



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LOS  
EFECTOS NEUROPROTECTORES DEL ESTRADIOL  
CONTRA EL DAÑO CEREBRAL INDUCIDO POR  
HIPOPERFUSIÓN CEREBRAL CRÓNICA, EN RATAS.**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

P R E S E N T A:

INGENIERA BIOQUÍMICA

**NOEMÍ MONTOYA FRAGA**

DIRECCIÓN DE TESIS:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
**JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO**



**MORELIA, MICH. JULIO, 2016**

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pertenece al:

Padrón de Posgrados de Excelencia CONACyT

La estudiante de la División de Estudios de Posgrado,  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Ingeniera Bioquímica  
Noemí Montoya Fraga

Recibió beca del CONACyT durante la realización de las actividades académicas y la tesis correspondientes al programa de Maestría en Ciencias de la Salud

Registro de becaria: 305212

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 de Maestría en Ciencias de la Salud que presentó:

Ingeniera Bioquímica. Noemí Montoya Fraga

Doctora en Ciencias  
Gabriela Morali de la Brena.

---

Doctora en Ciencias Biomédicas  
Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo.

---

Doctora en Ciencias Fisiológicas  
Bertha Fenton Navarro.

---

Doctora en Ciencias Especialidad en Farmacología  
Marcia Yvette Gauthereau Torres.

---

Director de tesis:

Doctor en Ciencias Biomédicas José Miguel Cervantes Alfaro.  
Profesor Investigador Titular C, TC.  
Laboratorio de Neurociencias, División de Estudios de Posgrado.  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Colaboradores:

Doctora en Ciencias Biomédicas Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo  
Profesor Investigador Titular A  
Laboratorio de Neurociencias, División de Estudios de Posgrado.  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias del Comportamiento María Esther Olvera Cortés  
Investigadora Titular B  
Laboratorio de Fisiología Experimental  
Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), IMSS.

Maestro en Ciencias de la Salud Manuel López Rodríguez  
Profesor Investigador Asociado B, TC  
Laboratorio de Histopatología de la USAD  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias Gabriela Morali de la Brena  
Investigadora Titular C  
Unidad de Investigación Médica en Farmacología. UMAE.  
Hospital de Especialidades  
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS

El proyecto de investigación correspondiente a la presente tesis de Maestría en Ciencias de la Salud 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)

Laboratorio de Histopatología, USAD  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

## **AGRADECIMIENTOS**

*La presente Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud, así como las actividades académicas realizadas para la obtención del grado de Maestría en Ciencias de la Salud han sido posibles gracias al apoyo recibido mediante la Beca otorgada por el CONACYT, para llevar al cabo y culminar exitosamente este proceso académico.*

*Primero y como más importante, agradezco sinceramente a mi asesor de Tesis, Doctor en Ciencias Biomédicas José Miguel Cervantes Alfaro, su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación.*

*Agradezco de manera especial a los integrantes del Comité Tutorial, quienes aprobaron, supervisaron y aportaron importantes sugerencias y recomendaciones para el desarrollo y avance del proyecto de investigación, que ha culminado con la presentación de la presente Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud.*

*Así mismo expreso mi agradecimiento a los Profesores Investigadores integrantes de la planta docente de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, por sus enseñanzas y participación en mi desarrollo académico.*

*La autora de la presente Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud agradece el valioso apoyo metodológico recibido para la realización del trabajo experimental de la misma, por parte de:*

*Doctora en Ciencias del Comportamiento María Esther Olvera Cortés del Laboratorio de Neurofisiología Experimental, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, IMSS.*

*Maestro en Ciencias de la Salud Manuel López Rodríguez del Laboratorio de Histopatología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH.*

## DEDICATORIA

A:

**Dios**, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

**Mis padres**, que a pesar de que no están conmigo de forma física su recuerdo y amor infinito siguen siendo el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

**Mis hermanos**, Por su apoyo moral, sus consejos, por escucharme, pero sobre por su amor incondicional.

**Mis amigos**, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Alicia Viveros, Lizeth Flores, Andrés Raya, Armando Benítez, Manuel Vargas y Luis Miguel Saavedra, por haberme ayudado a realizar este trabajo y ser compañeros del mismo trayecto forjado.

También de manera muy especial a mis amigos de toda la vida Edward Hinojosa, Cynthia Bartolo y Yamín Solís, por su inmenso apoyo, por soportarme en las buenas y malas, por ese ánimo cuando las cosas no pintan bien. Gracias infinitas.

## RELACIÓN DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Valores (Media $\pm$ EE) de la distancia de nado.	<b>27</b>
<b>Tabla 2.</b> Número (Media $\pm$ EE) y porcentaje de neuronas piramidales remanentes en una extensión de 500 $\mu$ m lineales en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en las diferentes condiciones experimentales.	<b>34</b>

## RELACIÓN DE FIGURAS.

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Valores (Mediana y Rango) de las latencias de escape de los diferentes grupos experimentales, durante los 7 días de prueba.	<b>26</b>
<b>Figura 2.</b> Trayectorias de nado de uno de los animales representativo de cada uno de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris.	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> Tiempo (s) de permanencia (media $\pm$ EE) en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia.	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b> Tiempo de permanencia (media $\pm$ EE) en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma en los diferentes grupos experimentales.	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Velocidad de nado de los animales en los diferentes grupos experimentales los días de prueba en el laberinto acuático de Morris.	<b>31</b>
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografías que ilustran el aspecto de la población neuronal del segmento CA1 del hipocampo.	<b>32</b>
<b>Figura 7.</b> Número de neuronas piramidales (Media $\pm$ EE) remanentes en una extensión de 500 $\mu$ m lineales del estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en las diferentes condiciones experimentales.	<b>33</b>

## ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
• Generalidades.	<b>3</b>
• Mecanismos celulares de daño neuronal inducidos por la isquemia cerebral.	<b>4</b>
• Modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica (HCC).	<b>7</b>
• Estudios experimentales de neuroprotección.	<b>7</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	
• Efectos neuroprotectores del estradiol en modelos de isquemia cerebral global y de isquemia cerebral focal aguda.	<b>10</b>
• Otros mecanismos de neuroprotección por estradiol.	<b>17</b>
• Neurorreparación del tejido cerebral dañado por la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral.	<b>17</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>20</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>21</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>39</b>





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



## Evaluación morfológica y funcional de los efectos neuroprotectores del estradiol contra el daño cerebral inducido por hipoperfusión cerebral crónica, en ratas.

**Introducción.** La reducción del flujo sanguíneo cerebral de manera crónica que puede ocurrir durante el envejecimiento y como parte de enfermedades cerebrovasculares, metabólicas y neurodegenerativas, provoca la muerte neuronal en estructuras cerebrales involucradas en las funciones cognitivas. De ahí la importancia del estudio de procedimientos de neuroprotección tendientes a prevenir o reducir el daño cerebral inducido por la hipoperfusión cerebral crónica. **Objetivos.** Evaluar los efectos neuroprotectores del estradiol sobre la estructura y el funcionamiento del hipocampo, en el modelo de hipoperfusión cerebral crónica (HCC), en la rata. **Materiales y métodos.** Se incluyeron en el estudio los siguientes grupos experimentales (ratas Sprague-Dawley 300-350g, ovariectomizadas): Sham (HCC simulada, n=8); E2 (benzoato de estradiol 5µg/día, sc, n=8); HCC-Veh (HCC + vehículo, aceite vegetal, 0.06ml/día, sc n=8); HCC-E2-5 (HCC + benzoato de estradiol 5µg/día, sc, n=8); HCC-E2-10 (HCC + benzoato de estradiol 10µg/día, sc, n=8). Luego de cuarenta días de los procedimientos anestésico-quirúrgicos y de tratamiento con benzoato de estradiol se evaluó el aprendizaje/memoria espacial de los animales de experimentación en el laberinto acuático de Morris (dos ensayos diarios de aprendizaje durante 7 días y una prueba de transferencia en el día 8). Al término de estas pruebas se evaluó, en los diferentes grupos experimentales, la población de neuronas piramidales (cortes coronales seriados de 7 µm de espesor, teñidos con violeta de Cresilo) remanentes en una extensión lineal de 500 µm en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo (Leica Microsystems Mod. LAS06886). **Resultados.** Las alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial (retraso de 2-3 días en el aprendizaje espacial y eficiencia significativamente menor en la prueba de memoria espacial); así como la reducción significativa (30% menos en comparación con el grupo Sham, 100%) de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo que fueron inducidas por la HCC en ausencia de actividad estrogénica atribuible al estradiol secretado por el ovario (grupo HCC-Veh), fueron prevenidas por el tratamiento crónico con benzoato de estradiol (grupos: HCC-E2-5, HCC-E2-10). **Conclusiones.** La administración crónica de benzoato de estradiol dio lugar a efectos neuroprotectores reduciendo el daño neuronal en el cuerno de Ammon del hipocampo y las alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial dependientes del funcionamiento del hipocampo, inducidas por la hipoperfusión cerebral crónica, en ratas ovariectomizadas.

**Palabras clave.** Neuroprotección, estradiol, estructura y función del hipocampo, hipoperfusión cerebral crónica, ratas ovariectomizadas.



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



**Morphological and functional evaluation of neuroprotective effects of estradiol against brain damage elicited by chronic cerebral hypoperfusion, in rats.**

**Introduction.** Chronic reduction of cerebral blood flow that may occur during aging and as a pathophysiological component of cerebrovascular, metabolic and neurodegenerative diseases, leads to neuronal death in brain structures mainly involved in cognitive functions. Hence, it seems relevant the evaluation of neuroprotective procedures aiming to prevent or to reduce the brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion (CCH). **Objectives.** Evaluation of neuroprotective effects of estradiol on hippocampal structure and function under the experimental model of CCH, in rats. **Materials and Methods.** Five experimental groups (Sprague-Dawley female, ovariectomized rats; 300-350g BW) were included for the present study, as follows: Sham (Sham simulated CCH, n=8); E2 (estradiol benzoate 5µg/day, sc, N=8); CCH-Veh (CCH + sesame oil 0.06 ml/day sc, n=8); CCH-E2-5 (CCH + estradiol benzoate 5µg/day, sc, N=8); CCH-E2-10 (CCH + estradiol benzoate 10µg/day, sc, n=8). Forty days after surgical procedures were effected and daily treatments started, performance of animals of the different experimental groups was daily evaluated under spatial learning/memory tests in the Morris water maze (two daily learning trials during 7 days and a probe trial at day 8). Immediately after these learning/memory tests, pyramidal neuron population (serial coronal 7 µm thick slides, Cresyl violet staining) was evaluated by counting the number of remaining pyramidal neurons into a 500 µm lineal extension on the CA1 pyramidal layer of the hippocampal Ammon's horn (Leica Microsystems Mod. LAS06886). **Results.** Alterations of spatial learning/memory (2-3 delay in learning acquisition and significant low efficiency in the probe trial); as well as a significant reduction (30%, as compared to Sham group) of hippocampal pyramidal neuron population in the CA1 segment of the Ammon's horn, that would have been induced by CCH under the absence of estrogenic activity from ovarysecreted estradiol (group: HCC-Veh), were prevented by estradiol benzoate treatment (groups: HCC-E2-5, HCC-E2-10). **Conclusions.** Chronic estradiol benzoate treatment led to neuroprotective effects, by reducing the neuronal damage in the Ammon's horn of hippocampus; as well as counteracting those alterations of hippocampal dependent spatial learning/memory, induced by chronic cerebral hypoperfusion, in ovariectomized rats.

**Key words.** Neuroprotection, estradiol, hippocampal structure and function, cerebral chronic hypoperfusion, ovariectomized rats.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Generalidades**

La demencia asociada al avance de la edad durante el proceso de envejecimiento, es una condición fisiopatológica usualmente irreversible que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas. La demencia se ha considerado como uno de los principales problemas de salud en la actualidad; las evaluaciones de la Organización Mundial de la Salud muestran que poco más de 35 millones de personas en el mundo viven actualmente con demencia grave e incapacitante y se anticipa que este número puede incrementarse considerablemente para el año 2050, dado que anualmente se diagnostican aproximadamente 7 millones de nuevos casos de demencia [1]. Esto implica una enorme carga de atención médica, cuidados personales y costos que, en algunos aspectos, ya han sobrepasado a los generados por las enfermedades oncológicas o cardiovasculares [2]. En México, el estudio de base poblacional realizado para la evaluación de la demencia indica que su prevalencia en ancianos de bajo y mediano ingreso económico es de 8.6% y 8.5% para las áreas urbana y rural, respectivamente [3].

La demencia forma parte de un grupo heterogéneo de trastornos cerebrales en los que el deterioro cognoscitivo es atribuible a patologías cerebrovasculares, que parecen ser la causa primaria de al menos el 20% de los casos de demencia, así como ser parte de los fenómenos fisiopatológicos concurrentes a otras etiologías neurodegenerativas de la demencia entre las que destaca la enfermedad de Alzheimer [4-6]. Así mismo, se ha mostrado la importancia de la relación funcional y la sinergia fisiopatológica entre neuronas, células gliales, y células vasculares [7-9] como parte de los procesos cerebrales en los que alteraciones en los vasos sanguíneos cerebrales y el flujo sanguíneo en estructuras cerebrales específicas podrían contribuir al daño cerebral subyacente al deterioro cognoscitivo.

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 CO<sub>2</sub>, 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. Debido a los altos requerimientos y a la falta de reservas de energía, el suministro continuo de oxígeno y glucosa a través de un flujo sanguíneo bien regulado es una condición indispensable para el funcionamiento cerebral normal [10]. De hecho, la mayor parte de la energía que se utiliza en el cerebro corresponde al gasto energético generado por la operación de los mecanismos neuronales de transporte activo que mantienen los gradientes iónicos trans-membranales indispensables para la generación y el flujo de señales eléctricas y químicas involucradas en el funcionamiento neuronal y la comunicación celular sináptica, en los circuitos neuronales que forman las diferentes estructuras cerebrales [11].

### **Mecanismos celulares de daño neuronal inducidos por la isquemia cerebral.**

La supresión o la reducción del flujo sanguíneo cerebral de manera global y aguda pueden dar lugar a diversas alteraciones de la homeostasis celular que han sido consideradas como fenómenos fisiopatológicos capaces de iniciar diversos procesos de daño y muerte en neuronas vulnerables. Entre estos se incluye: la acumulación intracelular anormal de calcio y sodio y la despolarización subsecuente como resultado de la falla de los procesos dependientes de energía que mantienen los gradientes iónicos trans-membranales; la despolarización anormal de las terminales sinápticas, el ingreso adicional anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , la liberación de neurotransmisores excitatorios tales como glutamato, la activación de canales de sodio y calcio operados por los propios receptores de glutamato, que contribuyen al proceso de excitotoxicidad por incremento anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a partir de sus depósitos intracelulares. La sobrecarga anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que puede provocar la activación directa de lipasas, proteasas y nucleasas calcio-dependientes con la consiguiente lipoperoxidación de membranas celulares, y la degradación química de proteínas estructurales y funcionales, así como de macromoléculas, incluyendo a los ácidos nucleídos [12-14].

