

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2005
October-December

Artículo:

Efecto del estradiol en el *tectum opticum* de embriones de pollo y su interacción con la resección del prosencéfalo

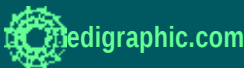
Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



Efecto del estradiol en el *tectum opticum* de embriones de pollo y su interacción con la resección del prosencéfalo

Effect of estradiol on the chick embryo *tectum opticum* and its interactions with forebrain resection

Marco Antonio Martínez* Herón Mendoza** Azucena Aguilar*** Sofía Y. Díaz Miranda***

Abstract

Sexual steroid hormones have effects on the growth, maturation, differentiation and functionality of glial as well as on the neuronal type nerve cells, even in areas unassociated with reproduction, stimulating the formation of synapsis, the synthesis and release of neurotransmitters and growth factors. In addition, they may exert beneficial neuroprotective type effects, such as in cases of Alzheimer's disease in women. This study is about the effect of estradiol on the maturation of the laminated structure of the optic *tectum* male and female normal chick embryos submitted to experiment on encephalectomy and transplant of the pituitary primordium, by measuring the gray and superficial fibrous, central gray, central *albo*, gray and periventricular fibrous strata slices, stained by using the Golgi-Cox method. The results showed significant increases in the majority of the strata of both male and female embryos in comparison to the intact group treated with estradiol. It was also seen that pituitary sectorized animals slowed down the recovery of the thickness of the gray and superficial fibrous strata of males and females. These data suggest that estradiol treatment induces the formation and maturation of cellular elements in the *tectum opticum* lamination of chick embryos, in both males and females, and that the effect is greater when the tectal structure is intact.

Key words:ESTRADIOL, NEUROPROTECTION, CHICK EMBRYOS, *TECTUM OPTICUM*.

Resumen

Las hormonas esteroides sexuales tienen efectos sobre el crecimiento, maduración, diferenciación y funcionalidad de las células nerviosas, tanto en las del tipo glial como neuronal, aun en áreas que no están involucradas directamente con fenómenos de reproducción, estimulando la formación de sinapsis, síntesis y liberación de neurotransmisores y factores de crecimiento; además puede tener efectos benéficos de tipo neuroprotector, como en los casos de Alzheimer en mujeres. En el presente trabajo se estudió el efecto del estradiol sobre la maduración de la estructura laminada del *tectum opticum* de embriones machos y hembras de pollos normales, con encefalectomía parcial experimental y con trasplante de primordio hipofisiario, por medio de la medición de los estratos gris y fibroso superficial, gris central, albo central, gris y fibroso periventricular en cortes procesados con el método de Golgi-Cox. Los resultados mostraron incrementos significativos en la mayoría de los estratos de los embriones machos y hembras del grupo testigo tratados con estradiol. También se apreció que los grupos hipofisectomizados e hipofisectomizados con trasplante del primordio hipofisiario tuvieron menor desarrollo de los estratos tectales y que el tratamiento con estradiol en animales hipofisectomizados permitió la recuperación del grosor del estrato gris y fibroso superficial de machos y hembras. Estos datos sugieren que el tratamiento con estradiol induce la formación y maduración de elementos celulares en la laminación del *tectum opticum* de embriones de pollo, tanto en machos

Recibido el 30 de noviembre de 2004 y aceptado el 27 de mayo de 2005.

*División de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, División de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Av Insurgentes Sur 3700, letra C, Col. Insurgentes Cuicuilco, 04530, México, D. F.

**Laboratorio de Fisiología, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros 8 y 9, Col. Centro, 87110, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

***Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Juriquilla, Querétaro, México.

como en hembras, y que el efecto es mayor cuando la estructura tectal está intacta.

Palabras clave: ESTRADIOL, NEUROPROTECCIÓN, EMBRION DE POLLO, TECTUM OPTICUM.

Introduction

The nervous system is target of the sexual steroid hormones that have profound actions through the interaction pathways with intracellular and membrane receptors, and with ionic channels of growth, maturation, differentiation, and brain cells. The presence of receptors in steroids is demonstrated in primary cultures of oligodendrocytes and astrocytes obtained from the medial brain as well as in Schwann cells of the peripheral nerve of newborn rats;¹ affecting brain zones not involved in reproduction such as: anterior brain, hippocampus, caudate putamen, medial brain and *locus coeruleus*. They stimulate the creation of excitable synapses through N-methyl D-aspartate, programmed by sexual differentiation.² It is also known that steroid hormones intervene in the trans-synapses modulation, inducing the synthesis and liberation of neurotransmitters during the development and remodel of neuronal circuits, and acting in the pre and postsynaptic sites.³ They also activate different kinases and second messengers⁴ in the hippocampus and *in vitro* cortical neurons.^{5,6}

The actions of the estrogens in the reproductive apparatus are well known, but it is evident that this hormone has modulated substantial capacities in systems different from the reproductive one, since it can be neuroprotector, as in the case of Alzheimer disease, that slowly progresses in women that receive substitute hormone therapy.^{5,7} On the other hand, *in vitro* studies have shown that the use of β -estradiol in low concentrations protects against the action of free radicals, what suggests that it can prevent learning disability and neuronal loss in initial states of transitory brain ischemia.⁸ This study has demonstrated that estradiol and insulin have synergic action in the induction of dendrite growth in fetal hippocampus cultures of rats.⁹

The *tectum opticum* is the main target of retina axons in birds. In chickens, the axons of the retina ganglion cells get in the *tectum opticum* through the superficial lamina, spreading its ramifications towards the deeper laminae ramifying into the superficial ones (Figure 1), where they form synapses.¹⁰ It has been described, with autoradiographic techniques in chick embryos, that the gonads, reproductive apparatus, Fabricius pouch, and anterior hypophysis present receptors of estrogens, androgens, or both;¹¹ and, recently, with the help of immunocytochemistry, the

Introducción

El sistema nervioso es blanco de hormonas esteroideas sexuales que tienen profundas acciones a través de las vías de interacción con receptores intracelulares, de membrana y de canales iónicos en el crecimiento, maduración, diferenciación y funcionalidad de células cerebrales. La presencia de receptores a esteroides está demostrada en cultivos primarios de oligodendrocitos y astrocitos, obtenidos del cerebro medio; así como en células de Schwann de nervio periférico en ratas recién nacidas;¹ afectan áreas del cerebro que no están involucradas con la reproducción: cerebro anterior, hipocampo, putamen caudado, cerebro medio y *locus coeruleus*. Asimismo, estimulan la formación de sinapsis excitatorias por medio de receptores N-metil D-aspartato, programadas por diferencias sexuales.² Se sabe además que las hormonas esteroideas intervienen en la modulación transináptica e inducen la síntesis y liberación de neurotransmisores durante el desarrollo y remodelación de los circuitos neuronales, actuando de manera simultánea en los sitios pre y postsinápticos.³ De igual manera, activa diferentes cinasas y segundos mensajeros en el hipocampo⁴ y neuronas corticales *in vitro*.^{5,6}

Se conocen las acciones de los estrógenos sobre el aparato reproductor; sin embargo, es evidente que esta hormona tiene capacidades sustancialmente moduladoras en sistemas diferentes al reproductor, ya que puede ser neuroprotector, como en la enfermedad de Alzheimer, que progresa más lentamente en mujeres que reciben terapia hormonal sustitutiva.^{5,7} Por otro lado, en estudios *in vitro*, el empleo de β -estradiol a bajas concentraciones protege de manera adecuada contra la acción de radicales libres, lo que sugiere que puede prevenir las discapacidades en el aprendizaje y la pérdida neuronal en estadios iniciales a la isquemia transitoria en cerebro.⁸ En este contexto, se ha demostrado que el estradiol y la insulina tienen acción sinérgica en la inducción de crecimiento de dendritas en cultivos de explantes fetales de hipocampo en la rata.⁹

El *tectum opticum* es el blanco principal de los axones retinianos en las aves. En el pollo, los axones de las células ganglionares de la retina entran al *tectum opticum* a través de la lámina superficial, extendiendo sus ramificaciones hacia las láminas

distribution of three types of neuroglia in chickens' *tectum opticum*.¹²

This study proposed the use of chick embryos, due to its ideal model for the study of estradiol and the effect of its nervous development, besides other things, because it lacks of maternal influences as it develops independently inside the egg. The objective is to study the estradiol effects on the laminated structure of the *tectum opticum*, as well as the influence that has the hypophysis primordium in tectal maturation.

