecto, ratones con una deleción en la subunidad $\alpha5$ mostraron una alta performance en varios test de memoria como el fear conditioning y el watermaze. Por el contrario, ratones knock out heterocigotas para la subunidad γ del receptor $GABA_A$ muestran ansiedad y comportamientos de depresión acompañados por déficit cognitivos (Femenía et al., 2012).

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la exposición de ratas neonatas a 5 Gy de radiación ionizante induce un empeoramiento en la memoria de habituación, una disminución en las conductas relacionadas a la ansiedad, como así también cambios en la memoria asociativa (Caceres et al., 2009; 2010). Hemos propuesto que la mejora en la performance en el test de EI de los animales irradiados podría deberse a los bajos niveles de reactividad emocional observados, caracterizado como una disminución en los niveles de ansiedad. El Elevated Plus Maze (EPM) es actualmente un test de primera elección para la medición de conductas de ansiedad y para el análisis de drogas ansiolíticas (Ramos, 2008).

1.6. Neurotrofinas

Las neurotrofinas son factores de crecimiento implicados en diferentes funciones en el SNC, incluyendo sobrevida, proliferación, diferenciación, mielinización, apoptosis, crecimiento axonal y plasticidad sináptica. Las neurotrofinas median sus efectos a través de la unión con dos tipos de receptores, el Trk y el p75NTR. El P75NTR pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y fue el primer receptor identificado para NGF (Arévalo y Wu, 2006). Las neurotrofinas comprenden una familia de al menos 4 proteínas relacionadas estructuralmente, entre las cuales se encuentra el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (McAllister et al., 1999), las cuales ejercen su influencia a través de

receptores tirosina kinasa (Trk): NGF activa TrkA y BDNF activa TrkB (Waterhouse y Xu, 2009).

Las neurotrofinas son producidas como pro-isoformas, las cuales luego son clivadas para producir la neurotrofina madura. El último destino de las proneurotrofinas intracelulares pueden ser: clivaje intracelular seguido de secreción, secreción seguida de clivaje extracelular, secreción sin clivaje consecuente o rápida conversión intracelular a neurotrofina madura (Barker, 2009; Sallaberry et al., 2013). El BDNF existe como forma precursora (pro) y madura. El proBDNF es secretado y funciona como ligando para regular la función neuronal. El NGF funciona promoviendo la sobrevida o la apoptosis, dependiendo si está o no procesado (Barker, 2009, Fig 1.5).

El BDNF está ampliamente expresado, tanto en el cerebro en desarrollo como en el cerebro maduro, encontrándose los más altos niveles en el HP y en la corteza (Hofer et al., 1990). Además de su rol como promotor de la proliferación, diferenciación y sobrevida de las neuronas (Davies, 1994), se ha demostrado que el BDNF es crucial en la regulación de la actividad sináptica y de la plasticidad a través de la generación de cambios estructurales y funcionales en las neuronas (Arancio y Chao, 2007; Lu et al., 2008).

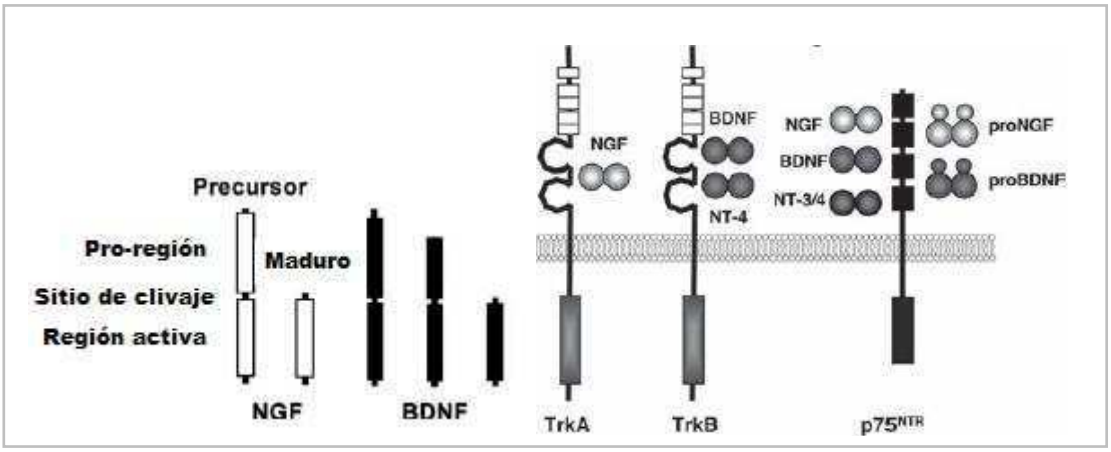


Fig. 1.5. Izquierda: representación esquemática de las isoformas de las neurotrofinas de mamífero. Las pro-neurotrofinas son clivadas por convertasas espcíficas para la liberación de la neurotrofina madura (modificado de Roux y Barker, 2002). Derecha: Neurotrofinas y sus receptores Trk y p75NTR (modificado de Arévalo y Wu, 2006).

Los precursores de las neurotrofinas (las proneurotrofinas) son secretados, siendo el proBDNF el mayormente secretado por las dendritas. Su acción biológica se ejerce a través del complejo p75NTR/sortilina (Waterhouse y Xu, 2009). Mientras la activación de Trk ha sido muy bien estudiada y gatilla la activación de las bien caracterizadas cascadas Ras/Rap-MAPK, PI3KAkt y PLCγ-PKC, la señalización mediada por el p75NTR es más compleja y su rol *in vivo* no ha sido completamente dilucidado (Arévalo y Wu, 2006). La expresión de p75NTR juega un rol central en la regulación de la sobrevida neuronal y el crecimiento axonal en respuesta a las neurotrofinas *target* (Rakin et al., 2008).

El clivaje de proBDNF al BDNF maduro también parece jugar un rol en la restricción de BDNF a las sinapsis activadas. Existe evidencia que sugiere que el proBDNF produciría una *downregulation* de la plasticidad sináptica hipocampal, facilitando la depresión de largo término (LTD) (Woo et al., 2005, Lu et al., 2005). Esto podría funcionar como mecanismo protector en los casos de excitotoxicidad glutamatérgica en desórdenes psiquiátricos (Lu et al., 2005). El ProBDNF es capaz de promover la eliminación de conexiones sinápticas, mientras que el BDNF promueve su aumento. Más aún, la función del proBDNF en el SNC no está limitada solo a la apoptosis y consolidación del LTD, sino que también puede afectar el crecimiento de dendritas, espinas y la sobrevida de células del SNC (Teng et al., 2005; Koshimizu, et al., 2009).

El NGF, descubierto originalmente como molécula de señalización de las células nerviosas, es una molécula endógena que resulta necesaria para la sobrevida, diferenciación y mantenimiento de la plasticidad sináptica, principalmente en neuronas colinérgicas.

Diversos estudios demostraron que el NGF previene la muerte neuronal, promueve el *sprouting* colinérgico, mejora el deterioro de la memoria, y estimula el crecimiento de neuritas a través de la regulación de las proteínas del citoesqueleto. Por estas razones, el NGF es un potencial target terapéutico en distintos tipos de demencia (Choi et al., 2011).

La interacción entre los factores neurotróficos y las isoformas de la PKC representan un importante mecanismo endógeno de cambio entre la sobrevida y la muerte neuronal (Sun y Alkon, 2010). Arévalo y Wu (2006) demostraron que las neurotrofinas pueden producir la activación de diferentes isoformas de la PKC a través del inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG).

1.7. Neuroprotección

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que es posible prevenir parcialmente los daños producidos por las radiaciones ionizantes en el cerebelo a nivel conductual, del estado oxidativo e histológico, a través del uso de agentes como la amifostina y la deferoxamina, los cuales resultaron ser neuroprotectores a través de un mecanismo antioxidante (Guelman et al., 2003, 2004, 2005).

Diferentes estudios han mostrado que la terapia antioxidante puede retrasar o disminuir los síntomas relacionados con las enfermedades neurodegenerativas, como la generación de efectos benéficos cognitivos en pacientes con enfermedad de Alzheimer y disminución de algunos síntomas en pacientes con enfermedad de Parkinson (Martinez-Sámano et al., 2011).

Las hormonas sexuales, como los estrógenos, también han mostrado jugar un rol neuroprotector en diversos modelos animales de isquemia focal y global (Wise y Dubal 2000; Lebesgue et al., 2009; Saraceno et al., 2010). Más aun, el tratamiento de ratas macho con 17β-estradiol (βE) mejoró la respuesta neurológica luego de una injuria traumática (Green y Simpkins, 2000) o de un infarto neonatal (Nuñez et al., 2007). En consecuencia, se puede hipotetizar que el βE podría prevenir el daño inducido por diferentes injurias cuya patofisiología involucre la generación de estrés oxidativo, incluyendo a las radiaciones ionizantes.

1.7.1. Estradiol

Los estrógenos son hormonas multifacéticas que modulan muchos aspectos de la función neuronal y están asociados también con un gran número de beneficios clínicos a nivel neurológico.

Como neuroprotectores, los estrógenos mostraron actuar de manera rápida y aguda, como así también de manera crónica y a largo plazo en la fisiología neuronal. Esto puede deberse a que se produciría una activación diferencial de los receptores de estrógeno (RE), uno de los cuales reside en la membrana celular.

Si bien en los últimos años se comenzó a estudiar al estradiol como agente neuroprotector, poco se sabe aún acerca del mecanismo de acción de su función neuroprotectora. Los estrógenos producen una gran cantidad de efectos celulares, incluyendo la activación de su receptor nuclear, la disminución en la expresión de proteínas apoptóticas, la interacción con cascadas de segundos mensajeros, las alteraciones en la activación glutamatérgica y la actividad antioxidante (Manthey y Behl, 2006). Se sabe que muchos de estos efectos aumentan la supervivencia neuronal, pero aún no se sabe cuál es la vía responsable (Connell y Saleh, 2011).

Clásicamente, los estrógenos llevan a cabo sus efectos como hormonas sexuales mediante su receptor citosólico-nuclear, al cual se unen luego de su entrada a la célula mediante un proceso de difusión pasiva. Luego de una serie de pasos de activación, el complejo estrógeno-receptor (E-RE) se asocia con el elemento respondedor de estrógeno (ERE) ubicado en el ADN y funciona como un reforzador de la inducción de genes que contienen ERE. El gen anti-apoptótico bcl-2 contiene un ERE en la región promotora y la expresión de bcl-2 se encuentra también aumentada con la exposición a βE.

Muchas líneas de investigación sugieren que este efecto neuroprotector del βE no estaría mediado únicamente por el mecanismo clásico de unión al receptor, sino que actuaría también mediante otros mecanismos. En primer lugar, la administración de antagonistas del receptor de βE no atenúa las acciones neuroprotectoras del βE en modelos de neurotoxicidad. Además, la estructura activada relacionada con los

procesos de neuroprotección difiere de la estructura activada relacionada con la activación mediada por receptor. La estructura asociada a la neuroprotección consiste en la posesión de muchos anillos fenólicos A de estrógenos. El α- estradiol (αE), que tiene bajo potencial estrogénico, resulta ser un potente esteroide neuroprotector en células en cultivo y modelos animales de neurotoxicidad. Finalmente, los estrógenos han sido capaces de atenuar el estrés oxidativo que induce la muerte neuronal en células HT-22, una línea celular que carece del receptor nuclear de estrógenos. Aunque el receptor nuclear de estrógenos podría contribuir con los efectos neuroprotectores, hay mucha evidencia que indica que los estrógenos pueden incrementar la supervivencia neuronal en ausencia de su actividad clásica, probablemente mediante un mecanismo de acción antioxidante (Green y Simpkins, 2000; Manthey y Behl, 2006). Si bien no se puede descartar que el βE ejerza su acción neuroprotectora través de la activación de los RE, la actividad antioxidante de los estrógenos ha recibido creciente atención (Behl 2002; Shughrue et al., 1997; Jover et al., 2002; Connell et al., 2007).

Esta actividad antioxidante estaría relacionada con la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C3 en el anillo esteroide de la hormona (Mann et al., 2007). La acción directa del βE fue observada en ausencia del RE funcional, tanto *in vitro* como *in vivo* (Prokai y Simpkins, 2007; McClean y Nuñez, 2008), aunque la participación de mecanismos indirectos, como la regulación de enzimas antioxidantes (Borrás et al., 2005), no debería ser descartado (Fig. 1.6).

Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron, en cultivos de células granulares de cerebelo expuestas a la radiación, un aumento en los niveles de ROS que fue revertido luego del tratamiento con βE, sugiriendo que su acción neuroprotectora podría ser mediada por un mecanismo antioxidante (Zorrilla Zubilete et al., 2011).

En consecuencia, es razonable hipotetizar que si el βE actúa a través de un mecanismo antioxidante, se podrían usar en su lugar enantiómeros no feminizantes como el αE. Diversos autores mostraron que el αE es un potente neuroprotector tanto *in vitro* como en modelos animales, lo que resultaría clínicamente relevante (Simpkins et al., 2004; Yi et al., 2008, Fig. 1.6).

Se identificaron dos tipos principales de receptores estrogénicos: REα y REβ, además del receptor putativo de membrana GPR30 (Connell y Saleh, 2011). Los RE se expresan de manera abundante en varias áreas del cerebro (Don Carlos et al., 2009). Tanto el REα como el REβ se expresan en la corteza cerebral de ratas adultas (Connell y Saleh, 2011). Si bien el HP tiene menos receptores que otras áreas, la existencia de RE hipocampales no debe ser subestimada (Shughrue et al., 1997; Toran- Allerand, 2004; Fan et al., 2010). En consecuencia, se podría postular que ambos receptores podrían estar involucrados en la neuroprotección. Por ejemplo, se sabe que los mismos son capaces de mediar la neuroprotección frente a la toxicidad del péptido β amiloide y el estrés oxidativo inducido por glutamato (Fitzpatrick et al., 2002; Mize et al., 2003).

El estradiol también puede interaccionar con los REs ubicados en la membrana plasmática, el citoplasma y las mitocondrias tanto en neuronas como en células gliales, activando diferentes vías de transducción de señales: la vía de PI3K quinasa (Cardona-Gómez et al., 2002; McEwen, 2002), la vía de quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Toran-Allerand et al., 1999) o la de las proteínas G (Moss et al., 1999; Raap et al., 2000). Estos efectos del βE se caracterizan por ocurrir rápidamente, en segundos o minutos.

El uso de ligandos específicos para los RE provee una herramienta farmacológica para estudiar la implicancia de cada RE en el mecanismo de neuroprotección. El PPT (propil-pirazole-triol, agonista REα) demostró ser 400 veces más afín al REα que al REβ y es inactivo sobre la actividad transcripcional del REβ (Harrington et al., 2003), mientras que el DPN (diarilpropionitrilo, agonista REβ) demostró tener 100 veces más afinidad por el REβ que por el REα y tiene más de 170 veces más potencia relativa en ensayos transcripcionales sobre REβ que REα (Meyers et al., 2001).

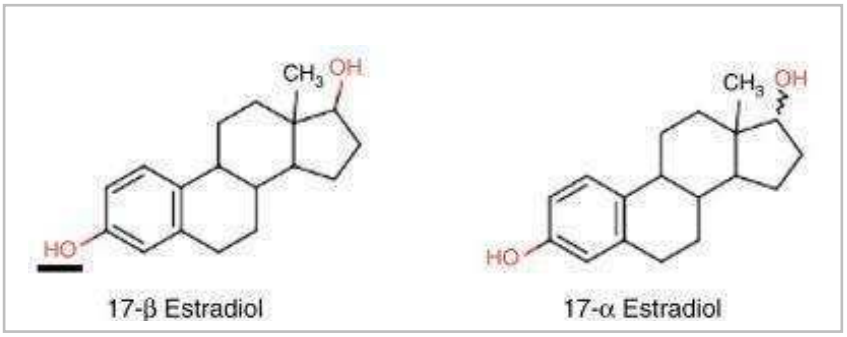


Fig. 1.6. En ambos compuestos se puede observar la presencia del grupo hidroxilo en la posición C3, lo que les permitiría ejercer su acción antioxidante (Mann et al., 2007).

El REβ cumple un rol crucial en el mantenimiento y desarrollo del cerebro, mientras que el REα parece estar implicado en una variedad de eventos celulares asociados con neuroprotección contra diferentes injurias neuronales (Dubal y Wise, 2001; Zhang et al., 2009). Dubal y colaboradores (2001) reportaron que la deleción del REβ, usando ratones knock out, no afecta la neuroprotección por βE, mientras que estas acciones sí fueron afectadas en los ratones *knock out* para el REα. Sin embargo, la activación del REβ demostró promover la neuroprotección contra la excitotoxicidad por glutamato en neuronas hipocampales (Zhao y Brinton, 2007). En consecuencia, podría esperarse que el βE se comporte como un neuroprotector, actuando por diferentes mecanismos.

1. Objetivos

El objetivo general del presente proyecto fue profundizar en el estudio de los efectos de las radiaciones ionizantes a nivel bioquímico, conductual y molecular en animales adultos expuestos durante el desarrollo. Parte de estos efectos podrían ser gatillados por un aumento del estrés oxidativo inicial que persistiría, en parte, debido a una retroalimentación positiva generada por el incremento de la actividad de PKC (Caceres et. al., 2010).

Dado que hemos reportado en los animales irradiados una mejora en la performance en una tarea de memoria asociativa y que la PKC podría ser la responsable de dicho cambio, se procedió a evaluar distintos parámetros que podrían participar en dichos procesos y que podrían ser también potencialmente regulados por la PKC.

En particular, uno de los objetivos fue evaluar los niveles de PKCβ1 en el HP, una de las isoformas de la PKC que puede ser up-regulada por ROS (Almeida et al., 2010) y que además resulta relevante a nivel conductual, ya que está principalmente involucrada en los eventos sinápticos tempranos responsables de la adquisición y consolidación de la memoria en el test de evitación inhibitoria a corto plazo (Paratcha et al., 2000).

Por otro lado, debido a la conexión entre estados de ansiedad y memoria, se evaluaron mediante el EPM los niveles de ansiedad en ratas irradiadas con el objetivo de encontrar una relación con los cambios en la memoria asociativa encontrados previamente. Además, dado que el sistema GABAérgico podría estar alterado como respuesta a la acción de las ROS y la PKC, otro objetivo fue evaluar los niveles de la enzima sintética de GABA, la GAD, y el binding de sus receptores $GABA_A$ y relacionar estos potenciales cambios con los observados en los niveles de ansiedad.

Adicionalmente, dado que las ROS también podrían comprometer la integridad del HP y la neuroplasticidad por disrupción de la función de neurotrofinas (Aiguo et al, 2010), un tercer objetivo fue evaluar los niveles de las neurotrofinas BDNF y NGF en el HP, como así también realizar un estudio a nivel histológico de esta estructura.

Un análisis de la secuencia temporal de los cambios inducidos por la radiación fue realizado con el objeto de dilucidar cuál podría ser el blanco primario de las radiaciones ionizantes en este modelo.

Finalmente, una vez esclarecido el hipotético mecanismo mediante el cual la radiación generaría su acción en este modelo, el último objetivo se orientó a evaluar alguna forma de intervención terapéutica que pueda reparar o prevenir los daños generados. Fue seleccionado el βE como una herramienta ideal por poseer múltiples mecanismos de acción neuroprotectora. Con el objetivo de dilucidar el mecanismo mediante el cual este fármaco podría prevenir los cambios producidos por la radiación, se utilizaron además como posibles agentes reparadores de daño el α-estradiol -el cual se une débilmente al RE pero que mantiene actividad antioxidante- como así también agonistas selectivos de los RE, un agonista REα (propil-pirazole-triol) y un agonista REβ (diarilpropionitrilo).