Además, el incremento anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provoca: daño de la estructura y alteraciones funcionales de la mitocondria; funcionamiento mitocondrial anormal;

la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, que exceden la capacidad de las reservas antioxidantes de las neuronas; una situación que puede agravarse por la presencia de sustratos que pueden ser transformados en radicales libres peroxidantes que dan lugar a diversas alteraciones estructurales en las células nerviosas y eventual ruptura de la barrera hematoencefálica [12, 13, 15-16].

El incremento anormal de  $Ca^{2+}$  intracelular y el daño mitocondrial subsecuente pueden dar lugar a daño neuronal adicional debido a la activación de la secuencia de señalización pro-apoptótica: vías dependientes del factor nuclear  $\kappa B$  y p53; cambios de la relación Bcl-2 - Bax; apertura de poros mitocondriales de transición; liberación de citocromo c, activación de caspasas [13, 17].

Además, la muerte neuronal por apoptosis puede ser inducida por la activación de vías de señalización independientes de caspasas: expresión de familias de genes, de proteínas de choque térmico, inflamación, apoptosis; activación de enzimas involucradas en la fragmentación del DNA, interrupción de la síntesis de proteínas y muerte neuronal [12, 18].

Por otra parte, la acumulación anormal de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno inducidas por la alteración del flujo sanguíneo cerebral, incluyendo anión superóxido, radical hidroxilo, anión peroxilnitrito, son mediadores de daño tisular por inflamación mediante la activación y secreción de citosinas inflamatorias: factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), ciclo-oxigenasa-2 (COX-2), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), que originan reacciones inflamatorias en las estructuras cerebrales [13, 20- 21].

La existencia de mecanismos de reparación neuronal y mecanismos de plasticidad que involucran ajustes de la citoarquitectura, la densidad sináptica y la conectividad que tienen lugar, simultáneamente o consecutivamente a los mecanismos de daño cerebral, en las estructuras cerebrales muy vulnerables o poco vulnerables que han sido expuestas a la reducción o supresión del flujo sanguíneo cerebral, da lugar a que las neuronas puedan sobrevivir y permanecer en dichos circuitos neuronales. Esto puede influir de manera decisiva en la alteración o la pérdida permanente de funciones cerebrales específicas o en la

recuperación funcional como resultado final a largo plazo de la reducción o supresión del flujo sanguíneo cerebral [19, 22-26]. Cuando la reducción del flujo sanguíneo cerebral afecta de manera global y aguda al cerebro, su magnitud, su duración y el grado de vulnerabilidad selectiva de diferentes tipos neuronales determinan la localización y la intensidad del daño cerebral. En estas condiciones se ha mostrado que las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo son las neuronas más vulnerables, seguidas por las neuronas piramidales de las capas 3, 5 y 6 de la corteza cerebral, las células de Purkinje y las neuronas espinosas del cuerpo estriado. Así mismo, la diferente latencia, magnitud y curso temporal, de minutos a semanas, de los mecanismos celulares de daño cerebral y muerte neuronal inducidos por la reducción del flujo sanguíneo cerebral, así como el inicio y el curso temporal de los mecanismos celulares de reparación neuronal, plasticidad y recuperación funcional, son referencias importantes para establecer la diferente relevancia de dichos mecanismos en el curso de períodos críticos para el daño y muerte o para la reparación neuronal y para los procesos de restauración morfológica y funcional del cerebro. De la misma manera pueden determinarse las características de la “ventana de oportunidad” para la eficiencia de procedimientos neuroprotectores [13, 18-19, 21, 27-29].

En particular, varios de los mecanismos fisiopatológicos descritos como factores concurrentes en el daño cerebral resultante de la isquemia cerebral global aguda, han sido asimismo involucrados en el daño a las estructuras cerebrales del hipocampo y de la corteza cerebral bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica. Entre ellos destacan: estrés oxidativo, neuroinflamación, disfunción de sistemas de neurotransmisores (colinérgico, GABAérgico), disfunción mitocondrial y procesos pro-apoptóticos, lipoperoxidación y alteración de la secreción de factores tróficos, en estructuras cerebrales especialmente vulnerables (hipocampo, corteza prefrontal) y en las que la reducción del flujo sanguíneo cerebral luego de HCC son proporcionalmente mayores que en otras partes del cerebro [30- 32].

### **Modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica (HCC)**

El modelo de HCC se ha desarrollado en animales para estudiar las condiciones y consecuencias de reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral FSC que pueden ocurrir en seres humanos [33-36]. El modelo, en su versión original, consiste en la oclusión simultánea, permanente de ambas arterias carótidas comunes en ratas (oclusión de 2 vasos, 2VO), lo cual provoca una reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC) de aproximadamente 35-45 % en las áreas corticales, y del 60% en el hipocampo [37-38]. En estas condiciones se han observado diversas alteraciones progresivas del funcionamiento cerebral que incluyen: la pérdida neuronal de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, gliosis, deterioro de las funciones cognitivas de aprendizaje y memoria espacial y memoria de trabajo; así como la reducción de la actividad de la acetil-transferasa de colina en el hipocampo [35-36, 38-41]. Posteriormente el modelo original de HCC fue modificado, realizando la oclusión de las arterias carótidas comunes de manera secuencial, con un intervalo de 7 días [42], inclusive con sección de las arterias carótidas comunes una vez que fueron ligadas [42]; en estas condiciones la reducción del flujo sanguíneo cerebral también provoca a largo plazo deterioro significativo de funciones cognitivas en pruebas de memoria de referencia y memoria de trabajo espaciales, asociado con una reducción significativa de la población de neuronas piramidales en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo y la presencia de gliosis [42-44]. Este modelo de HCC permite evaluar los efectos de fármacos potencialmente neuroprotectores, de los cuales se esperaría que impidieran o disminuyeran la muerte neuronal inducida por la hipoperfusión cerebral crónica y sus consecuencias sobre las funciones cognitivas.

### **Estudios experimentales de neuroprotección.**

El consenso acerca de las mejores características de los estudios pre-clínicos de neuroprotección ha dado lugar al establecimiento de diversos lineamientos para el diseño de dichos estudios [45]. Estos pueden enfocarse sobre los fenómenos que tienen lugar a diversos niveles de organización biológica en el sistema nervioso central, desde el nivel molecular y celular hasta la integración de fenómenos

cerebrales, sensoriales y motores, complejos y expresiones conductuales y emocionales. En este sentido, deben utilizarse parámetros adecuados para evaluar, a estos distintos niveles de organización biológica, la presencia y magnitud del daño cerebral asociado a la reducción del flujo sanguíneo, así como las consecuencias de mecanismos de neuroprotección generados por el propio cerebro, tales como reparación neuronal y plasticidad, lo mismo que las consecuencias de otros procedimientos neuroprotectores farmacológicos y no farmacológicos. De esta manera, diversas técnicas neuroquímicas y de biología celular se han utilizado en la evaluación temporal y topográfica de: cambios iónicos, liberación de neurotransmisores, modificación de la estructura de los receptores, excitotoxicidad, alteraciones morfológicas y funcionales de la mitocondria, concentraciones de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, expresión y actividad de enzimas antioxidantes y lipoperoxidación, activación de cascadas pro- y anti-apoptóticas, degradación del DNA, procesos pro- y anti-inflamatorios, entre otros, que permiten la evaluación de los procesos que son puntos de partida del daño cerebral y que pueden ser modificados por compuestos neuroprotectores. Además, puede obtenerse información del estado final del daño cerebral resultante de la reducción del flujo sanguíneo cerebral y de los mecanismos de neuroprotección mediante procedimientos de evaluación por neuroimagen (RMF), neurológicos (escalas de deficiencia neurológica), de la conducta (laberinto en cruz elevado, campo abierto), de las funciones cognoscitivas (laberinto de Morris, laberinto de 8 brazos de Olton, Laberinto en T, reconocimiento de objetos novedosos), de neurohistopatología (población neuronal, citoarquitectura neuronal, marcadores inmunohistoquímicos) que se correlacionen con la evolución del daño cerebral a corto o a largo plazo [29, 46-47].

En general los efectos neuroprotectores de compuestos químicos endógenos o exógenos pueden sustentarse conceptualmente en una relación de oposición entre las acciones que pueden ejercer en las neuronas vulnerables que están en riesgo de daño o muerte al quedar expuestas a la reducción del flujo sanguíneo cerebral y los mecanismos fisiopatológicos de muerte neuronal y daño cerebral. Además, las acciones que promueven los procesos de reparación neuronal,

plasticidad, conectividad y remodelación de los circuitos neuronales, dando lugar a recuperación de las alteraciones funcionales provocadas por la reducción del flujo sanguíneo cerebral, son un importante componente de los efectos neuroprotectores de compuestos endógenos o exógenos.

En este sentido, existen datos que han sugerido que los estrógenos endógenos, interaccionando con sus receptores en el cerebro pueden mediar una variedad de acciones que pueden ser consideradas como neuroprotectoras contra los fenómenos fisiopatológicos inducidos por la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral. Se ha observado una relación inversa entre el volumen del infarto y las concentraciones plasmáticas de estradiol en ratas en las que se ha ocluido una de las ramas de la arteria cerebral media durante el proestro, cuando las concentraciones fisiológicas de estradiol alcanzan los valores más altos. En estas condiciones, los infartos son más pequeños que cuando la oclusión de la arteria cerebral media se realiza en cualquier otra fase del ciclo estral. Por el contrario, la administración de antagonistas de receptores de estradiol se asocia con aumento del volumen del infarto luego de oclusión de la arteria cerebral media [48-58]. Así mismo, se han descrito diferencias en la incidencia de infarto cerebral y de su evolución asociadas al sexo de los individuos, que han permitido sugerir que los estrógenos endógenos ejercen acciones neuroprotectoras contra la isquemia cerebral en las mujeres, en tanto se mantenga la síntesis y secreción de estrógenos ováricos [51-55]. Además, la importancia de los estrógenos sintetizados en el cerebro, como resultado de la actividad de la aromatasa de andrógenos, ha sido sustentada por resultados experimentales que muestran que luego de la administración de inhibidores de la aromatasa cerebral, el volumen de los infartos provocados por la oclusión de la arteria cerebral media es mayor que el de los observados en ratas ovariectomizadas. Por ello se ha sugerido que tanto los estrógenos sintetizados en el ovario como los estrógenos sintetizados en el cerebro pueden tener un efecto aditivo de neuroprotección contra el daño cerebral provocado por la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral [56-61].

## **ANTECEDENTES**

### **Efectos neuroprotectores del estradiol en modelos de isquemia cerebral global y de isquemia cerebral focal aguda.**

Diversos aspectos de los efectos neuroprotectores del estradiol, en estudios clínicos y en modelos experimentales con reducción del flujo sanguíneo e isquemia cerebral han sido revisados recientemente [50-51].

Los resultados de muchos estudios experimentales han mostrado que tanto el estradiol de origen endógeno como el estradiol administrado en diversos esquemas de tratamiento ejercen efectos neuroprotectores en modelos de isquemia cerebral focal o de isquemia cerebral global en animales de experimentación. En estas condiciones, el estradiol previene la alteración o promueve la recuperación de las funciones cognitivas, aprendizaje y memoria visual y espacial, inducidas por el daño cerebral debido a la reducción del flujo sanguíneo cerebral [62-68]. El pre-tratamiento con estradiol, que da lugar a concentraciones plasmáticas similares a las que alcanza este esteroide durante el proestro, o bien la administración que provoca concentraciones supra-fisiológicas de estradiol, reduce la lesión del hipocampo y preserva la integridad funcional de esta estructura como lo muestra la reducción de las deficiencias cognitivas que se esperaría que ocurrieran luego de la reducción global del flujo sanguíneo e isquemia cerebral global. Así, el estradiol disminuye la pérdida de neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo en gerbos machos y en gerbos y ratas hembras ovariectomizadas, reduce el deterioro de funciones cognitivas dependientes del funcionamiento del hipocampo y previene la supresión de la activación de las conexiones sinápticas colaterales de Schaffer con las neuronas piramidales del segmento CA1 y la generación de la potenciación de larga duración en el cuerno de Ammon del hipocampo; que ocurrirían luego de la isquemia en ausencia de tratamiento neuroprotector [62, 69-75].

En el caso de reducción del flujo sanguíneo cerebral e isquemia focal, inducidos por la oclusión de una rama de la arteria cerebral media en animales de experimentación, se observó una relación inversa entre el volumen del infarto

cerebral y la concentración plasmática de estradiol en el proestro, que es la concentración plasmática más alta en condiciones fisiológicas, en la rata [48-50].

Además, la administración de estradiol antes o después de la oclusión de la arteria cerebral media, ejerce efectos neuroprotectores en ausencia de estrógenos de origen ovárico, luego de un tiempo breve después de ovariectomía, pero no tiene efectos neuroprotectores si la isquemia y el tratamiento neuroprotector tienen lugar después de un período prolongado a partir de la ovariectomía. Los resultados de varios estudios muestran que diferentes dosis de estradiol, diferentes esquemas de tratamiento cuyo inicio puede variar con respecto al momento en que se induce la isquemia (14 días a 6 h antes; 30 min a 6 h después), provocan una reducción del volumen del infarto cerebral, en comparación con animales de experimentación tratados solamente con vehículo. En estos estudios el efecto neuroprotector puede ser dependiente de la dosis, del esquema de tratamiento, del momento de inicio del tratamiento antes o después del momento en que ocurre el episodio de isquemia [65-66, 68, 76-77].

