

ISBN 970-27-1045-6

EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA PREGNENOLONA Y PROGESTERONA EN ASTROCITOS DE LOS SEGMENTOS MEDULARES L7 Y S2 DE PERROS CAUSADOS POR AXOTOMIA-TUBULIZACION DEL NERVIPO CIATICO

**Dr. Manuel Rosales Cortés^a, Dr. Jorge Peregrina Sandoval^b,
MVZ Jorge Hernández Mercado^a, MVZ Ma. Milagros Orozco Delgado,
M en C Guillermo Nolasco Rodríguez^a, Dra. Esther Albarrán Rodríguez^a.**

^aLab. Morfofisiología, Dpto. Medicina Veterinaria, Div. Ciencias Veterinarias, del C.U.C.B.A. UdeG. ^bLab, Inmunología, Dpto. Biología Molecular, Div. Ciencias Biológicas y Ambientales, C.U.C.B.A. UdeG.
Km 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Predio Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. C.P. 44

Introducción

La activación astrocitaria se conoce como astrocitosis reactiva, consiste en un aumento del número (hiperplasia) y del tamaño (hipertrofia) de estas células. Una manera de evidenciarlas es a través de marcar la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) componente estructural del citoesqueleto astrocitario. El aumento del número o la modificación fenotípica de astrocitos después de una lesión al tejido nervioso se presenta como un mecanismo compensador para la reparación del daño tisular.

En el nervio ciático de ratones machos, se ha reportado la presencia de progesterona en concentraciones de 10.5 ± 1.1 ng/g de tejido y en el plasma de 1.5 ± 0.2 ng/ml, además existen concentraciones altas de pregnenolona en el nervio ciático de roedores adultos, lo que apoya la hipótesis de sus efectos neuroprotectores.

Hipótesis

La tubulización con prótesis de quitosana y el tratamiento con pregnenolona y progesterona de forma *in-situ*, inhiben la glíosis reactiva en los segmentos medulares L7 y S2, además de facilitar la regeneración del nervio ciático axotomizado.

Objetivo general

Realizar una descripción morfométrica de la población astrocitaria en los segmentos medulares L7 y S2 del nervio ciático del perro axotomizado y tratado con progesterona y pregnenolona *in situ*.

Metodología

Para determinar si la prótesis de quitosana y el tratamiento con neuroesteroides de forma in-situ inhiben la gliosis reactiva en los segmentos medulares L7 y S2 y además facilitan la regeneración del nervio ciático se utilizaron 9 caninos machos adultos jóvenes divididos en tres grupos con una n=3, un control que fue axotomizado y tubulizado con prótesis de quitosana sin esteroides y dos experimentales con prótesis precargadas con 10mg/2ml de progesterona y pregnenolona, respectivamente. Se sacrifico un animal de cada grupo a los 30 y 60 días post-lesión analizando los segmentos medulares con la técnica de inmunocitoquímica para revelar (GFAP) utilizando como control el segmento contralateral no lesionado.

Resultados

Como se puede observar en las figuras 1-4 los neuroesteroides, en algunas etapas, redujeron casi a la normalidad la gliosis reactiva, pero variaban constantemente, sin embargo, se puede establecer que la hormona base de la pregnenolona, provocó un mejor efecto en las dos regiones, aunque también la progesterona presentó efectos neuroprotectores. En los primeros 30 días post-lesión las neuronas de las zonas medulares axotomizadas mostraron incremento del espacio de Virchow-Robins, indicativo de alteración de los mecanismos normales de regulación de permeabilidad de las membranas. Posteriormente, en el siguiente estadio, revelaron aspecto normal (figura 5), lo que demuestra que estos efectos fueron transitorios. la pregnenolona presento un mayor efecto inhibiendo la gliosis reactiva y promoviendo una mejor regeneración del nervio ciático axotomizado y tubulizado (figura 6).