Material and methods

Chick embryos

Two lots of chick embryos (*Gallus domesticus*) of White Leghorn hens were introduced in an incubator* at $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and 60 ± 5 of relative humidity. In all cases, the egg was incubated at the same hour; humidity was maintained through a pan lying beneath the incuba-

más profundas y se ramifican en láminas específicas (Figura 1), donde forman sinapsis.¹⁰ Se ha descrito, con técnicas autorradiográficas en embriones de pollo que las gónadas, el tracto reproductor, la bolsa de Fabricio y la hipófisis anterior, presentan receptores de estrógenos, andrógenos o ambos¹¹ y de manera reciente con métodos de inmunocitoquímica, la distribución de tres tipos de neuroglia en el *tectum opticum* de pollo.¹²

En el presente trabajo se propuso el empleo de embriones de pollo, debido a que constituye un modelo ideal para el estudio del estradiol y el efecto sobre su desarrollo nervioso, entre otros aspectos, porque carece de influencias maternas al desarrollarse de manera independiente dentro del huevo. El objetivo consiste en estudiar los efectos del estradiol sobre la estructura laminada del *tectum opticum*, así como la influencia que tiene el primordio hipofisiario en la maduración tectal.

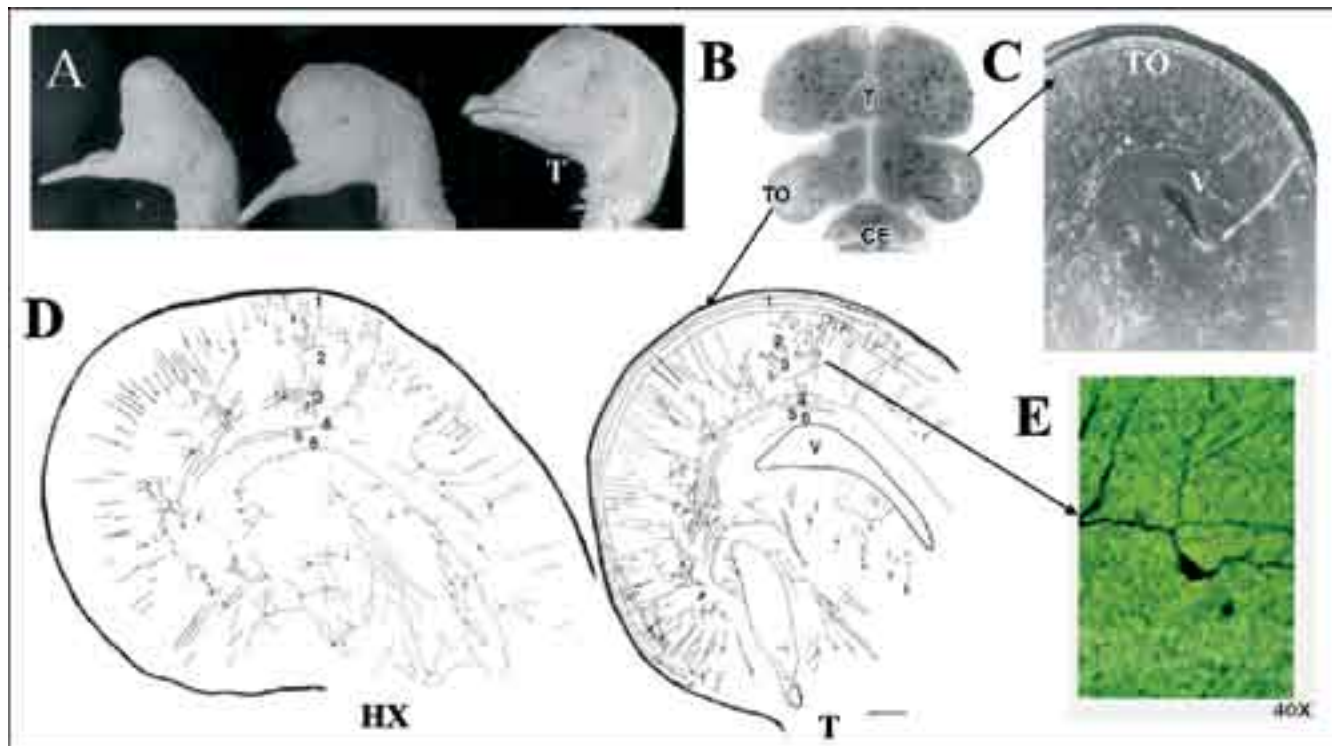


Figura 1. En A, pollos testigo (T) con encefalectomía parcial (hembra y macho) de 16 días. B, corte horizontal del telencéfalo (T), donde se indica con TO, el *tectum opticum* y CE, el cerebelo. C, un corte de 120 µm de grosor donde se muestra el TO y el ventrículo (V). D, dibujos realizados con la cámara lúcida de cortes ventrales del TO de macho hipofisectomizado (HX) y de hembra testigo (T), donde se indican los estratos: SGFS (1); SGC (2); SAC, (3); SGFP (4). En E, neurona fusiforme del *stratum album centrale* (SAC). La barra indica 250 micras.

Figure 1. In A, (T) control chickens with partial encephalotomy (female and male) of 16 days. B, horizontal cut of telencephalous (T), where *tectum opticum* is indicated with TO and the ventricle with (V). D, drawings drawn with the lucid camera of ventral cuts of TO of hypophysectomized male (HX) and of control female (T), where the strata are indicated with: SGFS (1), SGC (2), SAC (3), SGFP (4). In E, the fusiform neuron of the *stratum album centrale* (SAC). The bar indicates 250 µ.

tor, and was daily filled with water. Each group was integrated by four male embryos or four female embryos, previous identification of sex by means of stereoscopic microscopy and later verification by dissection.

Experimental design

It consisted of ten groups with four embryos each one. Five groups were formed by male embryos and the five left by female embryos. Three experimental conditions were maintained and two untouched for each sex. The groups were: *a*) control group (T); *b*) encephalectomized (hypophysectomized) (HX); *c*) encephalectomized with transplants (HXTX); *d*) intact by estrogens (IES); *e*) encephalectomized with estrogens (HXES).

Control and intact groups

Two groups were formed, the first one consisted of male or female embryos to which their shells were opened at 38 hours of incubation, were immediately closed with cellulose tape and were returned to the incubator until day sixteen. This was the control group (C); the other group was inoculated with 200 picograms of estradiol** at 12 and 14 days of incubation over the corium allantoïdal in Eagle-Dulbecco medium. The shell was closed and the development continued until day sixteen (Figure 1A). This group was designated estrogen intact (ESI).