1°) Hipótesis: Los cambios en la memoria asociativa se deberían a modificaciones a nivel molecular e histológico.

Objetivo específico:

a) Determinar los niveles proteicos de la isoforma PKCβ1, el proBDNF y el proNGF en HP mediante ensayos de WB.
b) Realizar histología convencional en cortes de HP.
c) Realizar inmunohistoquímica para astrocitos y proliferación en cortes de HP.

2°) Hipótesis: Las radiaciones ionizantes producirían una disminución en los niveles de ansiedad con modificaciones en componentes del sistema GABAérgico.

Objetivo específico:

a) Analizar mediante el EPM si las radiaciones ionizantes fueron capaces de modificar los niveles de ansiedad.
b) Caracterizar el receptor $GABA_A$ en HP mediante ensayos de binding y determinar los niveles de GAD en ensayos de WB.

3º) Hipótesis: Los cambios en la memoria asociativa a los 30 días de edad tienen su origen en eventos que ocurren a una edad más temprana en el desarrollo.

Objetivo específico:

Determinar la relación y el orden en el cual se suceden los cambios en los niveles proteicos de la PKCβ1, BDNF, NGF, GAD 65-67 (mediante WB), niveles de ROS y receptores de $GABA_A$ (por medio de la técnica de binding) a la edad de 15 días, lo cual desencadenaría los cambios posteriores en la memoria asociativa a los 30 días.

4°) Hipótesis: El βE actúa como neuroprotector frente a los cambios producidos por las radiaciones ionizantes.

Objetivo específico:

a) Evaluar la acción del βE administrado de manera sub-crónica en el período neonatal en animales irradiados y sus respectivos controles. Estudiar su capacidad neuroprotectora mediante el análisis de parámetros conductuales y bioquímicos que presentaron diferencias significativas en animales irradiados.
b) Evaluar el mecanismo de acción de la función neuroprotectora. Determinar si los efectos se producen a través de una acción antioxidante, mediante la administración de αE y/o a través dela participación de los receptores mediante la administración de los agonistas selectivos de los RE, PPT (propil-pirazole-triol, agonista REα) y DPN (diarilpropionitrilo, agonista REβ).

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales

Ratas Wistar albinas de ambos sexos fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) o en el Instituto de Investigaciones Cardiológicas Alberto Taquini (UBA-CONICET) entre los 30 y 60 días de vida. Dado que para el presente proyecto se debían utilizar ratas neonatas, los apareamientos se realizaron en el Bioterio de la 1ª Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina (UBA-CEFyBO-CONICET), lugar donde se llevaron a cabo los experimentos. Se aparearon 1 macho y 2 hembras en jaulas de reproducción y las ratas preñadas fueron separadas en jaulas individuales pocos días antes del alumbramiento. El día de nacimiento (día 0) fue determinado mediante la inspección diaria de las jaulas. Las ratas neonatas fueron asignadas al azar a los diferentes grupos, según el diseño experimental. Solo los machos fueron utilizados.

Luego de los respectivos tratamientos, los animales retornaron con sus madres, un grupo hasta los 15 días de vida y otro se mantuvo con su madre hasta los 22 días de vida. Luego del destete, se mantuvieron de a 6 animales por jaula hasta su utilización a los 30 días de vida. Todos los animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (encendido de la luz: 7am) y a una temperatura de 22±2 °C.

Los animales fueron manipulados y sometidos a eutanasia de acuerdo a las normas del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de de Laboratorio (CICUAL, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina). El protocolo utilizado fue aprobado por este Comité bajo la resolución 2079/07 y 081/10. El CICUAL adhiere a las reglas de la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (NIH). Se tomaron las medidas necesarias para minimizar el dolor y disconfort en los animales, para lo cual se utilizó la guía ARRIVE (Kilkenny et al. 2010). Para los estudios bioquímicos y moleculares, los animales fueron sometidos a eutanasia por decapitación con guillotina. Los animales utilizados en experimentos conductuales, fueron sometidos a eutanasia en una cámara de CO_2, diseñada “ad hoc”.

3.2. Procedimiento de irradiación

Machos Wistar neonatos (entre 24 y 48 h después del nacimiento) fueron expuestos a una única dosis de rayos X de 5 Gy en su extremidad cefálica, para lo cual los animales fueron inmovilizados en un soporte de plástico. Dado que 1 Gy es la unidad de dosis absorbida equivalente a 1 J/kg, la energía de radiación absorbida por el tejido fue de aproximadamente 5 J/kg. La fuente de irradiación utilizada consistió en un acelerador lineal de electrones de alta energía (Mevatron Siemens, 6 MV de energía, Fig. 3.1).

Fig. 3.1: Acelerador lineal de electrones utilizado para radioterapia. Este dispositivo es similar al utilizado en nuestro modelo de radiación neonatal. Fuente: www.abchoy.com.ar

El haz de rayos X fue alineado sobre la cabeza de los animales a una distancia de 50 cm y homogenizado usando placas de acrílico. La tasa de dosis usada fue de aproximadamente 1 Gy/min, siendo el tiempo total de exposición a la radiación de aproximadamente 5 min. El número de sujetos permaneció constante a lo largo del estudio debido a que la dosis usada en el presente estudio no produjo la muerte de los animales.El experimentador usó protección contra la radiación en todo momento. Diseño experimental Fig. 3.2.

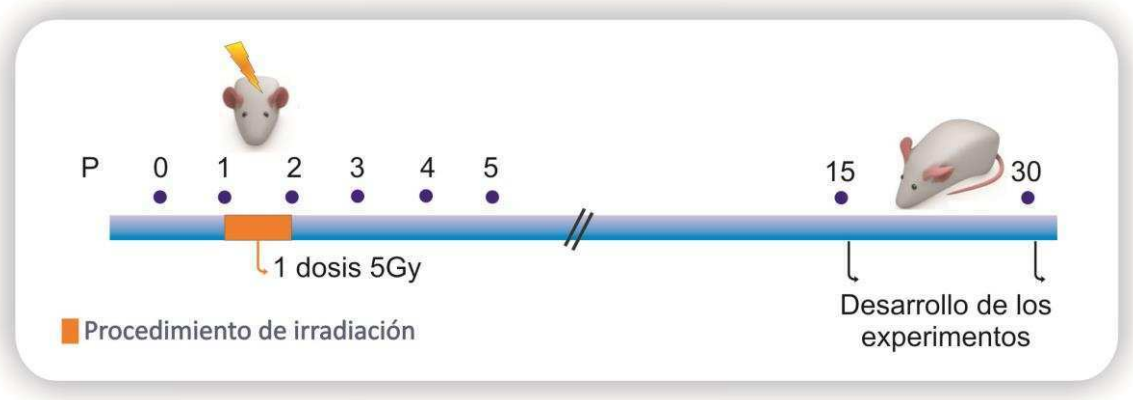


Fig. 3.2. Diseño experimental. P: día postnatal.

3.3. Test conductuales

Todos los experimentos fueron desarrollados en una sala de comportamiento aislada, entre las 11am y las 4am.

3.3.1. Evitación inhibitoria (EI)

El test de evitación inhibitoria permite evaluar el recuerdo de una experiencia aversiva mediante la simple evitación de un ambiente en el cual ocurrió dicha experiencia.

Diferentes publicaciones han demostrado que el HP dorsal está involucrado en este tipo de memoria asociativa (Ennaceur y Delacour 1988; Izquierdo y Medina, 1997). El dispositivo utilizado fue similar al descripto por Roozendaal et al. (2002), el cual consiste en una caja (60 cm x 60 cm x 40 cm) dividida en dos compartimientos: uno está iluminado, mientras que el otro está equipado con una cubierta removible que lo mantiene oscuro. Ambos compartimientos están separados por una sección removible. El piso del compartimiento oscuro consiste en una rejilla metálica por la cual puede circular una corriente continua, Fig.3.3

Fig. 3.3: Dispositivo utilizado para la realización del test de EI. El compartimiento con la rejilla corresponde al compartimiento oscuro.

Habituación: la rata fue colocada en el compartimiento luminoso y se dejó que pase 3 veces al lado oscuro o que quede 3 min en el mismo. Luego de 10 min de descanso, se la colocó nuevamente en el lado luminoso y, una vez que pasó al compartimiento oscuro, se la dejó 10 seg en él. Entrenamiento: la rata se colocó en el compartimiento luminoso y se tomó el tiempo que tardó en pasar al lado oscuro (T1). Una vez en él, recibió un shock eléctrico de 1,2 mA, luego de lo cual retornó a su jaula. Testeo: se realizó el test de retención, tomándose el tiempo en que la rata tardó en pasar al lado oscuro (T2). La latencia para pasar al lado oscuro fue registrada hasta un tiempo máximo de 5 min. En esta tercera exposición, la rata no recibió el shock eléctrico. Se evaluó la latencia de escape como el cociente T2/T1. La tercera exposición se realizó a la hora (memoria de corto plazo). Para minimizar el estímulo olfativo, la caja se limpió con una solución de etanol 10⁄ entre sesiones y entre animales.

3.3.2. Elevated Plus Maze (EPM)

El test de EPM es utilizado para cuantificar los niveles de ansiedad, ya que está basado en el conflicto natural de la rata a explorar un nuevo ambiente y la tendencia a evitar áreas potencialmente peligrosas (Pellow et al., 1985).

Fig. 3.4: Dispositivo utilizado para la realización del test de EPM.

El dispositivo consiste en un laberinto en cruz de madera con 4 brazos de iguales dimensiones (50 cm x 10 cm), elevado 50 cm del piso, Fig. 3.4. Dos de los brazos poseen paredes de 40 cm de altura y se encuentran perpendiculares a los otros dos brazos que son abiertos. Para evitar caídas de los animales, los brazos abiertos poseen un borde de Fórmica de 0.5 cm de altura. El EPM se ilumina de manera tenue mediante una lámpara que se encuentra a 200 cm del laberinto.

Cuando comienza la sesión, la rata es ubicada en el centro del laberinto, mirando hacia los brazos cerrados. La sesión fue grabada por 5 min usando una video cámara digital y se cuantificó el porcentaje de tiempo que la rata permanecía en cada tipo de brazo (abierto o cerrado). Para eliminar claves olfatorias, el dispositivo fue limpiado entre animales con una solución de etanol al 10⁄ (Brenes et al., 2009). Los animales que cayeron del dispositivo fueron excluidos del análisis estadístico.

3.3.3. Open Field (OF)

La habituación a un ambiente novedoso es una de las más elementales formas de memoria no asociativa, mediante la cual la repetida exposición a un mismo ambiente induce una reducción en el comportamiento exploratorio, lo cual depende del HP (Vianna et al., 2000).

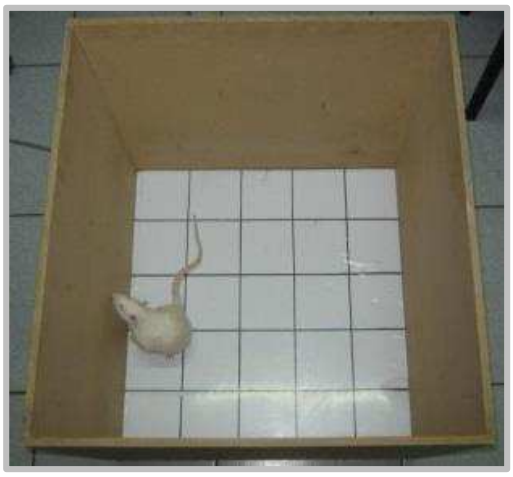


Fig. 3.5: Dispositivo utilizado para la realización del test de OF.

El dispositivo consiste en una caja de madera de 50 cm x 50 cm x 45 cm con la base dividida por líneas negras en 25 cuadrados iguales construida "ad hoc", Fig. 3.5. Luego de 3 min de habituación a la habitación comportamental, los animales fueron ubicados en el cuadrante inferior izquierdo y se les permitió desplazarse libremente durante 6 min. Luego de un intervalo entre sesiones de 1 h, las ratas fueron nuevamente expuestas al OF por otros 6 min. El número de líneas cruzadas fue registrado usando una video cámara digital y comparado con la primera sesión para evaluar la memoria de habituación (Barros et al., 2006). Se definió como S1 al número de líneas cruzadas durante la primera exposición al OF y S2 al número de líneas cruzadas durante la segunda exposición. Se definió S2/S1 como el cociente de habituación donde valores menores a 1 reflejan la existencia de una memoria de habituación. Para minimizar las claves olfatorias, el piso de la caja se limpió con una solución de etanol 10⁄ entre sesiones y entre animales.

3.4. Determinación de especies reactivas de oxigeno (ROS)

Los niveles de ROS en el HP fueron determinados por el método descripto por Driver et al (2000). El HP se homogeneizó en una solución de Locke's (0.5 mg de tejido/ml). Se tomaron alícuotas de los homogenatos y se dejaron a temperatura ambiente por 5 min. Se agregó dicloro-fluoresceína diacetato (0.97mg/ml en metanol, 10 µM, concentración final) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15

min. Se midió la fluorescencia a 485 nm (excitación) y 530 nm (emisión). Se realizó una curva estándar, usando dicloro-fluoresceína oxidada (DCF). Los resultados fueron calculados como pmol DCF/mg de tejido/min y expresados como promedio ± SEM.

3.5. Western Blot

El ensayo se realizó en homogenatos de HP. Las muestras fueron suplementadas con solución de buffer muestra 1X (2% SDS, 10% (v/v) glicerol, 10 mMTris–HCl, pH 6.8, 0.06% azul de bromofenol). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y transferidas a membrana de PVDF (Amersham Biosciences, UK) usando el dispositivo Transblot Mini II (Bio-Rad) a 100 V (voltaje constante), 1 h a 4 °C. Las proteínas fueron visualizadas con una tinción reversible de solución Ponceau-S (Sigma, Co., MO, USA) y luego se procedió a lavar con buffer Tris (TBS). Los sitios de unión no especifica fueron bloqueados con buffer de bloqueo (5% leche descremada, 3% gelatina) por 2 hs. Las membranas fueron incubadas overnight a 4 °C con el anticuerpo anti péptido PKCβ1 (1/250) Abcam Biochemicals, Cambridge, MA, USA), pro-NGF (1/500), pro-BDNF (1/2000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) o GAD 65/67 (1/1000, Abcam Biochemicals, Cambridge, MA, USA). El anticuerpo anti-β-actina (1/500, Santa Cruz Biotechnology) fue utilizado como control de carga.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario IgG anti-rabbit conjugado con horseradish peroxidasa (1/5000, Abcam Biochemicals, Cambridge, MA, USA) por 2 hs a temperatura ambiente, con agitación. La densidad óptica (OD) de las bandas fue determinada cuantitativamente por densitometría luego del agregado de una solución de luminol y H_2O_2, utilizando el procesador GE Health care Image Quant. Para el análisis se utilizó el software Image J (versión 1.43u, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3.6. Histología

3.6.1. Procesamiento del tejido

Los animales fueron anestesiados con hidrato de coral (28% p/v; 0.1 ml/100g), y perfundidos intracardiacamente con 4% de paraformaldehido en 0.1 M de buffer fosfato, pH 7.4. El cerebro fue removido y post-fijado en la misma solución fijadora por 2 h a temperatura ambiente y luego inmerso overnight a 4 °C en 0.1 M de buffer fosfato, pH 7.4.

Se obtuvieron secciones coronales del HP (40 µm de espesor) utilizando un vibrátomo (VT 1000 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Algunos cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina mientras que otros cortes fueron utilizados para la técnica de inmumohistoquímica usando anticuerpos específicos.

3.6.2. Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica fue desarrollada en secciones en flotación y agitación moderada. Se inhibió la peroxidasa endógena (3% H_2O_2, 30% metanol, 70% PBS 0.1 M) y se bloqueó utilizando una solución de PBTBSA (PBS 0.1M, 0.3% tritón, 0.3% BSA). Las secciones fueron incubadas overnight at 4 °C con anticuerpo primario anti mouse para NeuN (1:1000, Sigma-Aldrich Co., MO, USA), anti mouse para GFAP (1:2000), Dako. Agilent Technologies Company, Dinamarca) y anti rabbit para DCX (1:500, Sigma-Aldrich, Inc). Luego de varios lavados las secciones fueron incubadas por 2 hs a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti mouse IgG, 1:300, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA o anti rabbitIgG1:500, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Para el revelado se utilizó el kit ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). La actividad de la peroxidasa fue revelada con peróxido de hidrogeno 0.01% , utilizando 3,3′-diaminobenzidina como cromógeno (DAB, Sigma). Se tomaron fotografías de las secciones con un microscopio Axhiophot Zeiss.

3.6.3. Morfometría

El grado de severidad de la lesión fue determinado mediante la medición del ancho de las capas y el número de células utilizando el software Image J (versión 1.43u, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (Roy et al., 2005). Para garantizar un muestreo uniforme, se mantuvieron las orientaciones septotemporal y mediolateral y se usaron las posiciones de los vasos sanguíneos como guía. Los valores obtenidos para cada parámetro en un animal dado fueron promediados a un solo valor. Se contaron las células en un tamaño de campo fijo (60000 μm^2 para CA1 y 10000 μm^2 para el GD). El ancho de las capa de células piramidales del área CA1 y la capa de células granulares del GD, fueron medidas considerando la distancia máxima entre los núcleos a través de la capa. En el GD se contaron las neuronas DCX positivas en un tamaño de campo fijo (12000 μm^2). Se delimitó una grilla de 200000 μm^2 en el *Stratum radiatum* de la región CA1 del HP y el porcentaje de área reactiva para GFAP se estimó usando el programa Image J (versión 1.43u, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3.7. Ensayo de Binding

Preparación de sinaptosomas: Se procedió a aislar el HP para obtener sinaptosomas en un gradiente de Percoll, de acuerdo a lo descripto por Cid et al. (2008). Los sinaptosomas son estructuras subcelulares que se forman durante la disgregación del tejido nervioso y mantienen las características morfológicas y la composición química de la presinapsis. Dado que los receptores de $GABA_A$ están principalmente localizados en la postsinapsis, resultó útil estudiar estos receptores en sinaptosomas, que son una pequeña parte del soma neuronal (Cid et al., 2007).

Los sinaptosomas que sedimentaron entre el 10 y el 23⁄ en el gradiente de Percoll fueron tomados y diluidos en 30 ml de HEPES buffer (140 mMNaCl, 5 mMKCl, 5 mM $NaHCO_3$, 1 mM $MgCl_2$, 1.2 mM Na_2HPO_4, 10 mM glucosa, and 10 mM HEPES, pH 7.4) para luego centrifugar a 27,000×g por 10 min a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 5 ml de HEPES buffer y la concentración de proteínas fue determinada mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Binding específico de [^{3}H]-

flunitrazepam: El binding específico de [^{3}H]-flunitrazepam (85 Ci/mmol) fue medido mediante la técnica de filtración (Cid et al., 2008). El binding fue llevado a cabo en presencia del radioligando.

Cada ensayo fue realizado por triplicado, utilizando 0.3 mg de proteína de la fracción sinaptosomal. El binding no específico fue medido en presencia de diazepam. Luego de 60 min de incubación, las muestras fueron filtradas, lavadas y la radiactividad fue medida utilizando un contador LKB-1214-RackBeta.

Los valores de Kd y Bmax fueron obtenidos por regresión no lineal usando la ecuación de hipérbola (un solo sitio de binding): Y = Bmax*X/(Kd + X), siendo Bmax el máximo binding y Kd la concentración de ligando requerida para alcanzar la mitad del binding máximo. La densidad del receptor de benzodiacepinas puede ser usado para expresar la densidad del receptor $GABA_A$ porque el sitio de binding para flunitrazepam está localizado en la subunidad α del receptor de $GABA_A$.

