



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Memoria de tesis:

“Evaluación de los efectos neuroprotectores del estradiol bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de secreción de estrógenos ováricos en ratas viejas”

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Médico Veterinario Zootecnista
Rafael Getzemaní Díaz Jiménez

Director de tesis:
Doctor en Ciencias Biomédicas
José Miguel Cervantes Alfaro

Co-directora de tesis:
Doctora en Ciencias (Biología)
Gabriela Morali de la Brena

Morelia, Michoacán,
México
Agosto 2018.





Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"

SECRETARÍA ACADÉMICA

A S U N T O: INFORMACIÓN

Morelia, Mich., 30 de Junio de 2017.

C. DR. JOSE MIGUEL CERVANTES ALFARO
PROFESOR INVESTIGADOR DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
P R E S E N T E

Le notifico que el protocolo de investigación que Usted presentó ante esta Secretaría Académica a mi cargo, y cuyo título es ***"Evaluación de los efectos neuroprotectores del estradiol bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de secreción de estrógenos ováricos en ratas viejas"*** y que fue sometido a la evaluación del Comité de Investigación y Ética en Investigación de esta Dependencia Universitaria, quien (es) de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación vigentes, por lo que el protocolo fue **AUTORIZADO**, habiéndose asignado el número de registro de la dependencia siguiente:

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN	ÁREA	Nº DE REGISTRO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"	POSGRADO	006/P/5/2017

Se le solicita informar del grado de avance del mismo acorde al cronograma de actividades así como el título de la revista, volumen, año y páginas una vez que el mismo sea publicado. En caso de que el mismo contemple la graduación de un alumno indicar fecha y grado académico obtenido.

Atentamente:


DR. MARIO MIGUEL ÁNGEL HERRERA CHAYRES
SECRETARIO ACADÉMICO

c.c.p. Coordinador de la Investigación Científica. UMSNH
c.c.p. Archivo y Correspondencia de la Facultad.
c.c.p. Archivo de la Secretaría Académica.
c.c.p. Coordinación de Investigación Fac Cs Med y Biol. "Dr. Ignacio Chávez"
DR. MMAHC/CAA.*

La Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT

El estudiante de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de Estudios de Posgrado
Laboratorio de Neurociencias
Recibió beca del CONACyT
durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud

El presente trabajo fue financiado por: Programa de Investigación 2017. Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Aprobó la tesis que presentó:

Médico Veterinario Zootecnista Rafael Getzemaní Díaz Jiménez

Maestro en Ciencias de la Salud

Manuel López Rodríguez

Doctora en Ciencias Fisiológicas

Bertha Fenton Navarro

Doctora en Ciencias Biomédicas

Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo

Dirección de tesis:

Doctor en Ciencias Biomédicas
José Miguel Cervantes Alfaro

Co-directora de tesis:
Doctora en Ciencias (Biología)
Gabriela Morali de la Brena

Colaboradores:

Doctora en Ciencias del Comportamiento
María Esther Olvera Cortes
Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), IMSS

Doctora en Ciencias Biomédicas
Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La presente investigación se realizó en:

Laboratorio de Neurociencias
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Laboratorio de Neurofisiología Experimental
Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI)
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al laboratorio de Neurociencias de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” por ser un sitio excepcional y lleno de camaradería, ya que me permitió conocer el mundo de la investigación.

A mis directores de tesis, el D en C José Miguel Cervantes Alfaro y D en C Gabriela Morali de la Brena, ya que con su guía y ejemplo no solo me han permitido estructurar un pensamiento científico, sino una nueva y mejor visión de mi vida.

A la D en C Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo por sus amenas pláticas y ser un apoyo en cualquier circunstancia.

A mi comité tutorial por haberme guiado y siempre estar ahí para mí.

Al Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), IMSS, a la D en C. María Esther Olvera Cortes por las facilidades otorgadas para el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de generación y de laboratorio por haber compartido esta aventura, especialmente a Elena, Lucía y Ulises, ya que sin ellos no hubiese sido posible concluir este trabajo.

A mi padre, tu visión de la vida, el espíritu en todas tus acciones y obras, fue el mayor ejemplo que me brindaste. Te quiero, nos veremos después.

A mi madre, mis hermanos y sobrinos por nunca dejar que me rindiera, no solo en este proyecto, sino en toda mi vida. Los amo.



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”



“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES DEL ESTRADIOL
BAJO CONDICIONES DE HIPOPERFUSIÓN CEREBRAL CRÓNICA Y AUSENCIA DE
SECRECIÓN DE ESTRÓGENOS OVÁRICOS EN RATAS VIEJAS”

RESUMEN:

Introducción. La demencia, una condición que consiste en el deterioro progresivo de las funciones cognitivas y que ha sido considerada como un problema prioritario de salud, puede ser causada por diversas patologías. Entre éstas se cuenta la reducción del flujo sanguíneo cerebral atribuible a hipoperfusión cerebral crónica (HCC) y la disminución y/o la ausencia de actividad estrogénica dependiente de los estrógenos ováricos durante el proceso de envejecimiento. **Objetivo.** En el presente proyecto se estudiaron los efectos neuroprotectores del estradiol en un modelo de hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos, en ratas viejas. **Material y Métodos.** Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las normas internacionales y normas vigentes en los Estados Unidos Mexicanos. Se utilizaron 24 ratas hembras, de la cepa Sprague-Dawley, de 18 meses de edad, que fueron asignadas al azar a los siguientes grupos: Intacto (n=3); SHAM+OVX (ovariectomía, simulación del procedimiento quirúrgico de HCC, n=5); SHAM+OVX+E2 (ovariectomía, simulación del procedimiento quirúrgico de HCC, administración de Benzoato de Estradiol, 5 µg/kg sc, n=5); HCC+OVX+Veh (ovariectomía, HCC, administración de aceite vegetal 0.05 ml sc, n=6; HCC+OVX+E2 (ovariectomía, HCC, administración de Benzoato de Estradiol, 5 µg/kg sc, n=5). La ovariectomía se realizó 2 semanas antes de HCC y los tratamientos se administraron cada 48 horas durante 30 días, iniciando inmediatamente después de haber completado los procedimientos anestésico-quirúrgicos de la HCC o SHAM. Al término del tratamiento se evaluaron el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y posteriormente se obtuvieron los cerebros para su procesamiento histológico (tinción con Violeta de Cresilo) y evaluación de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo. **Resultados.** La HCC provocó una reducción significativa de la población de neuronas piramidales en el segmento CA1 del hipocampo (grupo HCC+OVX+Veh, 75% de neuronas remanentes en comparación con el grupo Sham+OVX) y el tratamiento con estradiol impidió dicha reducción (grupo HCC+OVX+E2, 86.3% de neuronas remanentes). Los valores de los parámetros de aprendizaje y memoria espacial (latencias de escape, longitud de las trayectorias de nado) mostraron un patrón de reducción progresiva en el transcurso de los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris, en los grupos experimentales Intacto, Sham+OVX y HCC+OVX+E2; mientras que en el grupo HCC+OVX+Veh no se observó el patrón de reducción progresiva de esos valores. Sin embargo, durante la prueba de transferencia (día 8), el tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo y el número de cruces por el sitio preciso donde se encontraba la plataforma no mostraron diferencias consistentes entre los grupos. **Conclusión.** Estos resultados sustentan el efecto neuroprotector del estradiol sobre las estructuras cerebrales que son parte del sustrato neural de las funciones cognitivas, afectadas por la ausencia de estrógenos y la hipoperfusión cerebral crónica, en ratas viejas.

Palabras clave: Estradiol, Hipoperfusión Cerebral Crónica, ratas viejas.



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"



"EVALUATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF ESTRADIOL UNDER CHRONIC CEREBRAL HYPOPERFUSION AND ABSENCE OF ESTROGEN OVARIAN SECRETION, IN AGING RATS"

Abstract:

Introduction. Dementia in women has been considered as a relevant health problem. It is characterized by a progressive loss of cognitive functions, which can be a result of several pathophysiological conditions; among them, reduction of cerebral blood flow, as occurred under chronic cerebral hypoperfusion, as well as a decrease of ovarian estradiol synthesis and blood levels, leading to scanty estrogenic actions on brain structures, along aging. **Objective.** The present study was aimed to evaluate the neuroprotective effect of estradiol (E2) in an experimental model of CCH (permanent occlusion of both common carotid arteries, one-week apart), under absence of estrogenic actions dependent on ovarian E2 secretion, in aging rats. **Material and Methods.** Twenty-four Sprague-Dawley, 18 months old female rats were randomly allotted to the following groups: Intact (n=3); Sham+OVX (ovariectomy, surgical procedures for CCH, without interrupting cerebral blood flow, n=5); Sham+OVX+E2 (ovariectomy, surgical procedures for CCH, without interrupting cerebral blood flow, estradiol benzoate 5 µg/kg/48 h, sc, 30 days, n=5); (CCH+OVX+Veh (ovariectomy, CCH, sesame oil 0.05 ml/48 h, sc, 30 days, n=6); CCH+OVX+E2 (ovariectomy, CCH, estradiol benzoate 5 µg/kg/48 h, sc, 30 days, n=5); E2 or sesame oil treatments started immediately after the ending of CCH surgical procedures. After 30 days of vehicle or E2 treatment, spatial learning and memory were evaluated in the Morris water maze, and brains were processed (Cresyl violet staining) to evaluate hippocampal CA1 pyramidal neuron population. **Results.** Estradiol treatment prevented the significant reduction of hippocampal neuron population (75% remaining neurons, as compared to Sham+OVX group, 100%) otherwise resulting from chronic cerebral hypoperfusion. Values of parameters of spatial learning and memory (escape latencies, swimming path lengths) showed a progressive reduction pattern along the 7 days testing period in the Intact, Sham+OVX, and CCH+OVX+E2 experimental groups; while the progressive reduction of these values was not observed in the CCH+OVX+Veh group. However, during the probe trial (day 8) swimming through the target quadrant, as well as number of crossings over the precise former escape platform location, did not show consistent differences between the experimental groups. **Conclusion.** These results support the neuroprotective effects of estradiol on the brain structures being a part of the neural substrate for cognitive functions, affected by estrogenic deprivation and chronic cerebral hypo perfusion, in aging rats.

Key words: Estradiol, Chronic Cerebral Hypoperfusion, Aging rats.

ABREVIATURAS

° C: Grados Celsius

µg/kg: Microgramos por kilogramo

µm: Micrómetro

ATP: Adenosin trifosfato

Ca²⁺: Calcio

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico

cm: Centímetro

cm/seg: Centímetros sobre segundo

CO₂: Dióxido de carbono

COX-2: Ciclo-oxigenasa-2

DNA: Acido desoxirribonucleico

E2: 17β-estradiol

EE: Error estándar

ER-α: Receptor a estrógenos α

ER-β: Receptor a estrógenos β

GPR30: Receptor transmembranal
acoplado a proteínas G

HCC: Hipoperfusión cerebral crónica

hr: Hora

IL-6: Interleucina 6

IM: Intramuscular

iNOS: Sintasa inducible de óxido nítrico

Kg: Kilogramo

min: Minuto

mm: Milímetro

mg/kg: miligramos por kilogramo

ml: Mililitro

Na⁺: Sodio

NADPH: Nicotinamida adenina
dinucleótido fosfato

OVX: Ovariectomía

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SC: Subcutánea

seg: Segundo

StAR: Proteína reguladora
esteroidogénica aguda

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

Veh: Vehículo

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Latencias de escape (mediana y rango) de los grupos diferentes grupos experimentales.....26

Figura 2. Trayectorias de nado representativas de los diferentes grupos experimentales.....27

Figura 3. Tiempo (seg) de recorrido (media \pm EE) en diferentes cuadrantes del laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia, en los grupos experimentales.....29

Figura 4. Fotomicrografías de cortes histológicos representativos de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales.....31

Figura 5. Número de neuronas piramidales remanentes (media \pm EE) en una extensión lineal de 400 μ m en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon en los diferentes grupos experimentales.....32

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Longitud (cm) de las trayectorias de nado (media \pm EE) de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris.....25

Tabla 2. Velocidad (cm/seg) de nado (media \pm EE) de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris.....28

Tabla 3. Número de cruces (mediana y rango) por el sitio donde se encontraba la plataforma de los diferentes grupos experimentales.....30

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
7. RESULTADOS	24
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIÓN	40
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUCCIÓN

La demencia, una condición que consiste en el deterioro progresivo de las funciones cognitivas, puede ser causada por diversas patologías, muchas veces concurrentes con el proceso de envejecimiento, pero, no forma parte natural de este proceso, considerándola como uno de los principales problemas de salud en la actualidad (Organización Mundial de la Salud, 2012; Iadecola, 2013).

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que alrededor de 50 millones de personas en el mundo viven con diferentes grados de demencia, cifra que se prevé se triplique para el año 2050; de hecho, datos recientes muestran que cada año, se diagnostican alrededor de 7,7 millones de casos nuevos de demencia (Organización Mundial de la Salud, 2017). En estas condiciones, las repercusiones de la demencia en cuanto a la atención médica y la calidad de vida de los individuos afectados; así como en el ámbito, familiar, social y económico han adquirido una gran importancia. Así, en Estados Unidos de América los costos directos e indirectos originados por la demencia han sobrepasado en diversos aspectos a los generados por la atención médica de las enfermedades cardiovasculares y oncológicas (Hurd et al, 2013).

En México, cerca de 860,000 personas presentan algún tipo de demencia, debió a la transición demográfica se prevé que la incidencia seguirá en aumento en los siguientes años (Mejía-Arango & Gutiérrez-Robledo, 2011). Un estudio de base poblacional indicó que la prevalencia de demencia en ancianos de bajo y mediano ingreso económico fue estimada en 7.4% para las áreas urbana y rural (Llibre Rodríguez et al, 2008). Por su parte, la Encuesta Nacional Sobre Salud y Envejecimiento en México (ENASEM) mostró que la incidencia de demencia es de 27.3 casos por cada 1,000 personas al año en adultos mayores de 60 años (ENASEM, 2012); en otro estudio la incidencia fue de 16.9 por cada 1,000 personas al año en zonas urbanas y de 34.2 por cada 1,000 habitantes en las zonas rurales, con una tendencia mayor en las mujeres que en los hombres, la cual se incrementa de manera exponencial con el envejecimiento (Prince et al, 2012).

Por otra parte, el deterioro de las funciones cognitivas atribuible a diversas patologías cerebrovasculares, corresponde al 20% de todas las formas de demencia y a la segunda causa de demencia luego de la Enfermedad de Alzheimer (Gorelick et al, 2011; Levine &

Langa, 2011). Cabe destacar que la alteración cerebrovascular no sólo puede ser la causa principal del deterioro cognitivo, sino que también es un adyuvante para la expresión de la demencia causada por otros factores, incluyendo la Enfermedad de Alzheimer y otras patologías neurodegenerativas (Gorelick et al, 2011).

A este respecto, se ha mostrado la importancia de la relación funcional y la sinergia fisiopatológica entre las neuronas, células gliales y células vasculares como parte de los procesos de daño cerebral en los que las alteraciones del flujo sanguíneo podrían contribuir al daño subyacente al deterioro cognitivo. De hecho las alteraciones de los componentes celulares de la pared vascular en condiciones de hipertensión arterial y en mayor grado la formación de placas aterogénicas en los vasos involucrados en el flujo sanguíneo cerebral, se han considerado como factores de riesgo para el desarrollo de hipoperfusión cerebral crónica (HCC) con la consecuente disfunción cerebrovascular y la generación de condiciones de daño isquémico-hipóxico en estructuras cerebrales muy vulnerables, como el hipocampo y la corteza prefrontal, cuya alteración morfológica y/o funcional daría lugar al deterioro de las funciones cognoscitivas (Iadecola, 2010; Levine & Langa, 2011; Zlokovic, 2011).