Número de astrocitos en el segmento séptimo de la médula espinal comparación entre el lado (ipsilateral a la lesión) y el contralateral.

Días	30		60	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
Control	502	646	261	338
Progesterona	220	326	200	269
Pregnenolona	174	237	152	179

Figura.- 1 Población astrocitaria presente en una superficie analizada de 25 mm² del lado medular ipsilateral y contralateral a lesión del nervio ciático a través del estudio en todos los animales controles y experimentales. El segmento medular ipsilateral reveló una mayor cantidad de astrocitos así mismo resulta evidente el efecto inhibitorio de los neuroesteroides sobre la gliosis reactiva, los mejores resultados se obtuvieron por el efecto de la pregnenolona.

Transformación del citoplasma astrocitario evaluado mediante calculo de densidad de superficie del séptimo segmento medular.

Días	30		60	
Grupos	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
Control	41,545	52,254	18,847	29,725
Progesterona	19,205	25,354	12,818	20,261
Pregnenolona	8,132	10,639	7,361	9,529

Figura.- 2 Los valores corresponden a μm^2 de superficie ocupada por astrocitos en 25 mm^2 , los datos se relacionan con el fenómeno manifestado al analizar la población astrocitaria. Los astrocitos con mayor superficie citoplasmática corresponden al segmento medular ipsilateral a la lesión nerviosa, tanto en controles como experimentales a través de los diferentes periodos analizados. Los tejidos de animales controles tubulizados con quitosana y sin tratamiento “IN SITU” con neuroesteroides, mostraron fluctuaciones de la densidad de superficie a lo largo del estudio, mientras que en los tejidos de animales tratados con los neuroesteroides progesterona y pregnenolona la transformación del citoplasma astrocitario fue menor y se mantuvo sin embargo, a los 60 días posesión los tres grupos revelaron valores comparables, las fluctuaciones de astrogliosis puede deberse a la distancia donde se producen la lesión nerviosa, los neuroesteroides produjeron efectos inhibitorios sobre la reactividad astrocitaria.

Número de astrocitos en el segundo segmento medular sacro.

Días	30		60	
grupos	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
Control	289	358	397	549
Progesterona	230	301	374	468
Pregnenolona	180	243	277	350

Figura.-3 El análisis se realizo de la misma forma descrita en el lado ipsilateral a la lesión, también mostró una mayor cantidad de astrocitos en todas las preparaciones controles y experimentales examinadas a través del tiempo, y a pesar de que en algunos estadios se manifestó efecto inhibitorio de ambos neuroesteroides la pregnenolona reveló el efecto más potente a lo largo del estudio con mayor disminución de astrocitos 60 días posesión.

Transformación del citoplasma astrocitario evaluado mediante calculo de densidad de superficie del séptimo segmento medular.

Días	30		60	
Grupos	Contralateral.	Ipsilateral.	Contralateral	Ipsilateral
Control	18,253	25,565	30,606	51,254
Progesterona	10,851	15,347	25,786	35,051
Pregnenolona	10,224	15,627	1,382	1,916

Figura.- 4 Los resultados fueron comparables a los descritos para el segmento séptimo de la médula espinal; solo que en estos tejidos fueron más evidentes los efectos inhibitorios de progesterona que pregnenolona a través del estudio. En comparación con los valores obtenidos del grupo de animales de controles sin tratamiento con neuroesteroides, al finalizar el estadio (60 días) los mejores resultados fueron obtenidos por el tratamiento con pregnenolona, compuesto progénico de todas las diferentes clases de neuroesteroides.