3.8. Tratamientos farmacológicos

Se administraron a ratas neonatas cinco inyecciones subcutáneas de las siguientes drogas: 17β-estradiol (βE) y 17α-estradiol (αE), de 50 μg/kg cada una (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA); diarylpropionitrilo (DPN), agonista selectivo del REβ y propylpirazol-triol (PPT), agonista selectivo del Reα, 200μg/Kg cada dosis (Tocris Bioscience). La primera y segunda dosis fueron administradas 30 min antes y 30 min después de la exposición a la radiación, respectivamente. Las siguientes dosis fueron administradas diariamente. Las ratas control fueron inyectadas con vehículo (solución salina 0.9 ⁄), dejando un intervalo de 1 h entre la primera y la segunda inyección, para luego aplicar las siguientes dosis diariamente, Fig. 3.6.

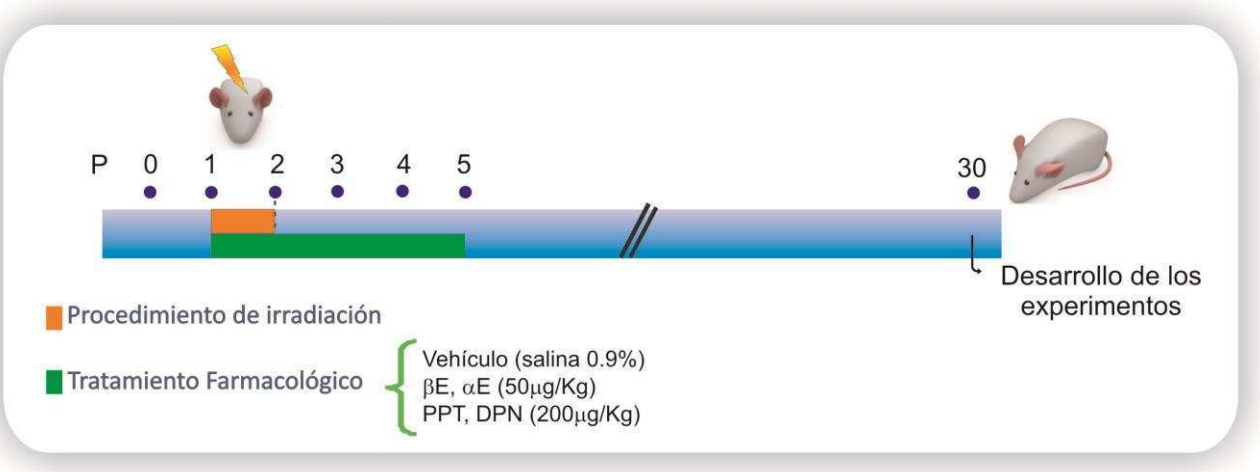


Fig. 3.6. Diseño experimental para la administración de fármacos. P: día postnatal.

3.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados usando el paquete estadístico Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Las diferencias significativas entre dos grupos fueron analizadas mediante el test de *t*. Las diferencias entre más de dos grupos fueron determinadas mediante el test de ANOVA de dos vías. En el caso donde los efectos de interacción resultaron significativos, se realizó un análisis de efectos simples. Para las comparaciones *post hoc* se usó el test de Bonferroni. Para homogeneizar los valores en los ensayos de Western Blot, se realizó una transformación logarítmica de los datos. Los resultados fueron expresados como promedio ± SEM. Una probabilidad de < 0.05 fue aceptada como significativa.

4. Resultados

PARTE 1

Efectos de las radiaciones ionizantes

En esta sección profundizaremos en el estudio de los cambios producidos por la exposición neonatal a las radiaciones ionizantes. Los efectos serán evaluados en animales a P15 y/o a P30.

4.1. Los cambios observados en la memoria asociativa se deben a modificaciones a nivel molecular e histológico

4.1.1. El grupo Rx presentó un aumento en los niveles de PKCβ1 y una disminución en los niveles de proBDNF

Existen diferentes proteínas y neurotrofinas que participan activamente en los procesos de memoria y aprendizaje, por cuanto la modificación de sus niveles podría desencadenar cambios a nivel conductual. En estudios previos hemos observado que las ratas expuestas a la radiación poseían un aumento en la actividad de PKC (Caceres et al., 2010), lo que podría estar favoreciendo los cambios observados en la memoria asociativa a P30. A raíz de estos resultados, decidimos estudiar los niveles de la isoforma PKCβ1, la cual parecería estar relacionada con los mecanismos conductuales gatillados por el test de EI. Dada la participación de distintas neurotrofinas en dicha tarea, los niveles de dos neurotrofinas, BNDF y NGF, fueron también evaluados.

Se observó que los niveles de PKCβ1 estaban significativamente aumentados en el HP de los animales a P30 expuestos a la radiación luego del nacimiento ($t=2.710$, $p<0.05$, Fig. 4.1a). Por otro lado, estos animales presentaban una disminución en los niveles de proBDNF ($t=3.147$, $p<0.05$, Fig 4.1b), mientras que la radiación ionizante no produjo cambios significativos en los niveles de proNGF (Fig. 4.1c).

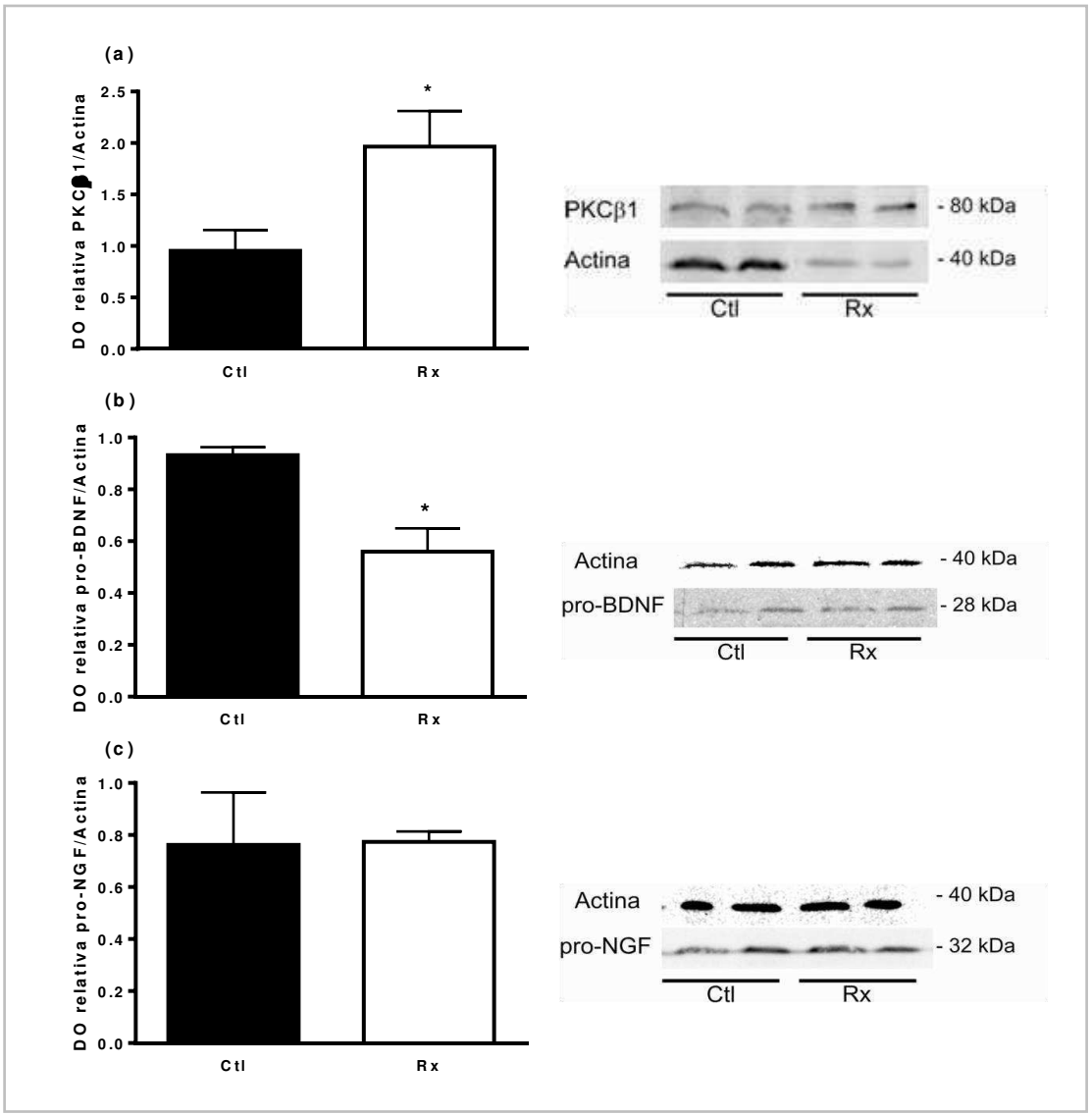


Fig. 4.1. Las radiaciones ionizantes producen un aumento en los niveles de PKCβ1 y una disminución en los niveles de proBDNF. Los datos corresponden al análisis de densidad óptica (DO) relativa a la actina (a) PKCβ1 (Ctl: 0.956 ± 0.202, Rx: 1.98 ± 0.35), *$p<0.05$ con respecto al control; (b) proBDNF (Ctl: 0.932 ± 0. 030, Rx: 0.560 ± 0.089), *$p<0.05$ con respecto al control; (c) proNGF (Ctl: 0.762 ± 0.202, Rx: 0.774 ± 0.039), NS. A la derecha se muestra una foto representativa de los niveles de cada proteína analizada. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM. N=6.

4.1.2. Las radiaciones ionizantes producen alteraciones en la capa CA1 del HP y una disminución de células GFAP+

Diversos estudios sugieren que cambios en la morfología y las conexiones del HP podrían influir en los cambios a nivel conductual. Por lo tanto, resultó importante estudiar la integridad de las distintas estructuras que participan en los procesos de memoria. En este caso nos hemos focalizado en el área CA1 y GD del HP. Por otro lado, dado que las células gliales son una fuente importante de producción de neurotrofinas y el proBDNF se encontró alterado en los animales irradiados, se procedió a la evaluación de este tipo celular.

Secciones histológicas de HP de ratas del grupo Rx teñidas con H-E mostraron una disminución en el número de neuronas piramidales de la capa CA1 ($t= 4.592$, $p<0.001$), la cual se encuentra de manera focalizada en ciertas áreas de la capa. En el área del GD no se observaron diferencias con respecto al control, Fig. 4.2 a y b.

Posteriormente se procedió a medir el ancho de las capas CA1 y GD, sin encontrarse cambios asociados a la radiación en ninguna de las dos áreas (CA1: Ctl: 73.39±1.06 µm; Rx: 71.34±1.47 µm, NS; GD: Ctl: 74.61±7.92 µm; Rx: 90.26±5.04 µm, NS, N=4).

Se observaron núcleos condensados y picnóticos aislados en la región CA1 del grupo Rx ($t= 3.055$, $p<0.01$), indicativo de daño celular, a diferencia del GD, área donde no se encontraron signos de picnosis (Tabla 4.3).

El GD es un área en la cual se generan neuronas nuevas durante toda la vida. Si bien no se encontraron diferencias en cuanto al número de células granulares en los animales expuestos a la radiación, no se puede descartar que existan diferencias en el proceso de proliferación celular. Diversos autores sugieren que cambios en este proceso podrían estar relacionados con los cambios observados a nivel conductual (Hellström et al. 2009).

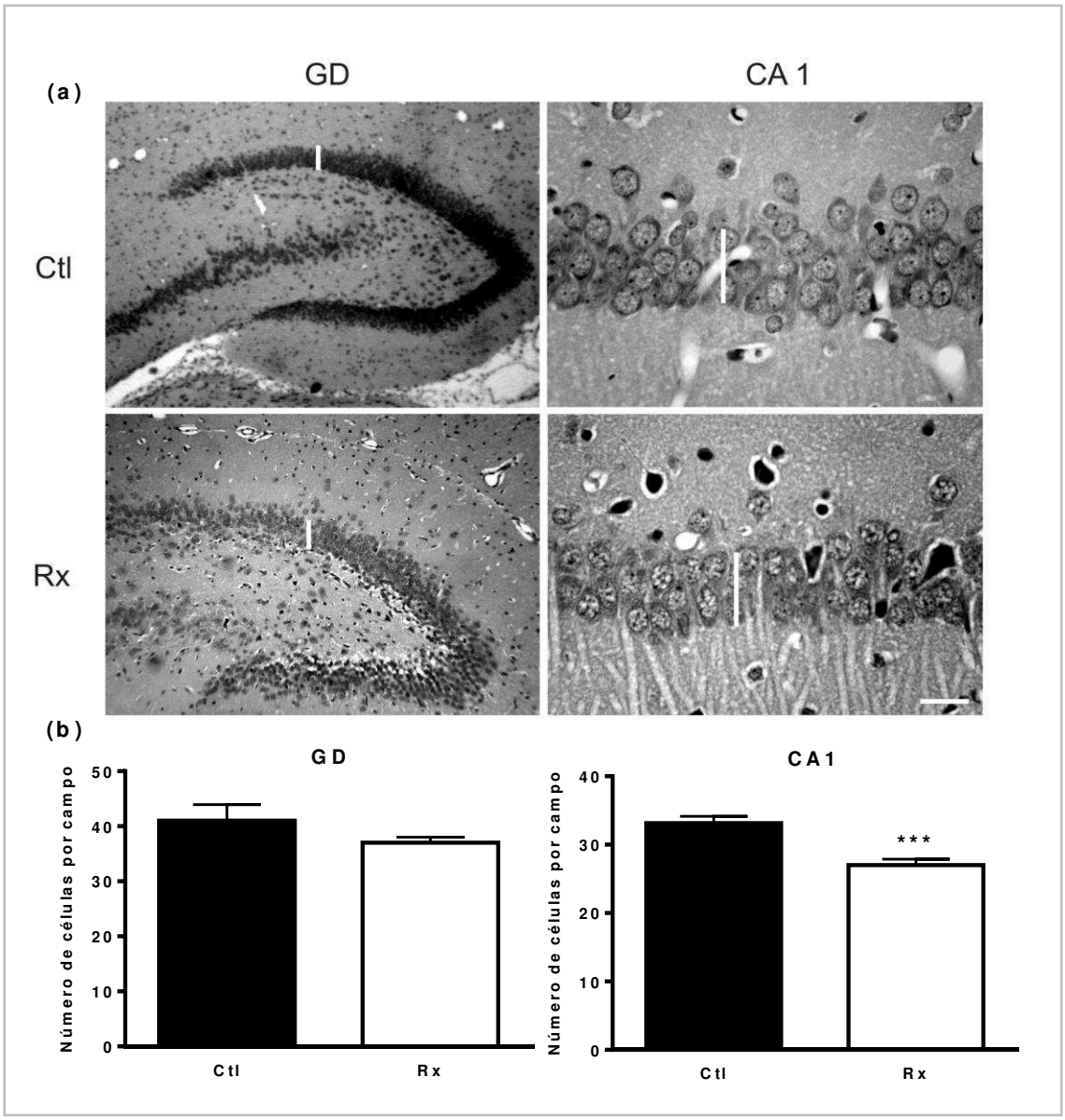


Fig. 4.2. La exposición neonatal a las radiaciones ionizantes induce una disminución en el número de neuronas del área CA1. (a) Secciones coronales de HP teñidos con H-E a 4.5X y 40X. Las líneas verticales indican el ancho de la capa; (b) Gráfico con los valores de número de células por campo (CA1. Ctl: 33.14 ± 1.01; Rx: 27.00 ± 0.88, ***p< 0.001. (GD. Ctl: 41.00 ± 2.94; Rx: 37.00 ± 1.00, NS) Los datos fueron expresados como el número de células en 60000 μm^2 en la región CA1 y 10000 μm^2 en GD ± SEM. Barra de escala: 30 μm. N=4.

Los resultados mostraron una marca dispersa de DCX (doblecortina, marcador de proliferación), sin detección de precursores neuronales con procesos bien desarrollados, tal como lo observan otros autores en ratas de la misma edad (Hwang et al., 2008). No se encontraron diferencias significativas en la proliferación entre animales controles y Rx, Fig 4.4.

Porcentaje de células picnóticas		
	CA 1	DG
Ctl	4.5 ± 1.0	0.016 ± 0.005
Rx	8.87 ± 0.97 **	0.029 ± 0.015

Tabla. 4.3. Porcentaje de células picnóticas. Los animales expuestos a la radiación presentaron un aumento en el porcentaje de células picnóticas en el área CA1. **p<0.01 con respecto al control. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM. N=4.

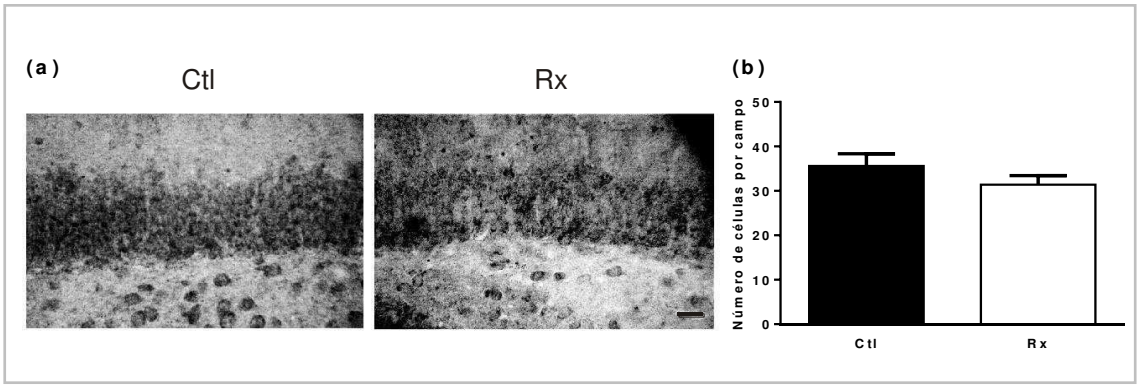


Fig. 4.4. Inmunohistoquímica para DCX. (a) Imágenes al microscopio óptico de la inmunohistoquimica de DCX en GD. 25X. Barra de escala 30 µm (b) Gráfico correspondiente a la cuantificación de células en proliferación. (Ctl: 35.60 ± 2.76, Rx: 31.42 ± 2.03). Los datos fueron expresados como promedio ± SEM. N=4.

Con el objetivo de definir qué tipo celular era el que presentaba los cambios en el área CA1, se utilizaron los marcadores NeuN (marcador de núcleos neuronales) y GFAP (proteína gliofibrilar ácida, marcador de células gliales) en cortes de HP.

Como se muestra en la Fig. 4.5, los núcleos condensados y picnóticos observados en los animales irradiados presentan una marca NeuN+, mientras que la marca GFAP+ corresponde a astrocitos localizados principalmente en el *striatum radiatum*.