En particular, los circuitos neuronales del hipocampo dorsal, incluyendo el cuerno de Amón y el giro dentado son estructuras cerebrales de cuya integridad morfológica y funcional depende la codificación de la información durante el aprendizaje, para la formación de la memoria espacial, la memoria episódica y la memoria declarativa. Asimismo, con base en los resultados de estudios principalmente en animales de experimentación, se conoce que las acciones de los estrógenos tanto en concentraciones fisiológicas como supra-fisiológicas afectan las funciones cognoscitivas en los mamíferos, incluyendo a los seres humanos mediante la modulación de la estructura y funcionamiento del sustrato neural del hipocampo que participa en las funciones cognoscitivas, incluyendo: la morfología y la excitabilidad neuronal, la formación de sinapsis, la conectividad, así como la generación y el flujo de señales eléctricas y químicas a través de sus circuitos neuronales (McEwen et al, 1995; González-Burgos et al, 2005; Liu et al, 2008; Spencer et al, 2008; González-Burgos, 2009; Méndez et al, 2011; Diz-Chávez et al, 2012; Morali & Cervantes, 2014).

En este sentido, se ha mostrado en mujeres que diversas capacidades cognitivas, como la memoria verbal, fluctúan a través el ciclo menstrual y se correlacionan de forma positiva con las concentraciones plasmáticas de estrógenos (Rosenberg & Park, 2002; Sherwin, 2003). Sin embargo, los efectos de la terapia de remplazo con estrógenos (estrógenos conjugados) sobre el deterioro de funciones cognitivas en mujeres postmenopáusicas ha dado lugar a resultados variables (Rapp et al, 2003; Schneider et al, 2004; Craig et al, 2005), aparentemente relacionados con las diferencias en el tiempo transcurrido con carencia de actividad de estrógenos ováricos al momento del inicio de la terapia de remplazo (Maki, 2006; Sherwin, 2006).

Considerando la edad en que ocurre en las mujeres la declinación de la actividad secretora de estrógenos por parte del ovario, cabría la posibilidad de que la disminución y/o la ausencia de actividad estrogénica dependiente de los estrógenos ováricos y la reducción del flujo sanguíneo cerebral atribuible a hipoperfusión cerebral crónica puedan ser factores concurrentes para el deterioro de las funciones cognitivas dependientes del hipocampo, en el curso del proceso de envejecimiento (Sherwin, 2003). Asimismo, que las acciones tróficas de los estrógenos o de otros compuestos con actividad estrogénica puedan dar lugar a efectos neuroprotectores, luego de su administración como terapia de remplazo (Spencer et al, 2008; Etgen et al, 2012; Morali & Cervantes 2014).

La rata ha sido considerada como un modelo ideal para estudiar patologías asociadas al envejecimiento (Venkat et al, 2015; Du et al, 2017), pero, existen diferencias entre animales jóvenes y animales viejos, entre las que destacan las concentraciones y acciones de los compuestos estrogénicos sobre el sustrato neural; así, conforme las ratas envejecen, se reducen las concentraciones plasmáticas, así como la concentración de 17β -estradiol en el hipocampo, en comparación con las observadas en los animales jóvenes. Se ha sugerido que estos fenómenos están relacionados con la disminución en la síntesis de estrógenos ováricos y con la reducción de la síntesis y actividad de la aromatasa (Citocromo P450) y la proteína reguladora esteroideogénica aguda (StAR) en el sistema nervioso central. Asimismo, como parte del proceso de envejecimiento, se ha descrito una disminución en la densidad de los receptores de estradiol que potencialmente puede limitar los efectos de este esteroide en sistema nervioso central, incluyendo su participación en funciones cognitivas, tales como el aprendizaje y la

memoria espacial (Foster, 2012; Foster et al, 2012; Chamniansawat & Sawatdiyaphanon, 2018).

2. ANTECEDENTES

2.1 Fenómenos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por la isquemia.

Aunque el cerebro humano constituye sólo el 2% de la masa corporal total, el suministro de oxígeno y glucosa que se requiere para satisfacer sus demandas metabólicas corresponde aproximadamente a la cantidad de dichos compuestos contenida en al menos el 20% del total del flujo sanguíneo para todo el organismo (Brust, 2013). En estas condiciones, la circulación cerebral está regulada de manera muy precisa para adaptarse a los requerimientos de consumo de oxígeno y glucosa en distintas condiciones del funcionamiento cerebral. La presión arterial media, la producción de dióxido de carbono (CO_2), el pH tisular y otros mediadores químicos están involucrados en la regulación del flujo sanguíneo cerebral global y del flujo sanguíneo en estructuras cerebrales específicas (Moralí & Cervantes, 2014).

La interrupción o la reducción del aporte sanguíneo al cerebro pueden dar lugar a la falla del soporte metabólico que provee de energía a las células nerviosas, lo cual a su vez puede provocar un conjunto de alteraciones, que ocurren de manera simultánea o secuencial en los mecanismos celulares esenciales para el funcionamiento neuronal. Tal es el caso de la disminución en la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) y las diversas alteraciones posteriores en los gradientes iónicos transmembranales, como la despolarización anóxica e incremento anormal de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y de Na^+ , y disminución del pH. Asimismo, el ingreso excesivo, no regulado, de Ca^{2+} al interior de las células a través de los canales iónicos operados por voltaje y por la activación anormal de receptores glutamatérgicos, debida a la liberación excesiva de glutamato (Excitotoxicidad), puede subsecuentemente activar procesos celulares que promueven alteraciones mitocondriales, en el transporte membranal y en la síntesis de proteínas; así como activación directa de lipasas, proteasas y endonucleasas dependientes de Ca^{2+} . Como consecuencia, puede haber sobreproducción de radicales libres, lipoperoxidación de las membranas celulares, daño a macromoléculas y al citoesqueleto, así como activación de citocinas proinflamatorias. Adicionalmente la activación de cascadas de señalización proapoptóticas mantiene condiciones que pueden dar lugar a daño estructural, funcional y muerte neuronal, principalmente en estructuras vulnerables como las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon de

hipocampo y de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral (Pulsinelli, 1985; Pulsinelli et al, 1997; Lipton, 1999; Suwagara et al, 2004).

En particular, a partir de la falla energética inicial, la liberación subsecuente, anormal y excitotóxica de glutamato, así como la alteración de la estructura y de la función mitocondrial pueden quedar involucradas de manera transitoria o permanente en procesos celulares de daño neuronal. Así, la incorporación a la mitocondria de cantidades anormalmente elevadas de Ca^{2+} intracelular da lugar a la sobreproducción de radicales libres, a la apertura de los poros de transición mitocondriales, a la liberación de citocromo c, a la falla secundaria de la función mitocondrial y a la iniciación de la cascada de señalización proapoptótica. La cascada proapoptótica involucra vías de señalización dependientes del factor nuclear κB y P53, cambios en la relación bax/bcl-2, liberación de citocromo c con activación de caspasas y finalmente activación de enzimas que rompen la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) y de las enzimas que pueden repararlo, dando lugar a la degradación del DNA y a la muerte neuronal. Adicionalmente, la sobreproducción de radicales libres por parte de la mitocondria puede exceder la capacidad de la reserva antioxidante de las neuronas y sumarse como un factor de riesgo para la integridad estructural y funcional de las células nerviosas (Chan, 2001; Iadecola & Alexander, 2001; Leker & Shoami, 2002; Warner et al, 2004; Chinopoulos & Adam, 2006).

Los radicales libres incluyendo superóxido, hidroxilo y peroxil nitrito también son mediadores importantes de daño inflamatorio al tejido cerebral, de la activación y secreción de citocinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 e interleucina-6 (IL-6); así como la expresión y activación de la sintasa inducible óxido nítrico (iNOS) y la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2). Estas alteraciones favorecen la presencia de reacciones inflamatorias, especialmente si el deterioro del balance oxidativo, inducido por la isquemia, coincide con la restitución total (reperfusión) o parcial (hipoperfusión) del flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno al tejido cerebral. Sin embargo, la isquemia/reperfusión cerebral también puede dar lugar a mecanismos de reparación neuronal y recuperación funcional mediante procesos de plasticidad que involucran a las neuronas remanentes tanto en las estructuras mayormente afectadas por la isquemia como en aquellas que no fueron involucradas en el daño isquémico (Barone & Feuerstein, 1999; Jourdain et al, 2002; Leker & Shoami, 2002; Crepel et al, 2003; Bendel et al, 2005; Hurtado et al, 2006; Ruan et al, 2006).

Los diferentes fenómenos celulares inducidos por la isquemia/reperfusión cerebral que dan lugar ya sea a muerte neuronal y daño cerebral o a reparación neuronal, plasticidad y recuperación funcional, pueden ocurrir en forma secuencial o de manera simultánea a partir del episodio de isquemia. Sus latencias y curso temporal, que pueden ir desde minutos hasta semanas, son referencias importantes para establecer su relevancia en los periodos críticos para el daño y muerte neuronal; lo mismo que para establecer las “ventanas de oportunidad” para procedimientos neuroprotectores específicos (Pulsinelli et al, 1997; Lipton et al, 1999).

2.2 Hipoperfusión cerebral crónica. Abordaje experimental.

Estos fenómenos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por la isquemia, ocurren con gran intensidad y en corto tiempo (minutos a horas) en los casos de isquemia cerebral aguda global o focal; sin embargo, dichos fenómenos fisiopatológico también pueden ocurrir de otra manera ante la reducción parcial del flujo sanguíneo, con un curso temporal a largo plazo (semanas a meses), que altere progresivamente los procesos celulares de las neuronas y finalmente el efecto acumulativo de dichas alteraciones provoque la muerte de las neuronas más vulnerables a la isquemia y el deterioro de las funciones que dependen de la integridad morfo-funcional de las estructuras cerebrales. Tal es el caso de la Hipoperfusión Cerebral Crónica, una alteración provocada por una reducción progresiva, a largo plazo, del flujo sanguíneo y por consiguiente del aporte de oxígeno y glucosa al cerebro. Se ha sugerido que esta condición puede ser una causa importante de la demencia en pacientes con enfermedades cerebro vasculares en las que la oclusión progresiva de los vasos sanguíneos que proveen de irrigación al cerebro, da lugar a diversas alteraciones y finalmente al deterioro y la pérdida de las funciones y capacidades cognoscitivas (Bakker et al, 2000; Rao et al, 2001; Iadecola, 2010).

El abordaje de las características del daño cerebral y las alteraciones de las funciones cognoscitivas atribuibles a hipoperfusión cerebral crónica, como podría ocurrir en seres humanos, ha sido realizado en gran parte mediante modelos de dicha patología en animales de experimentación (Sarti et al, 2002). De esta manera, la oclusión permanente o la sección bilateral, simultánea o secuencial, de las arterias carótidas comunes (2VO), en ratas, dejando el suministro de sangre al cerebro dependiente solamente del flujo sanguíneo cerebral a través de las arterias vertebrales y su redistribución a partir del

polígono de Willis, ha sido considerado como un modelo experimental de hipoperfusión cerebral crónica (Ginsberg & Busto, 1989; Farkas et al, 2007; Hossman, 2008; Ulrich et al, 1998; Pappas et al, 1996; Ohta et al, 1997; Cechetti et al., 2012a, 2012b).

En las condiciones de HCC inducidas por este modelo experimental se ha observado una reducción, a largo plazo, de al menos un 30% del flujo sanguíneo cerebral normal (Otori et al, 2003); así como, daño, alteración funcional y muerte neuronal en las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia, entre las que destacan las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo y de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral, directamente involucradas en la integración de funciones cognitivas. Así, se ha mostrado que la HCC provoca la muerte de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, las cuales son parte fundamental del circuito trisináptico, donde se realiza la adquisición y procesamiento de la información sensorial involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria. Asimismo, este daño neuronal se ha relacionado con el deterioro progresivo de las funciones cognitivas dependientes del hipocampo como son el aprendizaje y la memoria espacial y el aprendizaje y la memoria de trabajo espacial (Ginsberg & Busto, 1989; Pappas et al, 1996; Ohta et al, 1997; Ulrich et al, 1998; Otori et al, 2003; Farkas et al, 2007; Hossman, 2008; Cechetti et al, 2012a).

El modelo de HCC ha sido caracterizado por diversos autores, quienes han descrito la magnitud de la pérdida de las neuronas piramidales en CA1 en función del transcurso del tiempo, desde 14 días hasta 6 meses, a partir del inicio de la isquemia. En estas condiciones se observó que la pérdida neuronal en CA1 se incrementa progresivamente de tal manera que en el término de 4 meses la población neuronal de CA1 se ha reducido al menos en un 30%. Esta pérdida neuronal se acompaña de una notable activación de las células gliales (Ginsberg & Busto, 1989; Pappas et al, 1996; Ohta et al, 1997; Ulrich et al, 1998; Farkas et al, 2007; Hossman, 2008; Cechetti et al, 2010, 2012a; Morali & Cervantes, 2014).

Así mismo, la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y de memoria de trabajo espacial en el laberinto de 8 brazos de Olton se deteriora progresivamente a partir del inicio de la isquemia. En efecto, la latencia de escape (tiempo que toma la localización, mediante señales espaciales, de una plataforma

sumergida) en el laberinto acuático de Morris fue significativamente mayor y el tiempo de permanencia en el cuadrante donde se encontraba la plataforma (una vez que la plataforma fue retirada) durante la prueba de transferencia fue significativamente menor en ratas tres meses después de HCC en comparación con animales en los que no se redujo el flujo sanguíneo cerebral. La ejecución en el laberinto de 8 brazos de Olton se altera permanentemente de manera significativa a partir de los 2 meses post isquemia (Ni et al, 1994; Pappas et al, 1996; Ohta et al, 1997; Ulrich et al, 1998; Cechetti et al, 2012a).

La lesión de dichas estructuras cerebrales en condiciones de HCC se debe fundamentalmente a fenómenos proapoptóticos, estrés oxidativo y fenómenos proinflamatorios originados por la activación glial como consecuencia de la HCC (Ozacmak et al, 2009; Cechetti et al, 2012a, 2012b).

2.3 Acciones del 17- β estradiol en las estructuras cerebrales.

La participación de los estrógenos (especialmente del 17- β estradiol, el estrógeno endógeno con mayor actividad endocrina) en diversas funciones fisiológicas, tales como la reproducción, el funcionamiento cardiovascular y el metabolismo óseo, entre otras, ha sido claramente establecida. En particular, a partir del reconocimiento de las acciones estrogénicas en estructuras cerebrales involucradas en el control neuroendócrino del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, así como en aquellas involucradas en el comportamiento reproductivo de las hembras de diferentes especies de mamíferos y en seres humanos, se ha considerado al sistema nervioso central como un “blanco” de la mayor importancia para las acciones de los estrógenos. Asimismo, se ha mostrado que las acciones estrogénicas pueden tener también lugar en estructuras involucradas en la integración de otras funciones cerebrales, entre las que destacan las funciones cognitivas, el comportamiento y las emociones, incluyendo al hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral (McEwen & Alves, 1999; Kelly et al, 2005; Brinton, 2009).

La interacción del estradiol con las estructuras cerebrales forma parte de un mecanismo neuro-endócrino en el que el estradiol sintetizado en el ovario puede acceder, vía sanguínea, a las células nerviosas, donde puede ejercer funciones de regulación principalmente mediante mecanismos genómicos. Sin embargo, también hay evidencias de que el estradiol puede alcanzar concentraciones efectivas en estructuras cerebrales

donde puede ser sintetizado localmente y modificar la estructura y/o el funcionamiento del sustrato neural involucrado en la integración de diversas funciones cerebrales (Bauleiu, 1998; McEwen & Alves, 1999; Yague et al, 2006; Woolley, 2007; Do Rego et al, 2009; Boon et al, 2010; Srivastava et al, 2011; Saldanha et al, 2011).