Partial encephalectomy group

The groups with partial encephalectomy (hypophysectomized) were manipulated between 36 and 40 hours of incubation. The eggs were extracted from the incubator and transferred to a static table. Each egg was cleaned with 70% alcohol and the existence of the embryo was identified by means of an ovoscope. A 1.5 cm square was draw with a pencil over the shell on the site where the embryo was localized and a hole was made with a needle in the air chamber. With a carbon disc and a dental motor tool, a hatch was made following the previous square draw, trying not to reach the internal membrane of the shell. With a scalpel, a piece of shell was raised and a corium allantoïdal membrane was adapted. This was accomplished by the air administration previous to the unfastened interior membrane shell. The primordium from the hypophysis was extracted from the chicken embryos by decapitation, using a modification of Fugo's method.¹³ The operation was performed with an stereoscopic microscope and a high power lamp. The vitelline membrane was slightly cut with a help of a sterile dissector; once separated, a medial brain cut was done (with a fine

Material y métodos

Embriones de pollo

Se formaron lotes de embriones de pollo (*Gallus domesticus*) de gallinas White Leghorn incubados a $38 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y 60 ± 5 de humedad relativa, en una incubadora* en todos los casos se incubó al huevo a la misma hora; la humedad se mantuvo a través de una charola que se encontraba en la parte baja de la incubadora, y que se llenaba a diario con agua. Cada grupo estuvo integrado por cuatro embriones macho o cuatro embriones hembra, previa identificación del sexo por medio de microscopía estereoscópica y posterior comprobación por disección.

Diseño experimental

Consistió de diez grupos con cuatro embriones cada uno: Cinco grupos estuvieron formados por embriones macho y cinco por embriones hembra. Se tuvieron tres condiciones experimentales y dos intacto para cada sexo. Los grupos fueron: *a*) testigo (T); *b*) encefalectomizado (hipofisectomizado) (HX); *c*) encefalectomizado con transplantes (HXTX); *d*) intacto con estrógenos (IES); *e*) encefalectomizado con estrógenos (HXES).

Grupos testigo e intacto

Se formaron dos grupos, el primero consistió de embriones macho o hembra a los que sólo se les abrió el cascarón a las 38 horas de incubación e inmediatamente se cerró éste con cinta de celulosa y se regresaron a la incubadora hasta el día 16. A este grupo se le llamó testigo (T); al otro grupo se le inocularon 200 picogramos de estradiol** a los 12 y 14 días de incubación sobre la membrana corioalantoidea en medio Eagle-Dulbecco. Se cerró el cascarón y se continuó el desarrollo hasta el día 16 (Figura 1A). A este grupo se le designó intacto de estrógenos (IES).

Grupos con encefalectomía parcial

Los grupos que presentaban encefalectomía parcial (hipofisectomizados) fueron manipulados entre 36 y 40 horas de incubación. Se extrajeron los huevos de la incubadora y se transfirieron a una mesa estática. Cada huevo se limpió con alcohol al 70% y se localizó la existencia de embrión por medio de un ovoscopio. Se trazó un cuadro de aproximadamente 1.5 cm de lado con un lápiz sobre el cascarón en el

*Marca Galván, México.

** Marca Sigma.

needle) and the piece was extracted corresponding to the anterior portion of the encephalous. In the majority of cases, it was possible to extract the complete sectional piece; when this was not achieved the embryo was disposed. After extracting the piece, and with the finality of avoiding possible infections, a transparent adhesive tape was placed on the window and the orifice practiced in the air chamber. The embryos were returned into the static incubator, and their viability was observed throughout the tape. The incubation was continued until day 16. These groups were named hypophysectomized (HX), or hypophysectomized with the administration of 200 picograms of estradiol (HXES), between 36 and 40 hours of incubation.

Transplanted chicken embryos

To this group of hypophysectomized animals, the adenohypophysis primordium of embryos from the same age (16 days) was placed in the corium allantoic membrane, neurohypophysis was not differentiated. The donator embryos were incubated at the same time as the operated ones. A window was practiced as previously described, at the tenth day of the operation the adenohypophysis was extracted from the donor embryos, to achieve this the embryo was extracted from the shell and placed in a Petri box and with the stereoscopic microscope the skull was opened with fine scissors and tweezers. The brain was raised and the optic chiasm cut and then proceeded to separate the whole brain. By means of a scalpel the hypophysis was extracted and placed in culture medium (Eagle-Dubecco). With the use of a scalpel the transplant was placed in the corium allantoic membrane in one of the bifurcations of the vessels. The viability of the transplant was daily observed with the help of an stereoscopic microscope, checking the gland coloration and the capillaries' neo-formation.¹⁴ The embryos that presented gland transplanted necrosis, were disposed. The transplanted embryos were returned to the incubator at the 16th day. This group was designated as transplanted hypophysectomized (TXHX).

Obtained and processed histological material

Chicken embryos were sacrificed on the 16th day of incubation. The encephalic portion was processed by the Golgi-Cox method.¹⁵ Blocks of nervous tissue containing the *tectum opticum*, were fixed during 25 days in amber jars with a mercury chloride solution at 1%; potassium bichromate at 1%; potassium chromate at 0.8%; and sodium and potassium tungsten 0.5%, previously dissolving the mercury chloride with the

sitio donde se localizaba el embrión y se practicó un orificio con una aguja en la cámara de aire. Con un disco de carbón y un motor dental se hizo una ventanilla siguiendo el cuadro trazado previamente, procurando no alcanzar la membrana interna del cascarón. Con escalpelo se levantó el trozo de cascarón y se colocó la membrana corioalantoidea del embrión. Esto último se logró al permitir la entrada de aire previo al desprendimiento de la membrana interna del cascarón. A los embriones se les extrajo el primordio de la hipófisis mediante decapitación usando una modificación del método de Fugo.¹³ La operación se llevó a cabo bajo un microscopio estereoscópico y con lámpara de luz potente. La membrana vitelina se cortó ligeramente con la ayuda de un disector estéril. Una vez separada ésta, se hizo el corte en el cerebro medio (con aguja fina) y se extrajo la pieza cortada, que correspondió a la porción anterior del encéfalo. En la mayoría de los casos fue posible extraer la pieza seccionada completa; cuando esto último no se logró, se desechó el embrión. Después de extraer la pieza y con la finalidad de evitar posibles infecciones, se colocó cinta adhesiva transparente en la ventana y en el orificio que se practicó en la cámara de aire. Los embriones se regresaron a la incubadora estática y se observó, a través de la cinta, la viabilidad del embrión. Se continuó la incubación hasta el día 16. A estos grupos se les denominó hipofisectomizados (HX) o hipofisectomizados con administración de 200 picogramos de estradiol (HXES), entre 36 y 40 horas de incubación.