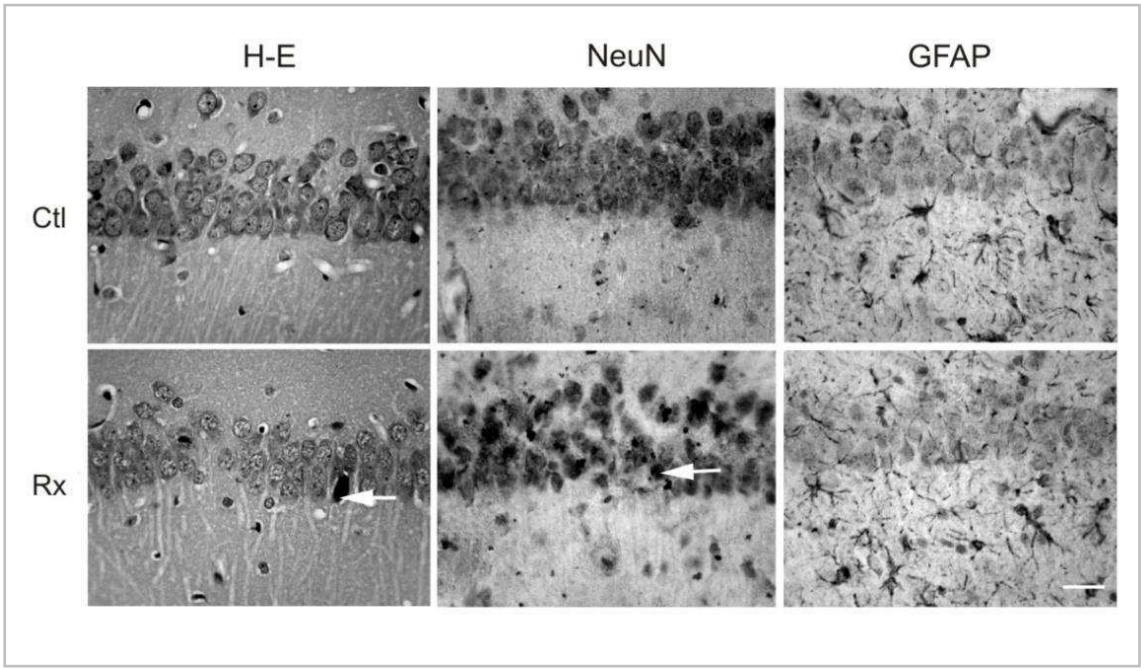


Fig. 4.5. Los núcleos picnóticos y condensados en el área CA1 corresponden a cuerpos neuronales. Secciones coronales de HP teñidos con H-E e inmunihistoquímica con el marcador específico neuronal NeuN y el glial GFAP a 40X. Las flechas señalan células picnóticas. Barra de escala: 30μm. N=4.

No se observó marca GFAP+ para astrocitos en la capa de células piramidales de CA1, demostrando que las células picnóticas observadas corresponderían a cuerpos neuronales.

Sin embargo, se observó que las ratas expuestas a la radiación presentaron una disminución en el área reactiva de las células GFAP+ ($t=3.774$, $P<0.01$, Fig. 4.6).

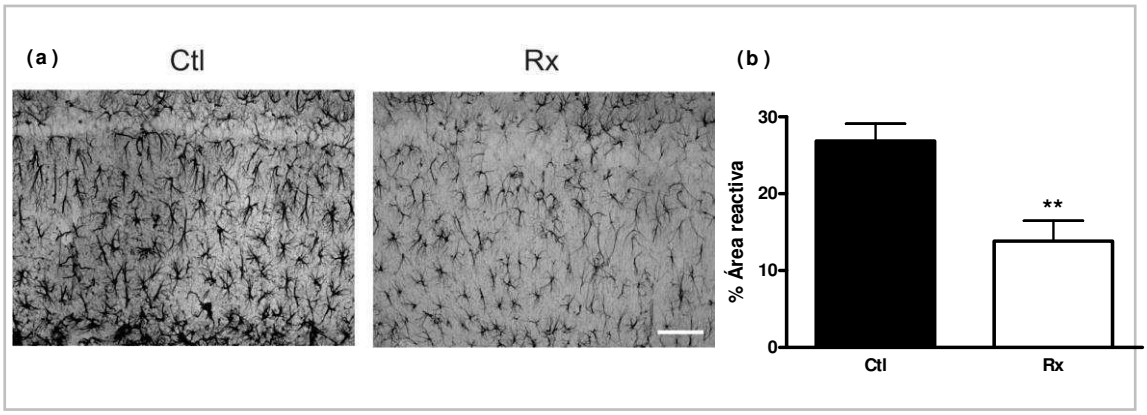


Fig. 4.6. Inmunohistoquímica para GFAP. (a) Imágenes al microscopio óptico de la inmunohistoquimica de GFAP en el *striatum radiatum* del área CA1 del HP. 25X. Barra de escala= 50 μm; (b) Gráfico correspondiente al análisis de porcentaje de área reactiva (astrocitos GFAP+) (Ctl: 26.86 ± 2.24, Rx: 13.85 ± 2.64). **p<0.01 con respecto al control. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM. N=5.

4.2. Las radiaciones ionizantes inducen una disminución en los niveles de ansiedad, con modificaciones en el sistema GABAérgico

Resultados previos en nuestro laboratorio demostraron que las ratas expuestas a la radiación en el período neonatal presentaban una disminución en las conductas relacionadas con la ansiedad en el test de OF (Caceres et al., 2010). Este resultado podría estar indicando cambios en componentes del sistema GABAérgico.

Por otro lado, este cambio en los niveles de ansiedad podría estar favoreciendo los cambios en la memoria asociativa, evaluada a través del test de EI (Caceres et al., 2010, Martin García et al., 2008).

La realización de otro test, el EPM, nos permitió confirmar los cambios en los niveles de ansiedad y el estudio del sistema GABAérgico en los animales irradiados permitió postular los mecanismos mediante los cuales se producirían los cambios a nivel conductual.

4.2.1. Los animales irradiados mostraron una menor ansiedad en el test de EPM

El test de EPM nos permitió confirmar los datos obtenidos mediante el test de OF. Las ratas irradiadas pasaron un mayor tiempo explorando los brazos abiertos con respecto al control (t=3.631, P<0.01, Fig. 4.7), demostrando una disminución de los niveles de ansiedad.

4.2.2. El binding de receptores $GABA_A$ se encontró aumentado en el HP del grupo Rx

Los datos obtenidos mediante el ensayo de binding nos proporcionaron una idea de la fuerza inhibitoria del sistema GABAégico en el HP de las ratas irradiadas neonatalmente. El grupo Rx presentó un aumento en el valor de Bmax de receptores $GABA_A$ en sinaptosomas de HP (t=2.290, p< 0.05). De manera similar, el factor Kd también fue afectado por las radiaciones ionizantes, observándose un aumento en dicho valor (t=3.235, p< 0.01), Tabla 4.8.

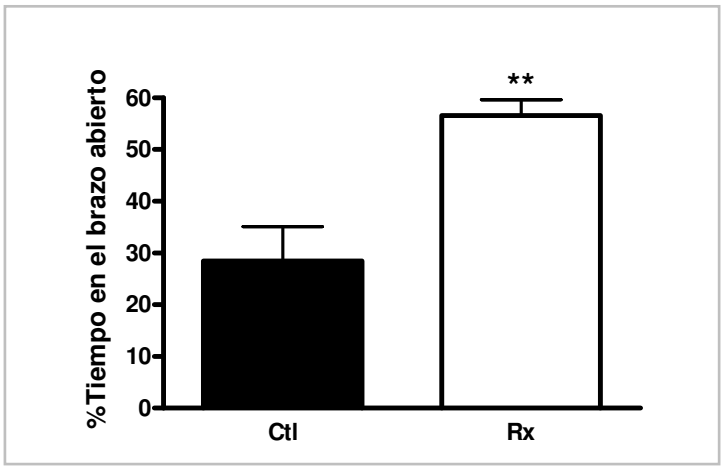


Fig. 4.7: Porcentaje exploración de los brazos abiertos durante el EPM (Ctl: 28.44 ± 6.64; Rx: 56.59 ± 3.05). **, p<0.01 con respecto al control. Datos expresados como porcentaje de tiempo en los brazos abiertos con respecto al total ± SEM. N=7.

4.2.3. Los animales irradiados mostraron un aumento de los niveles de GAD_{65-67}

Conjuntamente con el aumento de receptores $GABA_A$ y un aumento en su afinidad, las radiaciones ionizantes produjeron un aumento en la enzima que sintetiza GABA en el HP. A los 30 días post radiación se observó un aumento en los niveles de GAD_{65-67} en las ratas irradiadas (t=4.357, p<0.01, Fig. 4.9).

	Bmax (fmol/mg proteina)	Kd (nM)
Ctl	452.3 ± 20.7	0.95 ± 0.07
Rx	532.5 ± 29.6 *	1.75 ± 0.26 *

Tabla. 4.8. Binding de receptores $GABA_A$. Los Animales expuestos a la radiación presentaron un aumento tanto en el valor de Bmax como en el valor de Kd. *p<0.05 con respecto al control. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM. N=6.

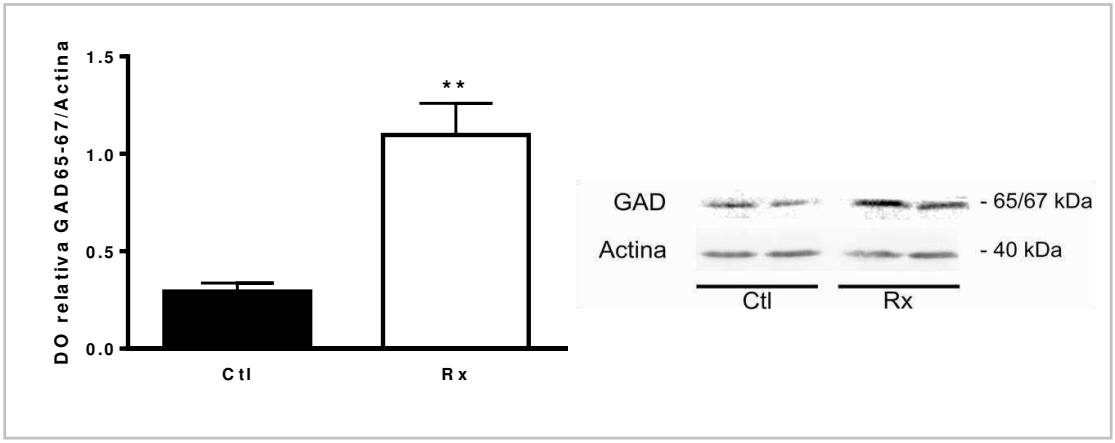


Fig. 4.9. Las radiaciones ionizantes producen un aumento de los niveles de GAD_{65-67} en el HP. Gráfico correspondiente al análisis de densidad óptica (DO) relativa a la actina (Ctl: 0.293 ± 0.043, Rx: 1.097 ± 0.162). A la derecha, foto representativa de los valores de GAD_{65-67}. **p<0.01 con respecto al control. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM. N=6

4.3. Los cambios en la memoria asociativa observados a P30 tienen su origen en eventos que ocurren a una edad más temprana del desarrollo

En la rata de 15 días las conexiones en el HP aún no se han establecido, lo cual señala un periodo de amplia plasticidad. Para profundizar en el entendimiento de los mecanismos que subyacen a los cambios en la memoria asociativa, se decidió estudiar a P15, edad en la cual aún no se encuentran establecidas las conexiones del HP, los parámetros que se encontraron alterados a P30.

4.3.1. Las ROS no presentaron cambios a P15

Datos previos de nuestro laboratorio mostraron que las ratas irradiadas poseen un aumento en las ROS en el HP al P30 (Caceres et al, 2010). Dada la implicancia de dichas especies como mediadoras de daño en diferentes modelos, resulta de suma importancia evaluar si este parámetro se encuentra modificado a una edad más temprana. Sin embargo, los resultados demostraron que a la edad de 15 días las ratas irradiadas poseen los mismos niveles de ROS que los animales controles, Fig 4.10a.

4.3.2. A P15 no se observaron cambios en los niveles de proneurotrofinas en el HP del grupo Rx

Los niveles de BDNF y de NGF en el HP de ratas irradiadas son semejantes a los de los animales control (Fig. 4.10 d y e).

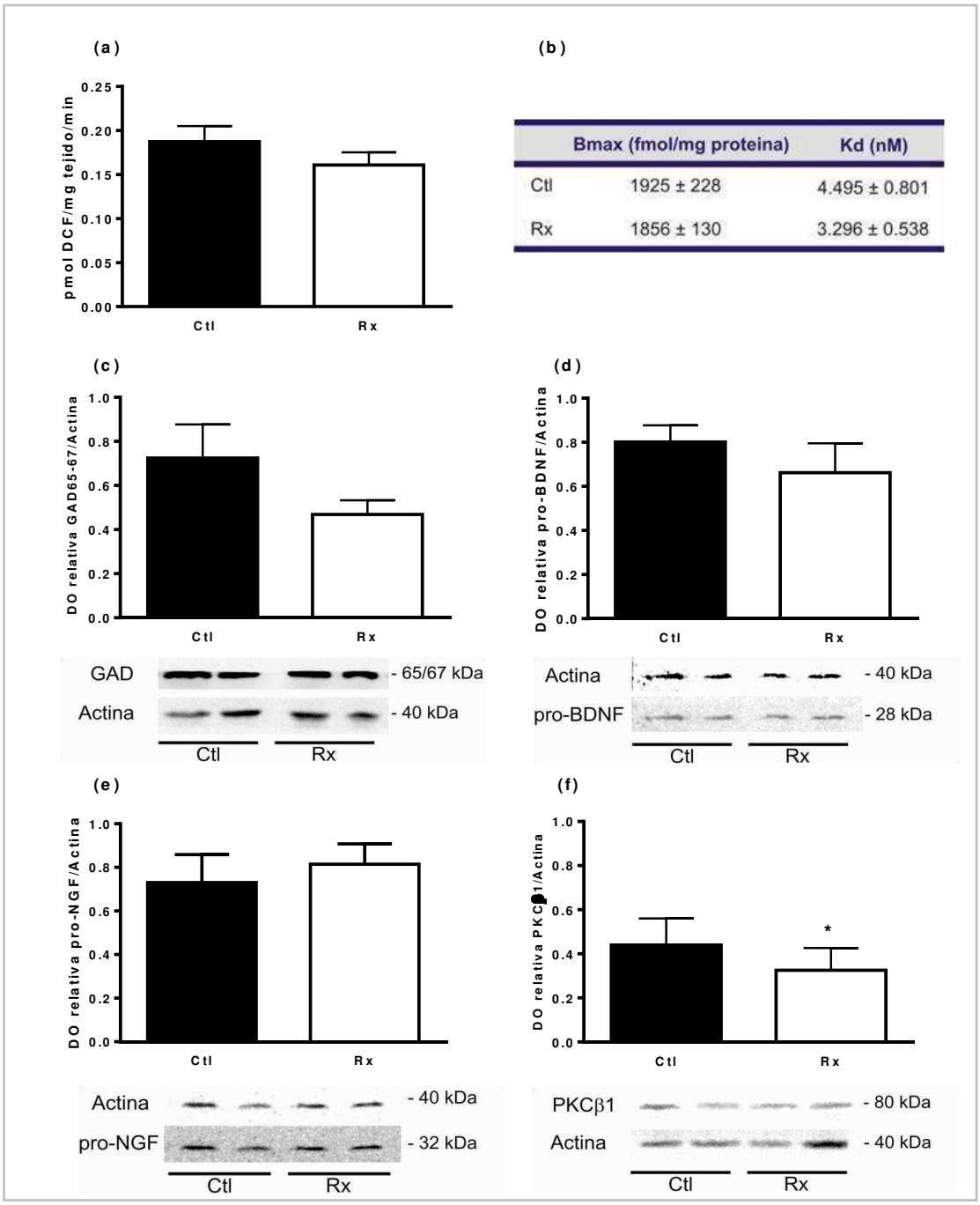


Fig. 4.10. Efectos de las radiaciones ionizantes sobre distintos parámetros evaluados a P15. Solo se observaron cambios en los niveles de PKCβ1. (a) Especies reactivas de oxígeno (Ctl: 0.187 ± 0.017, Rx: 0.160 ± 0.014, NS, N=6). Sistema GABAérgico. (b) Tabla con los valores de binding, N=6. (c) Niveles de GAD65-67 y foto representativa (Ctl: 0.724 ± 0.152, Rx: 0.468 ± 0.064, NS, N=6). Niveles de proneurotrofinas. (d) Niveles de proBNDF y foto representativa (Ctl: 0.801 ± 0. 75 Rx: 0.662 ± 0.133, NS, N=6). (e) Niveles de proNGF y foto representativa (Ctl: 0.730 ± 0.128, Rx: 0.814 ± 0.093, NS, N=6). (f) Niveles de PKCβ1 y foto representativa (Ctl: 0.439 ± 0.120, Rx: 0.325 ± 0.101, $p<0.05$, N=6). *$p<0.05$ con respecto al control. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM.

4.3.1. Los animales irradiados presentan una disminución de PKCβ1 a P15

A la edad de 15 días, los valores de PKCβ1 se encontraron disminuidos con respecto a los valores control, siendo el único parámetro que parecería ser afectado por las radiaciones ionizantes a esta edad (t= 0.684, $p<0.05$, Fig. 4.10f).

	P15	P30
ROS	S/C	↑
PKCβ1	↓	↑
proBDNF	S/C	↓
proNGF	S/C	S/C
BND	S/C	↑
ANS	S/D	↓
GAD_{65-67}	S/C	↑
CA1	S/D	↑ picnosis, DC
GD	S/D	S/C
GFAP	S/D	↓ marca GFAP+

Resumen parte 1

Cuadro comparativo con los principales efectos producidos por las radiaciones ionizantes a las edades de P15 y P30. ANS: ansiedad. BND: Binding receptores GABA. DC: desorganización de la capa. S/C: sin cambios con respecto al control. S/D: sin datos para esta edad.

PARTE 2

Neuroprotección

En esta sección se evaluará la función neuroprotectora de distintos fármacos frente a los efectos producidos por las radiaciones ionizantes a P30.

4.4. El βE actúa como neuroprotector frente a los cambios producidos por las radiaciones ionizantes

Los estrógenos comenzaron a ser utilizados debido a sus capacidades neuroprotectoras, entre ellas, su capacidad de actuar como antioxidante. En consecuencia, se procedió a evaluar el uso de βE como neuroprotector frente a los efectos inducidos luego de la exposición a la radiación.

Uno de los principales efectos producidos por las radiaciones ionizantes es el estrés oxidativo, manifestado como un aumento en los niveles de ROS, lo cual constituye un punto en común con varias enfermedades neurodegenerativas.

4.4.1. El βE administrado neonatalmente fue capaz de revertir la mayoría de los cambios a nivel bioquímico y conductual observados a P30

4.4.1.1. Niveles de ROS

Los resultados muestran una interacción entre los grupos tratamiento (Ctl vs. Rx) x droga (vehículo vs estradiol) ($F_{1,29}$= 5.823, $p<0.05$). Al realizar el análisis de efectos simples, los niveles de ROS resultaron similares al control en el grupo Rx tratado con βE ($F_{1,29}$= 11.02, $p<0.01$). El βE sólo tuvo efecto sobre el grupo Rx (Ctl vs Ctl-βE, NS; Rx vs. Rx-βE, $p < 0.001$, Fig. 4.11a).

4.4.1.2. Conducta

Se observó una interacción entre los grupos tratamiento x droga ($F_{1,25}$= 8.746, p<0.01). El análisis de efectos simples nos permitió determinar que el déficit en la habituación observado a los 30 días de edad en las ratas irradiadas fue prevenido por la administración de βE, el cual no afectó la performance del grupo control ($F_{1,25}$= 11.90, p<0.01; Ctl vs. Ctl-βE, NS; Rx vs. Rx-βE, p<0.001, Fig. 4.11b).

En el test de EPM se observó interacción entre los grupos tratamiento x droga ($F_{1,23}$= 5.823, p<0.05). El grupo Rx tratado con βE redujo el tiempo de permanencia en los brazos abiertos ($F_{1,23}$= 10.42, p<0.01; Ctl vs Ctl-βE, NS; Rx vs. Rx-βE p<0.01, Fig. 4.11c).

El aumento en la latencia de escape en el test de EI por parte del grupo Rx, no fue revertido en el grupo Rx-βE ($F_{1,31}$= 0.49, NS; Ctl vs Ctl-βE, NS; Rx vs. Rx-βE, NS, Fig. 4.11d)

4.4.1.3. PKCβ1

Similarmente, la actividad de PKC, proteína que está involucrada en los procesos de memoria asociativa y que está aumentada en el grupo Rx, no presentó cambios en el grupo Rx-βE ($F_{1,16}$= 0.17, NS; Ctl vs Ctl-βE, NS; Rx vs. Rx-βE, NS, Fig. 4.11e).