De esta manera, los estrógenos pueden acceder y ejercer su acciones en los circuitos neuronales de un conjunto de estructuras cerebrales que incluyen a: la médula espinal, el hipotálamo, el cerebelo, las estructuras de los sistemas nigro-estriatal y meso-límbico, la amígdala, el hipocampo, la corteza cerebral y el tallo cerebral. En estas estructuras, dichas acciones son mediadas por receptores a estrógeno α , β (ER- α , ER- β) y GPR30; los cuales pueden afectar la comunicación celular, la generación, la codificación, y el procesamiento de la información contenida en las señales eléctricas y químicas, mediante la modificación de la síntesis, liberación, biotransformación, recaptura e interacción con receptores de diversos neurotransmisores en los sistemas colinérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, glutamatérgico y neuropeptidérgicos (neuropéptido Y, péptidos opioides), determinantes de las características de la plasticidad neuronal, esencial en procesos cerebrales tales como el desarrollo cerebral, el aprendizaje, la memoria y los diversos patrones de comportamiento (Liu et al, 2010; McEwen et al, 2012; Morali & Cervantes, 2014).

Así, se han descrito procesos cerebrales cuya regulación parece ser, al menos en una parte importante, dependiente de estrógenos, en los que se ha destacado la remodelación de la conectividad sináptica, incluyendo cambios en la densidad y la forma de las espinas dendríticas, en redes o circuitos neuronales que forman parte de estructuras cerebrales involucradas en el control neuroendócrino y en los patrones conductuales asociados con la reproducción en las hembras (Frankfurt et al, 1990; Parducz et al, 2006; Csakvari et al, 2007; Naftolin et al, 2007; Griffin & Flanagan-Cato, 2011; González-Burgos et al, 2015); así como, en estructuras cerebrales de cuya actividad dependen otras funciones distintas a la reproducción, como es el caso de las funciones cognoscitivas (González-Burgos et al, 2005; Spencer et al, 2008).

De hecho, en diversas especies de mamíferos, incluso en seres humanos, se ha observado que la fluctuación cíclica en las concentraciones plasmáticas de estradiol durante el ciclo estral, se asocia con modificaciones de la eficiencia en la ejecución de

diversos procesos cognoscitivos. Asimismo, aquellos individuos cuya esteroidogénesis ovárica se ha sido reducida o suprimida, muestran deterioro del aprendizaje y memoria dependientes del funcionamiento del hipocampo y de la corteza pre-frontal, que puede ser revertido mediante la administración de estradiol (Sherwin & Tulandi, 1996; Spencer et al, 2008). Dichas alteraciones de las funciones cognoscitivas atribuibles a las consecuencias de la ovariectomía sobre las concentraciones plasmáticas de estradiol y sus acciones en sistema nervioso central, se han relacionado, en modelos experimentales, con una reducción en la densidad de espinas detriticas en las capas II y III de la corteza pre-frontal, así como en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo (Wallace et al, 2006). Estas modificaciones de las concentraciones plasmáticas y de las acciones estrogénicas en el cerebro, en individuos viejos podrían corresponder a la situación de las mujeres post-menopáusicas; situación que ha tratado de imitar en modelos experimentales en primates o roedores viejos en ausencia de secreción ovárica de estrógenos (Spencer et al, 2008).

Por otra parte, existe evidencia acerca de los efectos neuroprotectores del 17β -estradiol (E2) en contra del daño cerebral provocado por la isquemia, en los que intervienen múltiples mecanismos de acción estrogénica a nivel celular y molecular, que tienen lugar en las estructuras cerebrales más vulnerables a la reducción del flujo sanguíneo (Moralí y Cervantes, 2014). En estas estructuras cerebrales, la participación relevante del 17β -estradiol en la regulación de la expresión génica, la supervivencia neuronal, la diferenciación neuronal y glial, y la transmisión sináptica; así como, bajo ciertas condiciones, en procesos antiinflamatorios, de reparación de daño neuronal y de recuperación de funciones cerebrales mediante mecanismos de plasticidad en circuitos neuronales, ha sido considerada como parte fundamental de sus acciones y efectos neuroprotectores (Wolley, 2007; Spencer et al, 2008; Vegeto et al, 2008).

2.4 Receptores a estrógenos como mediadores de la neuroprotección del 17β -estradiol.

Los efectos neuroprotectores del estradiol dependen tanto de las concentraciones locales de la hormona, así como de la interacción de los estrógenos con sus receptores en los circuitos neuronales, los receptores de estrógenos (ER- α , ER- β y GPR30), cada uno con distintas distribuciones en el encéfalo y con la capacidad de influir en la señalización

dependiente del estradiol (Bean et al, 2014). Dichas interacciones del estradiol con sus receptores y sus consecuencias a diversos niveles de organización biológica, pueden ser evaluadas mediante parámetros adecuados desde el nivel molecular y celular hasta el nivel de mayor integración biológica en cada individuo y sus interacciones con el entorno.

Los efectos neuroprotectores del estradiol en contra de los mecanismos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por isquemia cerebral aguda, global o focal, principalmente en modelos experimentales, han sido motivo de revisiones por diversos autores, en las que se destaca la participación relevante de los diferentes tipos de receptores estrogénicos, ER- α , ER- β , GPR30, en diversas acciones estrogénicas que pueden dar lugar a neuroprotección (Liu et al, 2010; Etgen et al, 2012; Morali & Cervantes, 2014).

Los ER- α se ubican con gran densidad en el hipocampo, el hipotálamo y el área preóptica, mientras que su densidad es relativamente baja en la corteza cerebral. En contraste, los ER- β se ubican predominantemente en la corteza cerebral, aunque también son abundantes en el hipocampo, el bulbo olfatorio, el septum, el área preóptica, el núcleo de la estria terminalis, la amígdala, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el tálamo, el área tegmental ventral, la sustancia negra y el cerebelo (Dubal et al, 2001; Milner et al, 2001; Pérez et al, 2003; Kalita et al, 2005; Levin, 2005; Milner, 2005; Woolley, 2007; Hammes & Levin, 2007; Raz et al, 2008; Elzer et al, 2010). En estas estructuras cerebrales se ha descrito una interacción cooperativa de los ER- α , los ER- β y sus coactivadores para la regulación coordinada de la codificación de genes en el DNA nuclear y en el DNA mitocondrial para las proteínas involucradas en la cadena respiratoria (Chen et al, 2009). Tanto los ER- α como los ER- β se expresan también en los astrocitos, en los que la síntesis y liberación de factores de crecimiento pueden ser activados, como resultado de las acciones estrogénicas, y bajo ciertas condiciones formar parte de procesos cerebrales de neuroprotección (Carswell et al, 2004; Dhandapani et al, 2005; Dhandapani y Brann 2007; Azcoitia et al, 2010; Arevalo et al, 2010).

El grado de participación del ER- α o el ER- β como mediadores de los efectos neuroprotectores del estradiol ha sido motivo de discusión (Waters et al, 2011; Foster, 2012). No obstante, diversos resultados experimentales han sustentado el papel preponderante de ER- α como mediador de la neuroprotección del estradiol contra el daño cerebral por isquemia, aunque, la participación de ER- β como mediador de la

neuroprotección del estradiol no ha sido descartada. Esta propuesta se ha basado principalmente en estudios de neuroprotección efectuados en animales “knockout” o “knockdown” y en estudios con agonistas o antagonistas selectivos de ER- α y de ER- β (Dubal et al, 2001; Carswell et al, 2004; Miller et al, 2005; Dai et al, 2007; Zhang et al, 2009; Elzer et al, 2010). En cualquier caso, la interacción eficiente entre ambos podría propiciar la mayor neuroprotección posible con el estradiol.

Asimismo, ciertas acciones del estradiol, dependientes o independientes de procesos de transcripción en el cerebro pueden estar mediadas por el receptor GPR30, acoplado a Proteínas G, localizado en la membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplásmico de las neuronas en varias estructuras cerebrales, incluyendo el hipocampo, el hipotálamo y el cuerpo estriado, entre otras (Funakoshi et al, 2006; Matsuda et al, 2008). La interacción del E2 con el GPR30 puede dar lugar a la activación de vías de señalización de procesos celulares que cuales pueden iniciarse con un período de latencia muy breve e incluyen modificaciones de la fosforilación de proteínas y cambios en la concentración de segundos mensajeros intracelulares como Adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y calcio (Liu et al, 2010). En este sentido, cabe destacar que el agonista (G1) selectivo del GPR30, ha mostrado efectos neuroprotectores contra el daño cerebral provocado por la reducción del flujo sanguíneo cerebral en modelos experimentales de isquemia focal o global (Lebesgue et al, 2009, 2010; Zhang et al, 2010).

De esta manera los diferentes tipos de receptores estrogénicos parecen estar involucrados en procesos celulares que guardan una relación de oposición con mecanismos fisiopatológicos del daño cerebral por isquemia. Éste es el caso de: a) reducción del estrés oxidativo, a través de la reducción del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial, la reducción de la activación NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa y de la producción de ROS, la modulación de enzimas antioxidantes, la captura de ROS; b) reducción de los fenómenos proinflamatorios inducidos por la isquemia; c) incremento de los mecanismos celulares antiapoptóticos; d) promoción de la síntesis y liberación de factores tróficos por parte de los astrocitos; e) mejoramiento a corto y largo plazo del flujo sanguíneo en las zonas isquémicas; f) regulación de las vías de señalización PI3K/Akt/MAPK en favor de la supervivencia neuronal; g) preservación funcional de la barrera hematoencefálica; h) reparación de los circuitos neuronales dañados mediante sinaptogénesis y neurogénesis.

En estas condiciones, la neuroprotección del estradiol contra el daño cerebral por isquemia se sustenta en la reducción del daño excitotóxico, reducción del daño oxidativo, reducción de las respuestas inflamatorias, reducción de la muerte neuronal y mayor supervivencia de las neuronas, efectos de plasticidad y recuperación funcional de las estructuras afectadas (Moralí & Cervantes, 2014).

La presencia de estos diferentes tipos de receptor a estrógeno en las neuronas y las células gliales que forman parte de la estructura y los circuitos neuronales del hipocampo adquiere gran importancia debido al papel fundamental del hipocampo para la codificación de la información y el procesamiento de las señales eléctricas y químicas involucradas en los procesos cerebrales que dan lugar a las funciones cognitivas. De esta manera, las acciones estrogénicas mediadas por receptores, se traducen en cambios en la densidad, la configuración y proporciones relativas de los diferentes tipos de espinas dendríticas en las células piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo y de las capas 3 y 5 de la corteza prefrontal, los cuales son parte fundamental de la generación de señales, la comunicación celular y los cambios plásticos que inciden en las características del aprendizaje y la memoria espacial (Gould et al, 1990; Ikeda et al, 2006; Zhou et al, 2007; Mukai et al, 2007; Jelks et al, 2007; Marin et al, 2009; Garcia-Segura et al, 2010; Roepke et al, 2011).

Por otra parte, se ha observado que en la rata la capacidad de respuesta a los estrógenos, en pruebas de memoria espacial (dependientes de la integridad morfofuncional del hipocampo) y no espacial, se ve disminuida por el envejecimiento; de tal manera que para lograr un efecto benéfico es necesario el uso de dosis más altas que los animales jóvenes (Foster et al, 2003; Foster, 2015). Se ha sugerido que en el proceso de envejecimiento ocurren cambios en las estructuras cerebrales que pueden dar lugar a diferencias en la respuesta a estrógenos entre individuos jóvenes y viejos (Foster, 2012).

En la rata se ha observado que a partir de los 12 meses de edad tiene lugar una disminución de la densidad y las proporciones relativas de los receptores a estrógenos clásicos (ER- α y ER- β), en estructuras cerebrales tales como el hipocampo y la corteza prefrontal (Westberry et al, 2011; Foster, 2012), lo que podría estar relacionado con diferencias en las acciones y los efectos estrogénicos, asociadas al envejecimiento. De hecho, se ha observado, tanto en mujeres como en roedores, que la densidad de

receptores a estrógenos en diversas estructuras cerebrales disminuye con el proceso de envejecimiento (Bean et al, 2014).

En este sentido, se ha descrito que en mujeres el envejecimiento no solo se asocia con reducción de la densidad de receptores ER- α en hipocampo, sino también con reducción de la actividad transcripcional mediada por el este receptor (Tohgi et al, 1995; Ishunina et al, 2007; Ishunina & Swaab, 2008, 2009). Asimismo, se ha descrito que en la rata una disminución de la densidad no solo de los ER- α , sino también de los ER- β , asociada al envejecimiento (12 meses de edad), aparentemente debido a metilación del ADN que codifica para el ER- α y el ER- β , disminuyendo así la transcripción y posterior síntesis del mismo a nivel del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo; un proceso que está asociado tanto con la edad como con la supresión de estrógenos de origen ovárico en plasma (Westberry et al, 2011; Janov et al, 2017).

En este sentido, las variaciones en los resultados de la terapia de reemplazo sobre el deterioro de funciones cognitivas en mujeres post-menopáusicas, podrían estar relacionadas con diferencias individuales en los cambios en los receptores estrogénicos, así como con el intervalo entre la supresión de la secreción ovárica de estrógenos y el inicio de la terapia de reemplazo (Sherwi, 2006; Etgen et al, 2012; Foster, 2012)

Asimismo, estudios en animales de experimentación viejos, referentes a las modificaciones de la vulnerabilidad de estructuras cerebrales ante la reducción o supresión del flujo sanguíneo cerebral y los efectos neuroprotectores de compuestos con actividad estrogénica han mostrado algunos fenómenos adicionales a las modificaciones de la densidad y características de los receptores a estradiol en el sistema nervioso central, asociados al envejecimiento, que pueden incidir en variaciones de la magnitud del deterioro cognoscitivo y de la respuesta al estradiol en esas condiciones. Tal es el caso de la disminución adicional de la densidad de receptores a estrógenos, que se presenta con el transcurso del tiempo ante el descenso en la producción de estrógenos ováricos; así como la reducción en la síntesis de las enzimas esteroideogénicas StAR y aromatasas cerebral, que dan lugar a reducción de las concentraciones de estradiol en estructuras cerebrales específicas (hipocampo) atribuible a la misma causa y a la producción excesiva, anormal de IL-6 por parte de la glía (Foster et al, 2012; Chamniansawat & Chongthammakun, 2015; Chamniansawat & Sawatdiyaphanon, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

En el proceso de envejecimiento, la disminución de las concentraciones sanguíneas y tisulares de las hormonas gonadales secretadas por el ovario puede propiciar modificaciones en la estructura y el funcionamiento cerebral que favorezcan la presencia y progresión de trastornos neurodegenerativos. Por lo que la disminución y/o la ausencia de actividad estrogénica y la hipoperfusión crónica pueden ser factores concurrentes de daño cerebral y deterioro cognoscitivo.

En estas condiciones, el abordaje experimental de la carencia de efectos de estrógenos ováricos y de los efectos de terapia de remplazo en el sistema nervioso central durante el envejecimiento, ha sido realizado en ratas ovariectomizadas entre 18 y 22 meses de edad.

Sin embargo, las consecuencias de la hipoperfusión cerebral crónica en ausencia de actividad estrogénica de origen ovárico, no ha sido abordada en modelos experimentales en los que la ausencia de estrógenos ocurra como parte de la declinación de la esteroidogénesis ovárica, asociada al envejecimiento; una situación que podría ser semejante a la de mujeres post-menopaúsicas bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica.

4. HIPÓTESIS

El estradiol reducirá las alteraciones morfológicas y funcionales provocadas en el hipocampo por hipoperfusión cerebral crónica, en las ratas viejas, con ausencia de actividad estrogénica de origen ovárico.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto neuroprotector del Estradiol en contra del daño cerebral inducido por Hipoperfusión Cerebral Crónica, en las ratas viejas con ausencia de secreción ovárica de estradiol por medio de la evaluación de la eficiencia en el aprendizaje, memoria espacial y la población neuronal del hipocampo.

5.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la población neuronal de células piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en condiciones de Hipoperfusión Cerebral Crónica y ausencia de secreción ovárica, bajo tratamiento neuroprotector con Estradiol, en ratas viejas.
2. Evaluar la eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en condiciones de Hipoperfusión Cerebral Crónica y ausencia de secreción ovárica, bajo tratamiento neuroprotector con Estradiol, en ratas viejas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos establecidos en normas internacionales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication 80-23, 1996), y en normas vigentes en los Estados Unidos Mexicanos: Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM 062-ZOO-1999).