Embriones de pollo transplantado

A este grupo de animales hipofisectomizados se le colocó el primordio de la adenohipófisis de embriones de la misma edad (16 días) en la membrana corioalantoidea, no se diferenció la neurohipófisis. Los embriones donadores se incubaron al mismo tiempo que los operados. Se les practicó una ventana, como ya se describió, al décimo día de la operación se extrajo la adenohipófisis del embrión donador, con ese propósito se extrajo el embrión del cascarón y se colocó en una caja de Petri; bajo un microscopio estereoscópico se abrió el cráneo con pinzas y tijeras finas. Se levantó el cerebro, se cortó el quiasma óptico y se procedió a separar todo el cerebro. Por medio de un escalpelo se extrajo la hipófisis y se le colocó en medio de cultivo (Eagle-Dulbecco). Con ayuda de un escalpelo se colocó el trasplante en la membrana corioalantoidea en una de las bifurcaciones de los vasos. La viabilidad del trasplante se observó a diario con ayuda de un microscopio estereoscópico; se revisó la coloración de la glándula y la neoformación de capilares.¹⁴

potassium bichromate, and the potassium chromate with sodium and potassium tungsten, mixing both solutions in cold just before the reactive was used. Next, the samples were washed with distilled water and dehydrated in ethylic alcohol at 50%, 70%, 80% and 95% for 30 minutes in each change. They were transferred to alcohol and acetone in equal parts for 24 hours, and were infiltrated in increasing solutions of nitrocellulose of low viscosity from 5%, 10%, 15% and 30% (in ether-alcohol vol/vol) for 24 hours in each concentration. For the polymerization of the blocks with tissue, this was put in molds of inclusion with nitrocellulose at 30% and were maintained in a glass dryer saturated with chloroform vapors, during 12 hours. The polymerized blocks were pasted to *ad hoc* supports with nitrocellulose at 15%, for being cut with a slide microtome. The 120 μ m cuts were collected in alcohol at 70%, in plastic boxes (of 24 divisions), to preserve the orientation and sequence. Then, they were dehydrated with alcohols graded at 50% and 25%, followed by a change of distilled water, with the finality of being differentiated with a common photographic reveler every five minutes, until they acquired a greenish gray color (indicating that the chromo-argentic reaction revealed the neuronal tissue). This differentiation ended when the cuts were washed several times with distilled water, to immediately proceed to its dehydration with increasing changes of ethylic alcohol at 70%, 80% and 95% each ten minutes, and the dehydration ended with two isopropanol alcohol changes (to prevent the dissolution of nitrocellulose), they were then transferred to an isopropanol / xylene change (vol/vol). The final clarification of the tissue was done in two changes of pure xylene, during ten minutes each one. The cuts were mounted on a slide with synthetic resin conserving their strict sequence.¹⁵

Elaboration of drawings with lucid camera

The best impregnated cuts were selected, where the left or right ventricle of the *tectum opticum* was localized (Figure 1C). Drawings with lucid camera were made in a clear camp microscope*, with an objective lens of 6.3 X (Figure 1D), to the cuts situated at one fourth, half, and three fourth parts of the *tectum opticum*, for which they were progressively numerated, assigning the first digit to the cut that first identified the tectal ventricle and so on, until the last cut containing the ventricle was identified. Then, the number of cuts were divided in four, being identified as the ones localized at one fourth, half, and three fourth parts of the total volume of the *tectum opticum*, which were identified as: dorsal, medial, and ventral planes, respectively.

Se desecharon los embriones en donde se encontró necrosis de la glándula transplantada. Los embriones transplantados fueron regresados a la incubadora a los 16 días. A este grupo se le llamó hipofisectomizado transplantado (HXTX).

Obtención y procesamiento del material histológico

Los embriones de pollo se sacrificaron a los 16 días de incubación. La porción encefálica se procesó con el método de Golgi-Cox.¹⁵ Durante 25 días se fijaron bloques de tejido nervioso conteniendo al *tectum opticum*, en frascos ámbar con solución de cloruro de mercurio al 1%; bicromato de potasio al 1%; cromato de potasio al 0.8%; y tungstato de sodio y potasio al 0.5%, disolviendo previamente el cloruro de mercurio con el bicromato de potasio, y el cromato de potasio con el tungstato de sodio y potasio; ambas soluciones se mezclaron en frío antes de que se usara el reactivo. Luego se lavaron las muestras con agua destilada y se deshidrataron en alcohol etílico de 50%, 70%, 80% y 95%, por 30 minutos en cada cambio. Se transfirieron a alcohol y acetona a partes iguales por 24 horas y se infiltraron en soluciones crecientes de nitrocelulosa de baja viscosidad desde 5%, 10%, 15% y 30% (en éter-alcohol vol/vol) por 24 horas en cada concentración. Para la polimerización de los bloques con el tejido, éste se colocó en moldes de inclusión con nitrocelulosa a 30% y se mantuvieron en un desecador de vidrio saturado con vapores de cloroformo durante 12 horas. Los bloques polimerizados se pegaron en soportes *ad hoc* con nitrocelulosa al 15% y se cortaron en un microtomo de deslizamiento. Los cortes de 120 μ m se colectaron en alcohol al 70%, en cajas de plástico (en 24 divisiones), con el fin de preservar la orientación y seriación. Luego se hidrataron con alcoholes graduales de 50% y 25%, seguidos de cambio de agua destilada, con el fin de ser diferenciados con revelador fotográfico común durante cinco minutos, o hasta que adquirieron un color gris-verdoso (señal de que la reacción crono-argéntica reveló el tejido neuronal). Esta diferenciación cesó cuando se pasaron los cortes por varios lavados con agua destilada, para proceder de inmediato a su deshidratación con cambios crecientes de alcohol etílico de 70%, 80% y 95%, cada uno de diez minutos; la deshidratación terminó con dos cambios de alcohol isopropanol (para evitar que la nitrocelulosa se disolviera), se pasaron luego a un cambio de isopropanol/xileno (vol/vol). La aclaración final del tejido se efectuó en dos cambios de xileno puro, durante diez minutos cada uno. En este contexto, los cortes se montaron en laminillas portaobjetos con resina sintética de manera que conservara su estricta seriación.¹⁵

In each drawing with lucid camera of a cut (dorsal, medial or ventral) measures were taken from the *stratum griseum et fibrosum superficiale* (SGFS) to the border of the ventricle with a ruler graded in millimeters in rostral, medial, and caudal planes. This planes were also measured, subdividing the total thickness of the *tectum opticum* in the following portions: *stratum griseum et fibrosum superficiale* (SGFS); *stratum griseum centrale* (SGC); *stratum album centrale* (SAC); and *stratum griseum et fibrosum periventriculare* (SGFP).¹⁶ For each cut, five readings were obtained (total, SGFS, SGC, SAC, and SGFP) for three radial planes (rostral, medial, and caudal), in three frontal planes (dorsal, medial, and ventral), giving a total of 45 measurements per embryo, 180 readings per group, and 1800 for the whole male and female groups.

Statistic analysis

Comparative studies were made between all the experimental groups (T, HX, HXTX, TES, HXES) of the thickness of each lamina and of the total profundity of the *tectum opticum* (of males and females), with two ANOVA pathways, and specific groups were identified where there were differences ($P < 0.05$) by means of the Tukey test.

Results

Table 1 presents the expressed averages in μm , the standard errors for each stratum, and the thickness of the *tectum opticum*, related to the studied male and female embryo groups, where there are significant differences in each one of the strata related to the experimental groups.

Male group comparisons

The level of (469 μm) males indicates significant increases when compared to the T^a versus HX and HXTX of males and females; these differentiations are 10.23%,^b 36.67%,^c and 14.28%,^h respectively. The level of SGC (236 μm) and the percentage of significant increment was of 34.74%^c of the male HXES^c groups. The level of SAC (187 μm) and the percentages of significant increment were with the male groups: HXTX, HXES of 32.62%^c and 33.68%,^c respectively. In relation to the female groups, the significant increment was with the HXTX and HXES groups of 29.41%^h and 32.62%,^j respectively.

In relation to the *tectum opticum* thickness, the T^a male groups (1026 μm) was statistically higher in comparison with the HX, HXTX of 12.28%^b and 14.32%,^c respectively.