Al analizar la isoenzima PKCβ1, cuyos niveles aumentaron luego de la radiación, se observó que los niveles retornan a los niveles control en el grupo Rx-βE ($F_{1,18}$= 1.51, NS; Ctl vs Ctl-βE, NS; Rx vs. Rx-βE, p<0.01, Fig. 4.11f).

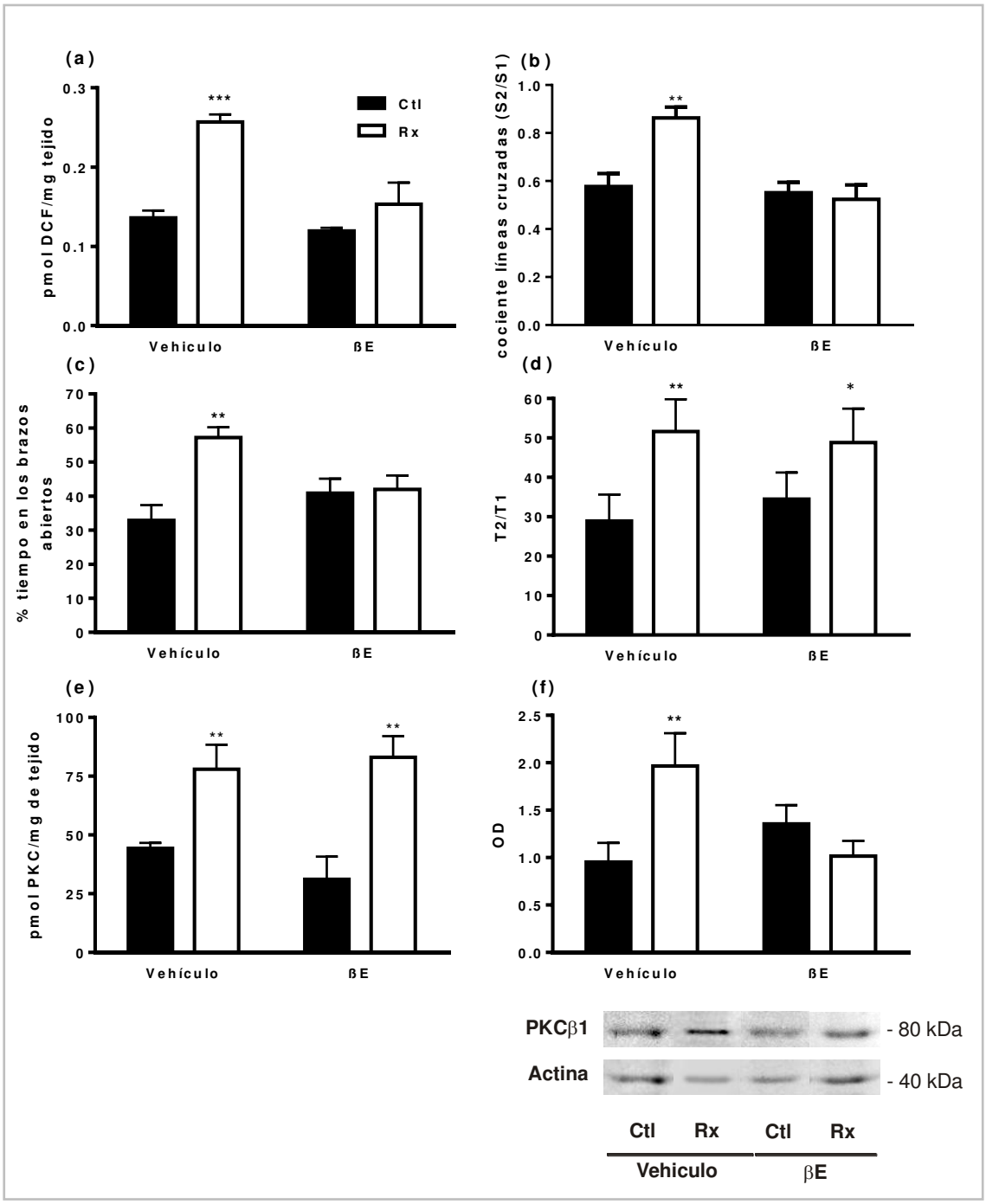


Fig. 4.11. El βE previno la mayoría de los efectos producidos por las radiaciones ionizantes. (a) Las ROS no se vieron afectadas por las radiaciones en el grupo tratado. (b) El déficit en la habituación observado en el grupo Rx, no fue observado en el grupo Rx-βE. (c) El tratamiento con βE previno la disminución en los niveles de ansiedad en el EPM. (d) La diferencia en la performance observada en el grupo Rx, se mantuvo en los animales Rx tratados, como así también (e) el aumento en la actividad de PKC. (f) Los niveles de PKCβ1 no fueron afectados por las radiación en el grupo Rx-βE. *** $p<0.001$, **$p<0.01$. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM.

4.5. El βE podría ejercer su acción a través de distintos mecanismos

El hallazgo de valores normales de ROS a P30 en los animales Rx-βE, nos condujo a postular la hipótesis de que los efectos neroprotectores del βE podrían deberse a un mecanismo antioxidante. Sin embargo, no se debería descartar la participación de los RE en la neuroprotección por βE.

Por lo tanto, resultó interesante determinar si la neuroprotección ejercida por βE era efectivamente mediada por un mecanismo antioxidante o si los RE eran también participes de esta acción. Para ello se evaluaron los mismos parámetros que fueron revertidos con el uso de βE en animales que recibieron αE, un isómero del βE con una muy baja unión al receptor y dos agonistas selectivos de los RE, PPT (agonista REα) y DPN (agonista REβ), Fig. 4.12.

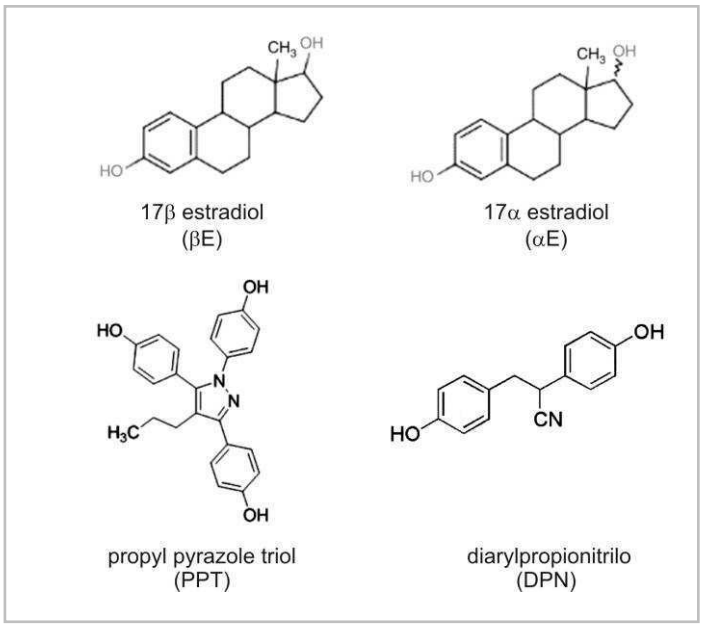


Fig. 4.12. Fármacos utilizados. αE es un esteroisómero del βE con muy baja unión al receptor estrogénico. PPT es agonista REα y DPN es agonista REβ.

Al analizar los niveles de ROS, se observó interacción para tratamiento x droga con todas las drogas utilizadas (αE: $F_{1,28} = 27.15$, $p<0.001$; PPT: $F_{1,29} = 15.15$, $p<0.001$; DPN: $F_{1,29} = 31.0$, $p<0.001$). Los grupos Rx tratados con αE, PPT y DPN no presentaron un aumento en los niveles de ROS luego de la radiación (αE: $F_{1,28} = 5.909$, $p<0.05$; PPT: $F_{1,29} = 52.64$, $P<0.001$; DPN: $F_{1,29} =14.52$, $P<0.01$, Ctl-αE vs. Rx-αE, Ctl-PPT vs. Rx-PPT, Ctl-DPN vs. Rx-DPN, NS, Fig. 4.13a).

Resultados similares fueron observados con respecto a la conducta de habituación, dado que los efectos de la radiación pudieron ser prevenidos mediante la administración de las drogas. Se observó Interacción tratamiento x droga en todos los casos (αE: $F_{1,19} = 5.609$, $p<0.05$; PPT: $F_{1,18} = 5.799$, $p<0.05$; DPN: $F_{1,19} = 7.742$, $p<0.05$). Los grupos Rx tratados con droga no difirieron de los controles con droga (αE: $F_{1,19} = 5.157$, $P<0.05$; PPT: $F_{1,18} = 64.41$, $P<0.05$; DPN: $F_{1,19} =8.598$, $P<0.01$; Ctl-αE vs. Rx-αE, Ctl-PPT vs. Rx-PPT, Ctl-DPN vs. Rx-DPN, NS, Fig. 4.13b).

Sin embargo, el grupo Rx-PPT, siguió presentando una disminución en la ansiedad en el test de EPM, a diferencia de los grupos Rx tratados con αE y DPN que mostraron niveles de ansiedad semejantes al control. Sólo se observó interacción en los grupos que recibieron αE ($F_{1,18} = 5.393$, $p<0.05$), (αE: $F_{1,18} = 5.244$, $p<0.05$; PPT: $F_{1,17} = 29.37$, $p<0.001$; DPN: $F_{1,19} =19.62$, $p<0.01$, Ctl-αE vs. Rx-αE, NS; Ctl-PPT vs. Rx-PPT, $P<0.001$; Ctl-DPN vs. Rx-DPN, NS. Fig. 4.13c).

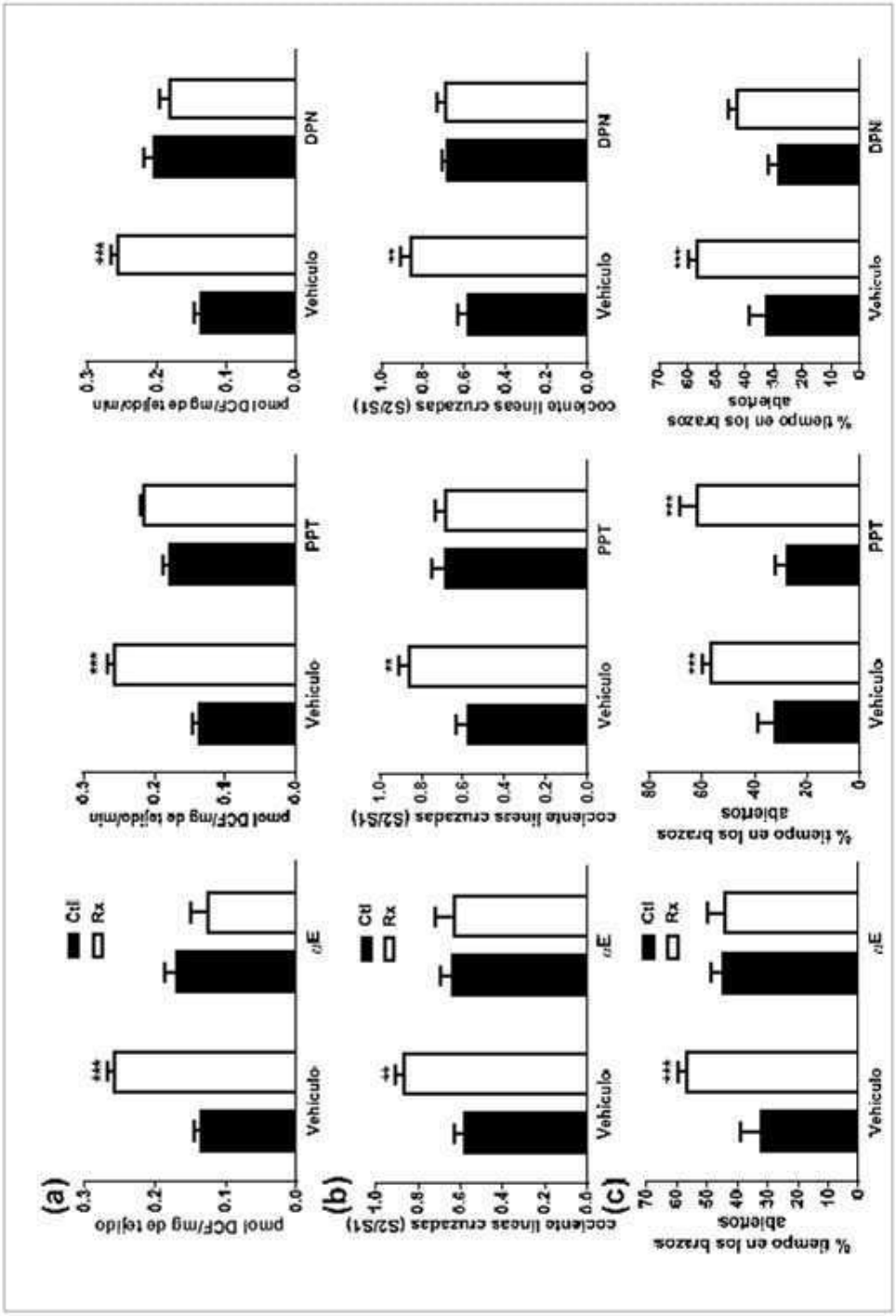


Fig. 4.13. El βE actuaría tanto mediante un mecanismo antioxidante como por el mediado por receptor. (a) Las ROS no se vieron afectadas por las radiaciones en ninguno de los grupos tratados con droga. (b) El déficit en la habituación observado en el grupo Rx, no fue observado en los grupos tratados. (c) El tratamiento con PPT no previno **la disminución** los niveles de ansiedad en el EPM. *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05. Los datos fueron expresados como promedio ± SEM.

	βE	αE	PPT	DPN
ROS	★	★	★	★
OF	★	★	★	★
EPM	★	★	●	★
EI	●			
A-PKC	●			
PKCβ1	★			

Resumen parte 2

Cuadro comparativo sobre neuroprotección a P30. A-PKC: Actividad de PKC. ★: La droga fue capaz de prevenir los efectos de las radiaciones ionizantes. ●: Sin capacidad neuroprotectora.

5. Discusión

Los resultados de este trabajo muestran que las radiaciones ionizantes aplicadas neonatalmente son capaces de inducir cambios a nivel conductual, los cuales surgirían como resultado de alteraciones a nivel histológico y molecular. Las mismas ocurrirían en una ventana de oportunidad entre el momento de la exposición y el día P30, generándose un nuevo estado adaptativo. Más aún, estos resultados demuestran que es posible proteger al SNC en desarrollo y prevenir los cambios encontrados mediante la utilización del βE, un fármaco que actuaría como neuroprotector mediante múltiples mecanismos.

Efectos de las radiaciones ionizantes

5.1. La PKC podría estar favoreciendo la sobrevida de las células hipocampales mediante su acción sobre las proneurotrofinas

Los resultados de este trabajo muestran que la PKCβ1 podría ser una de las isoenzimas que contribuye al aumento de la actividad total de PKC observada en los animales Rx (Caceres et al., 2010). Más aún, podría sugerirse que dicho incremento sería responsable de generar la disminución en los niveles del precursor de BDNF, el proBDNF, observada en la misma estructura, con la intención de disminuir los efectos antiapoptóticos que podrían gatillarse como consecuencia de un aumento de estrés oxidativo (Sun et al., 2009).

Distintos autores postulan que la isoforma PKCβ1 puede ser up-regulada por las ROS (Knapp y Klann, 2002; Jung et al., 2004). En consecuencia, el hallazgo de altos niveles de estas especies en el HP de animales a P30 (Caceres et al., 2009) sugiere que el aumento de los niveles de esta isoforma podría ser gatillado por un aumento temprano de estrés oxidativo inducido por las radiaciones ionizantes y, en un circuito de retroalimentación positiva, se estimularían mutuamente (Inoguchi et al., 2000; Knapp y Klann, 2002; Jung et al., 2004).

Según los datos derivados de la bibliografía, resulta controversial el rol desempeñado por la PKC en los organismos vivientes, dado que su activación puede resultar en un efecto neurotrófico o neurotóxico, dependiendo del tipo de célula y de las condiciones experimentales (Tomimatsu y Arakawa, 2008). Si bien varios estudios han sugerido que la activación de PKC estaría involucrada en la generación de muerte neuronal (Mattson, 1991; Kharlamov et al., 1993), la pérdida de su actividad también podría ser un paso esencial en la muerte celular por excitotoxicidad (Durkin et al., 1997). Los resultados opuestos surgidos de estos estudios están relacionados con los distintos mediadores involucrados en las diferentes vías que se activan y los roles que cada isoforma de la PKC cumple en el mantenimiento de la sobrevida neuronal (Koponen et al., 2000). Por ejemplo, en las neuronas del ganglio espiral de Corti, la activación de PKC es capaz de promover la sobrevida y crecimiento de neuritas a través de la activación de las vías PI3K/Akt y MEK/ERK (Lallemend at al., 2005). Por otro lado, en varias líneas celulares la PKC mostró jugar un rol en la fosforilación de Bcl-2 mitocondrial y en la subsiguiente supresión de la apoptosis (Ito et al., 1997; Ruvolo et al., 1998). En nuestro modelo de irradiación, la PKCβ1 parecería estar involucrada en el mantenimiento de los altos niveles de ROS, por lo que estaría cumpliendo un rol neurotóxico en el HP, aunque es este mismo aumento de PKCβ1 el cual también estaría favoreciendo a la mejora en la performance del test de EI.

Wu et al., (2007) demostraron que una *up-regulation* de PKCβ1 podría ser responsable, en parte, de una mejora en la memoria y aprendizaje en un modelo de estrés prenatal. Por otro lado, se ha reportado que la exposición prenatal a heroína deteriora la memoria y bloquea la translocación de PKCβ1 en el HP de ratón (Huleihel y Yanai, 2006). Dado que al día P30 se observa un aumento en los niveles de PKCβ1 conjuntamente con una mejora en la performance en el test de EI en los animales irradiados (Caceres et al., 2010), la hipótesis de que los cambios en PKCβ1 podrían afectar la memoria asociativa es respaldada por los resultados presentados en esta tesis.

Las neurotrofinas han estado, desde sus inicios, asociadas a la promoción de la supervivencia celular (Davies, 1994; Sun et al., 2009). Por el contrario, sus precursores, las proneurotrofinas, han sido consideradas funcionalmente inactivas hasta que se

obtuvo evidencia de que eran capaces de promover la apoptosis a través de la activación del receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR) (Lee et al., 2001). De esta manera, la activación del BDNF sobre su receptor TrkB y la de proBDNF sobre el p75 ejercerían efectos opuestos sobre la plasticidad sináptica (Lu et al., 2005). En consecuencia, se postuló que el clivaje de neurotrofinas podría constituir un importante mecanismo de regulación en el SNC (Lu y Martinowich, 2008).

El clivaje del proBDNF es regulado en el SNC de una manera específica y es dependiente del contexto celular (Koshimizu et al., 2009).De acuerdo a lo reportado por Perovic et al. (2012), el hallazgo de un déficit en la señalización mediada por neurotrofinas se relacionaría con la observación de una disminución en la expresión del receptor Trk, lo cual estaría acompañado por bajos niveles de los dos principales efectores río abajo, pAkt y PKC (Perovic et al., 2012). Siguiendo este razonamiento, se podría hipotetizar que un potencial aumento de la señalización surgido luego de la disminución del precursor, como se observa en nuestro modelo, podría estar generando un aumento en los niveles de PKC β1. Sin embargo, no se debería descartar que el aumento de actividad de PKC observado en el HP de animales irradiados sea el responsable de la posterior disminución de pro-BDNF, a través de un mecanismo antiapoptótico (Sun et al., 2009; Arévalo y Wu, 2006).