Se utilizaron 24 ratas, hembras, de la cepa Sprague-Dawley, con una edad de 18 meses al inicio del experimento; los animales fueron alojados en cajas de acrílico, bajo condiciones controladas de ciclos de luz y oscuridad (12hr/12hr), a una temperatura de $21 \pm 2^\circ \text{C}$, con provisión de comida (rodent laboratory Chow) y agua *ad libitum*.

Los animales de experimentación fueron asignados al azar a los siguientes grupos:

- Intacto: animales de 18 meses sin ningún procedimiento anestésico-quirúrgico (n=3).
- Sham+OVX: ovariectomía y simulación del procedimiento quirúrgico del modelo de HCC bajo anestesia general (n=5).
- Sham+OVX+E2: ovariectomía y simulación del procedimiento quirúrgico del modelo de HCC bajo anestesia general, con administración de Benzoato de Estradiol, $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{SC}$, cada 48 horas, durante 30 días, inmediatamente después de haber completado los procedimientos anestésico-quirúrgicos (n=5).
- HCC+OVX+Veh E2: ovariectomía y modelo de HCC bajo anestesia general, con administración de aceite vegetal $0.05 \text{ ml}/\text{SC}$, cada 48 horas, durante 30 días, inmediatamente después de haber completado los procedimientos anestésico-quirúrgicos de la HCC (n=6).
- HCC+OVX+E2: ovariectomía y modelo de HCC bajo anestesia general, con administración de Benzoato de Estradiol, $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{SC}$, cada 48 horas, durante 30 días, inmediatamente después de haber completado los procedimientos anestésico-quirúrgicos de la HCC (n=5).

6.1 Ovariectomía

La ovariectomía se realizó bajo anestesia general con ketamina (50 mg/kg, IM) y xilazina (10 mg/kg, IM) y condiciones asépticas, a través de una incisión bilateral en los flancos de la rata para tener acceso a los ovarios, realizar la ligadura y corte de los mismos, así como de la arteria ovárica correspondiente con sutura seda de 3-0, finalmente se procedió al cierre de los planos anatómicos con el mismo material de sutura.

6.2 Modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica

Dos semanas después de la ovariectomía, el modelo de hipoperfusión cerebral crónica se realizó bajo anestesia general con ketamina (50 mg/kg, IM) y xilazina (10 mg/kg, IM) y condiciones asépticas, de acuerdo con los procedimientos quirúrgicos descritos previamente (Pappas et al, 1996; Ohta et al, 1997; Otori et al, 2003; Farkas et al, 2007; Cechetti et al, 2010; Azzubaidi et al, 2012): a través de una incisión en la piel en la línea media de la cara ventral del cuello, mediante microscopio estereoscópico (Leica Mod. S6E) se localizó la vaina carotidea de la arteria carótida común izquierda, la cual se separó cuidadosamente del nervio vago para colocar una doble ligadura (seda 5-0) antes de la bifurcación que da origen a las arterias carótidas interna y externa; en estas condiciones se procedió al corte de la arteria carótida común entre las ligaduras. Siete días después se realizó el mismo procedimiento en la arteria carótida común derecha. Los procedimientos anestésico-quirúrgicos del modelo se realizaron bajo el mismo tipo de anestesia general y consistieron en localizar y disecar las arterias carótidas comunes pero sin interrumpir el flujo sanguíneo.

6.3 Evaluación de memoria y aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris

Para la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial se utilizó el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984). En esta prueba, las ratas se colocaron en una tina circular de 140 cm de diámetro y 50 cm de altura, con agua teñida de color azul oscuro, a una temperatura de 25°C, hasta una profundidad de 25 cm, ubicada en un cuarto con una variedad de señales visuales (puerta, figuras, el investigador, etc.) en lugares fijos del entorno, las cuales permitían la orientación espacial de la rata. El laberinto se dividió de manera virtual en cuatro cuadrantes designados como 1, 2, 3 y 4. En el centro del cuadrante 1 se colocó una plataforma de escape (13 x 13 cm) sumergida 2 cm por debajo de la superficie del agua.

Se diseñó un procedimiento experimental que incluyó un período de aprendizaje de 7 días con dos ensayos diarios (con un intervalo de 20 min); para cada ensayo cada rata se colocó en el agua, en cualquiera de los cuadrantes (seleccionados al azar) con la cabeza orientada frente a la pared de la tina, para iniciar la búsqueda y posible localización de la plataforma y se permitió un tiempo máximo de búsqueda de 60 seg; cada ensayo se dio por terminado con la localización de la plataforma antes de 60 segundos; en el caso de que la rata no localizara la plataforma en 60 seg, se le guiaba manualmente hasta la misma donde se le permitió su permanencia durante 15 segundos a fin de propiciar el aprendizaje de la posición de la plataforma con respecto a las señales del entorno. Tanto la plataforma como las señales espaciales alrededor del laberinto se mantuvieron en el mismo sitio durante los ensayos efectuados durante los 7 días de prueba para la evaluación del aprendizaje espacial. La ejecución del animal en cada ensayo se registró mediante video grabación. En cada ensayo se evaluaron: la latencia de escape (el tiempo que tardó la rata en localizar la plataforma), la distancia recorrida (cm) hasta encontrar la plataforma y la velocidad de nado (cm/s).

Al día siguiente de haber completado el periodo de aprendizaje (día 8) se realizó en cada rata una prueba de memoria espacial (30 seg), en la que se retiró la plataforma y se midió el tiempo que la rata permaneció nadando en el cuadrante donde se localizaba originalmente la plataforma, en comparación con el tiempo de permanencia en los otros tres cuadrantes, y el número de veces que cruzó por el sitio donde se encontraba la plataforma.

6.4 Evaluación de la población de neuronas remanentes del segmento CA1 del cuerno de Ammon del Hipocampo

Al término de las pruebas en el laberinto acuático de Morris, los animales fueron anestesiados con éter y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con 180 ml de solución amortiguadora de fosfatos, seguida de 180 ml de solución de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos. Los cerebros fueron retirados del cráneo y se conservaron en el mismo fijador durante 10 días antes del procesamiento histológico. Cada cerebro fue seccionado en 2 mitades a partir de la cisura interhemisférica; de una de las partes de cada animal de experimentación se obtuvo una rebanada coronal (7.0

mm de espesor) de la región que contiene el hipocampo dorsal, para ello se utilizó una matriz de acrílico para cortes coronales de cerebro de rata (Stoelting mod. 51384). Dichas rebanadas de tejido cerebral se deshidrataron mediante inmersión en alcohol etílico, en concentraciones crecientes y en alcohol amílico, posteriormente fueron aclaradas en aceite de madera de cedro y en cloroformo, para su inclusión en parafina. De estos bloques de tejido cerebral incluido en parafina se obtuvieron por medio de un microtomo (MICROTOM Mod. HM 325), series de cortes coronales de 10 μm de espesor, del hipocampo dorsal localizado entre -2.52 mm y -4.56 mm a partir de bregma, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas de Paxinos (Paxinos & Watson, 2009). Uno de cada 5 cortes coronales fueron teñidos con violeta de cresilo al 0.5%, pH 3.9 (Luna, 1960). Se contó el número de neuronas piramidales remanentes (neuronas con morfología normal, integridad de la membrana y nucléolo claramente visible) en 5 cortes histológicos de cada cerebro de los animales en los diferentes grupos experimentales. El número de neuronas piramidales remanentes se evaluó en una extensión lineal de 400 μm del estrato piramidal del segmento CA1, del cuerno de Ammon del hipocampo, mediante microscopio óptico (Leica Mod. DM 1000) con un aumento de 400x y un sistema computarizado de análisis de imágenes histológicas (Leica Microsystems Mod. LAS06886) (Letechipía-Vallejo et al, 2007).

6.5 Análisis Estadístico

Se evaluaron los siguientes parámetros de eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial: latencia de escape (seg), distancia recorrida (cm) para localizar la plataforma, velocidad de nado (cm/seg), tiempo de recorrido en el cuadrante objetivo (seg) y en los otros tres cuadrantes; y número de cruces por el sitio donde se encontraba la plataforma. Las comparaciones intragrupalas de los valores de latencia de escape (mediana) entre el día 1 y los 6 días subsecuentes de prueba, se realizaron mediante análisis de varianza no paramétrica, ANOVA de Friedman y la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon, *post hoc*; las comparaciones intergrupales de las latencias de escape durante los 7 días de prueba, fueron realizadas mediante ANOVA de Kruskal-Wallis y prueba U de Mann-Whitney, *post hoc*; la longitud de las trayectorias y la velocidad de nado durante el período de prueba, así como el número de cruces y el tiempo de recorrido en el cuadrante donde debería estar la plataforma (día 8) fue comparado entre los diferentes grupos mediante ANOVA de una vía y prueba de Tukey, *post hoc*; para las comparaciones

intragrupales de los valores de la longitud de las trayectorias y la velocidad de nado durante el período de 7 días de prueba y el tiempo de recorrido en el cuadrante donde debería estar la plataforma y en los otros tres cuadrantes (día 8) se empleó ANOVA y prueba de Tukey, *post hoc*; la comparación entre el número de cruces en el que originalmente se encontraba la plataforma objetivo se realizó ANOVA de Kruskal-Wallis y prueba U de Mann-Whitney, *post hoc* (Downie & Heath, 1983; Siegel, 1956).

La comparación del número de neuronas remanentes en el segmento CA1 del cuerno de Ammon en los diferentes grupos fue analizado mediante ANOVA de una vía y prueba de Tukey, *post hoc* (Downie & Heath, 1983).

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris

7.1.1 Aprendizaje espacial. Latencia de escape

Los valores (mediana y rango) de las latencias de escape de los diferentes grupos experimentales obtenidos cada día, durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris se muestran en la Figura 1; se aprecia una reducción progresiva con el transcurso del período de 7 días de prueba en los grupos Intacto, Sham+OVX y HCC+OVX+E2, a diferencia de los grupos Sham+OVX+E2 y HCC+OVX+Veh, en los que los valores de la latencia de escape fueron similares (aunque significativamente menores en algunos días en comparación con el 1er día de prueba) sin mostrar una tendencia a la reducción progresiva durante el período de 7 días de prueba.

Puede observarse una reducción significativa de los valores de latencia de escape en comparación con los valores obtenidos en el 1er día de prueba (comparación intragrupal), en varios días a partir del 2do día de prueba ($p < 0.05$) en el grupo Intacto; a partir del 3er día de prueba ($p < 0.05$) en el grupo Sham+OVX; a partir del 2do día de prueba ($p < 0.05$) en el grupo Sham+OVX+E2 y a partir del 3er día de prueba ($p < 0.05$) en el grupo HCC+OVX+E2. En cambio, los valores de latencia de escape fueron significativamente menores solamente los días 2, 6 y 7 ($p < 0.05$), en comparación con el primer día de prueba en el grupo HCC+OVX+Veh.

La comparación intergrupala de los valores de latencia de escape solo mostró una disminución significativa de este parámetro el día 5 de prueba en el grupo HCC+OVX+E2, en comparación con el grupo Intacto ($p < 0.05$).

7.1.2 Aprendizaje espacial. Longitud y características de las trayectorias de nado

Los valores de la distancia de nado (cm) que recorrieron los animales de los diferentes grupos experimentales para llegar a la plataforma sumergida, en el laberinto acuático de Morris, mostraron una tendencia a disminuir progresivamente en días sucesivos durante el período de 7 días de prueba, en comparación con el 1er día de prueba (Tabla 1). Los valores de los grupos Intacto y Sham+OVX, a partir del día 3 de prueba, presentaron

diferencias significativas ($p < 0.05$ o $p < 0.01$) en comparación con el día 1, en tanto que los de los grupos Sham+OVX+E2 e HCC+OVX+E2 mostraron reducción significativa ($p < 0.05$ o $p < 0.01$) a partir del día 4. En el grupo HCC+OVX+Veh se observaron diferencias significativas en algunos días en comparación con el día 1 ($p < 0.05$ o $p < 0.01$), pero sin mostrar la tendencia a la reducción progresiva. No se observaron diferencias significativas en las distancias de nado entre los grupos.

En la Figura 2, se ilustran las trayectorias de nado representativas de los grupos Intacto, Sham+OVX, Sham+OVX+E2, HCC+OVX+Veh y HCC+OVX+E2, en los días 1, 3 y 7 de prueba y en la prueba de transferencia (día 8). Se destaca el cambio de la trayectoria de nado, circular y cercano a la pared de la tina, observado el primer día de prueba, hacia rutas más cortas y orientadas hacia el sitio de la plataforma en los días sucesivos en todos los grupos experimentales.

Tabla 1. Valores (media \pm EE) de la longitud de las trayectorias de nado (cm) de los animales de los grupos Intacto, Sham+OVX, Sham+OVX+E2, HCC+OVX+Veh y HCC+OVX+E2 durante los 7 días sucesivos de la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris

	Intacto (n=3)	Sham+OVX (n=5)	Sham+OVX+E2 (n=4)	HCC+OVX+Veh E2 (n=6)	HCC+OVX+E2 (n=5)
Día 1	1062.8 \pm 114	1307.9 \pm 100.8	1216.1 \pm 111.4	1171.5 \pm 134.2	1264.96 \pm 110.4
Día 2	674.0 \pm 135.1	944.8 \pm 145.9	880.9 \pm 153	640.3 \pm 79.4 *	945.74 \pm 169
Día 3	487.4 \pm 77.9 **	681.1 \pm 137.7 *	807.5 \pm 132.7	770.5 \pm 103.9	822.47 \pm 88.9
Día 4	500.6 \pm 192.7 **	595.4 \pm 110.7 **	610.6 \pm 105.5 **	818.1 \pm 133.8	634.91 \pm 129 **
Día 5	390.1 \pm 66.4 **	382.2 \pm 143.9 **	424.1 \pm 69.3 **	739.5 \pm 122.6 **	395.37 \pm 67.9 **
Día 6	421.7 \pm 57.8 **	649.1 \pm 173.3 *	659.1 \pm 162.5 **	724.8 \pm 100.6 *	441.22 \pm 83.9 **
Día 7	271.2 \pm 41.9 **	391.5 \pm 118.2 **	479.8 \pm 122.1 **	476.6 \pm 96 *	576.83 \pm 168.2 **

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en los diferentes días vs día 1