Elaboración de dibujos con cámara lúcida

Se seleccionaron los cortes mejor impregnados en los que se localizaron los ventrículos izquierdo o derecho del *tectum opticum* (Figura 1C). Se hicieron dibujos con cámara lúcida en un microscopio* de campo claro, con objetivo 6.3 X (Figura 1, D), de los cortes ubicados a la cuarta parte, mitad y tres cuartas partes del *tectum opticum*; con ese propósito se numeraron progresivamente, asignando el primer dígito al corte que identificaba por primera vez al ventrículo tectal y así de manera sucesiva, hasta identificar el último corte que contuvo al ventrículo. Luego se dividió el número de cortes entre cuatro y se identificaron los que quedaban a la cuarta parte, mitad y tres cuartas partes del volumen total del *tectum opticum*, que se identificaron como: planos dorsal, medial y ventral, respectivamente.

En cada dibujo de cámara lúcida de un corte (dorsal, medial o ventral) se hicieron mediciones a partir del *stratum griseum et fibrosum superficiale* (SGFS) hasta el borde del ventrículo con una regla graduada en milímetros en los planos rostral, medial y caudal. En esos planos se subdividió el grosor total del *tectum opticum* en las porciones SGFS; *stratum griseum centrale* (SGC); *stratum album centrale* (SAC) y *stratum griseum et fibrosum periventriculare* (SGFP).¹⁶ Por cada corte se obtuvieron cinco lecturas (total SGFS, SGC, SAC y SGFP) por tres planos radiales (rostral, medial y caudal) en tres planos frontales (dorsal, medial y ventral), dando 45 mediciones por embrión, 180 lecturas por grupo y 1 800 para todos los grupos macho y hembra.

Análisis estadístico

Se hicieron comparaciones entre todos los grupos experimentales (T, HX, HXTX, TES, HXES) del grosor de cada una de las láminas, y para la profundidad total del *tectum opticum* (de machos y hembras), con ANOVA de dos vías y se identificaron los grupos específicos donde hubo diferencias ($P < 0.05$) por medio de la prueba de Tukey.

Resultados

En el Cuadro 1 aparecen los promedios expresados en μm y los errores estándar para cada estrato y el grosor del *tectum opticum*, pertenecientes a los grupos estudiados de embriones macho y hembra, en el que se aprecian se aprecian las diferencias significativas de cada uno de los estratos en relación con los grupos experimentales.

* Carl Zeiss.

Table 1 also shows that SGC of the HXTX male group (236 μm) was 34.74%,^c significantly higher than HXES^e group. The group that showed more significant differences was that of the IES^d males in comparison with the stratum of the rest groups, except for SGFP which, in general, was not affected in any of the groups. Thus, the thickness in SGFS (535 μm) was significantly

Comparaciones de grupos de machos

El nivel del SGFS (469 μm) de machos indica aumentos significativos cuando se comparan los grupos T^a contra HX, y con HXTX de machos y hembras, estas diferencias son de 10.23%,^b 36.67%^c y 14.28%,^h respectivamente. El nivel del SGC (236 μm) respecto del

Cuadro 1					
ESTRATOS DEL <i>Tectum opticum</i>					
<i>Tectum opticum</i> STRATA					
	SGFS	SGC	SAC	SGFP	Total
Males					
T ^a	469 $\pm$ 13	236 $\pm$ 9	187 $\pm$ 13	134 $\pm$ 9	1 026 $\pm$ 26
	b c h		c e h j		
HX ^b	421 $\pm$ 12	197 $\pm$ 9	157 $\pm$ 8	125 $\pm$ 5	900 $\pm$ 20
HXTX ^c	297 $\pm$ 11	236 $\pm$ 16	126 $\pm$ 8	120 $\pm$ 9	879 $\pm$ 36
IES ^d	535 $\pm$ 11	303 $\pm$ 18	198 $\pm$ 12	141 $\pm$ 91	1 177 $\pm$ 27
	a b c f g h j	b c e g h	b c e f h j		a b c e f g h j
HXES ^e	503 $\pm$ 9	154 $\pm$ 6	124 $\pm$ 6	149 $\pm$ 10	930 $\pm$ 19
	b c f h				
Females					
T ^f	446 $\pm$ 12	277 $\pm$ 10	158 $\pm$ 6	141 $\pm$ 6	1 022 $\pm$ 18
	c	b e g h			
HX ^g	453 $\pm$ 14	197 $\pm$ 18	164 $\pm$ 10	140 $\pm$ 10	954 $\pm$ 33
	c h				
HXTX ^h	402 $\pm$ 11	173 $\pm$ 8	132 $\pm$ 7	140 $\pm$ 7	947 $\pm$ 14
	c				
IES ⁱ	505 $\pm$ 8	271 $\pm$ 15	183 $\pm$ 9	134 $\pm$ 10	1 092 $\pm$ 32
	b c f h	b e g h	c e h j		b c e g h j
HXES ^j	463 $\pm$ 11	245 $\pm$ 25	126 $\pm$ 8	118 $\pm$ 9	952 $\pm$ 22
	c h	e h			

Average $\pm$ standard error in μm of the *tectum opticum* strata in intact T male and female chicken embryos; encephalectomized HX; encephalectomized and hypophysis primordium; intact and estradiol IES; encephalectomized and estradiol HXES. Letters appearing beneath of the averages correspond to the group in which there are significant differences. ANOVA and Tukey test ($P < 0.05$)

higher in comparison with the male groups T,^a HX and HXTX with 12.36%,^a 21.30%^b and 44.48%.^c When SGFS is compared to the females, the significant differences are seen in groups T, HX, HXTX and HXES and they are of 16.6%,^f 15%,^g 24.85%^h and 13.4%.^j The SGC (303 μ m) showed significant differences of increment in relation to HX and HXES males, of 34.98%^b and 42.9%,^c respectively. When it is compared to females, the significant increment is between the groups HX and HXTX of 35%^g and 42.9%,^h respectively. For the SAC (198 μ m) the significant increments were observed between the male groups HX, HXTX and HXES with 20.7%,^b 36.36%^c and 37.37%.^c When it was compared to the female group the significant increment was observed between the groups T,^f HXTX and HXES of 20.20%,^f 33.33%,^h and 36.36%.^j The total thickness of the *tectum opticum* of group IES^d (177 μ m), was the major in all the male and female groups: T,^f HX,^{b,g} HXTX^{c,h} and HXES.^{e,j} Thus, in males, it increased in 12.82%,^f 23.5%,^b 25%,^c and 21%,^c respectively. While in females, it increased in 13%,^f 18.94%,^g 19.54%,^h and 19%.^j In the SGFS (503 μ m), the male group HXES, was higher in relation to the HX male groups (16.30%^b) and HXTX (40.95%^c), and to the female group of HXTX (20.07%^h).