En resumen, nuestros resultados muestran que las ratas irradiadas de P30 presentan una disminución de los niveles proBDNF sin cambios en los niveles de proNGF. Teniendo en cuenta que en nuestro modelo de irradiación neonatal los niveles de PKCβ1 están elevados a P30, se podría sugerir que la disminución de los niveles de proBDNF podría deberse a un aumento en la conversión de proBDNF a la forma madura. Más aún, esta conversión podría estar evitando que se sume un componente apoptótico al sistema, impidiendo la unión de la proneurotrofina al p75NTR y favoreciendo de esta manera la supervivencia celular frente a los altos niveles de ROS que se encuentran presentes en el HP del grupo Rx. Finalmente, el aumento de PKCβ1 en el HP conjuntamente con el potencial aumento de la conversión de proBDNF a la forma madura podrían estar favoreciendo a los cambios en la memoria asociativa observados en las ratas irradiadas, dada la participación de esta

isoforma en los mecanismos de formación de este tipo de memoria (Caceres et al, 2010).

5.2. Los cambios a nivel histológico podrían deberse a un desbalance homeostático

Los resultados presentados en este trabajo muestran la existencia de núcleos picnóticos en la capa CA1 del HP de los animales Rx, sugiriendo una considerable radiosensibilidad de dicha estructura. Si bien dichas células dañadas corresponden a neuronas, el número de células gliales también se encuentra disminuido, sugiriendo una falta de soporte trófico para las neuronas. Dado que diversos autores han propuesto que la existencia de alteraciones histológicas puede subyacer a cambios conductuales, se podría sugerir que estas alteraciones podrían estar mediando las alteraciones en la memoria de habituación observadas previamente en animales Rx (Caceres et al., 2009).

Es importante resaltar que en ratones y ratas adultas, expuestos a 10Gy de radiaciones ionizantes, diferentes autores reportaron mínimos daños en la capa CA1 del HP (Raber et al., 2004; Erkal et al., 2006), sugiriendo que el cerebro adulto sería más resistente a la injuria por radiación que el SNC en desarrollo (UNSCEAR, 1993; Fushiki, 2013). En contraste, en los pocos trabajos en los cuales se usaron animales inmaduros, tanto en el período prenatal como luego del destete (P21), la exposición a 3 u 8Gy generó grandes cambios en la capa CA1, tales como desarreglo de la estructura laminar de las células piramidales y reducción de las células granulares en el HP dorsal (Schmitz et al., 2005; Czurkó et al., 1997; Rola et al., 2004). Dado que hemos encontrado cambios significativos en el número de células en la capa CA1 del HP, estos reportes apoyan nuestros hallazgos.

La ausencia de cambios en el número de células del GD puede deberse a que ésta es un área capaz de generar neuronas nuevas durante toda la vida. En consecuencia, si bien podría haber ocurrido muerte celular en el período comprendido

entre la irradiación y la realización del corte histológico (P30), el evento sería más difícil de ser detectado.

Los núcleos picnóticos, encontrados sólo en la capa CA1, corresponden a células que han sido identificadas como neuronas, sugiriendo un daño selectivo. La persistencia de estos núcleos picnóticos aún 30 días luego dela exposición a la radiación podría deberse a una falla en el sistema de remoción de las células dañadas. Se sabe que el proBDNF funciona como un ligando endógeno para p75NTR (Hempstead et al., 1991), el cual es dinámicamente regulado en el daño cerebral, sugiriendo un rol plausible de las proneurotrofinas en la eliminación de células dañadas que expresen p75NTR (Lu et al., 2005). En consecuencia, la disminución en los niveles de proBDNF observada en el HP de animales Rx podría estar favoreciendo la persistencia de los núcleos picnóticos.

Por otro lado, los resultados presentados mostraron que los astrocitos también fueron afectados por las radiaciones ionizantes. La principal función de estas células gliales es la de proveer al SNC de una adecuada homeostasis a nivel molecular (regulación de la concentración de iones, neurohormonas y neurotransmisores; Danbolt, 2001), metabólico (suplemento de lactato a las neuronas; Magistretti, 2006), celular (neurogénesis, Alvarez-Buylla et al., 2006) y morfológico (migración celular durante el desarrollo; Nedergaard et al., 2003). Los astrocitos pueden entonces ser definidos como “células neurogliales homeostáticas”. La pérdida de la función homeostática astroglial puede conducir a una pérdida aguda de neuronas en insultos agudos como la isquemia, mientras que una disfunción sutil de astrocitos durante largos periodos puede contribuir a estados epilépticos y a una pérdida progresiva de neuronas en el caso de las enfermedades neurodegenerativas (Verkhratsky et al., 2012). De esta forma, un desbalance homeostático inducido por la disfunción astrocítica podría estar favoreciendo los cambios observados a nivel de la capa CA1 en nuestro modelo.

La disminución en la marca GFAP+ para astrocitos en la capa CA1 del HP de ratas irradiadas sugiere la existencia de astrodegeneración, la cual podría ser, en parte, producida como consecuencia del aumento de estrés oxidativo que se observa en los

animales Rx a P30. Diversos autores reportaron que la astrodegeneración glial afecta la homeostasis cerebral y favorece la excitotoxicidad (Verkhratsky et al., 2012). La encefalopatia de Wernicke es un ejemplo de astrodegeneración, en la cual también se observa una disminución en la expresión de GFAP (Hazell et al., 2009) y donde el principal mecanismo postulado que causa excitotoxicidad y muerte neuronal es una falla en la recaptación de glutamato.

En consecuencia, se podría hipotetizar que el desbalance en la homeostasis cerebral podría generarse a raíz del estrés oxidativo gatillado por la irradiación, lo cual podría estar desencadenando, al menos en parte, la disminución del número de neuronas piramidales del área CA1.

5.3. Los cambios en el sistema GABérgico subyacen los cambios a nivel conductual

Las ratas expuestas a la radiación mostraron una disminución en los niveles de ansiedad, lo cual fue observado mediante el test de EPM. Estos resultados concuerdan y refuerzan los resultados obtenidos previamente en el test de OF (Caceres et al., 2010).

Se podría sugerir que la disminución en los niveles de ansiedad observada en los animales Rx, indicativo de bajos niveles de reactividad emocional, podría subyacer a los cambios en la performance de estos animales en el test de EI (memoria asociativa, Caceres et al., 2010). Más aún, diversos autores han hipotetizado que una conducta ansiogénica podría interferir con el aprendizaje de ciertas tareas (Martin García et al., 2008). Por lo tanto, una conducta “ansiolítica” como la observada en nuestros animales Rx “ beneficiaría" ciertos aprendizajes, apoyando los presentes resultados.

Nuestros datos sugieren que el aumento en la afinidad y densidad de receptores $GABA_A$ en el grupo Rx a P30 podría tener una relación causal con los resultados observados en el EPM y que ambos, en conjunto, podrían estar

contribuyendo a los cambios en la memoria asociativa. Martin García et al. (2008) demostró que el finasteride, un inhibidor de la α5 reductasa, deteriora la performance en el test de EI en animales adultos, además de inducir comportamientos ansiogénicos. Otras evidencias indican que el HP, independientemente de su rol en memoria y aprendizaje, cumpliría un rol importante en procesos de comportamiento emocional y ansiedad (Bannerman et al., 2004).

Más aún, los cambios en el binding de los receptores $GABA_A$ observados en el grupo Rx, así como el incremento en los niveles de la enzima de síntesis de GABA en el HP, la GAD, sugieren que el sistema GABAérgico podría estar involucrado en los mecanismos patofisiológicos gatillados por la radiación ionizante. En consecuencia, se podría postular que la exposición a la radiación estaría provocando una estimulación de la neurotransmisión GABAérgica. Esto podría desencadenarse como respuesta antagónica a algún cambio farmacológico previo, inducido por la misma radiación a una edad más temprana, lo que daría como resultado un tono "excesivamente" inhibitorio a P30, provocando así la disminución en los niveles de ansiedad (Clarkson et al., 2010).

Por otro lado, se debe considerar que los circuitos neuronales en el cerebro inmaduro son excitatorios de manera dominante hasta aproximadamente el día P21-P22 debido al desarrollo tardío de los circuitos inhibitorios (Depino et al., 2008). Por lo tanto, no se puede descartar que el aumento en la densidad de los receptores GABA y su afinidad, así como el incremento en los niveles de GAD a P30, puedan estar contrarrestando una exacerbada sinaptogénesis excitotóxica inicial inducida por la exposición a la radiación. Por consiguiente, se trataría de una respuesta compensatoria tardía del sistema GABAérgico a un agente nocivo, que luego conduciría a un incremento en la inhibición conductual, en lugar de ser una alteración primaria de las radiaciones ionizantes sobre el sistema GABAérgico.

Más aún, debido a que la homeostasis de GABA durante el desarrollo contribuye a configurar los niveles de ansiedad en la adultez, se podría proponer que el excesivo número de receptores GABA observado en el HP de animales Rx fracasa en el establecimiento de los niveles "normales" de ansiedad. En consecuencia, el efecto

ansiolítico inducido por la exposición a las radiaciones ionizantes podría estar relacionado con un aumento en la liberación de GABA a través del aumento de los niveles de GAD (Tien-Hsiung et al., 2011), sugiriendo que la síntesis de GABA presináptico podría estar aumentada. Estos resultados concuerdan con lo observado por Kash et al. (1999) quien encontró que los ratones deficientes en GAD65 exhiben un aumento en la conducta relacionada a la ansiedad en el test de OF y en el EPM.

Con la obtención de estos resultados hemos podido demostrar que la reacción a claves emocionales (EPM) y la capacidad de aprender experiencias asociadas con estímulos emocionales como castigo (EI) son conductas que se ven afectadas por la exposición a la radiación. Más aun, se podría sugerir que el estrés inducido por una situación aversiva (shock eléctrico al final de la sesión de entrenamiento en EI), podría interactuar con los niveles bajos de ansiedad, dando como resultado una mejora en la performance.

Poco se sabe acerca de los mecanismos endógenos mediante los cuales las neuronas controlan las propiedades funcionales de los subtipos de receptores $GABA_A$ para mediar la inhibición. Se postula que algunos de los posibles mecanismos involucran las modificaciones post traduccionales de los receptores (Abramian et al., 2010). De acuerdo a estos autores, la fosforilación de residuos clave en ciertas subunidades de los receptores $GABA_A$ es capaz de regular la forma en la que los receptores interactúan con los complejos proteicos responsables de su endocitosis e inserción en la membrana celular. Por ejemplo, la PKC puede aumentar tanto la fosforilación como la estabilidad en la membrana de la subunidad α4 del receptor $GABA_A$ en el HP, un fenómeno que podría correlacionarse con un aumento en la inhibición (Song y Messing, 2005; Mou et al., 2011).

Dado que existen datos experimentales que demuestran que los receptores GABA pueden asociarse directamente con la isoforma PKCβ en neuronas (Brandon et al., 2000, 2002), se podría sugerir que un aumento en los niveles de esta isoforma podría subyacer a un aumento en la densidad de receptores GABA y un aumento en la neurotransmisión GABAérgica. Por lo tanto, el aumento en la actividad de la PKC observada en el HP de animales Rx, así como también el aumento en los niveles de PKCβ1, podrían estar cumpliendo un rol clave en los cambios observados en el sistema

GABAérgico. Los resultados presentados apoyan esta hipótesis, dado que hemos encontrado que la PKCβ1 aumenta en paralelo con el aumento de receptores $GABA_A$. La actividad de esta enzima favorecería una respuesta de las neuronas GABAérgicas hacia las alteraciones inducidas por la radiación, ajustando el tipo y número de receptores $GABA_A$ y aumentando de esta manera el tono inhibitorio.

En resumen, las vías que contribuyen a la correcta manifestación de conductas relacionadas con la ansiedad pueden ser bloqueadas, atenuadas o desorganizadas durante el desarrollo debido a injurias o influencia de agentes físicos como las radiaciones ionizantes. En consecuencia, el aumento en la afinidad y densidad de receptores $GABA_A$ gatillado por un aumento de la PKC, así como el aumento de GAD en el HP, podría determinar los niveles bajos de ansiedad observados en el EPM y el consecuente cambio en la performance en el test de IE.

5.4. El cambio en los niveles de PKCβ1 a P15 sería el origen de las alteraciones a observadas a P30

Los resultados muestran que la exposición a la radiación ionizante neonatal induce una disminución inicial en los niveles de PKCβ1, observado 15 días luego de la exposición, siendo el único parámetro que presenta diferencia a esta edad en el grupo irradiado con respecto al control. Estos resultados sugieren que los cambios a nivel conductual a P30 podrían tener su origen en una alteración específica dentro de una ventana de oportunidad entre P15 y P30. Se podría postular que estos cambios podrían estar manifestándose en este período debido a que al día P28 comienzan a establecerse las conexiones finales que van a dar origen a un cerebro adulto.

El hallazgo de una disminución inicial en los niveles de PKCβ1 hipocampal (P15) sin cambios en los niveles de ROS, sugiere que la radiación ionizante actuaría primariamente sobre la PKC, induciendo un déficit en los niveles de esta isoforma, probablemente actuando a través de un mecanismo independiente de la formación de ROS. La subsecuente *up-regulation* de PKCβ1 podría ser gatillada con el objetivo de

contrarrestar el daño potencial que pudiera resultar de este desbalance. Se necesitan más experimentos para confirmar esta hipótesis.

Neuroprotección

5.5. El βE estaría mediando su neuroprotección tanto a través de un mecanismo antioxidante como de uno mediado por receptor

Los resultados demuestran que el tratamiento con βE en el período perinatal fue efectivo en prevenir la disminución en los niveles de ansiedad, el déficit en la memoria de habituación y los niveles altos de ROS en el HP de animales de P30. Sin embargo, la administración de βE no logró prevenir el aumento en la actividad total de PKC. Se podría sugerir que la falta de eficacia del βE sobre la PKC podría deberse a una acción diferencial sobre las diferentes isoenzimas. Efectivamente, al analizar los valores de PKCβ1, se observó que el tratamiento logró prevenir el aumento de esta isoforma. Estos resultados sugieren que la PKCβ1 sería una de las isoformas que contribuiría al aumento de la actividad total de PKC pero no la única, ya que la actividad total se mantiene elevada aun después de la normalización en los niveles de PKCβ1.

En contraste con los niveles bajos de ansiedad observados en las ratas irradiadas, los animales que fueron tratados con βE tuvieron niveles de ansiedad semejantes al control. Esto podría sugerir que el βE induciría un aumento en los niveles de ansiedad para recuperar los valores normales. Esta hipótesis es respaldada por los resultados obtenidos por Arabo et al. (2005), quienes demostraron que el βE administrado en el *estadío intrauterino* es capaz *per se* de aumentar los niveles de ansiedad en la adultez. Por el contrario, cuando el estradiol fue administrado a ratas *adultas*, se observó una disminución en la ansiedad (Zhang et al., 2009; Walf y Frye, 2010). Cuando las ratas sin irradiar fueron tratadas con estradiol en el periodo *perinatal* y testeadas en la adultez, no se observaron cambios en los niveles de

ansiedad al compararlos con el grupo control. Esto sugiere que esta hormona podría actuar en períodos específicos, modificando diferencialmente el nivel de ansiedad y dependiendo de la existencia de una injuria. En consecuencia, se podría postular que los estrógenos administrados *neonatalmente* ejercerían una acción organizacional o de diferenciación sobre el cerebro, lo cual sería capaz de generar un comportamiento especifico en la adultez. Sin embargo, cuando el estradiol es administrado en la adultez, desempeñaría un rol activacional.

De acuerdo a Gillies y McArthur (2010), cuando una injuria se interpone en el período neonatal, parecería que los estrógenos tienden a restablecer la organización cerebral normal, substituyendo el rol organizacional por uno activacional, para alcanzar de esta manera los niveles normales. En otras palabras: en el cerebro dañado la administración de estrógenos produciría una recapitulación de ciertos procesos del desarrollo con el objetivo de promover la protección, la reparación y la recuperación, motivo por el cual sólo ejercería su acción neuroprotectora ante la existencia de una injuria.

Finalmente, la literatura muestra ciertas discrepancias con respecto a la dosis óptima de estradiol necesaria para obtener un efecto neuroprotector, tanto *in vitro* como *in vivo.* Esto puede ser debido, en parte, a las diferentes concentraciones hormonales requeridas en las distintas áreas en los diversos estadios del desarrollo. De hecho, autores como Prokai et al. (2003) demostraron que niveles moderados de estradiol pueden ejercer acciones neuroprotectoras mediante un mecanismo antioxidante *in vivo*. Por otro lado, se han observado acciones neuroprotectoras, independientes del RE, utilizando concentraciones fisiológicas de análogos de estrógenos que no se unen a los REs (Liu et al., 2002). Bajo las condiciones experimentales utilizadas en nuestro modelo, se han encontrado concentraciones farmacológicas (por encima del rango fisiológico) en suero 30 min después de la primera administración subcutánea de 50μg/Kg de βE. Dicha concentración fue, en promedio, de 1975 ± 22 pg/mL sobre el nivel basal, siendo también la concentración media que estaba presente al momento de la exposición a la radiación. Este valor es comparable con los niveles encontrados en suero de animales tratados con estradiol

sujetos a una injuria isquémica (Sandstrom y Rowan 2007) y en animales intactos (MacLusky et al., 2005).

Aunque la administración de βE no fue efectiva en modificar las alteraciones observadas en animales Rx en el test de EI, la falta de habituación a un OF (Caceres et al., 2010) en el grupo Rx fue contrarrestada con el tratamiento de βE. Estos resultados contrapuestos pueden atribuirse a las múltiples vías de señalización involucradas en la consolidación de la memoria de habituación en contraste con las necesarias para un test aversivo. La interferencia sobre una de las múltiples vías involucradas en la memoria de habituación podría ser suficiente para contrarrestar los cambios en este tipo de memoria, mientras que en un test aversivo sería más difícil contrarrestar el cambio inducido por un agente exógeno (Vianna et al., 2001).

Los mecanismos moleculares que podrían explicar la acción neuroprotectora de los estrógenos incluyen a las acciones genómicas mediadas por receptor (Sawada y Shimohama, 2000; Zhao et al., 2004), las acciones no genómicas mediadas por receptor (Yu et al., 2004) y las acciones no genómicas independientes del receptor. Estas últimas se refieren a las propiedades antioxidantes relacionadas con su estructura molecular (Daré et al., 2000; Prokai et al., 2003). Los efectos antioxidantes independientes del receptor parecen depender principalmente de un mecanismo directo de barrido de radicales libres, aunque ciertos mecanismos indirectos, como la regulación de enzimas antioxidantes (Garcia-Segura et al., 2001), y el quelado de iones metálicos (Ruiz-Larrea et al., 1995) estarían también operando.

Los resultados muestran que no se producen cambios en los niveles de ROS luego de tratamiento con βE en los animales irradiados, sugiriendo que es posible que altas concentraciones de estrógenos en un modelo *in vivo* puedan mediar una acción *scavenger* de manera directa (Prokai-Tatrai et al., 2008). Es posible que los niveles farmacológicos de estradiol, que permanecen elevados al momento de la irradiación, sean responsables de la acción neuroprotectora. Sin embargo, la severidad de la lesión y la ruta de administración pueden ser también factores determinantes de la concentración de hormona requerida para contrarrestar la injuria.