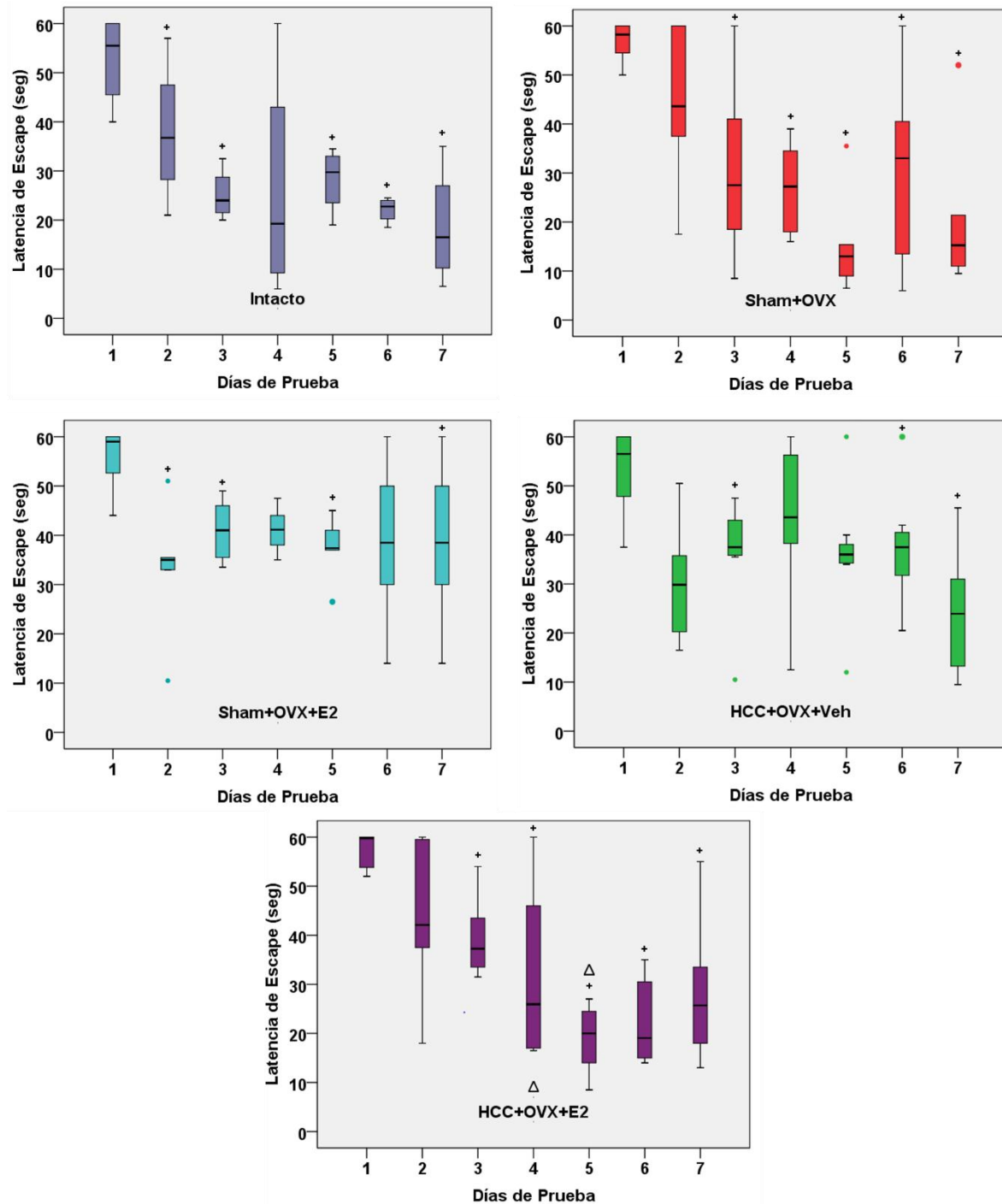


Figura 1. Latencias de escape (mediana y rango) de los grupos Intacto (n=3), Sham+OVX (n=5), Sham+OVX+E2 (n=4), HCC+OVX+Veh (n=6) e HCC+OVX+E2 (n=5), durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris. Puede observarse la reducción significativa de la latencia de escape a partir del segundo o tercer día de prueba, en algunos días en los diferentes grupos experimentales (+) y la diferencia intergrupar del grupo HCC+OVX+E2 con respecto al grupo Intacto (Δ). + p<0.05, días 2 y subsecuentes vs día 1; Δ p<0.05, día 5 de prueba.

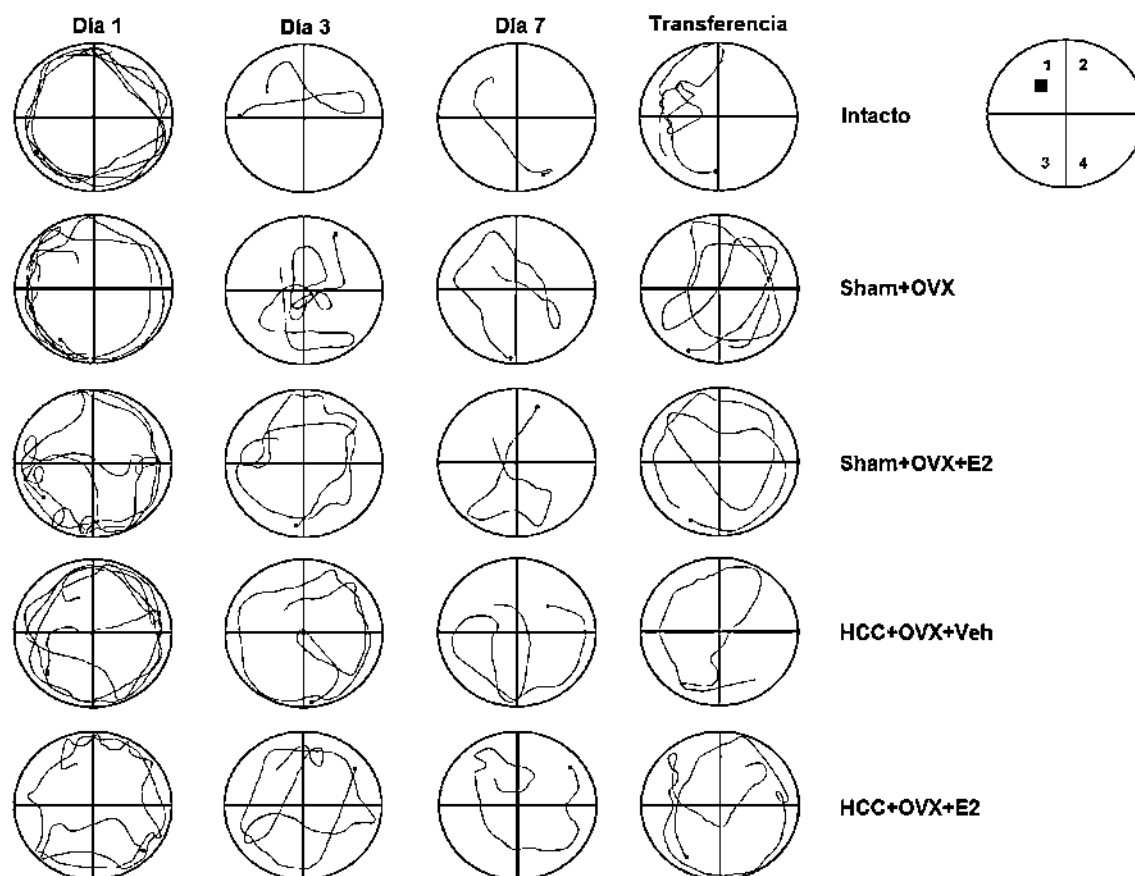


Figura 2. Trayectorias de nado representativas de un animal de cada uno de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris en los días de prueba 1, 3 y 7; así como durante la prueba de transferencia; el inicio de la ruta está representado por el punto en color negro. A la derecha se muestra un diagrama del laberinto acuático de Morris dividido en 4 cuadrantes y con la localización de la plataforma (cuadrante 1). Durante el primer día, se observa una trayectoria de nado circular en los diversos grupos experimentales; posteriormente las trayectorias son más cortas, y mejor orientadas hacia el sitio de ubicación de la plataforma sumergida en todos los grupos, principalmente en los grupos Intacto, Sham+OVX, Sham+OVX+E2 y HCC+OVX+E2.

7.1.3 Aprendizaje espacial. Velocidad de nado

La Tabla 2 muestra los valores de la velocidad de nado (cm/seg) en los diferentes grupos experimentales durante los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris. No se observaron diferencias en la velocidad de nado entre los diferentes grupos experimentales, excepto por un incremento significativo ($p < 0.05$) en el grupo Sham+OVX con respecto al grupo Intacto los días 3 y 5 de prueba, una disminución significativa ($p < 0.05$) en el grupo Sham+OVX+E2 el día 6 con respecto al Intacto.

Tabla 2. Valores (media \pm EE) de la velocidad de nado (cm/seg) de los animales de los grupos Intacto, Sham+OVX, Sham+OVX+ E2, HCC+OVX+Veh y HCC+OVX+E2 durante los 7 días sucesivos de la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris.

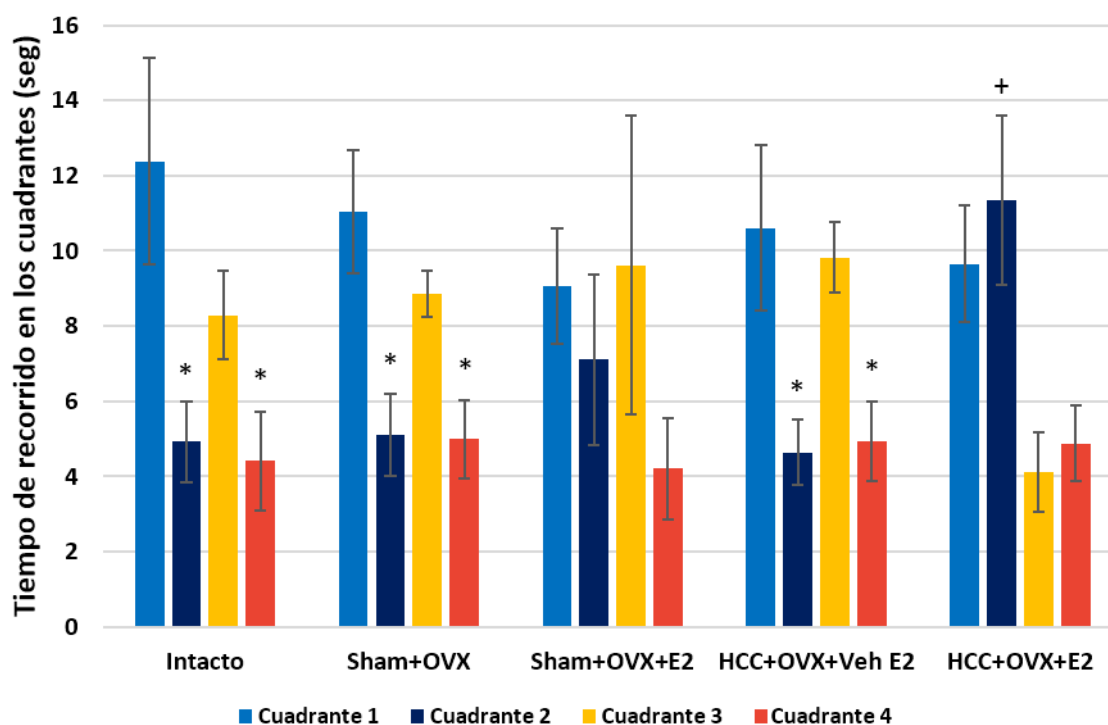
	Intacto (n=3)	Sham+OVX (n=5)	Sham+OVX+E2 (n=4)	HCC+OVX+Veh E2 (n=6)	HCC+OVX+E2 (n=5)
Día 1	22 \pm 1.2	23.9 \pm 0.7	23.4 \pm 1.1	24.2 \pm 1	23.3 \pm 1.1
Día 2	17.1 \pm 0.6	21.5 \pm 1.8	18.9 \pm 2.2	23.1 \pm 2.5	21.6 \pm 1
Día 3	17.6 \pm 1.1	24.3 \pm 1.6 Δ	18.2 \pm 1.9	20.8 \pm 1.4	19.9 \pm 1.7
Día 4	20.3 \pm 0.6	20.7 \pm 1.6	16.3 \pm 0.8	18.4 \pm 1.6	21 \pm 1.7
Día 5	14.9 \pm 2.1 *	23.5 \pm 2 Δ	14.4 \pm 2 *	20.2 \pm 1.7	20.7 \pm 1
Día 6	18.4 \pm 1.8	20.3 \pm 1.6	11.8 \pm 1.3 * Δ	20.2 \pm 1.6	20.2 \pm 0.9
Día 7	18.1 \pm 2.2	19.3 \pm 1.9	15.4 \pm 2.6 *	20.6 \pm 1.4	18.5 \pm 1.7

* p < 0.05 vs día 1 Δ p < 0.05 vs Intacto

7.1.4 Memoria espacial. Tiempo de recorrido por los diferentes cuadrantes

En la prueba de transferencia, se encontraron diferencias en el recorrido por los cuadrantes del laberinto acuático de Morris, entre los grupos experimentales (Figura 3). El grupo Intacto realizó un recorrido predominante en el cuadrante objetivo, donde originalmente se encontraba la plataforma (cuadrante 1) y en menor grado en uno de los cuadrantes adyacentes (cuadrante 3), con tiempos de recorrido significativamente más cortos ($p < 0.05$) en los cuadrantes 2 y 4 que en el 1. En los grupos Sham+OVX y HCC+OVX+Veh, se presentó un tiempo de recorrido similarmente predominante en el cuadrante objetivo y en el cuadrante 3, con recorridos significativamente menores ($p < 0.05$) por los cuadrantes 2 y 4 que por el cuadrante 1. Los animales del grupo Sham+OVX+E2 mostraron recorridos similares por los cuadrantes 1, 2 y 3, sin diferencias entre los cuatro cuadrantes. Las ratas del grupo HCC+OVX+E2 presentaron recorridos predominantes en el cuadrante objetivo (cuadrante 1) y en el otro cuadrante adyacente (cuadrante 2), con recorridos más cortos por los cuadrantes 3 y 4, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre los cuadrantes.

Por otra parte, los resultados de un análisis intergrupar no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, en el tiempo de recorrido en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma, pero sí se observó un mayor tiempo de recorrido de los animales del grupo HCC+OVX+E2 en el segundo cuadrante ($p < 0.05$) en comparación con el grupo HCC+OVX+Veh.



* $p < 0.05$ con respecto al tiempo de recorrido en el cuadrante 1.

+ $p < 0.05$ cuadrante 2 del grupo HCC+OVX+E2 vs. HCC+OVX+Veh.

Figura 3. Tiempo (seg) de recorrido (media \pm EE) en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia (30 seg), en los diferentes grupos experimentales. Puede observarse el tiempo de permanencia mayor en el cuadrante 1 (donde originalmente se encontraba la plataforma) en los grupos Intacto, Sham+OVX y HCC+OVX+Veh, pero, sin diferencias significativas entre los grupos.

7.1.5 Memoria Espacial. Número de cruces por el sitio de la plataforma

La tabla 3 ilustra el desempeño de los animales de los diferentes grupos experimentales durante la prueba de transferencia, en cuanto al número de cruces por el sitio donde estaba la plataforma; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 3. Número de cruces (mediana y rango) por el sitio donde se encontraba la plataforma, realizados por los grupos Intacto (n=3), Sham+OVX (n=5), Sham+OVX+E2 (n=4), HCC+OVX+Veh (n=6) e HCC+OVX+E2 (n=5).

Grupo	Mediana	Rango
Intacto	5	1 – 5
Sham+OVX	3	1 – 5
Sham+OVX+E2	1	1 – 3
HCC+OVX+Veh	3	1 – 5
HCC+OVX+E2	3	2 – 5

7.2 Evaluación de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo

En la Figura 4 se muestran fotomicrografías representativas de cortes coronales del cerebro de animales de cada condición experimental, teñidos con violeta de cresilo, que ilustran en imagen panorámica la población neuronal del Cuerno de Ammon y del giro dentado del hipocampo (40X), así como la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del Cuerno de Ammon (400X). En los diferentes grupos experimentales se observa una población de neuronas piramidales en CA1 semejante a la del grupo Intacto, a excepción del grupo HCC+OVX+Veh en el que se aprecia una reducción de la misma.

El análisis cuantitativo de la población de neuronas piramidales de CA1 (Figura 5), no mostró diferencias significativas entre los grupos Intacto, Sham+OVX, Sham+OVX+E2 y HCC+OVX+E2. En cambio, se observó una reducción significativa ($p=0.008$), hasta un 76%, en la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en el grupo HCC+OVX+Veh, en comparación con el grupo Intacto (100%). El tratamiento con estradiol contrarrestó parcialmente la pérdida de neuronas bajo esta condición, ya que en el grupo HCC+OVX+E2 la población neuronal se redujo sólo hasta un 86.4% con respecto al grupo Intacto (100%), sin diferencia estadísticamente significativa con el grupo HCC+OVX+Veh.