Se ha sugerido que el efecto neuroprotector del estradiol puede ser dependiente de las concentraciones plasmáticas, que pueden variar en el rango de las mayores concentraciones fisiológicas, que pueden alcanzarse por diferentes dosis y esquemas de tratamiento con estradiol. Por el contrario, las concentraciones plasmáticas supra-fisiológicas de estradiol pueden incrementar el daño cerebral inducido por la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral. A este respecto se ha enfatizado que a las concentraciones plasmáticas fisiológicas de estradiol pueden ser activados varios mecanismos que concurren para el efecto neuroprotector del estradiol, incluyendo la interacción con sus receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  nucleares y no nucleares, con receptores en la membrana ligados a vías de señalización intracelular y otros mecanismos moleculares directos. En cambio, los efectos perjudiciales de las concentraciones supra-fisiológicas de estradiol en condiciones de reducción de flujo sanguíneo e isquemia cerebral pueden ser debidos a incremento de estrés oxidativo, inflamación y excitotoxicidad [78-80]. Estas diferencias en la respuesta a los diversos tratamientos neuroprotectores con estradiol en situaciones de reducción del flujo sanguíneo e isquemia cerebral

global o focal pueden deberse a la relevancia que los múltiples mecanismos celulares conducentes al daño cerebral pueden tener en diversos momentos con respecto a la isquemia y a su curso temporal en diferentes estructuras cerebrales y diferentes tipos neuronales que son sitios de acción del estradiol, como puede ser el caso de los sistemas de señalización pro-apoptóticos en diferentes regiones cerebrales [79, 81-86].

#### Receptores a estrógenos ER $\alpha$ y ER $\beta$ en neuroprotección.

Se sabe que los ER $\alpha$  y los ER $\beta$  son los dos receptores primarios del estradiol, localizados en el núcleo, el citoplasma y la membrana de las neuronas, en las cuales son los mediadores de las señales genómicas y no genómicas involucradas en las acciones y los efectos del estradiol. Los ER $\alpha$  se localizan con gran densidad en el hipocampo, el hipotálamo y el área preóptica, mientras que su densidad es baja en la corteza cerebral. En contraste, los ER $\beta$  se localizan 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 para-ventricular del hipotálamo, el tálamo, el área tegmental ventral, la sustancia negra y el cerebelo [87-93]. Así mismo, se ha descrito la cooperación de los ER $\alpha$  y los ER $\beta$  y sus co-activadores en la regulación coordinada de la codificación de genes tanto en el DNA nuclear como en el DNA mitocondrial para las proteínas involucradas en la cadena respiratoria [88]. Tanto los ER $\alpha$  como los ER $\beta$  se expresan también en los astrocitos, y la síntesis y liberación de factores de crecimiento neuroprotectores, como resultado de las acciones del estradiol en estas células, puede ser, bajo ciertas condiciones, un mecanismo neuroprotector [59, 94-97]. Los datos experimentales que se han acumulado indican un papel preponderante de los ER $\alpha$  como mediadores de la neuroprotección del estradiol contra el daño cerebral por isquemia. Sin embargo, la participación de los ER $\beta$  como mediadores de la neuroprotección del estradiol no ha sido descartada. Esta propuesta se ha sustentado principalmente en estudios de neuroprotección efectuados en animales “knockout” o “knockdown” y en estudios con agonistas o antagonistas selectivos de los ER $\alpha$  y de los ER $\beta$  [47, 69, 74, 81, 98-99].

### Receptores a estradiol acoplados a Proteínas G (GPR30) en neuroprotección.

Se ha descrito que el estradiol puede inducir fenómenos celulares que ocurren con mayor rapidez que los que están mediados por los receptores estrogénicos clásicos ER $\alpha$  y ER $\beta$ . En efecto ciertas acciones, dependientes o independientes de procesos de transcripción, del estradiol en el cerebro pueden estar mediadas por un receptor con siete dominios trans-membranales acoplado a Proteínas G denominado GPR30 o GPER1, localizado en la membrana plasmática y en la membrana del retículo-endoplasmico de las neuronas en varias estructuras cerebrales, incluyendo el hipocampo, el hipotálamo y el cuerpo estriado, entre otras [85-86] 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 [82, 100-101]. Así mismo, varios análogos químicos del estradiol no feminizantes que carecen de afinidad por los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$ , pueden ejercer efectos neuroprotectores contra el daño cerebral en modelos experimentales de isquemia focal, aunque no se tiene la certeza de estos efectos estén mediados por el GPR30, ni el papel que tiene este receptor en los efectos neuroprotectores del estradiol endógeno [104].

Dado que estos análogos de estradiol no feminizantes no tienen interacción con los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$ , se esperaría que no tuvieran acciones sobre la glándula mamaria, el útero, la coagulación sanguínea; sin embargo, pueden tener eficacia como neuroprotectores en la terapia hormonal de remplazo en mujeres post-menopáusicas [62, 77, 105].

### Reducción del incremento anormal de ROS de origen mitocondrial.

Las acciones del estradiol en la mitocondria, regulación de la generación de ATP, producción de ROS, factores pro-apoptóticos mitocondriales y mecanismos antioxidantes, contribuyen a la preservación de la función mitocondrial y pueden tener una contribución relevante entre los mecanismos de neuroprotección por estradiol. De hecho, la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral inducen disfunción mitocondrial que forma parte importante de la fisiopatología del daño cerebral en estas condiciones generando especies reactivas de oxígeno

(ROS), estrés oxidativo, que comprometen las reservas antioxidantes de las células; así como cascadas de señalización pro-apoptóticas que dan lugar al deterioro y a la muerte neuronal por necrosis o por apoptosis. En estas condiciones, la administración de estradiol provoca un incremento de la actividad de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones, de la fosforilación oxidativa de los sustratos energéticos, la estabilización del ATP y del aporte energético a las neuronas, promoviendo la supervivencia neuronal [16, 84, 106-109].

#### Reducción de la activación de NADPH oxidasa y producción de ROS.

Otras acciones antioxidantes que pueden ser ejercidas por el estradiol pueden también contribuir a sus efectos neuroprotectores. Este es el caso de la reducción del incremento de la actividad de la NADPH oxidasa, de la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) que ocurren en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo luego de la reducción del flujo sanguíneo y de la isquemia cerebral. Estos efectos se relacionan con la reducción de la lipoperoxidación, el daño oxidativo al DNA y la neuroprotección, en ratas. Además, el tratamiento con estradiol antes de isquemia cerebral global previene (mediante la participación de Akt) el incremento de GTPasa y Rac, que es indispensable para la activación de NOX2 NADPH, que en ausencia de tratamiento con estradiol, serían inducidos por la isquemia cerebral; la inhibición de la NOX2 NADPH oxidasa se ha asociado con la reducción de factores y marcadores de apoptosis, tales como Bax, Bcl-2 y tinción TUNEL, sugiriendo que la activación de la NADPH oxidasa puede dar lugar a muerte neuronal por apoptosis luego de isquemia cerebral [81, 87, 108-115].

#### Modulación de enzimas antioxidantes

Las concentraciones fisiológicas de estradiol pueden ser neuroprotectoras a través de la modulación de la actividad de enzimas antioxidantes, incluyendo la superóxido-dismutasa, la catalasa y la glutatión-peroxidasa, como se ha mostrado en modelos experimentales de isquemia cerebral in vitro e in vivo. Sin embargo, no se ha observado esta actividad antioxidante en varones o mujeres viejas después de infarto cerebral [116-120].

### Captura de ROS

El atrapamiento de radicales hidroxilo, sin la participación de ERs, puede ser agregado a los mecanismos neuroprotectores del estradiol como consecuencia de la formación de estrógenos a partir de quinoles no fenólicos, sin generación de especies reactivas de oxígeno [121].

### Participación de las células gliales en la neuroprotección por estradiol

Varias acciones neuroprotectoras del estradiol se ha observado que están mediadas por la interacción del esteroide con receptores a estradiol (ERs) expresados por los astrocitos. Así, el estradiol puede regular la gliosis y la inflamación, mediante la inhibición de la liberación de mediadores molecula es pro-inflamatorios, y del edema; así como el incremento de la captura de glutamato extracelular. Además, el estradiol puede regular la producción de otros factores tróficos y otras moléculas neuroprotectoras por los astrocitos y promover de esta manera la supervivencia neuronal [94, 97].

### Reducción de las respuestas inflamatorias

Las concentraciones plasmáticas de estradiol son capaces de ejercer acciones anti-inflamatorias que pueden estar involucradas en la neuroprotección; tal es el caso de la supresión de la respuesta inmune de la microglía mediada por la activación de la iNOS, y la producción de mediadores pro-inflamatorios, como la metaloproteinasa, la prostaglandina E2 y la ciclo-oxigenasa2 [75, 122-125].

### Liberación de factores tróficos por los astrocitos en neuroprotección

Varios factores tróficos pueden ser liberados por acción del estradiol sobre astrocitos activados; de esta manera, los factores tróficos: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF), Factor Transformador del Factor de Crecimiento- $\beta$  derivado de la Glía (TGF- $\beta$ ), promueven la supervivencia neuronal y pueden ser considerados como parte de los mecanismos neuroprotectores del estradiol contra el daño cerebral provocado por la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral [95-96].

### Restauración del flujo sanguíneo en la zona cerebral afectada por la isquemia

Entre los fenómenos fisiopatológicos de daño cerebral por reducción del flujo sanguíneo e isquemia cerebral, el daño del endotelio vascular en las regiones afectadas puede dar lugar a desregulación de la actividad de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) e inhibición de la producción de NO, que contribuye a la reducción del flujo sanguíneo por incremento del tono del músculo liso vascular en el tejido nervioso. En estas condiciones la remodelación de la red arteriolar pre-existente involucra a la actividad de eNOS y al NO derivado de esta activación, lo cual induce dilatación vascular, proliferación y migración de células endoteliales y de músculo liso vascular de las arteriolas cerebrales, lo que contribuye a integración de la estructura neuro-vascular luego de isquemia cerebral [126-127]. Una acción neuroprotectora del estradiol está ligada a su eficacia para aumentar el flujo sanguíneo cerebral mediante el incremento de la actividad de la eNOS [46, 128].

### Incremento de los mecanismos celulares anti-apoptóticos

Diversos resultados experimentales han sustentado la participación del proto-oncogen Bcl-2, un componente importante de la vía de señalización anti-apoptótica celular, en la sobrevivencia de las células nerviosas y en los efectos de estradiol contra el daño cerebral por isquemia. Así, se ha mostrado que el estradiol previene la regulación a la baja de la expresión de bcl-2 inducida por reducción del flujo sanguíneo e isquemia cerebral focal, del gen anti-apoptótico Bcl-xl, y de los marcadores de plasticidad cerebral, sinapsina-1, nestina, en el hipocampo; así como previene el incremento de la enzima pro-apoptótica caspasa-3 y la fragmentación del núcleo de las neuronas, luego de la reducción del flujo sanguíneo e isquemia cerebral [129-133].

### Actividad de la aromatasa cerebral y neuroprotección por estradiol

Se ha sugerido que el estradiol sintetizado por la aromatasa cerebral (aromatasa P450) tiene un lugar importante en la neuroprotección contra el daño cerebral inducido por la isquemia, además del efecto neuroprotector que puede ser ejercido por el estradiol circulante, debido al incremento de la concentración de estradiol

que puede alcanzarse en estructuras cerebrales específicas. La aromatasa se expresa en las neuronas (sinapsis) y en los astrocitos de la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, el tallo cerebral la amígdala y la región preóptica/septal en mamíferos, incluyendo a los seres humanos 43, [61, 134-137]. De hecho, la expresión y la actividad de la aromatasa aumentan en estas regiones cerebrales cuando son afectadas por la reducción del flujo sanguíneo cerebral [57, 59, 75, 138] y se requiere para la aromatización de esteroides precursores de estradiol, como parte de los mecanismos endógenos de neuroprotección [56, 60, 139-140].

### **Otros mecanismos de neuroprotección por estradiol.**

#### **Regulación de las vías de señalización MAPK /PI3K/AKT**

En condiciones de disminución del flujo sanguíneo e isquemia cerebral se esperaría que el estradiol tenga efectos neuroprotectores a través del incremento de la actividad de la vía de señalización MAPK/PI3K/AKT, la cual es un importante mediador de la sobrevivencia neuronal [127, 141].

#### **Preservación del funcionamiento de la barrera hematoencefálica**

Se ha propuesto que el estradiol preserva la integridad de la barrera hematoencefálica y reduce el edema vasogénico mediante la activación del ER $\beta$ , que a su vez inhibe la expresión de HIF-1 $\alpha$  y VEGF inducida por la reducción del flujo sanguíneo cerebral [142- 143].

### **Neurorreparación del tejido cerebral dañado por la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral.**

#### **Aumento de la neurogénesis y sinaptogénesis.**

Se ha mostrado que la neurogénesis y la angiogénesis inducida por el estradiol puede mediar la neurorreparación en diferentes modelos de isquemia cerebral. En este sentido, el número de neuronas capaces de migrar de la zona sub-ventricular aumenta significativamente en roedores ovariectomizados bajo tratamiento con estradiol en condiciones de reducción del flujo sanguíneo e isquemia cerebral [46, 65, 67, 79, 144-147]. Así mismo, la participación importante del estradiol en la

remodelación de los circuitos neuronales dañados por la isquemia cerebral se ha sustentado en datos que muestran la regulación que puede ejercer el estradiol sobre las estructuras sinápticas formadas por espinas dendríticas en el hipocampo y en la corteza cerebral. De hecho el estradiol aumenta la sobrevivencia de neuronas piramidales y aumenta la transmisión sináptica en las colaterales de Shaffer, en condiciones de reducción del flujo sanguíneo e isquemia cerebral [33, 74, 80, 148]. En su conjunto los datos expuestos muestran que el estradiol puede ejercer múltiples acciones en contra de los mecanismos fisiopatológicos del daño cerebral que puede ser provocado por la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral, lo mismo que acciones que pueden promover fenómenos cerebrales de restauración y reparación, los cuales sustentan el efecto neuroprotector del estradiol.

Estas acciones pueden ser observadas en condiciones fisiológicas como resultado de la activación de los ERs neuronales y gliales por el estradiol secretado en el ovario que acceden al cerebro en concentraciones plasmáticas fisiológicas; lo mismo que por el estradiol sintetizado localmente en diversas estructuras cerebrales. Así mismo, diferentes esquemas de administración de estradiol que se han iniciado de semanas a horas antes, o minutos a horas después de la ocurrencia de la reducción del flujo sanguíneo e isquemia cerebral, resultan ser neuroprotectores.

Para ello mecanismos genómicos y no genómicos contribuyen a la neuroprotección del estradiol, mediada por receptores ER $\alpha$ , y ER $\beta$ , neuronales y gliales, nucleares y extra-nucleares; así como por receptores membranales a estradiol acoplados a proteínas G y activación de diversas vías de señalización.