Para confirmar la hipótesis de que el βE podría estar actuando mediante un mecanismo antioxidante, se utilizó el αE, un isómero óptico del βE que es 40 veces menos potente sobre los REs que es un compuesto natural que existe durante el embarazo en humanos (derivado de epistestosterona). Muchos autores reportaron que el αE es capaz de unirse eficientemente a los REs *in vitro*, incluyendo el receptor selectivo X (Toran-Allerandet al., 2004). En contraste, otros autores describen que el αE es un isómero inactivo sobre los RE cuando se realizan ensayos *in vivo* (Yi et al., 2008), ya que sugieren que la abundancia de ácidos grasos en el SNC puede interferir con la unión del αE con los REs (Yi et al., 2011). Debido a que el presente experimento fue realizado *in vivo*, se consideró al αE como un isómero que se une pobremente a los REs.

Si bien con menos diferencia significativa que el βE, el αE resultó ser efectivo en varios de los parámetros medidos. Teniendo en cuenta (i) la débil acción del αE sobre los REs; (ii) que tanto el αE como el βE tienen similares efectos neuroprotectores; (iii) y que los niveles de ROS fueron eficientemente restituidos, se podría sugerir que el βE podría estar actuando, al menos en parte, mediante un mecanismo antioxidante independiente de los REs, apoyando los resultados de Prokai y Simpkins (2007), McClean y Nuñez (2008) y Yi et al. (2008). Sin embargo, no se debería descartar que ambos mecanismos, antioxidante y mediado por RE, estén actuando en simultáneo para ejercer la neuroprotección.

Para dilucidar una posible participación de los REs en el mecanismo de neuroprotección del βE, se utilizaron dos agonistas selectivos de los REs, el PPT (agonista REα) y el DPN (agonista REβ). La normalización de los niveles de ROS en el grupo Rx observada luego de la administración de los agonistas selectivos sugiere que los RE estarían participando en la acción antioxidante. Esto concuerda con los trabajos de Connnell y Saleh (2011), quienes sugieren que el DPN puede actuar en áreas isquémicas como antioxidante o aumentando las capacidades antioxidantes de las células, estando esta acción relacionada con la activación del RE. La activación de ambos receptores, REα o REβ, es capaz de restituir la eficiencia funcional de la mitocondria en el cerebro en casos de injuria, ya que se produce un aumento en el

transporte de electrones y una reducción del daño por estrés oxidativo. Estos datos indican que el PPT y el DPN podrían regular directa e independientemente la función mitocondrial, incluyendo el aumento en la respiración mitocondrial, la actividad de la COX y una rápida eliminación del exceso de peroxidación lipídica (Irwin et al., 2012).

Los niveles de ansiedad observados en el EPM permanecieron semejantes a los niveles control solo en los animales irradiados tratados con DPN. Esto sugiere una participación del REβ en la neuroprotección mediada por estrógenos sobre conductas relacionadas a la ansiedad. Resultados similares fueron obtenidos por Lund et al. (2005) con hembras ovacteriomizadas. Es importante señalar que el REβ está críticamente involucrado en la regulación de comportamientos no reproductivos y del desarrollo del SNC, incluyendo la plasticidad sináptica en la amígdala basolateral y el procesamiento de conductas emocionales (Krezel et al., 2001). Existe la posibilidad de que la acción del DPN como ansiolítico no sea enteramente mediada por el REβ. El DPN podría estar actuando de manera similar a las benzodiacepinas, reforzando la transmisión de los receptores $GABA_A$ o como agonista del receptor de serotonina, actuando de manera similar a las principales drogas empleadas en el manejo de estados de ansiedad. Sin embargo, la habilidad del tamoxifeno de bloquear las acciones ansiolíticas del DPN sugiere que el REβ estaría mediando estos efectos, apoyando la hipótesis de que el REβ es un factor crítico en la regulación de las conductas relacionadas con la ansiedad (Lund et al., 2005).

Cuando se evaluó la memoria de habituación, tanto el PPT como el DPN fueron efectivos en prevenir los cambios en este tipo de memoria. Esto es congruente con la capacidad del estradiol de inducir un aumento en las espinas dendríticas y las sinapsis en el HP, proceso que es mediado por los REs (McEwen et al., 1999), lo cual estaría favoreciendo al restablecimiento de la conducta normal. Si bien el DPN parece no producir efectos significativos sobre estas estructuras, el PPT fue capaz de inducir el mismo aumento que el estradiol sobre la sinaptogénesis en regiones específicas del HP (Murakami et al., 2006). Estos estudios revelan que el REα jugaría un rol funcional critico en la sinaptogénesis hipocampal (Jelks et al., 2007).

Dado que el REβ parece ser importante en la función de los astrocitos, tanto en condiciones patológicas como fisiológicas, se ha sugerido un importante rol del REβ en la mantención del número de neuronas y células gliales en el SNC, lo que podría estar favoreciendo los efectos neuroprotectores del DPN en este modelo. Más aún, es probable que la respuesta fisiológica al estradiol en diferentes áreas sea influenciada por la expresión diferencial de los REα y REβ en astrocitos y neuronas (Wang et al., 2000).

La dosis utilizada de los agonista selectivos de REs en este trabajo es superior a la dosis de estradiol utilizada, lo cual ha sido también reportado previamente por otros autores (Saleh et al., 2001; Saleh et al., 2001b). El requerimiento de una dosis mayor indicaría que la activación de ambos subtipos de receptores al mismo tiempo por parte del estradiol produciría un efecto sinérgico sobre los mecanismos de neuroprotección activados. Además, se podría sugerir que el estradiol podría poseer una mayor capacidad antioxidante o actividad de secuestrador de radicales libres que los agonistas selectivos DPN y PPT. Esto sugiere que cada RE protegería de una manera selectiva y diferencial frente a los distintos tipos de injuria (Connell y Saleh, 2011).

Es importante destacar que varios de los efectos neuroprotectores mediados por los REs fueron observados debido a que la injuria en nuestro modelo fue provocada durante el desarrollo, en contraste con otros trabajos donde no se observó protección mediada por los REs (Cordey y Pike, 2005; Zhao y Brinton, 2007). Esto se debe a que ambos REs son expresados en el cerebro con distintos patrones, en diferentes áreas del cerebro y con diferentes niveles de expresión durante el desarrollo (Gonzalez et al., 2007; Prewitt, 2007).

En resumen, los mecanismos de neuromodulación y neuroprotección involucran una cascada compleja de eventos celulares. La acción global de las drogas estrogénicas en el cerebro depende de la organización neuroanatómica y espacio-temporal de los REα y REβ en varias poblaciones neuronales y de las moléculas involucradas en las vías de señalización que interactúen con los REs (Morissette et al., 2008). El rol de cada subtipo de RE en el mecanismo de neuroprotección parece ser dependiente del parámetro analizado, del tipo de injuria, del lugar de daño y de la etapa del desarrollo.

Conclusiones generales

Los resultados de este trabajo sugieren la existencia de una gran vulnerabilidad del hipocampo frente a la exposición a las radiaciones ionizantes durante el desarrollo. Los efectos inducidos por la irradiación neonatal se traducen en modificaciones conductuales (mejor performance en el test de EI, menor nivel de ansiedad, disminución de la memoria de habituación), probablemente gatilladas por modificaciones a nivel histológico (alteraciones en el área CA1 y en los astrocitos) y molecular (cambios en el sistema GABAérgico, PKC y proneurotrofinas). Estas modificaciones serían desencadenadas por un aumento inicial de la PKCβ1 a P15 y una persistencia de los niveles de ROS, lo cual generaría un desbalance homeostático.

El tratamiento con βE fue capaz de prevenir la mayoría de los cambios producidos por las radiaciones ionizantes a nivel bioquímico, molecular y conductual. Mediante el uso de αE y de agonistas de los REs se intentó dilucidar el mecanismo de acción neuroprotector del estradiol en este modelo, el cual parecería actuar tanto mediante una acción directa antioxidante como a través de un mecanismo mediado por receptor.

"Todo tiene un propósito, los relojes te dicen la hora, los trenes te llevan a lugares. Me imaginaba que el mundo entero era una gran máquina. Las máquinas nunca tienen alguna pieza extra, tú sabes. Tienen el número exacto de partes que necesitan. Así que pensé que si todo el mundo era una gran máquina, yo no podía ser una parte extra. Yo tenía que estar aquí por alguna razón. Y eso significa que tú tienes que estar aquí por alguna razón, también"

La invención de Hugo Cabret - Film

6. Bibliografía

Abeliovich A, Paylor R, Chen C, Kim JJ, Wehner JM, Tonegawa S. PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. Cell. 1993. 31;75(7):1263-71.

Abramian AM, Comenencia-Ortiz E, Vithlani M, Verena Tretter E, Sieghart W, Davies PA, Moss SJ. Protein Kinase C Phosphorylation Regulates Membrane Insertion of $GABA_A$ Receptor Subtypes That Mediate Tonic Inhibition. J Biol Chem. 2010. 285(53):41795-41805.

Adiga IK, Nair RR. Multiple signaling pathways coordinately mediate reactive oxygen species dependent cardiomyocyte hypertrophy. Cell Biochem Funct. 2008. 26(3):346-51.

Aiguo W, Zhe Y, Gomez-Pinilla F. Vitamin E protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic braininjury in rats. Neurorehabil Neural Repair. 2010. 24(3):290-8.

Almeida M, Han L, Ambrogini E, Bartell SM, Manolagas SC. Oxidative Stress Stimulates Apoptosis and Activates NF-κB in Osteoblastic Cells via a PKCß/p66shc Signaling Cascade: Counter Regulation by Estrogens or Androgens. Mol Endocrinol. 2010. 24: 2030-2037.

Altman J y Anderson WJ. Irradiation of the cerebellum in infant rats with low-level x-ray: histological and cytological effects during infancy and adulthood. Exp Neurol. 1971. 30(3):492-509.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Nat Rev Neurosci. 2001. 2:287–293.

Alzamora R, Harvey BJ. Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by steroid hormones. Steroids. 2008. 73:885-888.

Aon-Bertolino ML, Romero JI, Galeano P, Holubiec M, Badorrey MS, Saraceno GE, Hanschmann EM, Lillig CH, Capani F. Thioredoxin and glutaredoxin system proteins-immunolocalization in the rat central nervous system. Biochim Biophys Acta. 2011. 1810(1):93-110.

Arabo A, Lefebvre M, Fermanel M, Caston J. Administration of 17alpha-ethinylestradiol during pregnancy elicits modifications of maternal behavior and emotional alteration of the offspring in the rat. Brain Res. Dev. Brain Res. 2005. 156(1), 93–103.

Arancio O, Chao MV. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia Curr Opin Neurobiol. 2007. 17:325–330.

Arévalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! Cell Mol Life Sci. 2006. 63(13):1523-37.

Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ. Stressed-out, or in (utero)? Trends Neurosci. 2002. 25(10):518-24.

Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. Neurosci Biobehav Rev. 2004. 28(3):73-83.

Baranov AE, Guskova AK, Nadejina NM, Nugis VY. Chernobyl experience: biological indicators of exposure to ionizing radiation. Stem Cells. 1995. 13 (Suppl. 1) 69–77.

Barker PA. Whither proBDNF? Nat Neurosci. 2009. 12(2):105-6.

Barros D, Amaral OB, Izquierdo I, Geracitano L, do Carmo Bassols Raseira M, Henriques AT, Ramirez MR. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2006. 84(2), 229-234.

BEIR V, Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation National Research Council. Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. 1990. National Academy Press, Washington DC.

Behl C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. Nat Rev Neurosci. 2002. 3(6), 433–442.

Benés, AP y Gadea Carrera, E. Radiaciones ionizantes: normas de protección. 2002. Parte 1. En: Higiene Laboral. www.estrucplan.com.ar

Bernabeu R, Izquierdo I, Cammarota M, Jerusalinsky D, Medina JH. Learning-specific, time-dependent increase in [3H]phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of the rat brain. Brain Res. 1995. 10;685(1-2):163-8.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature. 1993. 7;361(6407):31-9.

Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera M C, Sastre J, Pallardó FV, Mann G, Viña J. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. Aging Cell. 2005. 4(3), 113–118.

Brandon NJ, Delmas P, Kittler JT, McDonald BJ, Sieghart W, Brown DA, Smart TG, Moss SJ. GABAA receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. J Biol Chem. 2000. 275(49):38856-38862.

Brandon NJ, Jovanovic JN, Smart TG, Moss SJ. Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors. J Neurosci. 2002. 22(15):6353-6361.

Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. Behav Brain Res. 2009. 197(1), 125-137.

Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. Glia. 2007. 55:1263–1271.

Caceres LG, Rios H, Guelman LR. Long-lasting effects of neonatal ionizing radiation exposure on spatial memory and anxiety- like behavior. Ecotoxicol Environ Saf. 2009. 72, 895–904.

Caceres LG, Aon Bertolino L, Saraceno GE, Zorrilla Zubilete MA, Uran SL, Capani F, Guelman LR. Hippocampal-related memory deficits and histological damage induced by neonatal ionizing radiation exposure. Role of oxidative status. Brain Res. 2010. 2;1312:67-78.

Cameron J. et al. Brain facts. A primer on the brain and nervous system. 2012. Society for Neuroscience. Washington, DC, USA.

Cardona-Gomez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. Brain Res Mol Brain Res. 2002. 107:80–88.

Carew, TJ. Behavioral neurobiology. The cellular organization of natural behavior. 2000. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, U.S.A.

Carrasco MA, Castro P, Sepulveda FJ, Tapia JC, Gatica K, Davis MI, Aguayo LG. Regulation of glycinergic and GABAergic synaptogenesis by brain-derived neurotrophic factor in developing spinal neurons. Neuroscience. 2007. 145, 484–494.

Cassarino, DS, Bennett Jr, JP. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. Brain Res. 1999. 29, 1–25.

Choi JG, Moon M, Jeong HU, Kim MC, Kim SY, Oh MS. Cistanches Herba enhances learning and memory by inducing nerve growth factor. Behav Brain Res. 2011. 20;216(2):652-8.

Cid MP, Arce A, Salvatierra NA. Acute stress or systemic insulin injection increases flunitrazepam sensitive-GABAA receptor density in synaptosomes of chick forebrain: Modulation by systemic epinephrine. Stress. 2008. 11(2):101-107.

Clarkson AN, Huang BS, MacIsaac SE, Mody I, Carmichael ST. Reducing excessive GABAergic tonic inhibition promotes post-stroke functional recovery. Nature .2010. 468(7321):305–309.

Connell BJ, Crosby KM, Richard MJ, Mayne MB, Saleh TM. Estrogen-mediated neuroprotection in the cortex may require NMDA receptor activation. Neuroscience. 2007. 146(1), 160–169.

Connell BJ, Saleh TM. Differential Neuroprotection of Selective Estrogen Receptor Agonists against AutonomicDysfunction and Ischemic Cell Death in Permanent versus Reperfusion Injury. Adv Pharmacol Sci. 2011. 2011:976951.

Cordey M, Pike CJ. Neuroprotective properties of selective estrogen receptor agonists in cultured neurons, Brain Res. 2005. 1045. 217–223.

Czurkó A, Czéh B, Seress L, Nadel L, Bures J. Severe spatial navigation deficit in the Morris water maze after single high dose of neonatal x-ray irradiation in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997. 94 (6), 2766–2771.

Dai X, Cao X, Kreulen DL. Superoxide anion is elevated in sympathetic neurons in DOCA-salt hypertension via activation of NADPH oxidase. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006. 290:H1019-H1026.

Danbolt NC. Glutamate uptake. Progr Neurobiol. 2001. 65:1–105.

Daré E, Götz ME, Zhivotovsky B, Manzo L, Ceccatelli S. Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. J. Neurosci. Res. 2000. 62(4), 557–565.

Davies AM. The role of neurotrophins during successive stages of sensory neuron development. Prog Growth Factor Res. 1994. 5(3):263-89.

Depino AM, Tsetsenis T, Gross C. GABA homeostasis contributes to the developmental programming of anxiety-related behavior. Brain Res. 2008. 1210:189-199.

Di Toro CG, Di Toro PA, Zieher LM, Guelman LR. Sensitivity of cerebellar glutathione system to neonatal ionizing radiation exposure. Neurotoxicology. 2007. 28 (3), 555–561.

DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. Psychoneuroendocrinology. 2009. 34(Suppl1), S113–122.

Dubal DB, Wise PM. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. Endocrinology. 2001. 142(1), 43–48.

Dubal DB, Zhu H, Yu J. Estrogen receptor α, not β, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001. 98. 4, pp. 1952–1957.

Durkin JP, Tremblay R, Chakravarthy B, Mealing G, Morley P, Small D, Song D. Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. J Neurochem. 1997. 68:1400–1412

Driver AS, Kodavanti PR, Mundy WR. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. Neurotoxicol Teratol. 2000. 22(2), 175-181.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. Behav Brain Res. 1988. 31(1), 47-59.

Erkal HS, Batçioğlu K, Serin M, Uyumlu B, Yücel N. The evaluation of the oxidant injury as a function of time following brain irradiation in a rat model. Neurochem Res. 2006. 31 (10), 1271–1277.

Fan X, Xu H, Warner M, Gustafsson JA. ERβ in CNS: new roles in development and function. Prog Brain Res. 2010. 181, 233–250.

Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Rooney RJ, Patel DH, Thuras PD. mRNA and protein levels for GABAAalpha4, alpha5, beta1 and GABABR1 receptors are altered in brains from subjects with autism. J Autism Dev Disord. 2010. 40(6):743-50.

Femenía T, Gómez-Galán M, Lindskog M, Magara S. Dysfunctional hippocampal activity affects emotion and cognition in mood disorders. Brain Res. 2012. 1476:58-70.

Filippova N, Sedelnikova A, Zong Y, Fortinberry H, Weiss DS. Regulation of recombinant gamma-aminobutyric acid (GABA)(A) and GABA(C) receptors by protein kinase C. Mol Pharmacol. 2000. 57(5):847-56.

Fishell G, Rudy B. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". Annu Rev Neurosci. 2011. 34:535-67.

Fitzpatrick JL, Mize AL, Wade CB, Harris JA, Shapiro RA, Dorsa DM. Estrogen-mediated neuroprotection against beta-amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor alpha or beta and activation of the MAPK pathway. J Neurochem. 2002. 82:674–682.

Fukuda H, Fukuda A, Zhu C, Korhonen L, Swanpalmer J, Hertzman S, Leist M, Lannering B, Lindholm D, Björk-Eriksson T, Marky I, Blomgren K. Irradiation-induced progenitor cell death in the developing brain is resistant to erythropoietin treatment and caspase inhibition. Cell Death Differ. 2004. 11 (11), 1166–1178.

Fushiki S. Radiation hazards in children - Lessons from Chernobyl, Three Mile Island and Fukushima. Brain Dev Brain Dev. 2013. 35(3):220-227.

Fuss J, Ben Abdallah NM, Hensley FW, Weber KJ, Hellweg R, Gass P. Deletion of running-induced hippocampal neurogenesis by irradiation prevents development of an anxious phenotype in mice. PLoS One. 2010. 5(9):e12769.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. Prog. Neurobiol. 2001. 63(1), 29–60.

Genaro AM, Hortelano S, Boscá L. Changes in distribution and isoenzymatic expression of protein kinase C in B lymphocytes induced by alloantigenic stimulation. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam. 1994. 44(4):124-34.

Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A. Glia: the fulcrum of brain diseases. Cell Death Differ. 2007. 14:1324–1335.

Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sexspecific medicines. Pharmacol. Rev. 2010. 62(2), 155–198.

Goodlett CR, Horn KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. Alcohol Res Health. 2001. 25 (3), 175–184.

Green PS, Simpkins JW. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. Int J Dev Neurosci. 2000. 18(4-5), 347–358.

Guelman LR, Zorrilla Zubilete MA, Rios H, Zieher, LM. WR-2721 (amifostine, ethyol®) prevents motor and morphological changes induced by neonatal X-irradiation. Neurochem Int. 2003. 42:385-391.