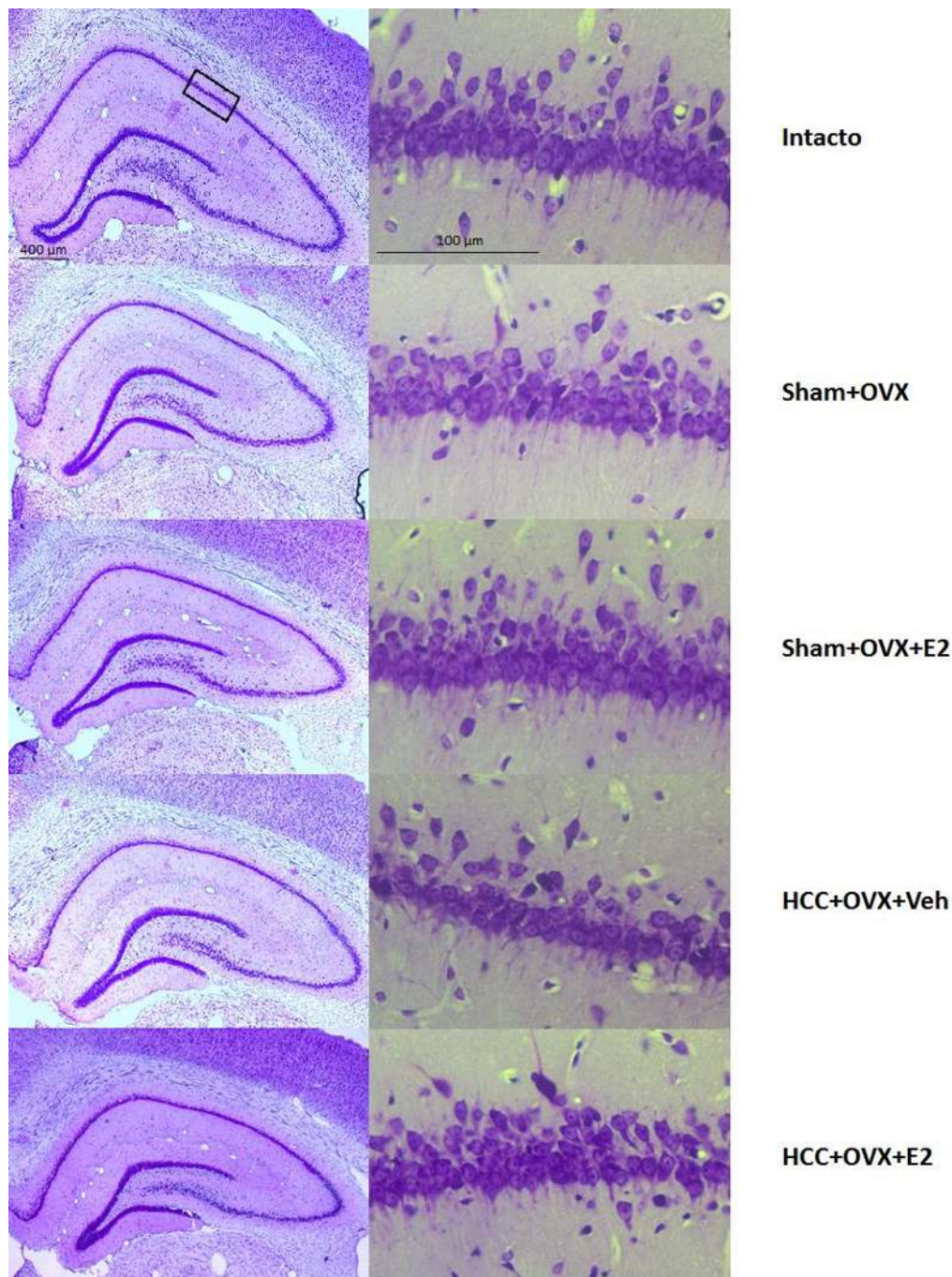


Figura 4. Fotomicrografías de cortes histológicos representativos, que ilustran a dos diferentes aumentos (40x del lado izquierdo y 400x del lado derecho) la población de neuronas piramidales remanentes, del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales. Puede observarse una reducción parcial del número de neuronas por efecto de la HCC en la imagen correspondiente al grupo HCC+OVX+Veh, y su preservación en el grupo HCC+OVX+E2, comparado con los grupos Intacto, Sham+OVX y Sham+OVX+E2.

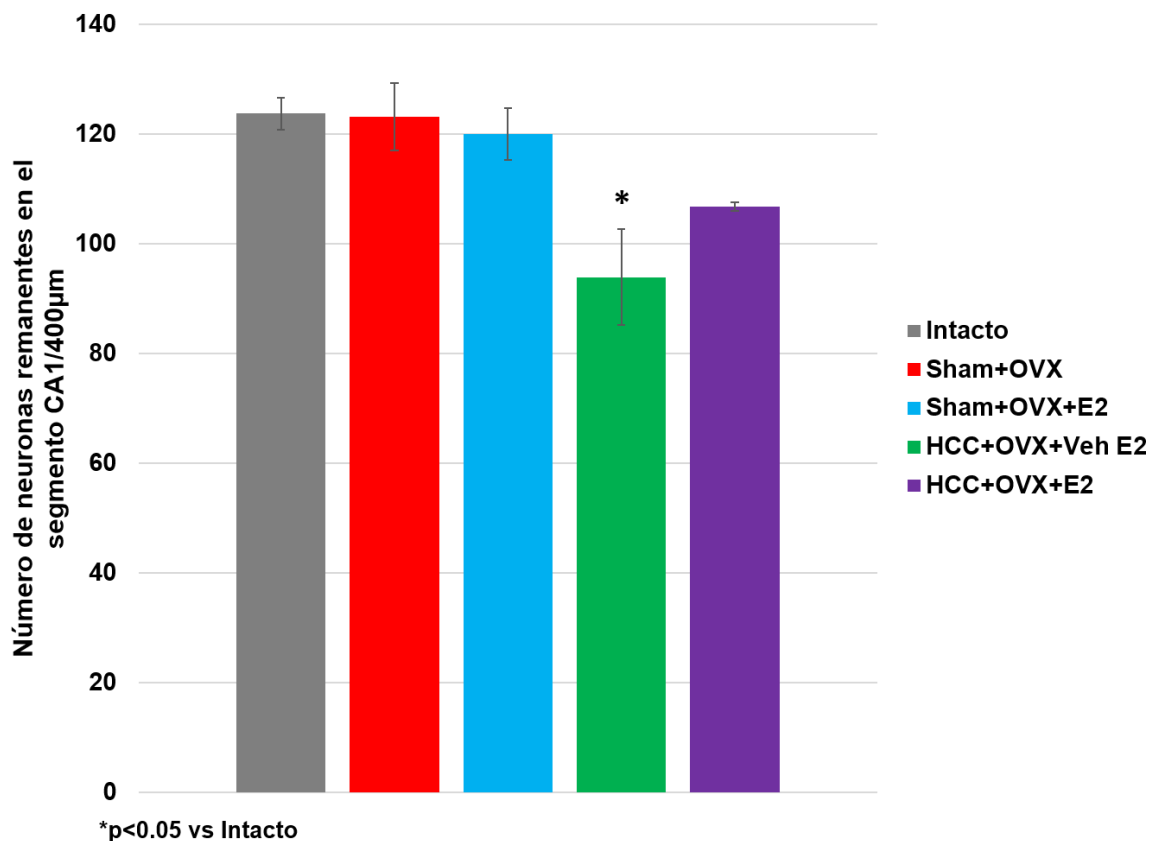


Figura 5. Número de neuronas piramidales remanentes (media ± EE) en una extensión lineal de 400 μm en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo de los animales de los diferentes grupos experimentales. *p<0.05 vs. Intacto

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluaron los efectos neuroprotectores del estradiol en un modelo experimental de hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de estrógenos de origen ovárico, en ratas viejas (18 meses de edad); condiciones que pueden ser concurrentes para la presencia y magnitud de alteraciones estructurales y/o funcionales en estructuras cerebrales vulnerables a la reducción del flujo sanguíneo cerebral (Pulsinelli, 1985). En particular, dichas alteraciones en el cuerno de Ammon del hipocampo y en la corteza prefrontal pueden dar lugar a deterioro de funciones cognitivas tales como el aprendizaje y la memoria espacial (Letechipía-Vallejo et al, 2007; Cechetti et al, 2012a, 2012b).

Con respecto a las alteraciones de la estructura del hipocampo, los resultados del presente trabajo, en ratas viejas ovariectomizadas, confirman la reducción de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo como consecuencia de un período de 3-4 meses bajo hipoperfusión cerebral crónica, de manera similar a como ha sido descrito previamente en ratas macho, por diversos autores (Ni et al, 1995; Cechetti et al, 2012a) y en ratas hembra, en nuestro laboratorio (Montoya-Fraga et al, 2016; Salcido-Cadena et al, 2017). En efecto, la reducción del número de neuronas del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, del orden de 30% con respecto al número de neuronas en condiciones experimentales sin hipoperfusión cerebral crónica (100%), ha sido atribuido a mecanismos de daño y muerte neuronal inducidos a largo plazo por la hipoperfusión cerebral crónica, en un modelo experimental en ratas macho con ligadura secuencial, con un intervalo de 7 días, de una y otra arterias carótidas comunes (Cechetti et al, 2012a, 2012b). En estas condiciones, el estrés oxidativo, la acumulación anormal de especies reactivas de oxígeno, la lipoperoxidación de estructuras neuronales, la activación de procesos pro-inflamatorios en las células gliales, así como mecanismos celulares pro-apoptóticos han sido considerados como fenómenos concurrentes al daño y muerte neuronal en el cuerno de Ammon del hipocampo. La coincidencia en la magnitud de la reducción de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, observados en el presente estudio en ratas viejas y en estudios previos en ratas hembra jóvenes (Montoya-Fraga et al, 2016; Salcido-Cadena et al, 2017), permitiría sugerir que la muerte neuronal en dicha estructura sería debida a estos mismos procesos fisiopatológicos.

En estas condiciones, la preservación de un mayor número de neuronas remanentes (10% mayor, con respecto al grupo sin tratamiento con estradiol, bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y ovariectomía) en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, por efecto del tratamiento con estradiol sugiere la presencia de acciones estrogénicas en oposición a los mecanismos de daño y muerte neuronal inducidos por hipoperfusión cerebral crónica, como ha sido descrito en otras situaciones experimentales (Singer et al, 1998; Dubal et al, 1999; Won et al, 2006; Razmara et al, 2007; Lewis et al, 2008; Pajović et al, 2008; Vegeto et al, 2008; Lebesgue et al, 2009; Arévalo et al, 2010; Azcoitia et al, 2010; Rao et al, 2011; Wappler et al, 2011; Etgen et al, 2012; Morali & Cervantes, 2014; Zhu et al, 2017). No obstante, estos efectos del estradiol parecen ser de menor magnitud en animales de 18 meses de edad en comparación con los observados en animales de 3-4 meses de edad (Montoya-Fraga et al, 2016). En la rata, se ha descrito una reducción de la densidad y proporciones relativas de los ER- α y ER- β en el hipocampo y la corteza prefrontal asociada al envejecimiento, lo que podría incidir en diferencias de la magnitud de las acciones y efectos estrogénicos entre individuos jóvenes y viejos (Westberry et al, 2011; Foster, 2012; Bean et al 2014).

Adicionalmente, en otros estudios, en los que el modelo de hipoperfusión cerebral crónica consistió en la ligadura simultánea, permanente, de ambas arterias carótidas comunes, en ratas macho, se han descrito diversos mecanismos de daño y muerte neuronal en estructuras cerebrales vulnerables, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal: estrés oxidativo (He et al, 2009; Choi et al, 2014), inflamación (Farkas et al, 2007), disfunción de sistemas de neurotransmisores tales como el colinérgico y el GABAérgico (Li et al, 2014; Xi et al, 2014), disfunción mitocondrial y procesos pro-apoptóticos (Du et al, 2013), lipoperoxidación (Wang et al, 2014) y alteración de la secreción de factores tróficos (Schmidt-Kastner et al, 2001).

Por otra parte, los resultados del presente estudio no sustentan que la supresión de estrógenos de origen ovárico, sea por sí misma un factor determinante de cambios en la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo; en efecto, el promedio del número de neuronas en el grupo Sham+OVX no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Intacto, sin ovariectomía.

Asimismo, la comparación del número de neuronas en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, entre los animales de 18 meses de edad, en el presente estudio, y los animales de 3-4 meses de edad observados en estudios previos en condiciones experimentales similares (Montoya-Fraga et al, 2016; Salcido-Cadena et al, 2017), tampoco sustenta la existencia de cambios en la población neuronal del hipocampo atribuibles solamente al proceso de envejecimiento en las ratas.

La reducción de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo observada en ratas macho, jóvenes, luego de 2-3 meses bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, mediante el modelo de ligadura secuencial de las arterias carótidas comunes, se ha asociado con el deterioro del aprendizaje y memoria espacial (Cechetti et al, 2010, 2012a, 2012b).

En el presente trabajo, los resultados obtenidos en ratas hembra de 18 meses de edad confirmaron parcialmente las alteraciones de las funciones cognitivas inducidas por la HCC, en ratas macho o en ratas hembra, en el mismo modelo experimental. En efecto, el de reducción progresiva de las latencias de escape, indicador de eficiencia en el aprendizaje y memoria espacial, en ratas hembra de 18 meses de edad, en los grupos Intacto y Sham+OVX, fue semejante al descrito por otros autores, en la misma prueba de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, en ratas hembras jóvenes, ovariectomizadas, de 3-4 meses de edad (Montoya-Fraga et al, 2016) y en ratas macho de 24-30 meses de edad (Olvera-Cortés et al, 2012); mientras que dicho patrón de reducción progresiva de las latencias de escape en días de prueba sucesivos, no fue observado en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica (HCC+OVX+Veh), sugiriendo la presencia de deterioro cognoscitivo en esta situación experimental. Por otra parte, los resultados del presente estudio indican que el efecto neuroprotector del tratamiento con estradiol en contra del deterioro del aprendizaje y la memoria espacial (Montoya-Fraga et al, 2016) descrito previamente en ratas hembra jóvenes, también ocurre en hembras viejas, dado que dicho patrón de reducción progresiva de las latencias de escape, indicador de aprendizaje y memoria espacial eficientes, también fue observado en los animales del grupo HCC+OVX+E2.

Sin embargo, estas diferencias en cuanto a la eficiencia en el aprendizaje y la memoria espacial durante el período de 7 días de prueba sucesivos en el laberinto acuático de

Morris, posiblemente atribuible a la hipoperfusión cerebral crónica, no fue confirmada cabalmente en el presente estudio en la prueba de transferencia, en la que en ausencia de la plataforma de escape el número de cruces por el sitio exacto donde se encontraba originalmente la plataforma no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos, bajo condiciones experimentales distintas.

Asimismo, el tiempo de permanencia preferentemente en el cuadrante “objetivo” y en uno de los cuadrantes adyacentes, en el laberinto acuático de Morris, siguió el mismo patrón en el grupo Intacto, Sham+OVX y HCC+OVX+Veh. No obstante, el tratamiento con E2 en condiciones de ovariectomía e hipoperfusión cerebral crónica dio lugar a un cambio del patrón de orientación espacial preferentemente en el cuadrante “objetivo” y el cuadrante adyacente opuesto al seleccionado por los animales del grupo HCC+OVX+Veh. Estos resultados podrían corresponder a diferencias en el funcionamiento de las estructuras cerebrales involucradas en la memoria espacial, bajo las acciones del estradiol, sin que el tratamiento con este compuesto llegara a preservar el mismo patrón de eficiencia, basado en orientación y memoria espacial, en la localización del sitio donde originalmente se encontraba la plataforma.

Por otra parte, se ha descrito que a diferencia de lo que ocurre en los ratas jóvenes, en las que la ovariectomía puede dar lugar a un deterioro del aprendizaje y la memoria espacial (González-Burgos et al, 2005; Wallace et al, 2006), en ratas viejas no se han encontrado diferencias en estas funciones cognoscitivas, atribuibles a la ovariectomía (Talboom et al, 2008). Estos datos coinciden con los resultados del presente estudio, en el que tampoco se identificaron diferencias en el aprendizaje y la memoria espacial como consecuencias de la ovariectomía, efectuada a los 19 meses de edad.