La reducción del estrés oxidativo, del incremento anormal de ROS, el incremento de la reserva enzimática antioxidante, el atrapamiento de ROS; así como acciones anti-inflamatorias y anti-apoptóticas, forman parte de los mecanismos de neuroprotección del estradiol que contrarrestan los fenómenos fisiopatológicos resultantes de la reducción del flujo sanguíneo y la isquemia cerebral. Además, la reparación del tejido cerebral dañado mediante la liberación de factores tróficos por parte de las células gliales, mejoran el flujo sanguíneo, promueven la

angiogénesis, la neurogénesis y la sinaptogénesis, pueden ser observados después de la isquemia cerebral y tratamiento con estradiol.

La eficacia a corto plazo de los tratamientos con estradiol ha sido mostrada después de episodios de isquemia en estudios pre-clínicos en diferentes modelos de isquemia cerebral focal o global, por medio de la evaluación de parámetros histológicos de daño cerebral, de la preservación de las funciones cognitivas y del curso temporal de la recuperación de funciones neurológicas y conductuales.

No obstante, la potencialidad de trasladar estos resultados a la práctica clínica en seres humanos ha sido hasta el momento limitada. A este respecto, debe tenerse en cuenta que la ocurrencia de episodios de isquemia cerebral focal o global es impredecible, por lo que el tratamiento con estradiol como una estrategia profiláctica con el propósito fundamental de generar condiciones de neuroprotección en el cerebro, debe ser planteado a largo plazo, con el riesgo de efectos indeseables del estradiol en órganos periféricos, que pueden afectar seriamente la salud e inclusive poner en peligro la vida de los seres humanos.

Por otra parte, los tratamientos con estradiol que pueden ser iniciados después de iniciado el episodio de isquemia deben mantenerse a largo plazo para contrarrestar los fenómenos fisiopatológicos inmediatos que dan lugar al daño cerebral, pero también para promover los fenómenos de reparación y de plasticidad cerebral a largo plazo, que puedan dar lugar a la recuperación funcional luego de la reducción del flujo sanguíneo y de la isquemia cerebral.

Una vez que se ha comprobado la participación de los ERs para los efectos neuroprotectores del estradiol, se han propuesto nuevas perspectivas de neuroprotección basada en la activación selectiva de ERs en el cerebro, pero no en otros órganos. Esto podría lograrse mediante tratamientos a base moduladores selectivos de receptores de estradiol (SERMs) naturales (genistein, coumestrol) o sintéticos (tamoxifeno, raloxifeno, basedoxifeno), los cuales tienen selectividad por las neuronas y las células gliales en el cerebro, donde promueven la interacción de los ERs con vías de señalización ligadas a la neuroprotección.

Por otra parte el efecto neuroprotector del estradiol no ha sido investigado en modelos de hipoperfusión cerebral crónica.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se ha planteado que la ausencia de actividad estrogénica y la hipoperfusión cerebral crónica pueden ser factores concurrentes de daño cerebral y deterioro cognoscitivo en mujeres pre y post-menopáusicas.

No se ha evaluado experimentalmente el posible efecto neuroprotector de compuestos con actividad estrogénica en condiciones de ausencia de acciones estrogénicas e hipoperfusión cerebral crónica.

El  $17\beta$  estradiol es el compuesto endógeno que se toma como referencia para el estudio de acciones estrogénicas y el punto de partida para el estudio de otros compuestos con actividad estrogénica pero con diferentes características farmacológicas con respecto al estradiol. (moduladores de receptores a estradiol)

## **JUSTIFICACION**

Es importante caracterizar los efectos del estradiol en el modelo de HCC en ausencia de acciones estrogénicas endógenas, ante la perspectiva de comparar los posibles efectos neuroprotectores de otros compuestos con actividad estrogénica que se utilizan en terapias de reemplazo.

En estas condiciones los resultados de la evaluación de fármacos con efectos neuroprotectores podría permitir la sustentación de propuestas con posible aplicación en el manejo clínico terapéutico, en seres humanos

## **HIPOTESIS**

El estradiol reduce las alteraciones morfológicas y funcionales provocadas por la hipoperfusión cerebral crónica en el hipocampo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos neuroprotectores del estradiol sobre la estructura y el funcionamiento del hipocampo, en el modelo hipoperfusión cerebral crónica, en la rata.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Evaluar las consecuencias de la hipoperfusión cerebral crónica sobre la población neuronal del cuerno de Ammon del hipocampo.
- Evaluar las funciones cognoscitivas dependientes del hipocampo mediante pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.
- Evaluar el efecto del  $17\beta$ -estradiol sobre las alteraciones de la población neuronal del cuerno de Ammon del hipocampo, inducidas por hipoperfusión cerebral crónica.
- Evaluar el efecto del  $17\beta$ -estradiol sobre las alteraciones de las funciones cognoscitivas dependientes del hipocampo, inducida por hipoperfusión cerebral crónica.

## **MATERIALES Y METODOS**

El estudio se realizó en ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 250-300 g al inicio de los procedimientos experimentales. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con suministro de alimento (rodent laboratory Chow) y agua *ad libitum*.

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la guía de los institutos de Salud de Norteamérica (NIH) para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (publicación NIH No. 80-23, 1996). Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales [149-150].

Los animales de experimentación fueron asignados al azar a los siguientes grupos experimentales. Sham (n=8); E2 (n=8); HCC-Veh (n=8); HCC-E2-5 (n=8); HCC-E2-10 (n=8). Todos los animales fueron ovariectomizados bajo anestesia general (Xilazina, 10 mg/kg im / Ketamina, 90 mg/kg im). Catorce días después de la ovariectomía se realizó en los grupos HCC+Veh, HCC+E2-5 y HCC+E2-10 los procedimientos anestésico/quirúrgicos del modelo de hipoperfusión cerebral crónica en ratas, mediante la oclusión permanente y sección de las arterias carótidas comunes [42-43] y se inició el tratamiento con Vehículo (aceite vegetal) o Benzoato de estradiol, 5 µg/48h sc (HCC+E2-5) o Benzoato de estradiol, 10 µg/48h sc (HCC+E2-10), durante 40 días. En los animales del grupo Sham, además de la ovariectomía, se realizaron los procedimientos anestésicos quirúrgicos de HCC sin oclusión de las arterias carótidas. En el grupo E2 se realizó ovariectomía y se inició inmediatamente tratamiento con benzoato de estradiol, (5 µg/48h sc, durante 40 días). Al término de este período cada uno de los animales de los 5 grupos en estudio se sometieron a la prueba de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y se evaluó su desempeño en la prueba mediante los parámetros adecuados, como se describe a continuación.

### **Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en el Laberinto acuático de Morris**

En esta prueba, las ratas se colocan en una piscina circular de 140 cm de diámetro, 50 cm de altura, llena con agua teñida de color azul oscuro, a una temperatura de 25 °C, hasta una profundidad de 25 cm. La piscina se ubica en un cuarto con una variedad de señales (puerta, figuras, el investigador, etc.,) en lugares fijos, las cuales permiten la orientación espacial. El laberinto se divide de manera virtual en cuatro cuadrantes del mismo tamaño orientados con referencia a los cuatro puntos cardinales; así como en tres anillos concéntricos equidistantes. El laberinto cuenta con una plataforma de escape (13 x 13 cm) sumergida 2 cm por debajo de la superficie del agua, que se ubica en un sitio fijo en el centro de uno de los cuatro cuadrantes a 28 cm de la pared de la piscina. Tanto la plataforma como las señales espaciales alrededor de la misma se mantienen en el

mismo sitio durante el tiempo que duren las pruebas de evaluación del aprendizaje espacial. En cada una de estas pruebas la rata se coloca dentro del agua con la cabeza frente a la pared de la piscina en cualquiera de los cuatro cuadrantes que son seleccionados al azar en cada día de prueba (6 días) y en diferentes sitios. Cada prueba se termina cuando la rata encuentra la plataforma (latencia de escape) en menos de 60 segundos; si no es así la rata es guiada hasta la plataforma por el investigador y en este caso se le asigna una latencia de escape de 60 segundos. Se permite que la rata permanezca en la plataforma durante 15 segundos para que aprenda su localización. La ejecución del animal en cada prueba se registra mediante video grabación.

En cada prueba se analiza la latencia de escape (el tiempo que tarda la rata en localizar la plataforma), la velocidad de nado (cm/s), así como el nado predominante a través de los anillos internos o externo en que se ha dividido virtualmente el laberinto y se calcula un índice con base en el tiempo que nada en los anillos internos o en el anillo externo. Usualmente en los diseños experimentales se utiliza un periodo de aprendizaje de 7 días.

Al día siguiente de haber completado el periodo de aprendizaje cada rata se somete a una prueba de memoria (30 segundos) en la que se ha retirado la plataforma y se mide el tiempo que la rata permanece o cruza a través del cuadrante donde se localizaba originalmente la plataforma [151].

Al término de las pruebas en el laberinto acuático de Morris, los animales fueron sacrificados mediante una dosis letal de Pentobarbital. Las ratas fueron perfundidas por vía intracardiaca con solución salina seguido de 10% de formaldehido en amortiguador de fosfato. Después de la perfusión, los cerebros fueron retirados del cráneo y se conservaron en el mismo fijador durante 2-4 días antes del procesamiento histológico. Mediante un micrótomo se realizaron cortes coronales (3,0 mm de espesor) de cada cerebro los cuales incluían al hipocampo dorsal y a la corteza prefrontal dorsal medial, estos se deshidrataron y se incluyeron en parafina. De cada cerebro se obtuvo una serie de 10 cortes coronales de 7  $\mu$ m de espesor que fueron teñidos con violeta de Cresilo.

Se contaron el número de neuronas piramidales remanentes (neuronas con morfología normal, integridad de la membrana y nucléolo claramente visible) en un segmento lineal de 500µm en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en los cerebros correspondientes a cada uno de los animales de los diferentes grupos experimentales, mediante microscopio óptico con un aumento de 40x y un sistema computarizado de análisis de imágenes histológicas [152-153].

#### Evaluación estadística.

Se evaluaron los parámetros convencionales de eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial: latencia de escape y trayectoria recorrida para localizar la plataforma sumergida. Se realizaron las comparaciones intragrupal de la mediana de las latencias de escape por día, mediante análisis de varianza no paramétrica de Friedman y la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon. Las comparaciones intergrupales de latencia de escape fueron realizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis y por la prueba de "U" de Mann-Whitney. Los datos de la distancia total recorrida y velocidad de nado durante la etapa de "búsqueda" fueron comparados mediante análisis de varianza de medias repetidas y la prueba de Tukey [154-155].

Las diferencias en los valores numéricos obtenidos en la evaluación de la población neuronal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en los grupos bajo las tres condiciones experimentales, fueron comparados mediante prueba ANOVA y prueba de Tukey post oc. [154-155]

## **RESULTADOS**

### **Aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.**

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. Puede observarse la reducción significativa de los valores de latencia de escape a partir del 3er día de

prueba en el grupo SHAM (día 3  $p=0.028$ , día 4  $p=0.028$ , día 5  $p=0.028$  día 6  $p=0.028$ , día 7  $p=0.028$ ), y a partir del 2º día prueba en el grupo E2 (día 2  $p=0.043$ , día 3  $p=0.028$ , día 4  $p=0.018$ , día 5  $p=0.018$ , día 6  $p=0.018$ , día 7  $p=0.018$ ) en comparación con los valores de latencia de escape obtenidos en ambos grupos en el 1er día de prueba. Asimismo, puede apreciarse la reducción progresiva de dichos valores de latencia de escapa hasta valores mínimos relativamente estables a partir del 4º ó 5º día de prueba. En cambio en el grupo HCC-Veh se observó una reducción significativa de la latencia de escape, en comparación con la obtenida el 1er día de prueba, a partir del 5º día de prueba (día 5  $p=0.026$ , día 6  $p=0.003$  y día 7  $p=0.004$ ). Por otra parte, los valores de latencia de escape fueron significativamente menores a partir del 2º día de prueba, en comparación con los obtenidos el 1er día de prueba, en los grupos HCC-E2-5 (día 2  $p=0.028$ , día 3  $p=0.018$ , día 4  $p=0.028$ , día 5  $p=0.018$ , día 6  $p=0.018$  y día 7  $p=0.018$ ) y HCC-E2-10 (día 2  $p=0.028$ , día 3  $p=0.028$ , día 4  $p=0.028$ , día 5  $p=0.028$ , día 6  $p=0.028$  y día 7  $p=0.028$ ) con una reducción progresiva de los mismos hasta valores mínimos estables a partir del 5º día ó del 3er día de prueba respectivamente. En estas condiciones, los valores de latencia de escape fueron significativamente menores que los del grupo HCC-Veh en los grupos HCC-E2-5 (día 2,  $p=0.006$ ; día 3  $p=0.049$ ; día 4,  $p=0.048$ ) y HCC-E2-10 (día 2,  $p=0.01$ ; día 3,  $p=0.047$ , día 4,  $p=0.01$ ) en los días de prueba 2, 3 y 4; sin diferencias significativas con los valores de latencia de escape de los grupos SHAM y E2, durante los 7 días de prueba.

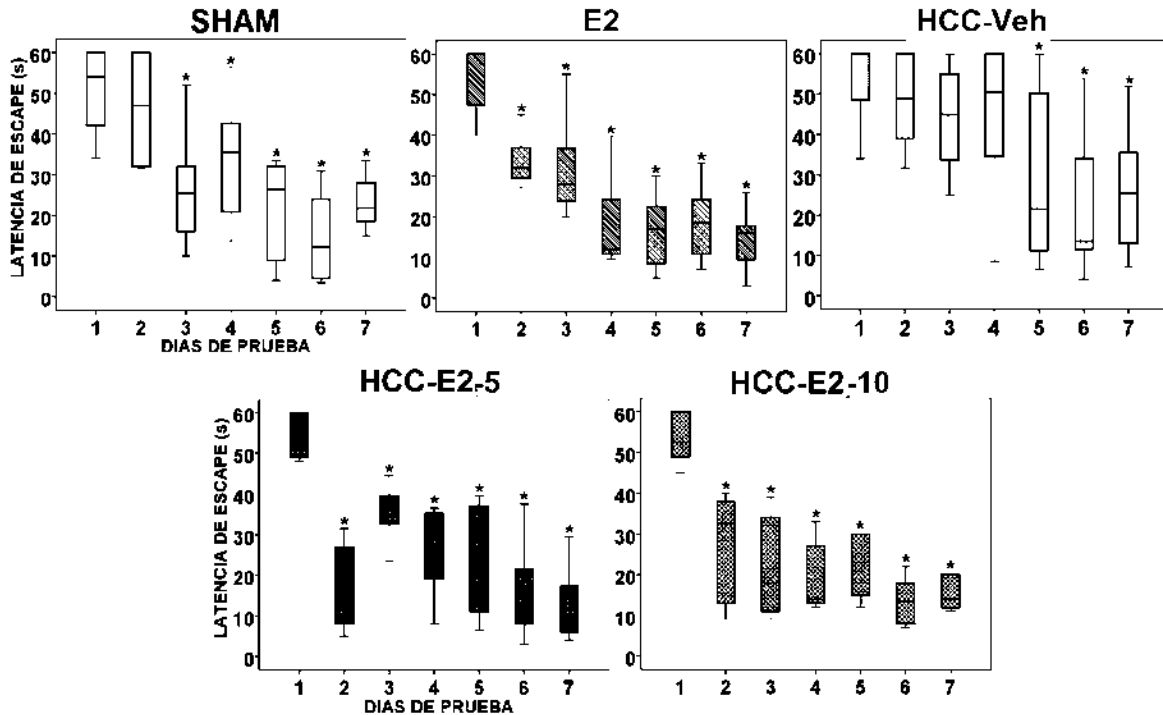


Figura1. Valores (Mediana y Rango) de las latencias de escape de los diferentes grupos experimentales, durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris, 40 días después del episodio de HCC. Puede observarse la reducción significativa de la latencia de escape a partir del segundo o tercer día en los grupos SHAM, E2, HCC-E2-5 y HCC-E2-10; a diferencia de la reducción de la latencia de escape a partir del quinto día de prueba, en el grupo OVX-HCC-Veh. (\* día 1 vs. días siguientes,  $p < 0.05$ ).