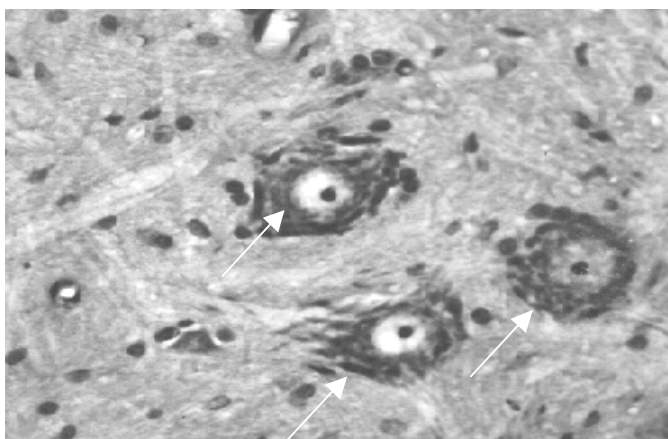


Figura.-5 Corte coronal de médula espinal correspondiente a la séptima lumbar, las flechas indican neuronas motoras de aspecto normal con cuerpos de Nissl en su citoplasma y alrededor de los somas neuronales se distinguen núcleos de células gliales, principalmente astrocitos inmersos en un neuropilo de aspecto compacto. (espesor de corte 50 μ m) 400x, técnica de Nissl.

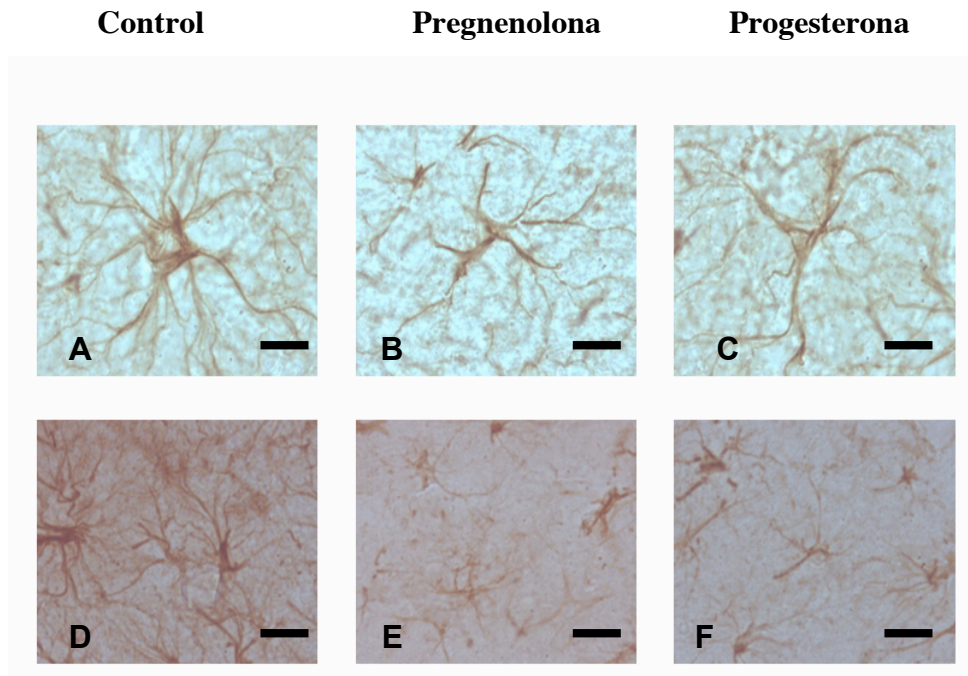


Figura.-6 Fotomicrografías de astrocitos inmunoreactivos a GFAP encontrados en el núcleo medular del nervio ciático del perro: A, B y C (100x) de 30 días postlesion y D, E y F (40x) de 60 días postlesion cortes coronales 40 μ m de espesor.

Conclusión

La regeneración de los nervios axotomizados se logro con mayor éxito en los animales que recibieron tratamiento con neuroesteroides, principalmente con la presencia de pregnenolona.

Agradecimiento

Este trabajo se realizo con financiamiento del proyecto apoyado por CONACYT (M-30437) y fondos recurrentes de la Universidad de Guadalajara.