El abordaje experimental de las acciones y efectos estrogénicos en el sistema nervioso central, ha conducido al establecimiento de diferencias importantes entre ratas jóvenes y ratas viejas. Así, se ha descrito que el proceso de envejecimiento en la rata se asocia a: la disminución en la densidad de receptores clásicos a estrógenos (α y β) en estructuras cerebrales como el hipocampo y la corteza prefrontal; la disminución en la capacidad de síntesis de estradiol en el ovario y de las concentraciones plasmáticas de este esteroide; la reducción en la expresión de genes que codifican para las enzimas esteroideogénicas, como la StAR y la aromatasa cerebral, lo que puede dar como resultado la disminución en

la síntesis local de estradiol en estructuras como el hipocampo; el incremento en la producción de IL-6, que regula de manera negativa la síntesis de la aromatasa cerebral (Foster et al, 2012; Bean et al, 2014; Chamniansawat y Chongthammakun, 2015; Chamniansawat y Sawatdiyaphanon, 2018); la disminución en la densidad de espinas dendríticas en la corteza prefrontal e hipocampo (Luine & Frankfurt, 2012). Estos fenómenos, a largo plazo, pueden dar lugar a una menor participación estrogénica en la determinación de características morfológicas y funcionales del sistema nervioso central, con modificaciones en el sustrato neural y en el funcionamiento de las estructuras cerebrales involucradas en las funciones cognitivas, que se expresan como deficiencias en el desempeño en pruebas de aprendizaje y memoria espacial y no espacial.

Asimismo, se ha descrito que en animales viejos, la terapia de remplazo con estradiol puede requerir mayores dosis para lograr los efectos deseados en las estructuras cerebrales, en comparación con las dosis necesarias para lograr los mismo efectos en animales jóvenes. Esta diferente capacidad de respuesta al estradiol, junto con la duración del intervalo entre la ovariectomía y el inicio del tratamiento estrogénico, parecen ser factores fundamentales en la menor magnitud de la respuesta al tratamiento estrogénico en animales viejos (Foster et al, 2003; Luine, 2014; Foster, 2015)

El modelo de hipoperfusión cerebral crónica en animales de experimentación ha sido reconocido como fuente de información de procesos cerebrales de daño y deterioro cognoscitivo (Du et al, 2017) y las consecuencias de la HCC en ratas macho han sido descritas en múltiples trabajos, en los que la ligadura y/o la sección bilateral de las arterias carótidas comunes o internas da lugar a una reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral, particularmente acentuada en el hipocampo y la corteza cerebral (Pappas et al, 1996; Ohta et al, 1997; Ulrich et al, 1998; Otori et al, 2003; Farkas et al, 2007). En este sentido, la integridad morfológica y funcional del hipocampo es esencial para la codificación y la recuperación de información para la memoria declarativa de tipo episódica en humanos y de la memoria espacial en roedores (Squire, 1992; Churchwell et al, 2010; Churchwell & Kesner, 2011). Asimismo, la corteza prefrontal es determinante para la orientación de acciones aprendidas dirigidas a objetivos (Daniel et al 1997; Luine et al, 1998; Hasselmo, 2005). De esta manera, la relación y funcionamiento coordinados entre el hipocampo y la corteza prefrontal son fundamentales para el aprendizaje, la

memoria y la navegación espacial (Lee & Kesner, 2003; Jo et al, 2007; Leon et al, 2010; Gordon, 2011; López-Vázquez et al, 2012).

Ya que la edad y la ausencia de secreción estrogénica ovárica pudieran ser factores concurrentes para la inducción de alteraciones morfológicas y funcionales en estas estructuras, catalogadas como muy vulnerables ante la reducción del flujo sanguíneo cerebral y consecuentemente para el deterioro cognoscitivo durante el proceso de envejecimiento, los modelos experimentales con animales viejos tendrían ventajas en comparación con modelos de deterioro cognoscitivo en animales jóvenes, (Chakraborty & Gore, 2004; Luine, 2014; Venkat et al, 2015). En este caso, algunos de los parámetros indicadores de la eficacia de un fármaco potencialmente neuroprotector serían la evaluación a largo plazo de la población neuronal en las estructuras cerebrales vulnerables (parámetro de estructura) y la evaluación de las funciones de aprendizaje y memoria espacial (parámetro de funciones), de acuerdo con los lineamientos establecidos por consenso para el estudio preclínico de fármacos neuroprotectores (Fisher et al, 2009).

Un resultado inesperado en el presente estudio fue la menor eficiencia en el desempeño de la prueba de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, sin modificaciones de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en el grupo Sham+OVX+E2.

Contrariamente a lo que cabría esperar, en el sentido de que el tratamiento con estradiol mejora el desempeño cognoscitivo en animales ovariectomizados (González-Burgos et al, 2005), en el presente estudio el tratamiento con E2 provocó un deterioro del aprendizaje (patrón de aprendizaje espacial sin reducción progresiva de la latencia de escape) y la memoria espacial (sin orientación de búsqueda preferente de la plataforma en alguno de los cuadrantes del laberinto acuático de Morris) que no fue observado en el grupo Sham+OVX, en el que se cumplieron los criterios de reducción progresiva de la latencia de escape y de orientación preferente en la búsqueda de la plataforma, en la prueba de aprendizaje y memoria espacial. No se tiene una explicación o interpretación al respecto; solamente cabría mencionar, que el tratamiento con E2 como terapia de remplazo en mujeres post-menopáusicas en algunos casos ha dado lugar a mayor deterioro cognoscitivo, en contraste con otros individuos en los que dicho tratamiento mejora o

retarda el deterioro cognoscitivo, sin que se tenga una explicación del efecto deletéreo del E2 en estas condiciones (Schneider, 2004).

9. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se ha descrito en ratas viejas la reducción de la población de neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo y su relación con deterioro del aprendizaje y la memoria espacial en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica. Estos resultados complementan los datos referentes a las alteraciones morfológicas y funcionales del hipocampo descritos en ratas macho por otros autores y en hembras jóvenes, en nuestro grupo, en el mismo modelo de reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral.

Asimismo, en el presente estudio se ha mostrado el efecto neuroprotector del estradiol en contra de los procesos de daño y muerte neuronal inducidos por hipoperfusión cerebral crónica en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, una estructura especialmente vulnerable e involucrada de manera muy importante en la integración de las funciones cognoscitivas de aprendizaje y memoria espacial.

En este aspecto, los resultados presentes de eficiencia en el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, sustentan los efectos del estradiol en contra del deterioro de funciones cognoscitivas dependientes predominantemente del hipocampo. Además, las modificaciones de la orientación y memoria espacial atribuibles a la hipoperfusión cerebral crónica y al tratamiento con estradiol sugieren que cambios en la estructura y el funcionamiento de la corteza prefrontal posiblemente estén involucradas en la alteración y/o preservación de dichas funciones cognoscitivas.

Sin embargo, el deterioro del aprendizaje y la memoria espacial observado en el grupo Sham, bajo tratamiento con estradiol, en ausencia de alteración de la población de neuronas piramidales del hipocampo, amerita un abordaje experimental futuro

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arevalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta*. 2010. 1800(10):1106-12.
- Azcoitia I, Santos-Galindo M, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Eur J Neurosci*. 2010. 32(12):1995-2002.
- Azzubaidi M, Saxena A, Talib N, Ahmed Q, Dogarai B. Protective effect of treatment with black cumin oil on spatial cognitive functions of rats that suffered global cerebrovascular hypoperfusion. *Acta Neurobiol Exp*. 2012. 72(2):154–165.
- Bakker FC, Klijn CJM, Jennekens-Schinkel A, Kappelle LJ. Cognitive disorders in patients with occlusive disease of the carotid artery: a systematic review of the literature. *J Neurol*. 2000. 247(9):669-76.
- Barone FC, Feuerstein GS. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow*. 1999. 19(8):19-34.
- Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*. 1998. 23(8):963-87.
- Bean LA, Ivanov L, Foster TC. Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist*. 2014. 20(5):534-45.
- Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J, von Euler G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005. 25(12):1586-95.
- Boon WC, Chow JD, Simpson ER. The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. *Prog Brain Res*. 2010. 181:209-32.
- Brinton RD. Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. *Trends Pharmacol Sci*. 2009. 30(4):212-22.
- Brust JCM. Appendix C / Circulation of the Brain. Disponible en: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (editors). *Principles of Neural Science*, 5th Edition. McGraw Hill, 2013. ISBN: 978-0-07-139011-8, pp 1550-64.

- Carswell HV, Macrae IM, Gallagher L, Harrop E, Horsburgh KJ. Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004. 287(4):H1501-4.
- Cechetti F, Worm P, Pereira L, Siqueira I, Netto C. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res*. 2010. 43(12):1178-83.
- Cechetti F, Pagnussat A, Worm P, Elsner V, Ben J, da Costa M, Mestriner R, Weis S, Netto C. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull*. 2012a. 87(1):109-16.
- Cechetti F, Worm PV, Lovatel G, Moysés F, Siqueira IR, Netto CA. Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sci*. 2012b. 91(1-2):29-36.
- Chakraborty TR, Gore AC. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Exp Biol Med*. 2004. 229(10):977-87.
- Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001. 21(1):2-14.
- Chamniansawat S, Chongthammakun S. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis by reactive microglia leads to downregulation of synaptic protein expression. *Neurotoxicology*. 2015. 46:25-34.
- Chamniansawat S, Sawatdiyaphanon C. Age-Related Memory Impairment Associated With Decreased Endogenous Estradiol in the Hippocampus of Female Rats. *Int J Toxicol*. 2018. 37(3):207-15.
- Chen JQ, Cammarata PR, Baines CP, Yaguer JD. Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Biogenesis by Estrogens/Estrogen Receptors and Physiological, Pathological and Pharmacological Implications. *Biochim Biophys Acta*. 2009. 1793(10):1540-70.
- Chinopoulos C, Adam V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J*. 2006. 273(3):433-50.

- Choi DH, Lee KH, Kim JH, et al. NADPH oxidase 1, a novel molecular source of ROS in hippocampal neuronal death in vascular dementia. *Antioxid Redox Signal*. 2014. 21:533-50.
- Churchwell JC, Morris AM, Musso ND, Kesner RP. Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2010. 93:415-21.
- Churchwell JC, Kesner RP. Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: Interactions and independent parallel processing. *Behav Brain Res*. 2011. 225(2):389-95.
- Craig MC, Maki PM, Murphy DG. The Women's Health Initiative Memory Study: findings and implications for treatment. *Lancet Neurol*. 2005. 4(3):190-4.
- Crepel V, Epsztein J, Ben-Ari Y. Ischemia induces short- and long-term remodeling of synaptic activity in the hippocampus. *J Cell Mol Med*. 2003. 7(4):401-7.
- Csakvari E, Hoyk Z, Gyenes A, Garcia-Ovejero D, Garcia-Segura LM, Parducz A. Fluctuation of synapse density in the arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience*. 2007. 144(4):1288-92.
- Etgen AM, Jover-Mengual T, Zukin RS. Neuroprotective actions of estradiol and novel estrogen analogs in ischemia: translational implications. *Front Neuroendocrinol*. 2012. 32(3):336-52.
- Farkas E, Luiten PGM, Baric F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res*. 2007. 54:162-80.
- Foster TC. Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus*. 2012. 22(4):656-69.
- Foster TC, Defazio RA, Bizon JL. Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Front Aging Neurosci*. 2012. 12(4):1-18
- Foster TC, Sharrow KM, Kumar A, Masse J. Interaction of age and chronic estradiol replacement on memory and markers of brain aging. *Neurobiol Aging*. 2003. 24(6):839-52.
- Daniel JM, Fader AJ, Spencer AL, Dohanich GP. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav*. 1997. 32(3):217-25.

- Dai X, Chen L, Sokabe M. Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacology*. 2007. 52(4):1124-38.
- Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, Brann DW. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*. 2005. 146(6):2749-59.
- Dhandapani KM, Brann DW. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol*. 2007. 42(1-2):70-5.
- Diz-Chaves Y, Kwiatkowska-Naqvi A, Von Hülst H, Pernía O, Carrero P, Garcia-Segura LM. Behavioral effects of estradiol therapy in ovariectomized rats depend on the age when the treatment is initiated. *Exp Gerontol*. 2012. 47(1):93-9.
- Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol*. 2009. 30(3):259-301.
- Downie MM, Heath RW. *Basic statistical methods*. Harper & Row. 1983. New York.
- Du J, Ma M, Zhao Q, et al. Mitochondrial bioenergetics deficits in the hippocampi of rats with chronic ischemia-induced vascular dementia. *Neuroscience*. 2013. 231:345-52.
- Du SQ, Wang XR, Xiao LY, Tu JF, Zhu W, He T, Liu CZ. Molecular Mechanisms of Vascular Dementia: What Can Be Learned from Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion?. *Molecul Neurobiol*. 2017. 54(5):3670-82.
- Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*. 1999. 19(15):6385-93.
- Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. 98(4):1952-7.
- ENASEM, Estudio Nacional de Salud y Envejecimiento en México: ENASEM Descripción de los Archivos de Datos, Versión 1, Septiembre 2013. Disponible en: www.ENASEM.org el 28/10/2016.

- Elzer JG, Muhammad S, Wintermantel TM, Regnier-Vigouroux A, Ludwig J, Schutz G, Schwaninger M. Neuronal estrogen receptor-alpha mediates neuroprotection by 17beta-estradiol. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010. 30(5):935-42.
- Etgen AM, Jover-Mengual T, Zukin RS. Neuroprotective actions of estradiol and novel estrogen analogs in ischemia: translational implications. *Front Neuroendocrinol.* 2012. 32(3):336-52.
- Farkas E, Luiten P, Baric F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* 2007. 54(1):162-80.
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH. Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke.* 2009. 40:2244-50.
- Foster TC, Sharrow KM, Kumar A, Masse J. Interaction of age and chronic estradiol replacement on memory and markers of brain aging. *Neurobiol Aging.* 2003. 24(6):839-52.
- Foster TC. Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus.* 2012. 22(4):656-69.
- Foster TC, Defazio RA, Bizon JL. Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Front Aging Neurosci.* 2012. 12(4):1-18.
- Frankfurt M, Gould E, Woolley CS, McEwen BS. Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: a Golgi study in the adult rat. *Neuroendocrinology.* 1990. 51(5):530-5.
- Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006. 346(3):904-10.
- Garcia-Segura LM, Arévalo MA, Azcoitia I. Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signalling in the nervous system: new advances. *Prog Brain Res.* 2010. 181:251-72.
- Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke.* 1989. 20(12):1627-42.

- González-Burgos I, Alejandre-Gómez M, Cervantes M. Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci Lett*. 2005. 379(1):52-4.
- González-Burgos I. Dendritic spines plasticity and learning/memory processes: theory, evidence and perspectives. In: Baylog, L.R, Dendritic Spines. Biochemistry, Modelling and Properties. Nova Science Publishers, Inc. 2009. New York, pp.163-86.
- González-Burgos I, Velázquez-Zamora D A, González-Tapia D, Cervantes M. A golgi study of the plasticity of dendritic spines in the hypothalamic ventromedial nucleus during the estrous cycle of female rats. *Neuroscience*. 2015. 298:74-80.
- Gordon JA. Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. *Current Opinion in Neurobiology*. 2011. 21(3):486-91.
- Gorelick P, Scuteri A, Black S, DeCarli C, Greenberg S, Iadecola C, Launer L, Laurent S, Lopez O, Nyenhuis D, Petersen R, Schneider J, Tzourio C, Arnett D, Bennett D, Chui H, Higashida R, Lindquist R, Nilsson P, Roman G, Sellke F, Seshadri S. Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. *Stroke*. 2011. 42(9):2672-713.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*. 1990. 10(4):1286-91.
- Griffin GD, Flanagan-Cato LM. Ovarian hormone action in the hypothalamic ventromedial nucleus: remodeling to regulate reproduction. *J Neuroendocrinol*. 2011. 23(6):465-71.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1996. <http://www.nap.edu/readigroom/books/labrats/>
- Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*. 2007. 28(7):726-41.
- Hasselmo ME. A model of prefrontal cortical mechanisms for goal-directed behavior. *J Cogn Neurosci*. 2005. 17(7):1115-29.
- He XL, Wang YH, Gao M, Li XX, Zhang TT, Du GH. Baicalein protects rat brain mitochondria against chronic cerebral hypoperfusion-induced oxidative damage. *Brain Res*. 2009. 1249: 212-21.