Magnitud y características de las trayectorias de nado.

Los valores de la distancia (cm) que debieron nadar los animales de los diferentes grupos experimentales para llegar a la plataforma sumergida, muestra una tendencia a variar en relación directa con los cambios de magnitud de la latencia de escape, durante los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris. Esto es, una disminución progresiva conforme las latencias de escape se fueron acortando en los días de prueba sucesivos.

Tabla 1. Valores (Media  $\pm$  EE) de la distancia de nado (cm) requerida, por los diferentes grupos experimentales, para encontrar la plataforma en 7 días sucesivos durante la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris.

	SHAM	E2	HCC-Veh	HCC-E2-5	HCC-E2-10
<b>DIA 1</b>	1824 $\pm$ 24.03	1756 $\pm$ 22.71	2000 $\pm$ 65.71 $\Delta^*$	1844 $\pm$ 42.57 $^+$	1804 $\pm$ 46.42 $^+$
<b>DIA 2</b>	1101 $\pm$ 45.41	1287 $\pm$ 74.27	1505 $\pm$ 52.56 $\Delta^*$	1451 $\pm$ 26.71 $\Delta$	1455 $\pm$ 40.58 $\Delta$
<b>DIA 3</b>	733 $\pm$ 57.97	1017 $\pm$ 12.09 $\Delta$	1208 $\pm$ 29.44 $\Delta^*$	890 $\pm$ 37.21 $^+$	705 $\pm$ 63.98 $^{*\Phi}$
<b>DIA 4</b>	677 $\pm$ 36.11	674 $\pm$ 15.38	1191 $\pm$ 53.66 $\Delta^*$	835 $\pm$ 56.22 $^+$	527 $\pm$ 57.45 $^{+\Phi}$
<b>DIA 5</b>	704 $\pm$ 15.05	791 $\pm$ 17.12	1022 $\pm$ 35.31 $\Delta^*$	605 $\pm$ 13.25 $^+$	518 $\pm$ 18.55 $\Delta^+$
<b>DIA 6</b>	377 $\pm$ 44.76	459 $\pm$ 15.12	667 $\pm$ 45.85 $\Delta^*$	404 $\pm$ 67.25 $^+$	370 $\pm$ 30.18 $^+$
<b>DIA 7</b>	255 $\pm$ 29.39	353 $\pm$ 17.11	454 $\pm$ 73.64	394 $\pm$ 99.96	284 $\pm$ 16.31

$\Delta$  p $\leq$ 0.05 Vs. SHAM; \* p $\leq$ 0.05 Vs. E2; + p $\leq$ 0.05 Vs. HCC-Veh;  $\Phi$  p $\leq$ 0.05 Vs. HCC-E2-5.

La Tabla 1 muestra los valores de la distancia de nado, en los diferentes grupos experimentales, durante los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris y su reducción progresivas conforme transcurrieron los días de prueba subsecuentes. Puede observarse que los valores de distancias de nado en el grupo HCC-Veh fueron significativamente mayores (con excepción del día 7) que los valores correspondientes a cualquiera de los otros grupos experimentales y que, en general, los valores de la distancia de nado de los grupos HCC-E2-5 y HCC-E2-10 no presentan diferencias significativas con respecto a los valores correspondientes a los grupos SHAM y E2. Así mismo, las distancias de nado fueron significativamente menores en el grupo HCC-E2-10 en comparación con las del grupo HCC-E2, 2 los días 3 y 4 de prueba.

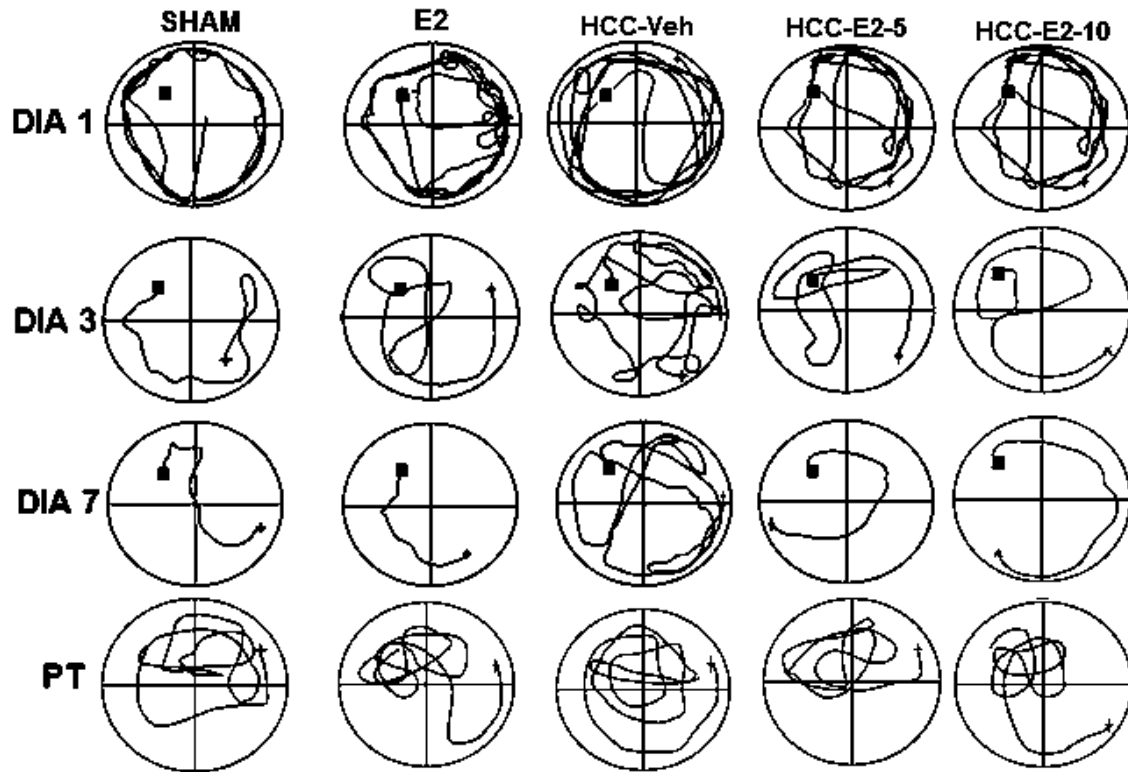


Figura 2. Trayectorias de nado de uno de los animales representativo de cada uno de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris en los días de prueba 1, 3, 7 y prueba de transferencia. Las trayectorias de nado circular cerca de la pared de la tina (tigmotaxis) se observa en todos los grupos el primer día, cambia a trayectorias orientadas hacia la parte interna del laberinto con ruta dirigida hacia el sitio de ubicación de la plataforma sumergida en los grupos SHAM, E2, HCC-E2-5 y HCC-E2-10 en tanto que en el grupo HCC-Veh se observan trayectorias menos orientadas y con mayor recorrido para llegar a la plataforma.

La Figura 2 ilustra la forma y magnitud de las trayectorias de nado en el laberinto acuático de Morris, efectuadas por animales representativos de cada uno de los grupos experimentales, los días 1, 3 y 7 de prueba. Cabe destacar el cambio de la forma de la trayectoria de nado, circular y cercano a la pared de la tina, observado el primer día de prueba en todos los grupos experimentales hacia rutas más cortas

y mejor orientadas hacia el sitio de la plataforma en los animales de los grupos SHAM, E2, HCC-E2-5 y HCC-E2-10; a diferencia de las trayectorias con mayor recorrido y menos orientadas efectuadas por el animal representativo del grupo HCC-Veh.

El tiempo de permanencia de los animales de experimentación en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris y en particular en cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma (cuadrante norte), durante la prueba de transferencia, se ilustra en las figuras 3 y 4 para los diferentes grupos y condiciones experimentales.

Puede observarse que el tiempo de permanencia en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma fue significativamente mayor, en los grupos SHAM, E2, HCC-E2-5 HCC-E2-10, en comparación con el tiempo de permanencia en cualquiera de los otros cuadrantes; a diferencia del grupo HCC-Veh, en el que no se observaron diferencias significativas en el tiempo de permanencia entre los cuadrantes norte (plataforma), este y sur, y solamente el tiempo de permanencia fue significativamente menor en el cuadrante oeste, en comparación con el cuadrante norte (Figura 3).

Asimismo, el tiempo de permanencia en el cuadrante oeste fue significativamente mayor, en los grupos SHAM, E2, HCC-E2-5 y HCC-E2-10, en comparación con el tiempo de permanencia en comparación con los cuadrantes oeste y sur (Figura 3).

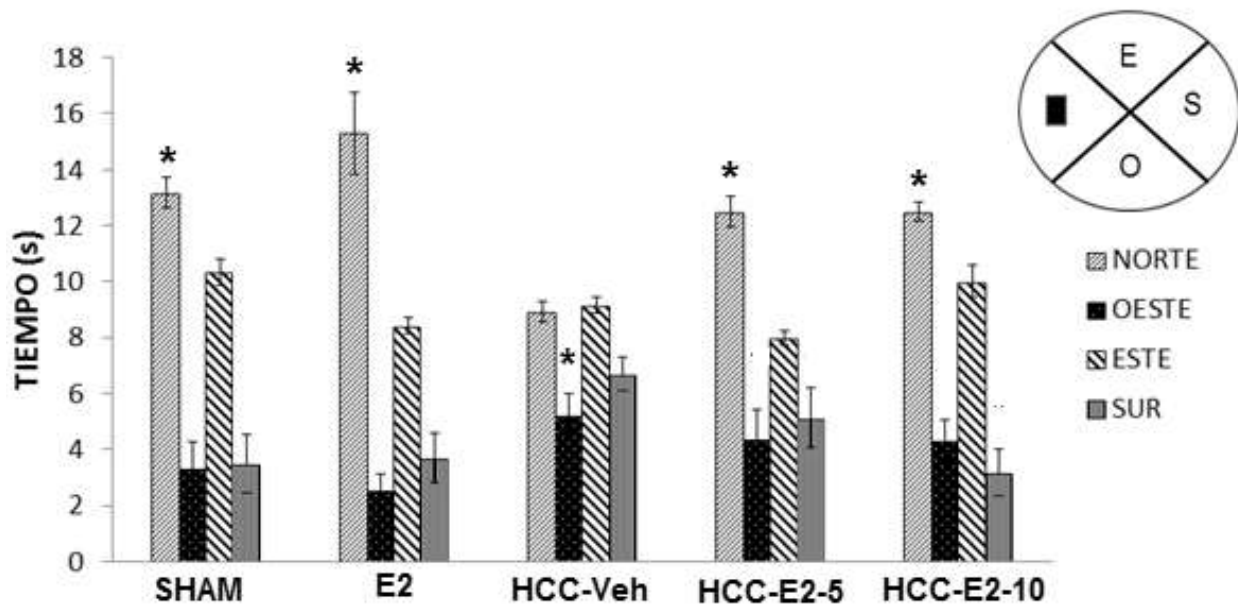


Figura 3. Tiempo (s) de permanencia (media  $\pm$  EE) en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia (30s de prueba), en los diferentes grupos experimentales. Puede observarse el tiempo de permanencia significativamente mayor en el cuadrante norte (donde originalmente se encontraba la plataforma) en los grupos SHAM, E2, HCC-E2, pero no en el grupo HCC-Veh, en comparación con el tiempo de permanencia en los otros cuadrantes. \*  $p \leq 0.05$  con respecto a los otros cuadrantes; +  $p \leq 0.05$  con respecto a los cuadrantes oeste y sur.

Por otra parte, los resultados de un análisis intergrupar tomando solo en cuenta los valores de permanencia en el cuadrante norte muestra que no existen diferencias significativas en el tiempo de permanencia entre los grupos SHAM, E2, HCC-E2, pero sí una reducción significativa del tiempo de permanencia en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma en el grupo HCC-Veh, en comparación con los demás grupos (Figura 4).