Comparisons of the female groups

When the female level SGFS (446 μ m) of group T was compared, the significant increment was of 33.40%^b compared to the male group HXTX^c. The SGC stratum (277 μ m) showed significant increments when compared to males HX (28.88%^b) and with the HXES (44%^c). When it is compared to the other female groups, the increment is 33.40%^g with group HX and 37.5%^h with group HXTX. The SGFS female stratum (453 μ m) of group HX,^g also showed significant increment compared to males HXTX (34.4%^c and 11.25%^h) in relation to female HXTX. The SGFS female stratum (402 μ m) of group HXTX showed a 26.11% increment in relation to HXTX males. Group IES^d (505 μ m) was significantly higher than that of males HX^b and HXTX, with 16.63%^b and 41%.^c

When comparisons were made with the other female groups, the increment showed in T^f and HXTX,^h with a difference of 11.68%^f and 20.39%,^j respectively. The SGC stratum of female group IESⁱ (271 μ m) showed a significant higher average of 27.30%^b compared to the male groups HX^b and a 43% in relation to group HXES,^c at the same time, when it was compared to the other female groups, the increment was that of 27.30%^g in group HX and 36.16% in the female group HXTX. The stratum SAC of the female group IESⁱ (183 μ m) was greater than the male groups HXTX and HXES

porcentaje de incremento significativo fue de 34.74%^c con el grupo de machos HXES^c. El nivel del SAC (187 μ m) en relación con los porcentajes de incremento fue significativo con los grupos HXTX, HXES, de 32.62%^c y 33.68%,^c respectivamente, de machos. Respecto de los grupos de hembras el incremento fue significativo con HXTX y HXES de 29.41%^h y 32.62%,^j respectivamente.

Con relación al grosor total del *tectum opticum*, el grupo T^a machos (1 026 μ m), éste fue mayor estadísticamente, comparado con los grupos HX, HXTX, de 12.28%^b y 14.32%,^c en forma respectiva.

En el Cuadro 1 también se observa que el SGC del grupo HXTX machos (236 μ m) fue 34.74%,^c o sea significativamente mayor que el grupo HXES^c. Donde se apreciaron más diferencias significativas fue en el grupo IES,^d machos, comparado con los estratos de los demás grupos, exceptuando SGFP, que, en general, no afectó ningún grupo. Así, el grosor a nivel del SGFS (535 μ m) fue significativamente mayor comparado con los grupos de machos T,^a HX, HXTX con 12.36%;^a 21.30%^b y 44.48%.^c Cuando el SGFS se compara con las hembras, las diferencias significativas se localizan en los grupos T, HX, HXTX y HXES, éstas son de 16.6%,^f 15%,^g 24.85%^h y 13.4%.^j El SGC (303 μ m) mostró diferencias significativas de aumento en relación con machos a HX y HXES de 34.98%^b y 42.9%,^c respectivamente. Cuando se compara con las hembras, el aumento significativo se encontró entre los grupos HX y HXTX, de 35%^g y 42.9%,^h respectivamente. Para el SAC (198 μ m) los incrementos significativos se localizaron entre los grupos de machos HX, HXTX y HXES con 20.7%,^b 36.36%^c y 37.37%.^c Cuando se comparó con el grupo de las hembras, el aumento significativo se localizó entre los grupos T^f, HXTX y HXES, de 20.20%,^f 33.33%^h y 36.36%,^j respectivamente. El grosor total del *tectum opticum* del grupo IES^d (1 177 μ m) fue mayor en todos los grupos de machos y hembras: T,^f HX,^{b,g} HXTX^{c,h} y HXES.^{e,j} Así, en machos se incrementó en 12.82%,^f 23.5%,^b 25%^c y 21%,^c respectivamente. Mientras que en las hembras los respectivos aumentos significativos fueron de 13%,^f 18.94%,^g 19.54%^h y 19%.^j En el SGFS (503 μ m), el grupo de machos HXES, fue mayor respecto de los grupos HX 16.30%^b y HXTX 40.95%,^c de machos, y con el grupo de HXTX (20.07%^h), de hembras.

Comparaciones de grupos de hembras

Cuando se comparó el nivel SGFS de hembras (446 μ m) del grupo T, el incremento significativo fue de 33.40%^b comparado con el grupo HXTX machos.^c El stratum SGC (277 μ m) mostró incrementos significativos cuando se comparó con los machos HX, de 28.88%,^b y con los HXES de 44%.^c Cuando se com-

with 31%^c and 32%^c, respectively. When it was compared to the female groups, the differences were of 27.86%^h and 31%^j. The total thickness of female group IESⁱ (1 092 μ m), showed significant increment when compared to the male groups HX, HXTX and HXES (17.58%^b, 19.5%^c and 14.80%^e). When comparisons were established between the females, the increment was significant when compared to groups HX, HXTX and HXES with percentages (12.60%^g, 13.3%^h and 12.8%^j). The female group HXES^j (463 μ m) in the SGFS stratum, showed significant increment compared to the female group HXTX of 13%^h. In SGC stratum (245 μ m), the increment was significant in relation to the male group HXES of 37.14%^e and to the female group HXTX of 29.3%^h.

It is important to highlight, in Table 1, that the SGFP did not present significant statistic changes between the studied groups; and the groups with minor averages were males and females HXTX^h and females HX.^g The analysis of variance of two pathways showed that there are treatment or group differences to which data correspond and not because of the embryos' gender; nevertheless, group-gender interactions can be observed in SGFS of $P < 0.02$ and in SGC of $P < 0.001$.

Discussion

Results show a thickness increment in the *tectum opticum* stratum of control animals, either in males as in females (Table 1), treated with estradiol, which can be explained because of the physical presence of a neuronal substrate, glial or tissue, in which estradiol acts and can be located either in the tectum opticum, as well as in the areas that send their nervous afferents to this one, among others the retina.¹⁶ Such an effect has been related to rats' fetal nervous tissue, where some of these effects of estradiol in the brain can be mediated by trophic factors, such as the growth insulin factor-1 (IGF-I); both increase in fetal rat, survival and differentiation of hypothalamic neurons in development.¹⁷ In adult rat brains, the interaction of estradiol and IGF-I promote the activation and expression of adrenal receptors,^{18,19} reciprocal regulation of receptors in estradiol and IGF-I,²⁰ activation of kinase protein (P13K/Akt),²¹ Bcl-2 expression,^{20,23} neuroprotection, and axon and dendrite growth.

The gonad steroids also influence the differentiation of the hypothalamic astroglia in fetal nervous tissue of rat, and participate in the genesis of sexual differences in the synaptic connectivity.²⁴ It is also found, for instance, in dopamine neurons of the embryo medial brain, where they stimulate neurites growth, induce the expression of RNAm of the

para con los otros grupos de hembras, el aumento es de 33.40%^g con el grupo HX y de 37.5%^h del grupo HXTX. El estrato SGFS (453 μ m) de las hembras del grupo HX^g también mostró aumentos significativos, comparado con los machos HXTX, de 34.4%^c y de 11.25%^h respecto de HXTX de las hembras. El estrato SGFS de hembras (402 μ m), del grupo HXTX, mostró aumento de 26.11% con respecto a HXTX de machos. El grupo IES^d (505 μ m) fue mayor que el de los machos HX^b y HXTX, con 16.63%^b y 41%^c, respectivamente.

Cuando las comparaciones se efectuaron con los otros grupos de hembras, el aumento se localizó con T^f y HXTX,^h la diferencia fue de 11.68%^f y 20.39%^j, respectivamente. El estrato SGC del grupo IESⁱ de hembras (271 μ m) presentó un promedio significativamente mayor de 27.3%^b comparado con los grupos HX,^b de machos, y de 43% con relación al grupo HXES;^e al mismo tiempo, cuando se comparó con los otros grupos de hembras, el incremento fue de 27.30%^g con el grupo HX y de 36.16%^h con el grupo HXTX, de hembras. El estrato SAC del grupo de hembras IESⁱ (183 μ m) fue mayor que los grupos de machos HXTX y HXES con 31%^c y 32%^e, respectivamente. Cuando se comparó con los otros grupos de hembras, las diferencias fueron de 27.86%^h y 31%.