- Hossmann K. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology*. 2008. 55(3):257-70.
- Hurd M, Martorell P, Delavande A, Mullen K, Langa K. Monetary Costs of Dementia in the United States. *N Engl J Med*. 2013. 368(14):1326-34.
- Hurtado O, Pradillo JM, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2006. 21:54-63.
- Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol*. 2001. 14(1):89-94.
- Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol*. 2010. 120(3):287-96.
- Iadecola C. The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron*. 2013. 80(4):844-66.
- Ianov L, Kumar A, Foster TC. Epigenetic regulation of estrogen receptor α contributes to age-related differences in transcription across the hippocampal region CA1 and CA3. *Neurobiol Aging*. 2017. 49:79-85.
- Ikedo T, Matsuki N, Yamada MK. Estrogen produced in cultured hippocampal neurons is a functional regulator of a GABAergic machinery. *J Neurosci Res*. 2006. 84(8):1771-7.
- Ishunina TA, Fischer DF, Swaab DF. Estrogen receptor alpha and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007. 28(11):1670-81.
- Ishunina TA, Swaab DF. Estrogen receptor-alpha splice variants in the human brain. *Gynecol Endocrinol*. 2008. 24(2):93-8.
- Ishunina TA, Swaab DF. Hippocampal estrogen receptor-alpha splice variant TADD1 in the human brain in aging and Alzheimer's disease. *Neuroendocrinology*. 2009. 89(2):187-99.
- Jelks KB, Wylie R, Floyd CL, McAllister AK, Wise P. Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-alpha. *J Neurosci*. 2007. 27(26):6903-13.
- Jo YS, Park EH, Kim IH, Park SK, Kim H, Kim HT, et al. The medial prefrontal cortex is involved in spatial memory retrieval under partial-cue conditions. *J Neurosci*. 2007. 27(49):13567-78.

- Jourdain, P., Nikonenko, I., Alberi, S., Muller, D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci.* 2002. 22(8):3108-16.
- Kalita K, Szymczak S, Kaczmarek L. Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus.* 2005. 15(3):404-12.
- Kelly MJ, Qiu J, Ronnekleiv OK. Estrogen signaling in the hypothalamus. *Vitam Horm.* 2005. 71:123-45.
- Lebesgue D, Chevalleyre V, Zukin RS, Etgen AM. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids.* 2009. 74(7):555-61.
- Lebesgue D, Traub M, de Butte-Smith M, Chen C, Zukin RS, Kelly MJ, Etgen AM. Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PLoS One.* 2010. 5(1):e8642.
- Lee I, Kesner RP. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci.* 2003. 23:1517-23.
- Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev.* 2002. 39(1):55-73.
- Leon WC, Bruno MA, Allard S, Nader K, Cuello AC. Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learning & Memory.* 2010. 17:297-305.
- Levin ER. Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Mol Endocrinol.* 2005. 19(8):1951-9.
- Levine D, Langa K. Vascular Cognitive Impairment: Disease Mechanisms and Therapeutic Implications. *Neurotherapeutics.* 2011. 8(3):361-73.
- Lewis DK, Johnson AB, Stohlgren S, Harms A, Sohrabji F. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *J Neuroimmunol.* 2008. 195(1-2):47-59.
- Letchipía-Vallejo G, López-Loeza E, Espinoza-González V, González-Burgos I, Olvera-Cortés ME, Morali G, Cervantes M. Long term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J Pineal Res.* 2007. 42(2):138-46.

- Li CJ, Lu Y, Zhou M, Zong XG, Li C, Xu XL, Guo LJ, Lu Q. Activation of GABAB receptors ameliorates cognitive impairment via restoring the balance of HCN1/HCN2 surface expression in the hippocampal CA1 area in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Mol Neurobiol.* 2014. 50:704-20.
- Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol Rev.* 1999. 79(4): 1431-568.
- Liu F, Day M, Muñíz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci.* 2008. 11(3):334-43.
- Liu M, Kelley MH, Herson PS, Hurn PD. Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinology.* 2010. 35(2):127-43.
- Llibre Rodriguez JJ, Ferri C, Acosta D, Guerra M, Huang Y, Jacob K, Krishnamoorthy E, Salas A, Sosa A, Acosta I, Dewey M, Gaona C, Jotheeswaran A, Li S, Rodríguez D, Rodríguez G, Kumar P, Valhuerdi A, Prince M. Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet.* 2008. 372(9637):464-74.
- López-Vázquez MA, Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, Olvera-Cortés ME. La comunicación entre el hipocampo y la corteza prefrontal en la expresión de procesos cognitivos. Disponible en: Hernández-González M, Guevara-Pérez MA, Amezcua-Gutiérrez CC, Sanz Martín A (Ed). *Aproximaciones al estudio del procesamiento sensorial, emocional y cognoscitivo.* Universidad Veracruzana, (2012). pp 199-241.
- Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav.* 1998. 34(2):149-62.
- Luine VN, Frankfurt M. An Integrative Review of Estradiol Effects on Dendritic Spines and Memory over the Lifespan. Disponible en: Kahn, Scott M. (Ed.), *Sex Steroids.* IntechOpen, (2012).
- Luine VN. Estradiol and cognitive function: Past, present and future. *Horm Behav.* 2014. 66(4):602-18.
- Luna G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology,* 3rd ed. McGraw-Hill. 1960. New York.

- Maki PM. Hormone therapy and cognitive function: is there a critical period for benefit? *Neuroscience*. 2006. 138(3):1027-30.
- Marin R, Díaz M, Alonso R, Sanz A, Arévalo MA, Garcia-Segura LM. Role of estrogen receptor alpha in membrane-initiated signaling in neural cells: interaction with IGF-1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009. 114(1-2):2-7.
- Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, Hosokawa K, Kawamura A, Itose M, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neurosci Lett*. 2008. 441(1):94-9.
- McEwen BS, Gould E, Orchinik M, Weiland NG, Woolley CS. Oestrogens and the structural and functional plasticity of neurons: implications for memory, ageing and neurodegenerative processes. In: Goode J. Editor. *Ciba Foundation Symposium #191 The Non-reproductive Actions of Sex Steroids*. CIBA Foundation. 1995. London. p. 52-73
- McEwen BS; Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*. 1999. 20(3):279-307.
- McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *BehavNeurosci*. 2012. 126(1):4-16.
- Mejia-Arango S, Gutierrez-Robledo LM. Prevalence and incidence rates of dementia and cognitive impairment no dementia in the Mexican population: data from the Mexican Health and Aging Study. *J Aging Health*. 2011. 23(7):1050-74.
- Méndez P, García-Segura LM, Müller D. Estradiol pro-motes spine growth and synapse formation without affecting pre-established networks. *Hippocampus*. 2011. 21(12):1263–7.
- Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP, Alves SE. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol*. 2001. 429(9):355-71.
- Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 2005. 491(2):81-95.
- Montoya-Fraga N, Cervantes M, Moralí G. (2016). Evaluación Morfológica y Funcional de los Efectos Neuroprotectores del Estradiol Contra el Daño Cerebral

- Inducido por Hipoperfusión Cerebral Crónica, en Ratas. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Moralí G, Cervantes M. Neuroprotective effects of estrogens against cerebral ischemia. En: Gonzalez-Burgos I (Ed.) Estrogens and Cognition. Psychobiological and Clinical Aspects. Research Signpost/Transworld Research Network, 37/661(2) Fort, P.O. Trivandrum-695 023. 2014. Kerala, India. pp 153-86.
- Morris RGM. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Met.* 1984. 11(1):47-60.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem.* 2007. 100(4):950-67.
- Naftolin F, Garcia-Segura LM, Horvath TL, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, Leranth C, Vondracek-Klepper S, Lewis C, Chang A, Parducz A. Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reprod Sci.* 2007. 14(2):101-16.
- Ni JW, Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res.* 1994. 653(1-2):231-6.
- Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999; Guía Para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf
- Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, Anayama H, Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neurosc.* 1997. 79(4):1039-50.
- Olvera-Cortés ME, García-Alcántara I, Gutierrez-Guzmán B, Hernández-Pérez JJ, López-Vázquez MA, Cervantes M. Differential learning-related changes in theta activity during place learning in young and old rats. *Behavioural Brain Research.* 2012. 226:555-562.
- Organización Mundial de la Salud. Demencia, una prioridad de salud pública. 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/98377/9789275318256_spa.pdf;jsessionid=C529584F26D7D9FA430AED3CBA75E26E?sequence=1

- Organización Mundial de la Salud. Demencia. 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/> el 16/04/18.
- Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurements of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003. 30(4):266-72.
- Ozacmak H, Figen B, Hale S. Melatonin provides neuroprotection by reducing oxidative stress and HSP70 expression during chronic cerebral hypoperfusion in ovariectomized rats. *J. Pineal Res*. 2009. 47(2):156-63.
- Pajović SB, Sačić ZS. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiol Res*. 2008. 57(6):801-11.
- Pappas B, De la Torre J, Davidson C, Keyes M, Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res*. 1996. 708(1-2):50-8.
- Parducz A, Hajszan T, Maclusky NJ, Hoyk Z, Csakvari E, Kurunczi A, Prange-Kiel J, Leranth C. Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience*. 2006. 138(3):977-85.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 6th edition. Elsevier, 2009.
- Pérez SE, Chen EY, Mufson EJ. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003. 145(1):117-39.
- Prince M, Acosta D, Ferri CP, Guerra M, Huang Y, Llibre Rodriguez JJ, Salas A, Sosa AL, Williams JD, Dewey ME, Acosta I, Jotheeswaran AT, Liu Z. Dementia incidence and mortality in middle-income countries, and associations with indicators of cognitive reserve: a 10/66 Dementia Research Group population-based cohort study. *Lancet*. 2012. 380(9836):50-8.
- Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Progress in Brain Research*. 1985. 63:29-37.
- Pulsinelli WA, Jacewicz M, Levy DE, Petito CK, Plum F. Ischemic brain injury and the therapeutic window. *Ann N Y Acad Sci*. 1997. 19;835:187-92.
- Rao R. The role of carotid stenosis in vascular cognitive impairment. *Eur Neurol*. 2001. 46(2):63-9.

- Rapp SR, Espeland MA, Shumaker SA, Henderson VW, Brunner RL, Manson JE, Gass ML, Stefanick ML, Lane DS, Hays J, Johnson KC, Coker LH, Dailey M, Bowen D. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003. 289(20):2663-72
- Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*. 2008. 16(2-3):140-53.
- Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res*. 2007. 1176:71-81.
- Rao AK, Dietrich AK, Ziegler YS, Nardulli AM. 17 β -Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: A mechanism to protect neurons from ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011. 127(3-5):382-89.
- Roepke TA, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Physiological consequences of membrane-initiated estrogen signaling in the brain. *Front Biosci*. 2011. 16:1560-73.
- Rosenberg L, Park S. Verbal and spatial functions across the menstrual cycle in healthy young women. *Psychoneuroendocrinology*. 2002. 27(7):835-41.
- Ruan YW, Zou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, Gao TM, Yao Z, Xu ZC. Dendritic plasticity of CA1 neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*. 2006. 140(1):191-201.
- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*. 1992. 99:195-231.
- Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport*. 1998. 9(11):2565-8.
- Saldanha CJ, Remage-Healey L, Schlinger BA. Synaptocrine signaling: steroid synthesis and action at the synapse. *Endocr Rev*. 2011. 32(4):532-49.
- Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, Inzitari D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: What can be learned from experimental models. *J Neurol Sci*. 2002. 203-2014: 263–266.
- Schmidt-Kastner R, Truettner J, Lin B, Zhao W, Saul I, Busto R, Ginsberg MD. Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic

- bilateral common carotid artery occlusions in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001. 92:157-66.
- Schneider LS. Estrogen and dementia: insights from the Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA*. 2004. 291(24):3005-7.
- Sherwin BB, Tulandi T. "Add-back" estrogen reverses cognitive deficits induced by a gonadotropin-releasing hormone agonist in women with leiomyomata uteri. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996. 81(7):2545-9.
- Sherwin BB. Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev*. 2003. 24(2):133-51.
- Sherwin BB. Estrogen and cognitive aging in women. *Neuroscience*. 2006. 138(3):1021-6.
- Siegel S. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill. 1956. New York.
- Spencer JL, Waters EM, Romeo RD, Wood GE, Milner TA, McEwen BS. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol*. 2008. 29(2):219-37.
- Srivastava DP, Penzes P. Rapid estradiol modulation of neuronal connectivity and its implications for disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011. 2:1-17.
- Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim G, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier C, Chan P. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 2004. 1(1):17-25.
- Talboom JS, Williams BJ, Baxley ER, West SG, Bimonte-Nelson HA. Higher levels of estradiol replacement correlate with better spatial memory in surgically menopausal young and middle-aged rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2008. 90(1):155-63.
- Tohgi H, Utsugisawa K, Yamagata M, Yoshimura M. Effects of age on messenger RNA expression of glucocorticoid, thyroid hormone, androgen, and estrogen receptors in postmortem human hippocampus. *Brain Res* 1995. 700(1-2):245-53.
- Ulrich PT, Kroppenstedt S, Heimann A, Kempfski O. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats. *Stroke*. 1998. 29(11):2412-20.

- Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Etteri S, Maggi A. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology*. 2006. 147:2263-72.
- Venkat P, Chopp M, Chen J. Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol*. 2015. 272:97-108.
- Wallace M, Luine V, Arellanos A, Frankfurt M. Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Res*. 2006. 1126(1):176-82.
- Wang L, Zhang X, LuY, Tian M, LiY. Dynamic changes of Apo A1 mediated by LXR/RXR/ABCA1 pathway in brains of the aging rats with cerebral hypoperfusion. *Brain Res Bull*. 2014. 100:84-92.
- Wappler EA, Gál A, Skopál J, Nagy Z. Single, high-dose 17 β -estradiol therapy has anti-apoptotic effect and induces cerebral plasticity following transient forebrain ischemia in gerbils. *Acta Physiol Hung*. 2011. 98(2):189-94.
- Warner D, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol*. 2004. 207:3221-31.
- Waters EM, Yildirim M, Janssen WG, Lou WY, McEwen BS, et al. Estrogen and aging affect the synaptic distribution of estrogen receptor beta-immunoreactivity in the CA1 region of female rat hippocampus. *Brain Res*. 2011. 1379:86-97.
- Westberry JM, Trout AL, Wilson ME. Epigenetic regulation of estrogen receptor beta expression in the rat cortex during aging. *Neuroreport*. 2011. 22(9):428-32.
- Won CK, Kim MO, Koh PO. Estrogen modulate Bcl-2 family proteins in ischemic brain injury. *J Vet Sci*. 2006. 68(3):277-80.
- Woolley CS. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007. 47:657-80.
- Xi Y, Wang M, Zhang W, Baj M, Du Y, Zhang Z, Li Z, Miao J. Neuronal damage, central cholinergic dysfunction and oxidative damage correlate with cognitive deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Neurobiol Learn Mem*. 2014.109:7-19.
- Yague JG, Wang AC, Janssen WG, Hof PR, Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Morrison JH. Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain Res*. 2008. 1209:115-27.
- Zhang B, Subramanian S, Dziennis S, Jia J, Uchida M, Akiyoshi K, Migliati E, Lewis AD, Vandenbark AA, Offner H, Hurn PD. Estradiol and G1 reduce infarct

size and improve immunosuppression after experimental stroke. *J Immunol.* 2010. 184(8):4087-94.

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):13823-36.

Zhu Y, Zhang Q, Zhang W, Li N, Dai Y, Tu J, Yang F, Brann DW, Wang R. Protective Effect of 17 β -Estradiol Upon Hippocampal Spine Density and Cognitive Function in an Animal Model of Vascular Dementia. *Sci Rep.* 2017. 16;7:42660.

Zlokovic B. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011. 12(12):723-38.