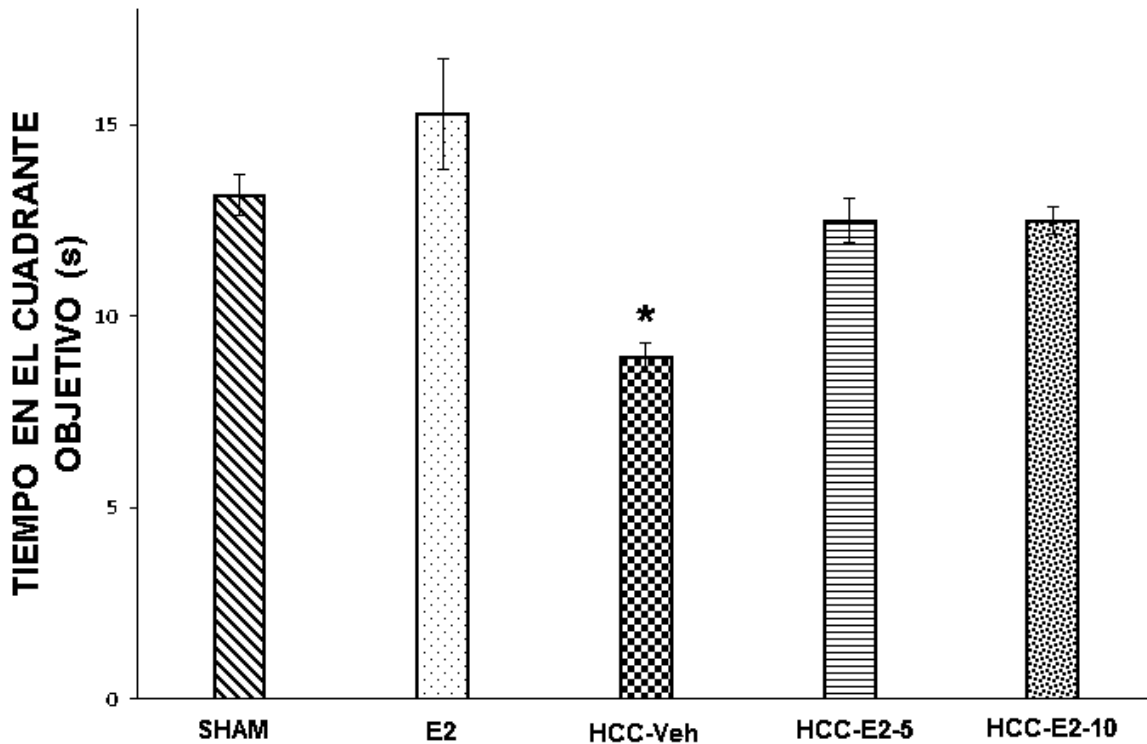


Figura 4. Tiempo de permanencia (media  $\pm$  EE) en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma en los diferentes grupos experimentales. \*  $p \leq 0.05$  con respecto a los otros grupos.

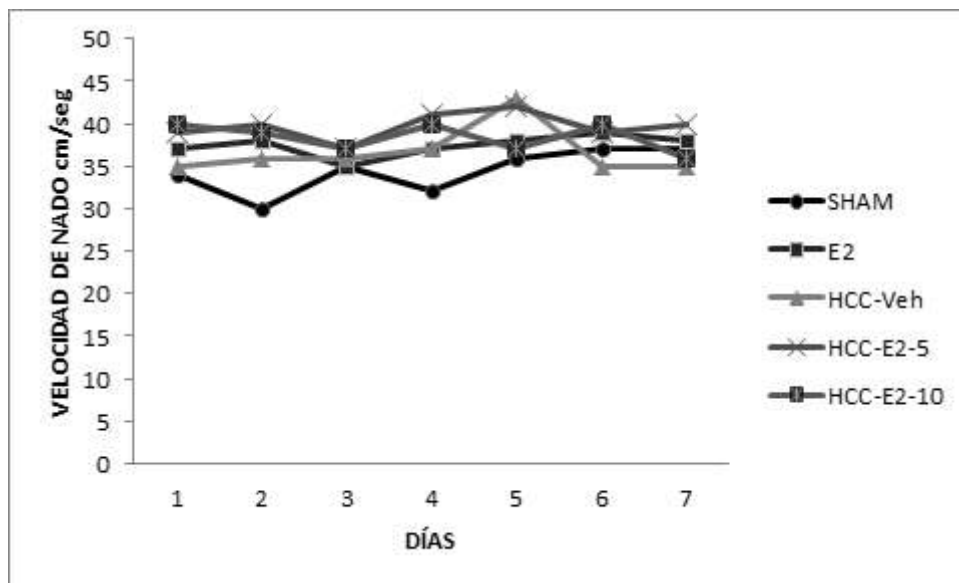


Figura 5. Velocidad de nado de los animales en los diferentes grupos experimentales los días de prueba en el laberinto acuático de Morris. Puede observarse que no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos.

**Evaluación de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo.**

En la figura 6 se muestran fotomicrográficas que ilustran el aspecto general de las estructuras del hipocampo visibles mediante la tinción de violeta de cresilo y a mayor aumento imágenes del estrato piramidal del segmento CA1 del hipocampo donde se observa la reducción de la población de neuronas piramidales en el grupo HCC-Veh, y la preservación de dicha población neuronal con características histológicas semejantes a las del Grupo SHAM en los grupos E2, HCC-E2-5 y HCC-E2-10, tratados con benzoato de estradiol.

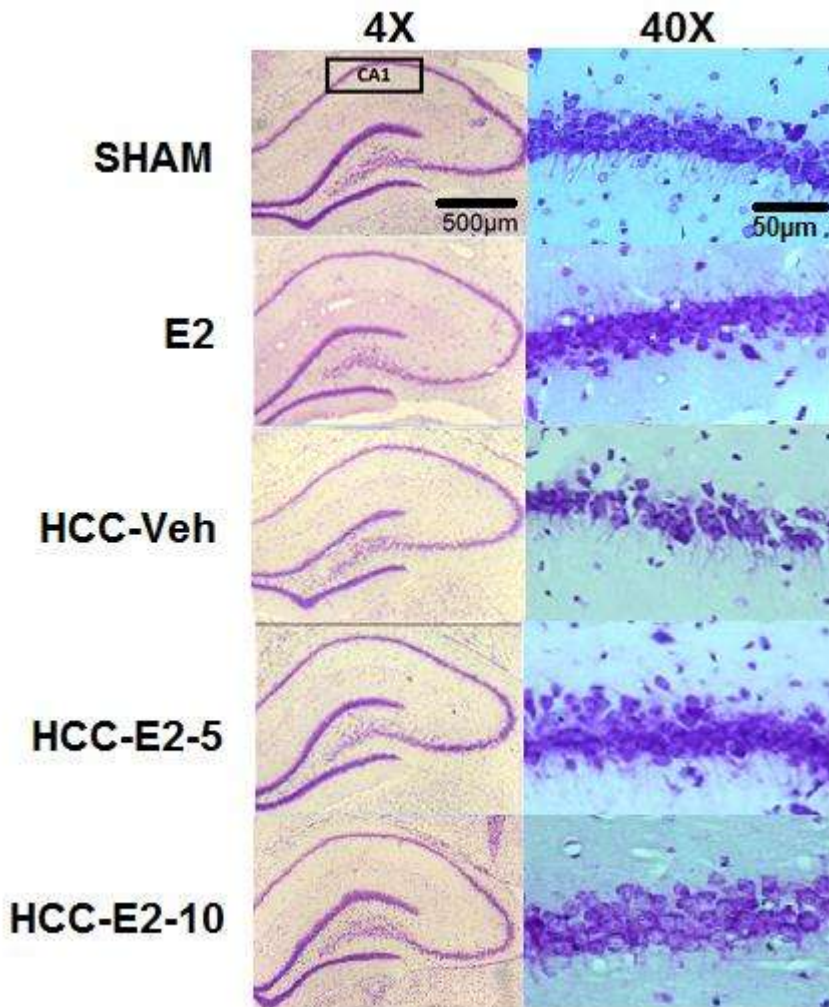


Figura 6. Fotomicrográficas que ilustran el aspecto de la población neuronal del segmento CA1 del hipocampo en preparaciones histológicas teñidas con violeta de cresilo, representativas de los diferentes grupos experimentales. Puede observarse la reducción de la población neuronal por efecto de la HCC y su preservación por efecto del tratamiento con benzoato de estradiol.

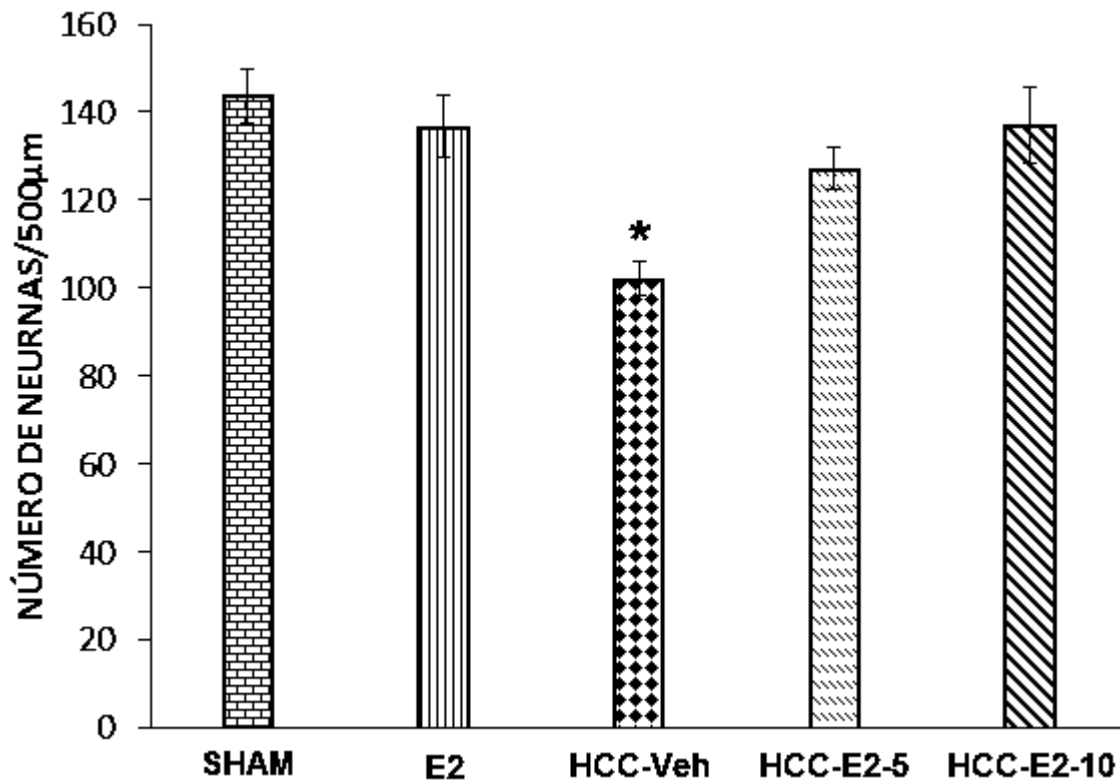


Figura 7. Número de neuronas piramidales (Media  $\pm$  EE) remanentes en una extensión de 500  $\mu$ m lineales del estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en las diferentes condiciones experimentales. \* $p \leq 0.05$  en comparación con cualquiera de los otros grupos experimentales.

La HCC (grupo HCC-Veh) redujo significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo, donde las neuronas remanentes en una extensión de 500  $\mu$ m lineales del estrato piramidal, correspondieron en promedio al 70% de las neuronas observadas en el grupo SHAM (100%), el cual no mostró diferencias significativas de la población neuronal del segmento CA1 con respecto a los grupos E2, HCC-E2-5 y HCC-E2-10 (Figura 7; Tabla 2).

Tabla 2. Número (Media  $\pm$  EE) y porcentaje de neuronas piramidales remanentes en una extensión de 500  $\mu$ m lineales en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en las diferentes condiciones experimentales. \* $p \leq 0.05$  en comparación con cualquiera de los otros grupos experimentales.

<b>GRUPO</b>	<b>MEDIA <math>\pm</math> EE</b>	<b>%<sup>+</sup></b>
SHAM	144 $\pm$ 6.19	100
E2	137 $\pm$ 7.06	95
HCC-VEH	102 $\pm$ 3.91*	70*
HCC-E2-5	127 $\pm$ 4.94	88
HCC-E2-10	137 $\pm$ 8.54	95

+Media expresada en % con respecto al número de neuronas en el grupo SHAM (100%).

## **DISCUSIÓN**

Los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento crónico con benzoato de estradiol, a dosis que darían lugar a concentraciones plasmáticas dentro de rangos fisiológicos [79-80], en ratas bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y en ausencia de secreción ovárica de estrógenos, da lugar a la preservación, a largo plazo, de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo; así como a una mejor ejecución de la tarea de memoria y aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, en comparación con los mismos parámetros obtenidos en animales tratados con vehículo. Estos datos sustentan el efecto neuroprotector del estradiol en contra de los mecanismos fisiopatológicos de daño cerebral resultantes de la hipoperfusión cerebral crónica.

Se ha mostrado que el modelo de hipoperfusión cerebral crónica inducido por la ligadura simultánea o secuencial (con un intervalo de 7 días) de las arterias carótidas comunes en la rata, da lugar a una reducción del flujo sanguíneo, de magnitud variable, en las diferentes estructuras cerebrales (del orden del 40% en el hipocampo y de 30% en la corteza cerebral), el cual persiste durante semanas a partir del inicio de la HCC [36-38, 156-157]. Asimismo, se ha mostrado deterioro de las funciones cognitivas dependientes de la integridad morfo-funcional del hipocampo y de la corteza prefrontal, a diferentes tiempos luego de HCC [40-42, 31-32]. En el presente estudio se utilizó el modelo de HCC modificado en el que se seccionó una de las arterias carótidas comunes, entre una doble ligadura previamente colocada, para realizar el mismo procedimiento en la otra arteria carótida común, 7 días después. En estas condiciones, se ha mostrado deterioro significativo de funciones cognitivas en pruebas de memoria de referencia y memoria de trabajo espaciales, asociado con una reducción significativa de la población de neuronas piramidales en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, evaluada mediante inmunofluorescencia con NeuN, tres meses después de la ligadura de la segunda carótida [42-43].

Los resultados del presente trabajo, confirman las alteraciones inducidas por la HCC sobre la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del

hipocampo; en efecto, 48 días después de haber completado los procedimientos quirúrgicos de la HCC, con la ligadura y sección de la segunda carótida, los animales ovariectomizados tratados con vehículo mostraron una reducción del 30% en el número de neuronas piramidales remanentes en una extensión lineal de 500µm del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en comparación con el mismo parámetro en el grupo SHAM (100%) y los otros grupos experimentales (88% a 95% de neuronas remanentes). En estas condiciones cabría esperar que esta pérdida neuronal y sus consecuencias sobre el funcionamiento de las estructuras neuronales del hipocampo se asociara con deterioro de la eficiencia del aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris [158-166]. De hecho, la HCC dio lugar a un deterioro de dichas funciones cognitivas dependientes de la integridad morfo-funcional del hipocampo en el grupo HCC-Veh, como lo muestran los valores de latencia de escape de este grupo, significativamente mayores los días de prueba 2, 3 y 4; así como el tiempo de permanencia significativamente menor en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma, durante la prueba de transferencia, en comparación con el grupo SHAM y los otros grupos experimentales.