^j El grosor total del grupo IESⁱ de hembras (1 092 μ m), mostró aumento significativo cuando se comparó con los grupos de machos HX, HXTX y HXES (17.58%^b, 19.5%^c y 14.8%^e). Cuando las comparaciones se establecieron entre las hembras el incremento fue significativo al comparar los grupos HX, HXTX y HXES (12.6%^g, 13.3%^h y 12.8%^j). El grupo de hembras HXES^j (463 μ m) en el estrato SGFS, mostró aumento significativo comparado con el grupo de hembras HXTX de 13%^h. En el estrato SGC (245 μ m), el aumento fue significativo en relación con el grupo de machos HXES con 37.14%^e y con el de hembras HXTX del 29.3%^h.

Es importante resaltar, en el Cuadro 1, que el SGFP no presentó cambios que fueran estadísticamente significativos entre los grupos estudiados; los grupos que tuvieron menores promedios fueron los de machos y hembras HXTX^h y hembras HX.^g El análisis de varianza de dos vías señaló que existen diferencias importantes por tratamiento o por grupo a que corresponden los datos y no por el género de los embriones; sin embargo, se observan interacciones grupo-género en el SGFS con $P < 0.02$ y en el SGC con $P < 0.001$.

Discusión

Los resultados señalan un incremento de grosor en los estratos del *tectum opticum* de animales testigo,

hydroxyl tyrosine, as well as the capture and liberation of dopamine; in spite of the fact that the dopamine cells of the prenatal medial brain do not express the classical receptor of estrogens.

The β -estradiol 17 is capable of rapidly modulate physiological parameters of medial brain neurons in development by the direct interaction with specific union sites of membrane, adapted to a transduction mechanism of the signal that originates liberation of calcium by intracellular reservoirs of Ca^{++} .²⁵ Electronic and light microscopic studies have demonstrated that high levels of estradiol are associated with high density of excitable synaptic connections in hippocampal pyramid cells in adult female rats, increasing the synaptic excitability and plasticity.²⁵

On the other hand, it has been proposed that the neurotrophic factor derived from the brain (BDNF) promotes the maturation, plasticity and functional regulation of inter-neurons GABAergic, and that, at the same time, this factor is negatively regulated by the estradiol in hippocampal neurons cultivated at 40% of the control group values, decreasing inhibition to increment the excitable tone of the pyramid neurons, what gives as result an increment of twice the density of dendrite thorns of hippocampal neurons.²⁶ Electronic and light microscopic studies have demonstrated that neurons of the hippocampal region CA1 increase the synapses in rats treated with β -estradiol on doses of ten micrograms per day, in relation to those who received saline solution. The β -estradiol induces the increment of the dendrite thorns that establish contact with pre-existing pre-synaptic buttons.²⁷

The results given in this study, affirm the idea that β -estradiol induces changes to optimum doses in the cellular substrate, which is proven in group HXES, in males as in females, that did not showed significant changes; maybe the dose was not enough to reestablish the normal thickness observed in control groups, in the majority of the analyzed strata.

It is evident that partial encephalectomy presented in group HX has notorious effect on the ulterior development of the *tectum opticum*, manifested in the diminish of the layer's SGFS thickness compared to the control group; this can be attributed to the lack of trophic factors coming from the dissected portion and that are not present at the moment of the *tectum opticum* maturation. The transplanted groups with hypophysis primordium, neither had increments that could point out a compensatory effect due to the lack of forebrain, what shows that the possible action of maturation came from the implant; if that was the case, it was not specific or enough for that purpose, it also seems as if it has an antagonist effect towards tectal develop-

tanto en machos como en hembras (Cuadro 1), que fueron tratados con estradiol, lo cual puede explicarse en razón de la presencia física de un sustrato neuronal, glial o tisular sobre el cual actúa el estrógeno y que puede estar localizado tanto en el propio *tectum opticum*, como en las áreas que envían sus aferencias a éste, entre otros la retina.¹⁶ Dicho efecto ha sido notificado para el tejido nervioso fetal de rata, en donde parte de los efectos que tiene el estradiol en el cerebro puede ser mediado por factores tróficos, como el factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I); ambos incrementan en feto de rata, la supervivencia y diferenciación de neuronas hipotalámicas en desarrollo.¹⁷ En cerebro de ratas adultas la interacción del estradiol y el IGF-I promueven la activación y expresión de receptores adrenérgicos;^{18,19} regulación recíproca de receptores a estradiol e IGF-I;^{19,20} activación de la proteína cinasa (PI3K/Akt);^{4,20,21} expresión de Bcl-2;^{22,23} neuroprotección^{5,19} y crecimiento axonal y dendrítico.

Los esteroides gonadales también influyen la diferenciación de la astrogía hipotalámica en cultivos de tejido nervioso fetal de rata y participan en la génesis de diferencias sexuales en la conectividad sináptica.²⁴ Se encuentran también, por ejemplo, en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio embrionario, donde estimulan el crecimiento de neuritas, inducen la expresión del mRNA de la tirosina hidroxilasa, así como la captura y liberación de dopamina; no obstante el hecho de que las células dopaminérgicas del cerebro medio prenatal no expresan el receptor clásico de estrógenos.

El 17 β -estradiol es capaz de modular rápidamente parámetros fisiológicos de neuronas del cerebro medio en desarrollo por la interacción directa con sitios de unión específica de membrana acoplados a un mecanismo de transducción de la señal que origina liberación de calcio de los reservorios intracelulares de Ca^{++} .²⁵ Estudios de microscopía electrónica y de luz han demostrado que los niveles altos de estradiol están asociados con alta densidad de conexiones sinápticas excitatorias en células piramidales hipocampales en hembras de rata adulta, incrementando la excitabilidad y plasticidad sináptica.²⁵

Por otro lado, se ha propuesto que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) promueve la maduración, plasticidad y regulación funcional de interneuronas GABAérgicas, y que este factor, a su vez, está regulado negativamente por el estradiol en neuronas hipocampales cultivadas a 40% de los valores del grupo testigo, disminuyendo la inhibición para incrementar el tono excitatorio de las neuronas piramidales, lo que da por resultado un incremento de dos veces la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales.²⁶

ment. In relation to the formation of receptors to estrogens or progesterone, there is only one literature report on P10 days' embryos, where, *in vitro*, effects of estradiol and testosterone studies were made on hypophysis cells. It was concluded that testosterone is locally aromatized and acts through receptors on estradiol.²⁸

A recent study of Yasuda and Fugita²⁹ notifies a differential distribution of proteins associated with the microtubules (MAP1A, MAP1B and MAP2/B) and their expression patrons occurred during the first days of incubation. Thus, the neuroblasts differentiate in multipolar neurons after day P19 in SAC and in SO, but the intensity of the MAP1B decreases with development, for which the *tectum opticum* development divides in four periods and, in the last one, it could probably correlate with the presence of the receptors to estradiol.

An interesting finding, from the present study, is the interaction of estradiol in relation with the gender of the chicken embryos, since we observed that SGFS, SGC and SAC stratum presented statistical significant increments in males when compared to females. There are evidences that estrogens are more actively formed in the male neurons than those in females, during prenatal and postnatal periods, in cortical and hypothalamic cells of mice.³⁰ In relation to the hypophysis implant result, this had no response related to the restitution of normal trophic conditions. So, it concludes that the administrated estradiol to chicken embryos has a trophic effect and that this is more evident when the neurological structure presents in an intact way; besides, in some analyzed strata the response was greater in males than in females.

Acknowledgements

The authors acknowledge the technical support of the captured images to Nidia Hernandez.