Guelman LR, Pagotto RML, Di Toro CG, Ziehe LM. Deferoxamine antioxidant activity on cerebellar granule cells gamma-irradiated in vitro. Neurotoxicol Teratol. 2004. 26, 477–483.

Guelman LR, Cabana JI, Pagotto RML, Zieher LM. Ionizing radiation-induced damage on developing cerebellar granule cells cultures can be prevented by an early amifostine post-treatment. Int J Dev Neurosci. 2005. 23, 1–7.

Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Activities of estrogen receptor alpha and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression, Mol. Cell. Endocrinol. 2003. 206, 13–22.

Hazell AS, Sheedy D, Oanea R, Aghourian M, Sun S, Jung JY, Wang D, Wang C. Loss of astrocytic glutamate transporters in Wernicke encephalopathy. Glia. 2009. 58:148–156.

Hellström NA, Björk-Eriksson T, Blomgren K, Kuhn HG. Differential recovery of neural stem cells in the subventricular zone and dentate gyrus after ionizing radiation. Stem Cells. 2009. 27(3), 634–641.

Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. Highaffinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. Nature. 1991. 350, 678e683.

Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. EMBO J. 1990. 9(8):2459-64.

Huang Y, Ko H, Cheung ZH, Yung KK, Yao T, Wang JJ, Morozov A, Ke Y, Ip NY, Yung WH. Dual actions of brain-derived neurotrophic factor on GABAergic transmission in cerebellar Purkinje neurons. Exp Neurol. 2012. 233(2):791-8.

Huleihel R, Yanai J. Disruption of the development of cholinergic-induced translocation/activation of PKC isoforms after prenatal heroin exposure. Brain Res Bull. 2006. 69(2):174-181.

Hwang IK, Yoo KI, Yi SS, Kwon YG, Ahn YK, Seong JK, Lee IS, Yoon YS, Won M H. Age-related differentiation in newly generated DCX immunoreactive neurons in the subgranular zone of the gerbil dentate gyrus. Neurochem. Res. 2008. 33(5), 867–872.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes. 2000. 49:1939–1945.

Irwin RW, Yao J, To J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD. Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. J Neuroendocrinol. 2012. 24(1):236-48

Ito T, Deng X, Carr B, May WS. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function J. Biol. Chem. 1997. 272. 11671–11673.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. Neurobiol Learn Mem. 1997. 68, 285–316.

Izquierdo I, Medina JH. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. Neurobiol Learn Mem. 1995. 63(1):19-32.

Jelks KB, Wylie R, Floyd CL, McAllister AK, Wise P. Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in culturedhippocampal neurons: critical role of estrogen receptor -alpha. J Neurosci. 2007. 27;27(26):6903-13.

Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I. Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. Behav Neural Biol. 1994. 61(2):107-9.

Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM y Zukin RS. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. J Neurosci. 2002. 22(6), 2115–2124.

Jung YS, Ryu BR, Lee BK, Mook-Jung I, Kim SU, Lee SH, Baik EJ, Moon CH. Role for PKC-epsilon in neuronal death induced by oxidative stress. Biochem Biophys Res Commun. 2004. 320(3):789-94.

Kash SF, Tecott LH, Hodge C, Baekkeskov S. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. Proc Natl Acad Sci USA. 1999. 96:1698–1703.

Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. Nature. 1998. 17;396(6712):683-7.

Kharlamov A, Guidotti A, Costa E, Hayes R, Armstrong D. Semisynthetic sphingolipids prevent protein kinase C translocation and neuronal damage in the perifocal area following a photochemically induced thrombotic brain cortical lesion. J Neurosci. 1993. 13:2483–2494

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol. 2010. 8(6), e1000412.

Kimler BF. Prenatal irradiation: a major concern for the developing brain. Int J Radiat Biol. 1998. 73(4), 423–434.

Kisková J, Šmajda B. Open field behavior and habituation in rats irradiated on the head with gamma-rays. Acta Physiol Hung. 2008. 95 (3), 307–312.

Knapp LT, Klann E. Potentiation of hippocampal synaptic transmission by superoxide requires the oxidative activation of protein kinase C. J Neurosci. 2002. 1; 22(3):674-83.

Koponen S, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Induction of protein kinase C delta subspecies in neurons and microglia after transient global brain ischemia.J Cereb Blood Flow Metab. 2000. 20(1):93-102.

Koshimizu H, Kiyosue K, Hara T, Hazama S, Suzuki S, Uegaki K, Nagappan G, Zaitsev E, Hirokawa T, Tatsu Y, Ogura A, Lu B, Kojima M. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth,spine formation and cell survival. Mol Brain. 2009. 13;2:27.

Krezel W, Dupont S, Krust A, Chambon P, Chapman PF. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor β deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2001. 98:12278–12282

Lallemend F, Hadjab S, Hans G, Moonen G, Lefebvre PP, Malgrange B. Activation of protein kinase CbetaI constitutes a new neurotrophic pathway for deafferented spiral ganglion neurons. J. CellSci. 2005. 118. 4511–4525.

Lebesgue D, Chevaleyre V, Zukin RS, Etgen AM. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. Steroids. 2009. 74(7), 555–561

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. Science. 2001. 294:1945–1948

Le Magueresse C, Monyer H. GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. Neuron. 2013. 6;77(3):388-405.

Limoli CL, Giedzinsk E, Rola R, Otsuka S, Palmer TD, Fike JR. Radiation response of neural precursor cells: linking cellular sensitivity to cell cycle checkpoints, apoptosis and oxidative stress. Radiat Res. 2004. 161, 17–27.

Little, MP. Risk associated with ionizing radiation. British Medical Bulletin. 2003. 68: 259–275.

Liu R, Yang SH, Perez E. Neuroprotective effects of a novel non–receptor-binding estrogen analogue in vitro and in vivo analysis. Stroke. 2002. 33, 2485–2491.

Llorente R, Villa P, Marco EM, Viveros MP. Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profilesin rat brain: a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy study. Neuroscience. 10;201:12-9.

Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. Nat Rev Neurosci. 2005. 6:603–614.

Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? Neurobiol Learn Mem. 2008. 89, 312–323.

Lund TD, Rovis T, Chung WC, Handa RJ. Novel_actions_of_estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. Endocrinology. 2005. 146(2):797-807.

McEwen BS, Tanapat P, Weiland NG. Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by a nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. Endocrinology. 1999. 140:1044 –1047.

McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. Recent Prog Horm Res. 2002. 57:357–384.

McClean J, Nuñez JL. 17a-estradiol is neuroprotective in male and female rats in a model of early brain injury. Exp Neurol. 2008. 210(1), 41–50.

MacLusky NJ, Luine VN, Hajszan T, Leranth C. The 17α and 17β Isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. Endocrinology. 2005. 146(1), 287–293.

Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. J Exp Biol. 2006. 209:2304–2311.

Mann V, Huber C, Kogianni G, Collins F, Noble B. The antioxidant effect of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the inhibition of osteocyte apoptosis in vitro. Bone. 2007. 40(3), 674–684.

Manthey D, Behl C. From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. Neuroscience. 2006. 138(3), 845–850.

Martín-García E, Darbra S, Pallarés M. Neonatal finasteride induces anxiogenic-like profile and Deteriorates passive avoidance in adulthood after Intrahippocampal neurosteroid administration. Neuroscience. 2008. 154:1497-1505.

Martínez-Sámano J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. El glutation y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. REB. 2011. 30(2): 56-67.

Mattson MP. Evidence for the involvement of protein kinase C in neurodegenerative changes in cultured human cortical neurons. Exp Neurol. 1991. 112:95–103

McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci. 1999. 22:295-318.

Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure–activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues, J. Med. Chem. 2001. 44 4230–4251.

Mize AL, Shapiro RA, Dorsa DM. Estrogen receptor-mediated neuroprotection from oxidative stress requires activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. Endocrinology. 2003. 144:306–312.

Monje ML, Palmer T. Radiation injury and neurogenesis. Curr Opin Neurol. 2003. 16 (2), 129–134.

Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, Estrada-Camarena E, Mendez P, Garcia-Segura LM, Di Paolo T. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008. 108(3-5):327-38.

Moss RL, Gu Q. Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons, Steroids. 1999. 64:14–21.

Murakami G, Tsurugizawa T, Hatanaka Y, Komatsuzaki Y, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Kominami S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S. Comparison between basal and apical dendritic spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus. Biochem Biophys Res Commun. 2006. 351:553–558.

Naylor AS, Bull C, Nilsson MK, Zhu C, Björk-Eriksson T, Eriksson PS, Blomgren K, Kuhn HG. Voluntary running rescues adult hippocampal neurogenesis after irradiation of the young mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2008. 105 (38), 14632–14637.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. Trends Neurosci. 2003. 26:523–530

Nuñez J, Yang Z, Jiang Y, Grandys T, Mark I, Levison SW. 17beta-estradiol protects the neonatal brain from hypoxiaischemia. Exp Neurol. 2007. 208(2), 269–276.

Palgi Y, Ben-Ezra M, Aviel O, Dubiner Y, Baruch E, Soffer Y, Shrira A. Mental health and disaster related attitudes among Japanese after the 2011 Fukushima nuclear disaster. J Psychiatr Res. 2012. 46(5):688-690.

Paratcha G, Furman M, Bevilaqua L, Cammarota M, Vianna M, de Stein ML, Izquierdo I, Medina JH. Involvement of hippocampal PKCbetaI isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning. Brain Res. 2000. 14;855(2):199-205.

Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Editorial: Academic Press. 2004

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Meth. 1985. 14(3), 149-167.

Perovic M, Tesic V, Mladenovic Djordjevic A, Smiljanic K, Loncarevic-Vasiljkovic N, Ruzdijic S, Kanazir S. BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat.. Age (Dordr). 2012. Dec 21. [Epub ahead of print].

Phelps EA. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. Curr Opin Neurobiol. 2004. 14(2):198-202.

Poisbeau P, Cheney MC, Browning MD, Mody I. Modulation of synaptic GABAA receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. J Neurosci. 1999. 15;19(2):674-83.

Prokai L, Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Zharikova AD, Perez EJ, Liu R, Simpkins JW. Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. Proc. Natl Acad. Sci. 2003. 100(20), 11741–11746.

Prokai L, Simpkins JW. Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. Pharmacol Ther. 2007. 114(1), 1–12.

Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Rivera-Portalatin NM, Simpkins JW y Prokai L. Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. Steroids. 2008. 73(3), 280–288.

Raap DK, DonCarlos L, Garcia F, Muma NA, Wolf WA, Battaglia G, van de Kar LD. Estrogen desensitizes 5-HT(1A) receptors and reduces levels of G(z), G(i1) and G(i3) proteins in the hypothalamus. Neuropharmacology. 2000. 39:1823–1832.

Raber J, Fan Y, Matsumori Y, Liu Z, Weinstein PR, Fike JR, Liu J. Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced deficits. Ann Neurol. 2004. 55 (3), 381–389.

Rahimi O, Claiborne BJ. Morphological development and maturation of granule neuron dendrites in the rat dentate gyrus. Prog Brain Res. 2007.163:167-81.

Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? Trends Pharmacol Sci. 2008. (10):493-8.

Rankin SL, Guy CS, Rahimtula M, Mearow KM. Neurotrophin induced upregulation of p75NTR via a protein kinase C-delta-dependent mechanism. Brain Res. 2008. 27;1217:10-24.

Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. Int J Radiat Biol. 1994. 65 (1), 27–33.

Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, Vanden Berg SR, Morhardt DR, Fike JR. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. Exp Neurol. 2004. 188 (2), 316–330.

Roozendaal B, Brunson KL, Holloway BL, McGaugh JL, Baram TZ. Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. Proc Natl Acad Sci (USA). 2002. 99(21), 13908-13913.

Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. Bioessays. 2004. 26, 1185–1194.

Roux PP y Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. Prog. Neurobiol. 2002. 67, 203-233.

Roy TS, Sharma V, Seidler FJ, Slotkin TA. Quantitative morphological assessment reveals neuronal and glial deficits in hippocampus after a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos in neonatal rats. Dev Brain Res. 2005. 155 (1), 71–80.

Ruiz-Larrea B, Leal A, Martín C, Martínez R y Lacort M. Effects of estrogens on the redox chemistry of iron: a possible mechanism of the antioxidant action of estrogens. Steroids. 1995. 60(11), 780783.

Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, May WS. A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. J. Biol. Chem. 1998. 273. 25436–25442.

Saleh TM, Cribb AE, Connell BJ. Estrogen-induced recovery of autonomic function after middle cerebral artery occlusion in male rats. American Journal of Physiology. 2001. 281, 5. R1531–R1539.

Saleh TM, Cribb AE, Connell BJ. Reduction in infarct size by local estrogen does not prevent autonomic dysfunction after stroke. American Journal of Physiology. 2001. 281, 6. R2088–R2095.

Sallaberry C, Nunes F, Costa MS, Fioreze GT, Ardais AP, Botton PH, Klaudat B, Forte T, Souza DO, Elisabetsky E, Porciúncula LO. Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance

memory and hippocampal BDNF immune content in middle-aged rats. Neuropharmacology. 2013. 64:153-9.

Sandstrom NJ, Rowan MH. Acute pretreatment with estradiol protects against CA1 cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia. Horm. Behav. 2007. 51(3), 335–345.

Saraceno GE, Bertolino ML, Galeano P, Romero JI, Garcia-Segura LM, Capani F. Estradiol therapy in adulthood reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia. Exp Neurol. 2010. 223(2), 615–622.

Schmitz C, Born M, Dolezel P, Rutten BPF, de Saint-Georges L, Hof PR, Korr H. Prenatal protracted irradiation at very low dose rate induces severe neuronal loss in rat hippocampus and cerebellum. Neuroscience. 2005. 130 (4), 935–948.

Schull WJ, Otake M, Yoshimaru H. Effects on intelligence test score of prenatal exposure to ionizing radiation in Hiroshima and Nagasaki: a comparison of the T65DR and DS86 dosimetry systems. RERF Technical Report. 1988. 3–88.

Schull WJ, Nishitani H, Hasuo K, Kobayashi T, Goto I, Otake M. Brain abnormalities among the mentally retarded prenatally exposed atomic bomb survivors. RERF Technical Report. 1991.13–91.

Sezen O, Ertekin MV, Demircan B, Karslioğlu I, Erdoğan F, Koçer I, Calik I, Gepdiremen A. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced brain and retinal damages. Neurosurg Rev. 2008. 31(2):205-13; discussion 213.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. J Comp Neurol. 1997. 388, 507–525.

Simpkins JW, Yang SH, Liu R, Perez E, Cai ZY, Covey DF, Green PS. Estrogen-like compounds for ischemic neuroprotection. Stroke. 2004. 35, 2648–2651.

Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? Trends Pharmacol Sci. 1998. 19(12):500-5.

Song M y Messing RO. Protein kinase C regulation of GABAA receptors. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 2005. 62 119–127.

Staak S, Behnisch T, Angenstein F. Hippocampal long-term potentiation: transient increase but no persistent translocation of protein kinase C isoenzymes alpha and beta. Brain Res. 1995. 5;682(1-2):55-62.

Sun MK, Hongpaisan J, Alkon DL. Postischemic PKC activation rescues retrograde and anterograde long-term memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 25;106(34):14676-80.

Sun MK, Alkon DL. Pharmacology of protein kinase C activators: cognition enhancing and antidementic therapeutics. Pharmacol Ther. 2010. 127(1):66-77.

Sawada H. and Shimohama S. Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. Neurosci. Biobehav. 2000. Rev. 24(1), 143–147.

Swcatt, JD. Mechanisms of memory. The hippocampus serves a role in multimodal information processing, and memory consolidation. Second Edition. 2010. Elsevier Inc. London, UK.

Takashima A, Yokota T, Maeda Y, Itoh S. Pretreatment with caerulein protects against memory impairment induced by protein kinase C inhibitors in the rat. Peptides. 1991. 12(4):699-703.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. J Neurosci. 2005. 25 pp. 5455–5463.

Thiels E, Urban NN, Gonzalez-Burgos GR, Kanterewicz BI, Barrionuevo G, Chu CT, Oury TD, Klann E. Impairment of long-term potentiation and associative memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. J Neurosci. 2000. 20 (20), 7631–7639.

Tien-Hsiung K, Yih-Jing L, Su-Jane W, Chen-Hua F, Lu-Tai T. Effect of honokiol on activity of GAD_{65} and GAD_{67} in the cortex and hippocampus of mice. Phytomedicine. 2011. 18(13):1126-1129.

Tomimatsu N y Arakawa Y. Protein kinase C-mediated protection of motoneurons from excitotoxicity. Neurosci Lett. 2008. 11;439(2):143-6.

Toran-Allerand CD, Singh M, Sétáló G. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. Front. Neuroendocrinol. 1999. 20:97–121.

Toran-Allerand CD. Estrogen and the brain: beyond ER-α and ER-β. Exp Gerontol. 2004. 39(11–12), 1579–1586.

United Nations Scientific Commitee of the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Radiation effects on the developing human brain. Report to the General Assembly, Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. 1993. United Nations publications, USA, annex H, pp. 805–842.

Verkhratsky A, Sofroniew MV, Messing A, deLanerolle NC, Rempe D, Rodríguez JJ, Nedergaard M. Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. ASN Neuro. 2012. 5;4(3).

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, De-Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of non associative learning task in the rat. Learn Mem. 2000. 7, 333–340.

Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH, Izquierdo I. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. Braz. J. Med. Biol. Res. 2001. 34, 233–240.

Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, Yu Y, Huganir RL. PKM-ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. Nature. 2013. 17;493(7432):420-3.

Walf AA, Frye CA. Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. Physiol. Behav. 2010. 99(2), 169–174.

Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. 27;98(5):2792-6.

Waterhouse EG, Xu B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synapticplasticity. Mol Cell Neurosci. 2009. 42(2):81-9.

Weeber EJ, Atkins CM, Selcher JC, Varga AW, Mirnikjoo B, Paylor R, Leitges M, Sweatt JD. A role for the beta isoform of protein kinase C in fear conditioning. J Neurosci. 2000. 15;20(16):5906-14.

Wise PM, Dubal DB. Estradiol protects against ischemic brain injury in middle-aged rats. Biol Reprod. 2000. 63(4), 982–985.

Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. Nat Neurosci. 2005. 8. 1069–1077.

Wu J, Song TB, Li YJ, He KS, Ge L, Wang LR. Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKCbeta1 expression and translocation in offspring rats. Brain Res. 2007. 1141:205-213.

Yi KD, Cai ZY, Covey DF, Simpkins JW. Estrogen receptor-independent neuroprotection via protein phosphatase preservation and attenuation of persistent extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. J Pharmacol Exp Ther. 2008. 324 (3) 1188–1195.

Yi KD, Perez E, Yang S, Liu R, Covey DF y Simpkins JW.The assessment of non feminizing estrogens for use in neuroprotection. Brain Res. 2001. 1379, 61–70.

Yip J, Soghomonian JJ, Blatt GJ. Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications. Acta Neuropathol. 2007. 113(5):559-68.

Yu X, Rajala RV, McGinnis JF. Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 betaestradiol- mediated neuroprotection. J. Biol. Chem. 2004. 279(13), 13086–13094.

Zhang QG, Raz L, Wang R, Han D, De Sevilla L, Yang F, Vadlamudi RK, Brann DW. Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. J Neurosci. 2009. 29(44), 13823–13836.

Zhao L., Wu T. W. and Brinton R. D. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. Brain Res. 2004. 1010(1-2), 22–34.

Zhao L, Brinton RD. Estrogen receptor α and β differentially regulate intracellular Ca2+dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. Brain Research. 2007. 1172.1. 48–59.

Zorrilla Zubilete MA, Guelman LR, Maur D, Caceres LG, Rios H, Zieher LM, Genaro AM. Partial neuroprotection by 17-b-estradiol in neonatal gamma-irradiated rat cerebellum. Neurochem Int. 2011. 58, 273–280.