En contraste, la ejecución de las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, no mostró diferencias entre los grupos SHAM, E2, HCC-E2-5 y HCC-E2-10. Este resultado sugiere que la capacidad de integración neural del aprendizaje y la memoria espacial fue preservada por efecto del tratamiento a largo plazo con estradiol, en ausencia de secreción ovárica de estradiol y bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, que de otra manera habría inducido el deterioro de dichas funciones cognitivas, como fue observado en los animales estudiados en las mismas condiciones experimentales pero a los que solamente se administró el vehículo de benzoato de estradiol (HCC-Veh). Asimismo, la preservación de la población de neuronas piramidales remanentes en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en los grupos ovariectomizados, bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, sugiere que el tratamiento con benzoato de estradiol dio lugar a acciones estrogénicas eficientes en contra de los mecanismos fisiopatológicos de daño y muerte neuronal ejercidos por la hipoperfusión cerebral crónica en el hipocampo,

una estructura que se distingue por la gran vulnerabilidad de las neuronas piramidales del segmento CA1 ante situaciones de reducción del flujo sanguíneo[13, 18-19, 21, 27-29]. A este respecto, se ha mostrado que la HCC puede dar lugar a diversas alteraciones de la homeostasis de varios procesos involucrados en el funcionamiento cerebral, las cuales a su vez pueden inducir mecanismos fisiopatológicos de daño neuronal tales como: estrés oxidativo, neuroinflamación, disfunción de sistemas de neurotransmisores (colinérgico, GABAérgico), disfunción mitocondrial y procesos pro-apoptóticos, lipoperoxidación y alteración de la secreción de factores tróficos, en estructuras cerebrales especialmente vulnerables (hipocampo, corteza prefrontal) y con reducciones proporcionalmente mayores del flujo sanguíneo [30] De hecho, se ha mostrado que el enriquecimiento ambiental o el ejercicio previene o revierte el deterioro del aprendizaje y la memoria espacial a la vez que reduce el estrés oxidativo, la lipoperoxidación y la neuroinflamación inducidos por HCC en el hipocampo y la corteza prefrontal, en la rata [31-32, 44], por lo que se ha sugerido que la preservación de las funciones cognitivas, en condiciones de enriquecimiento ambiental o ejercicio, puede deberse a la reducción de las alteraciones morfo-funcionales resultantes de dichos procesos de daño neuronal en estructuras cerebrales involucradas en la integración de estas funciones cognitivas. De hecho, bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, los efectos neuroprotectores de compuestos químicos antioxidantes y anti-inflamatorios también se asocian con una reducción significativa de la pérdida de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo; así como del deterioro concomitante de funciones cognitivas [43]. En este sentido, cabe señalar la potencialidad del estradiol para ejercer acciones neuroprotectoras en diversos modelos de isquemia cerebral aguda, focal o global [62-63], las cuales se ha mostrado que están mediadas por mecanismos de acción estrógenicos que incluyen la reducción del estrés oxidativo, de las alteraciones mitocondriales [81, 84, 108, 117, 120], de los procesos pro-apoptóticos subsecuentes [129-133] y de la neuroinflamación [75, 122-125 ] inducidos por la reducción del flujo sanguíneo cerebral.

Estos mecanismos de acción de los efectos neuroprotectores del estradiol en contra del daño y la alteraciones funcionales inducidas por la isquemia aguda en estructuras cerebrales específicas se encuentran en una relación de oposición con los mecanismos de daño y alteraciones morfo-funcionales provocadas por la HCC, por lo que cabría la posibilidad de que en el presente estudio dichos mecanismos de acción estrogénica estuvieran mediando el efecto neuroprotector del estradiol, bajo condiciones de HCC, en ausencia de la secreción de estrógenos ováricos.

## **CONCLUSIONES**

El tratamiento, a largo plazo, con benzoato de estradiol ejerce efectos neuroprotectores sobre la población neuronal del hipocampo y previene las alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial en ratas ovariectomizadas bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica.

## **PERSPECTIVAS**

Los resultados del presente trabajo constituyen un marco de referencia para la evaluación de compuestos con actividad estrogénica, diferentes del estradiol en su estructura química y capacidad de interaccionar con distintos tipos de receptores estrogénicos, en el sistema nervioso central. Asimismo, sustentan la propuesta del diseño de posibles procedimientos neuroprotectores, basados en la inducción de acciones estrogénicas, en contra del deterioro de funciones cognitivas bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y carencia de secreción ovárica de estrógenos, concurrentes al deterioro cognoscitivo a partir de la menopausia.

## BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization (2012). Dementia A Public Health Priority. (World Health Organization).
2. Hurd MD, Martorell P, Delavande A, Mullen KJ and Langa KM. Monetary costs of dementia in the United States. *N. Engl. J Med.* 2013; 368: 1326–1334.
3. Libre Rodríguez JJ, Ferri CP, Acosta D, Guerra M, Huang Y, Jacob KS, Krishnamoorthy ES, Salas A, Sosa AL, Acosta I, Dewey ME, Gaona C, Jotheeswaran AT, Li S, Rodríguez D, Rodríguez G, Kumar PS, Valhuerdi A and Prince M. Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet.* 2008; 372: 464-474.
4. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, Launer LJ, Laurent S, Lopez OL, Nyenhuis D, Petersen RC, Schneider JA, Tzourio C, Arnett DK, Bennett DA, Chui HC, Higashida RT, Lindquist R, Nilsson PM, Roman GC, Sellke FW and Seshadri S. American Heart Association Stroke Council, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke.* 2011; 42: 2672–2713.
5. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W and Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology.* 2007; 69: 2197–2204.
6. Toledo JB, Arnold SE, Raible K, Brettschneider J, Xie SX, Grossman M, Monsell SE, Kukull WA and Trojanowski JQ. Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain Res.* 2013; 136: 2697–2706.
7. Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 287–296.
8. Quaegebeur A, Lange C and Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron.* 2011; 71: 406–424.
9. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12: 723–738.
10. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5: 347–360.
11. Harris JJ, Jolivet R and Attwell D. Synaptic energy use and supply. *Neuron.* 2012; 75: 762–77.
12. Gwag BJ, Won SJ and Kim DY. Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Apoptosis in Ischemic Neuronal Death, En: *New Concepts in Cerebral Ischemia. Methods and New Frontiers In Neuroscience*, R.C.S. Lin, (Ed.), 2002. pp 79-112.
13. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physio Rev.* 1999; 79: 1431-1568.
14. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM and Chan PH. Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral Ischemia. *NeuroRx.* 2004; 1: 17-25.
15. Margaill I, Plotkine M and Lerouet D. Antioxidant Strategies in the Treatment of Stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39: 429-443.
16. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE and Chan PH. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid. Redox Signaling.* 2011; 14: 1505–1517.
17. Chinopoulos C and Adam-Vizi V. Calcium, mitochondria and Oxidative Stress in Neuronal Pathology. Novel Aspects of an Enduring Theme. *FEBS J.* 2006; 273: 433-450.
18. Leker RR and Shohami E. Cerebral Ischemia and Trauma – Different Etiologies yet Similar Mechanisms: Neuroprotective Opportunities. *Brain Res Rev.* 2002; 39: 55-73.

19. Barone FC and Feuerstein GZ. Inflammatory Mediators and Stroke: New Opportunities for Novel Therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 819-834.
20. Lakhan SE, Kirchgessner A and Hofer M. Inflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Therapeutic Approaches. *J Trans Med.* 2009; 7: 97.
21. Mehta SL, Manhas N and Raghbir R. Molecular Targets in Cerebral Ischemia for Developing Novel Therapeutics. *Brain Res Rev.* 2007; 54: 34-66.
22. Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J and 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: 1586-1595.
23. Crepel V, Epsztein J and Ben-Ari Y. Ischemia Induces Short- and Long-Term Remodeling of Synaptic Activity in the Hippocampus. *J Cell Mol Med.* 2004; 7: 401-407.
24. Hurtado O, Pradillo JM, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, Lizasoain I y Moro MA. Neurorepair versus Neuroprotection in Stroke. *Cerebrovascular Diseases.* 2006; 21: 54-63.
25. Jourdain P, Nikonenko I, Alberi S and Muller D. Remodeling of Hippocampal Synaptic Networks by a Brief Anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci.* 2002; 22: 3108-3116.
26. Ruan YW, Zou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, Gao TM, Yao Z and Xu ZC. Dendritic Plasticity of CA1 Pyramidal Neurons After Transient Global Ischemia. *Neuroscience.* 2006; 140: 191-201.
27. Pulsinelli WA, Jacewicz M, Levy DE, Petito CK and Plum F. Ischemic Brain Injury and the Therapeutic Window. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 835: 187-193.
28. Hossmann KA. Cerebral Ischemia: Models, Methods and Outcomes. *Neuropharmacology.* 2008; 55: 257-270.
29. Cervantes M, González-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, Olvera-Cortés ME and Morali G. Neuroprotection in animal models of global cerebral ischemia. En: Balestrino M (Ed.) *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke.* En Tech Rijeka, Croatia 2012; pp 305-346.
30. 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? *Mol Neurobiol.* 2016 May 20. [Epub ahead of print].
31. Cechetti F, Valdeci P, Rostirolla V, Bertoldi K, Sanches E, Benc J, Rodrigues I and Netto CA. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol Lear Mem.* 2012; 97: 90-96
32. Cechetti F, Worm PV, Lovatel G Moysés F, Rodrigues Siqueira IR and Netto CA. Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sci.* 2012; 91: 29-36
33. De la Torre JC. Impaired brain microcirculation may trigger Alzheimer's disease, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1994; 18: 397-401.
34. Srivastava DP and Penzes P. Rapid estradiol modulation of neuronal connectivity and its implications for disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011; 22: 2-77.
35. Ni JW, Ohta H, Matsumoto K and Watanabe H. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats, *Brain Res.* 1994; 653: 231-236.
36. Farkas E, Luiten PGM and Baric F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res.* 2007; 54: 162-180.
37. Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, Anayama H and Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats, *Neurosc.* 1997; 79: 1039-1050.

38. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y and Terashi A. Long term measurements of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30: 266–272.
39. Bennett SA, Tenniswood M, Chen JH, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T and Pappas BA. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport.* 1998; 9: 161–166.
40. Pappas BA, De la Torre JC, Davidson CM, Keyes MT and Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res.* 1996; 708: 50–58.
41. Sarti C, Pantoni L, Bartolini L and Inzitari D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J. Neurol. Sci.* 2002; 204: 263–266.
42. Cechetti F, Worm PV, Pereira LO, Siqueira IR and Netto CA. 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: 1178-1183.
43. Azzubaidi MS, Saxena AK, Talib NA, Ahmed QU and Dogarai BB. Protective effect of treatment with black cumin oil on spatial cognitive functions of rats that suffered global cerebrovascular hypoperfusion. *Acta Neurobiol. Exp.* 2012; 72: 154–165.
44. Cechetti F, Aline A and Pagnussat B. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain res bull.* 2012; 87: 109– 116.
45. STAIR. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke.* 1999; 30: 2752–2758.
46. Ardelt AA, Carpenter RS, Lobo MR, Zeng H, Solanki RB, Zhang A, Kulesza P and Pike MM. Estradiol modulates post-ischemic cerebral vascular remodeling and improves long-term functional outcome in a rat model of stroke. *Brain Res.* 2012; 21: 76–86.
47. Carswell HV, Macrae IM, Gallagher L, Harrop E and 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: 1501–1504.
48. Carswell HV, Dominiczak AF and Macrae IM. Estrogen status affects sensitivity to focal cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278: 290–294.
49. Liao S, Chen W, Kuo J and Chen C. Association of serum estrogen level and ischemic neuroprotection in female rats. *Neurosci Lett.* 2001; 297: 159–162.
50. Sawada M, Alkayed NJ, Goto S, Crain BJ, Traystman RJ, Shaivitz A, Nelson RJ and Hurn PD. Estrogen receptor antagonist ICI182,780 exacerbates ischemic injury in female mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20: 112–118.
51. Niewada M, Kobayashi A, Sandercock PA, Kaminski B and Czlonkowska A. Influence of gender on baseline features and clinical outcomes among 17,370 patients with confirmed ischaemic stroke in the international stroke trial. *Neuroepidemiology.* 2005; 24: 123–128.
52. Roquer J, Campello AR and Gomis M. Sex differences in first-ever acute stroke. *Stroke.* 2003; 34: 1581–1585.
53. Murphy SJ, McCullough LD and Smith JM. Stroke in the female: role of biological sex and estrogen. *ILAR J.* 2004; 45: 147–159.
54. Di Carlo A, Lamassa M, Baldereschi M, Pracucci G, Basile AM, Wolfe CD, Giroud M, Rudd A, Ghetti A and Inzitari D. Sex differences in the clinical presentation, resource use, and 3-month outcome of acute stroke in Europe: data from a multicenter multinational hospital-based registry. *Stroke.* 2003; 34: 1114–1119.

55. Hochner-Celnikier D, Manor O, Garbi B and Chajek-Shaul T. Gender gap in cerebrovascular accidents: comparison of the extent, severity, and risk factors in men and women aged 45-65. *Int J Fertil Womens Med.* 2005; 50: 122–128.
56. Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N and Garcia-Segura LM. Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 2001; 47: 318–329.
57. Azcoitia I, Sierra A, Veiga S and Garcia-Segura LM. Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 1007: 298–305.
58. Azcoitia I, Yague JG and Garcia-Segura LM. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience.* 2011; 191: 139-147.
59. Carswell HV, Dominiczak AF, Garcia-Segura LM, Harada N, Hutchison JB and Macrae IM. Brain aromatase expression after experimental stroke: topography and time course. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 96: 89–91.
60. Garcia-Segura LM. Aromatase in the Brain: Not Just for Reproduction Anymore. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20: 705-712.
61. McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, Oz OK and Hurn PD. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci.* 2003; 23: 8701-8705.
62. Etgen AM, Jover-Mengual T and Zukin RS. Neuroprotective actions of estradiol and novel estrogen analogs in ischemia: Translational implications. *Front. Neuroendocrinol.* 2011; 32: 336-352.
63. Morali G and 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, Kerala, India. 2014. ISBN 978-81-308-0550-4. pp 153-186.*
64. Alonso de Lecifiana M, and Egidio JA. Estrogens as neuroprotectants against ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 2006; 21: 48–53.
65. Brown CM, Suzuki S, Jelks KA, and Wise PM. Estradiol is a potent protective. *Semin. Reprod. Med.* 2009; 27: 240–249.
66. Gibson CL, Gray LJ, Murphy SP and Bath PM. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 2006; 26: 1103–1113.
67. Lebesgue D, Chevalyere V, Zukin RS and Etgen AM. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids.* 2009; 74: 555-561.
68. Suzuki S, Brown CM and Wise PM. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke, *Front. Neuroendocrinol.* 2009; 30: 201–211.
69. Miller NR, Jover T, Cohen HW, Zukin RS and Etgen AM. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology.* 2005; 146: 3070–3079.
70. Jover-Mengual T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM and Zukin RS. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J. Neurosci.* 2002; 22: 2115–2124.
71. Jover-Mengual T, Zukin RS and Etgen AM. MAPK signaling is critical to estradiol protection of CA1 neurons in global ischemia. *Endocrinology.* 2007; 148: 1131–1143.
72. Gulinello M, Lebesgue D, Jover-Mengual T, Zukin RS, and Etgen AM. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats, *Horm. Behav.* 2006; 49: 246–260.
73. Sandstrom NJ and Rowan MH. Acute pretreatment with estradiol protects against CA1 cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia. *Horm Behav.* 2007; 51: 335–345.