Referencias

1. Jung-Testas I, Baulieu EE. Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 65: 243-251.
2. McEwen BS, Alves SE, Bulloch K, Weiland NG. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 1997; 48:S8-15.
3. Alonso-Solis R, Abreu P, Lopez-Coviella I. Gonadal steroid of neuroendocrine transduction: a transynaptic view. *Cell Mol Neurobiol* 1996; 6: 357-382.
4. Bi R, Broutman G, Foy MR, Thomson RF, Braudy M. The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase

En estudios de microscopía electrónica y de luz se demostró que las neuronas de la región hipocam-pal CA1 aumentan la sinapsis en ratas tratadas con β -estradiol a dosis de diez microgramos por día, en relación con aquellos que recibieron solución salina. El β -estradiol induce el aumento de las espinas dendríticas que establecen contacto con botones presinápticos preexistentes.²⁷

En los resultados que se ofrecen aquí se reafirma la idea de que el β -estradiol induce cambios a dosis óptimas en el sustrato celular, lo que se comprueba en el grupo HXES, tanto en machos como en hembras, que no mostraron cambios significativos, quizás la dosis no fue la suficiente para restituir el grosor normal observado en los grupos testigo en la mayoría de los estratos analizados.

Es evidente que la encefalectomía parcial que se presentó en el grupo HX tiene efecto notorio en el desarrollo ulterior del *tectum opticum*, manifestándose en la disminución del grosor de la capa SGFS comparada con el grupo testigo; esto último se puede atribuir a la carencia de factores tróficos provenientes de la porción reseca y que no están presentes en el momento de la maduración del *tectum opticum*. Los grupos transplantados con el primordio hipofisiario tampoco tuvieron incrementos que pudieran señalar un efecto compensador por la falta del cerebro anterior, lo que señala, además, que la posible acción de maduración proveniente del implante, si ése fuera el caso, no es específico ni suficiente para tal fin, incluso pareciera que tiene efecto antagónico al desarrollo tectal. Acerca de la formación de receptores a estrógenos o a progesterona, existe sólo un informe en la literatura sobre embriones de P10 días, en donde, *in vitro*, se estudiaron los efectos del estradiol y testosterona en células de la hipófisis. Se concluyó que la testosterona es aromatizada localmente y que actúa a través de los receptores a estradiol.²⁸

Un estudio reciente de Yasuda y Fugita²⁹ notifica una distribución diferencial de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP1A, MAP1 B y MAP2/B) y cuyos patrones de expresión ocurren durante los primeros días de incubación. Así los neuroblastos se diferencian en neuronas multipolares después del día P19 en el SAC y en el SO, pero la intensidad de las MAP1B decrece con el desarrollo, por lo que el desarrollo del *tectum opticum* se divide en cuatro periodos y en el último pudiera correlacionarse con la presencia de los receptores a estradiol.

Un hallazgo interesante que se desprende del presente trabajo es la interacción del estradiol en relación con el género de los embriones de pollo, ya que observamos que los estratos SGFS, SGC y SAC presentaron incrementos estadísticamente significativos en los machos cuando se compararon con las hembras.

pathways mediate multiple effects of estrogen hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:3602-3607.

5. Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaile A, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* 2000; 60:321-327.
6. Singh M, Sétáló G, Guan S, Warren M, Toran-Allerand CD. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J. Neurosci* 1999; 844:153-165.
7. Miller DB, Ali SP, O'Callaghan JP, Laws SC. The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci* 1998; 844: 153-165.
8. Sudo S, Wen TC, Desaki J, Matsuda S, Tanaka J, Arai T, *et al.* M. β -estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. *Neurosci Res* 1997; 29: 345-354.
9. Toran-Allerand CD, Ellis L, Pffeninger KH. Estrogen and insulin synergism in neurite growth enhancement *in vitro*: mediation of steroids effects by interactions with growth factors? *Brain Res* 1988; 469:87-100.
10. Yamagata M, Herman JP, Sanes JR. Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci* 1995; 15: 4556-4571.
11. Gasc, J. M. Autoradiographic studies of steroid receptor sites in embryonic tissues. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 181-189.
12. Shin DH, Lee E, Cho SS. Glial cells in the chicken optic tectum. *Brain Res* 2003; 962:221-225.
13. Fugo NW, Butcher RL. Effects of prolonged estrous cycles on reproduction in aged rats. *Fertil Steril* 1971; 22:98-101.
14. Glaser Am, Van der Loos H. Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain *J Neurosci Methods* 1981; 4:117-125.
15. Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O, Morgane PJ. Nucleus raphe dorsalis: A morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res* 1981; 207:1-16.
16. Scicolone G, Pereyra-Alonso S, Brusco A, Saavedra JP, Flores V. Development of the laminated pattern of the chick tectum opticum. *Int J Dev Neurosci* 1995; 8:845-858.
17. Garcia-Segura LM, Dueñas M, Busiguina S, Naftolin F, Chowen JA. Gonadal hormone regulation of neuronal-glial interactions in the developing neuroendocrine hypothalamus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 293- 298.
18. Quesada A, Etgen AM. Insuline-like growth factor-I regulation of α (I)-adrenergic receptor signaling is estradiol dependent in the preoptic area and hypothalamus of female rats. *Endocrinology* 2001; 142:599-607.
19. Cardona-Gomez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Rev* 2001; 37:320-334.

Se tienen evidencias de que los estrógenos se forman más activamente en las neuronas de los machos, que en las de las hembras, durante los periodos prenatal y postnatal, en células corticales e hipotalámicas de ratón.³⁰ En cuanto al resultado del implante hipofisiario, éste no tuvo ninguna respuesta que se relacionara con la restitución de las condiciones tróficas normales. Así, se concluye que el estradiol suministrado a embriones de pollo tiene un efecto trófico y que éste es más evidente cuando la estructura neurológica se presenta de manera intacta, además de que en algunos estratos analizados la respuesta fue mayor en machos que en hembras.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico de la captura de imágenes a Nidia Hernández.

-
20. Cardona-Gomez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Interactions of estrogens and insuline-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 83:211-217.
 21. Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signaling. *J Neurosci Res* 1999; 58:815-822.
 22. Dueñas M, Torres-Aleman I, Naftolin F, Garcia-Segura LM. Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neuroscience* 1996; 74:531-539.
 23. Garcia-Segura LM, Dueñas M, Fernandez-Galaz MC, Chowen JA, Argente J, Naftolin F, *et al.* Interaction of the signalling pathways of insulin-like growth factor-I and sex steroids in the neuroendocrine hypothalamus. *Horm Res* 1996; 46: 160-164.
 24. Wooley CS. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav* 1998; 34: 140-148.
 25. Beyer C, Raab H. Nongenomic effects of estrogen: embryonic mouse midbrain neurons respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 255-262.
 26. Murphy DD, Cole NB, Segal M. Brain derived neurotrophic factor mediates estradiol induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11412-11427.
 27. Yankova M, Hart SA, Wolley S. Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: A

- serial electron-microscopic study. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:3525-3550.
28. Guennoum R, Gase JM. Evidence of a functional aromatase system in the pituitary gland of the chick embryo *in vitro*. Endocrinol 1988; 188:229-232
29. Yasuda Y, Fugita S. Distribution of MAP1A, MAP1B and MAP2A&B during layer formation in the optic tectum of developing chick embryos. Cell Tiss Res 2003; 314:315-324.
30. Hutchinson JB. Gender-specific steroid metabolism in neural differentiation. Cell Mol Neurobiol 1997; 17: 603-666.