74. Dai X, Chen L and Sokabe M. Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons, *Neuropharmacology*. 2007; 52: 1124–1138.
75. Zhang QG, Wang R, Tang H, Dong Y, Chan A, Sareddy GR, Vadlamudi RK and Brann DW. Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 389: 84-91.
76. Liu R, Wang X, Liu Q, Yang SH and Simpkins JW. Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of 17beta-estradiol when administered after cerebral ischemia, *Neurosci. Lett*. 2007; 415: 237–241.
77. Liu R and Yang S-H. Window of opportunity: estrogens as a treatment for ischemic stroke. *Brain Res*. 2013; 1514: 83-90.
78. Bingham D, Macrae IM and Carswell HV Detrimental effects of 17beta oestradiol after permanent middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2005; 25: 414–420.
79. Strom JO, Theodorsson A and Theodorsson E. Mechanisms of Estrogens' Dose-Dependent Neuroprotective and Neurodamaging Effects in Experimental Models of Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci*. 2011; 12: 1533-1562.
80. Inagaki T, Kaneko N, Zukin RS, Castillo PE and Etgen AM. Estradiol attenuates ischemia-induced death of hippocampal neurons and enhances synaptic transmission in aged, long-term hormone-deprived female rats. *PLoS One*. 2012; 7: e38018.
81. Zhang QG, Raz L, Wang R, Han D, De Sevilla L, Yang F, Vadlamudi RK and Brann DW. Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *J Neurosci*. 2009; 29: 13823–13836.
82. Adams M, Fink S, Janssen W, Shah R, and Morrison J. Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *J Comp Neurol* 2004; 474: 419–426.
83. Alkayed NJ, Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD and Miller VM. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke* 2000; 31: 161–168.
84. Arnold S and Beyer C. Neuroprotection by estrogen in the brain: the mitochondrial compartment as presumed therapeutic target. *J. Neurochem*. 2009; 110: 1–11.
85. Suzuki S, Brown CM, Dela Cruz CD, Yang E, Bridwell DA and Wise PM. Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2007; 104: 6013–6018.
86. Wappler EA, Felszeghy K, Szilagyí G, Gal A, Skopal J, Mehra RD, Nyakas C and Nagy Z. Neuroprotective effects of estrogen treatment on ischemia-induced behavioural deficits in ovariectomized gerbils at different ages. *Behav Brain Res*. 2010; 209: 42–48.
87. Chen J-Q, Cammarata PR, Baines CP and Yaguer JD. Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Biogenesis by Estrogens/Estrogen Receptors and Physiological, Pathological and Pharmacological Implications. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793: 1540–1570.
88. Kalita K, Szymczak S and Kaczmarek L. Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus*. 2005; 15: 404–412.
89. Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S and Alves SE. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 2005; 491: 81–95.
90. Levin ER. Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 1951–1959.
91. Hammes SR and Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 2007; 28: 726–741.

92. Perez SE, Chen EY and Mufson EJ. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003; 145: 117–139.
93. Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK and Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals.* 2008; 16: 140–153.
94. Arévalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, and Garcia-Segura LM. Actions of estrogens on glial cells: implications for neuroprotection. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 10: 1106-1112.
95. Dhandapani KM and Brann DW. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Experimental gerontology.* 2007; 42: 70–75.
96. Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB and Brann DW. Astrocyte-derived transforming growth factor- $\beta$  mediates the neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology.* 2005; 146: 2749–2759.
97. Azcoitia I, Santos-Galindo M, Arevalo MA and Garcia-Segura LM. Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Eur J Neurosci.* 2010; 32: 1995–2002.
98. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, and Wise PM. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98: 1952-1957.
99. Elzer JG, Muhammad S, Wintermantel TM, Regnier-Vigouroux A, Ludwig J, Schutz G and Schwaninger M. Neuronal estrogen receptor-alpha mediates neuroprotection by 17beta-estradiol. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30: 935–942.
100. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM and Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 346: 904-910.
101. Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, Hosokawa K, Kawamura A, Itose M, Nishi M, Prossnitz ER and Kawata M. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neurosci Lett.* 2008; 441: 94–99.
102. Lebesgue D, Traub M, De Butte-Smith M, Chen C, Zukin RS, Kelly MJ and 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: e8642.
103. Zhang B, Subramanian S, Dziennis S, Jia J, Uchida M, Akiyoshi K, Migliati E, Lewis AD, Vandenbark AA, Offner H and Hurn PD. Estradiol and G1 reduce infarct size and improve immunosuppression after experimental stroke. *J Immunol.* 2010; 184: 4087–4094.
104. Yi KD, Perez E, Yang S, Liu R, Covey DF and Simpkins JW. The assessment of non-feminizing estrogens for use in neuroprotection. *Brain Res.* 2011; 1379: 61–70.
105. Schreihof DA, and Ma Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: who, what, where and when? *Brain Res.* 2013; 1514: 107-122.
106. Simpkins JW, Yi KD, Yang SH and Dykens JA. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1800: 1113–1120.
107. Brinton RD. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. *Trends Neurosci.* 2008; 31:529–537.
108. Razmara A, Duckles SP, Krause DN and Procaccio V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res* 2007; 1176: 71–81.
109. Hamilton RT, Rettberg JR, Mao Z, To J, Zhao L, Appt SE, Register TC, Kaplan JR and Brinton RD. Hippocampal responsiveness to 17beta-estradiol and equol after long-term ovariectomy: implication for a therapeutic window of opportunity. *Brain Res.* 2011; 1379: 11–22.
110. Raz L, Zhang QG, Zhou CF, Han D, Gulati P, Yang LC, Yang F, Wang RM and Brann DW. Role of Rac1 GTPase in NADPH oxidase activation and cognitive impairment following cerebral ischemia in the rat. *PLoS One.* 2010; 5: e12606.

111. Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and athophysiology. 2007; 87: 245-313.
112. Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP and Klann E. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. Brain Res. 2003; 988: 193-198.
113. Jackman KA, Miller AA, De Silva TM, Crack PJ, Drummond GR and Sobey CG. Br J Pharmacol. 2009; 156: 180.
114. Tang XN, Cairns B, Cairns N and Yenari MA. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. Neuroscience. 2008; 154: 556-562.
115. Genovese T, Mazzon E, Paterniti I, Esposito E, Bramanti P and Cuzzocrea S. Modulation of NADPH oxidase activation in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. Brain Res. 2011; 1372: 92-102.
116. Azevedo RB, Lacava ZG, Miyasaka CK, Chaves SB and Curi R. Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. Braz. J. Med. Biol. Res 2001; 34: 683–687.
117. Rao AK, Dietrich AK, Ziegler YS and Nardulli AM. 17 $\beta$ -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: 382-389.
118. Liu M, Kelley MH, Herson PS and Hurn PD. Neuroprotection of sex steroids. Minerva Endocrinol. 2010; 35: 127.
119. Pajović SB and Sačić ZS. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. Physiol Res. 2008; 57: 801-811.
120. Sheikh N, Tavilani H, Rezaie A, Vaisi-Raygani A and Salimi S. Relationship between estradiol and antioxidant enzymes activity of ischemic stroke. J Biomed Biotechnol. 2009; 2009: 841468.
121. Prokai L, Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Zharikova AD, Perez EJ, Liu R and Simpkins JW. Quinolbased cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003; 100: 11741–11746.
122. Vegeto E, Benedusi V and Maggi A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. Front Neuroendocrinol. 2008; 29: 507–519.
123. Lewis DK, Johnson AB, Stohlgren S, Harms A and Sohrabji F. Effects of estrogen receptor agonistson regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. J.Neuroimmunol. 2008; 195: 47–59.
124. Sarvari M, Hrabovszky E, Kallo I, Solymosi N, Toth K, Liko I, Szeles J, Maho S, Molnar B, and Liposits Z. Estrogens regulate neuroinflammatory genes via estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the frontal cortex of middle-aged female rats. J Neuroinflammation. 2011; 8: 82-92.
125. Pérez-Álvarez MJ, Maza MC, Anton M, Ordoñez L and Wandosell F. Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. J Neuroinfl. 2012; 9: 157.
126. Cui X, Chopp M, Zacharek A, Zhang C, Roberts C and Chen J. Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice. Neuroscience. 2009; 159: 744–750.
127. Luque Contreras D, Vargas Robles H, Romo E, Rios A and Escalante B. The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process. Pharmacol Ther. 2006: 112: 553-563.
128. Stirone C, Boroujerdi A, Duckles SP and Krause DN. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and longterm effects. Mol Pharmacol. 2005; 67: 105–113.
129. Alkayed NJ, Goto S, Sugo N, Joh H, Klaus J, Crain BJ, Bernard O, Traystman R and Hurn PD. Estrogen and Bcl-2: gene induction and effect of transgene in experimental stroke. J. Neurosci. 2001; 21: 7543–7550.

130. Sribnick EA, Ray SK, Nowak MW, Li L and Banik NL. 17 $\beta$ -Estradiol Attenuates Glutamate-Induced Apoptosis and Preserves Electrophysiologic Function in Primary Cortical Neurons. *J Neurosci Res.* 2004; 76: 688–696.
131. Fujita K, Kato T, Shibayama K, Imada H, Yamauchi M, Yoshimoto N, Miyachi E and Nagata Y. Protective effect against 17beta-estradiol on neuronal apoptosis in hippocampus tissue following transient ischemia/recirculation in mongolian gerbils via down-regulation of tissue transglutaminase activity. *Neurochem Res.* 2006; 31: 1059-1068.
132. Won CK, Kim MO and Koh PO. Estrogen modulate Bcl-2 family proteins in ischemic brain injury. *J Vet Sci.* 2006; 68: 277-280.
133. Wappler EA, Gal A, Skopál J and Nagy Z. Single, high-dose 17 $\beta$ -estradiol therapy has anti-apoptotic effect and induces cerebral plasticity following transient forebrain ischemia in gerbils (Short communication). *Acta Physiol Hung.* 2011; 98: 189-194.
134. Liu M, Hurn PD and Alkayed NJ. Cytochrome P450 in neurological disease. *Curr. Drug Metab* 2004; 5: 225–234.
135. Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC and Azcoitia I. Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* 2003; 71: 31–41.
136. Yague JG, Muñoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM and Azcoitia I. Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience.* 2006; 138: 389–401.
137. Fester L, Prange-Kiel J, Jarry H and Rune GM. Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2011; 345: 285-294.
138. Saleh TM, Connell BJ, Legge C and Cribb AE. Estrogen synthesis in the central nucleus of the amygdala following middle cerebral artery occlusion: role in modulating neurotransmission. *Neuroscience* 2005; 135: 1141–1153.
139. Veiga S, Azcoitia I and Garcia-Segura LM. Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. *Neuro Report.* 2005; 16: 1599–1603.
140. Rune GM and Frotscher M. Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience* 2005; 136: 833–842.
141. Bryant DN, Sheldahl LC, Marriott LK, Shapiro RA and Dorsa DM. Multiple pathways transmit neuroprotective effects of gonadal steroids. *Endocrine.* 2006; 29: 199–207.
142. O'Donnell ME, Lam TI, Tran LQ, Foroutan S and Anderson SE. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 2006; 26: 1234–1249.
143. Shin JA, Yang SJ, Jeong SI, Park HJ, Y-H Choi Y-H and Parka E-M. Activation of estrogen receptor  $\beta$  reduces blood–brain barrier breakdown following ischemic injury. *Neuroscience.* 2013; 235: 165-173.
144. Li J, Siegel M, Yuan M, Zeng Z, Finnucan L, Persky R, Hurn PD and McCullough LD. Estrogen enhances neurogenesis and behavioral recovery after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2011; 31: 413-425.
145. Suzuki S, Gerhold LM, Bottner M, Rau SW, De la Cruz C, Yang E, Zhu H, Yu J, Cashion AB, Kindy MS, Merchenthaler I, Gage FH and Wise PM. Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. *J Comp Neurol.* 2007; 500: 1064–1075.
146. Cheng Y, Su Q, Shao B, Cheng J, Wang H, Wang L, Lin Z, Ruan L, ZhuGe Q and Jin K. 17 $\beta$ -Estradiol Attenuates Poststroke Depression and Increases Neurogenesis in Female Ovariectomized Rats. *Bio. Med. Res.* 2013; 392434, 10 pages.
147. Zheng J<sup>1</sup>, Zhang P, Li X, Lei S, Li W, He X, Zhang J, Wang N, Qi C, Chen X, Lu H and Liu Y. Post-stroke estradiol treatment enhances neurogenesis in the subventricular zone of rats after permanent focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2013; 231: 82-90.

148. McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA and Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neurosci.* 2012; 179: 40.
149. Norma Oficial Mexicana NOM-062-zoo-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
150. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Instituto de recursos animales de laboratorio. Consejo superior de investigaciones científicas. Academia nacional de medicina. México. 2002. pp.148.
151. Morris RGM. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J neurosci met.* 1984; 11: 47-60.
152. Luna G. Manual of Histologic staining methods of the armed forces institute of pathology, 3ra ed. Mcgraw-hill. New York. 1960.
153. González-Burgos I, Tapia-Arizmendi G and FeriaVelasco A. Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *biotech. histochem.* 1992; 67: 288–296.
154. Siegel S. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill. New York. 1956.
155. Downie MM and Heath RW. Basic Statistical Methods. Harper E Row. New York. 1983.
156. Tsuchiya M, Sako K, Yura S and Yonemasu Y. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp. Brain Res.* 1992; 89: 87–92.
157. Ulrich PT, Kroppenstedt S, Heimann A and 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: 2412–2420.
158. McDonald RJ and White NM. A triple dissociation of memory systems: hippocampus. *Behav. Neurosci.* 1993; 107: 3-22.
159. McNamara RK and Sketton RW. The neuropharmacological and neurochemical of place learning in the Morris water maze. *Brain Res. Rev.* 1993; 18:33-49.
160. Olsen GM, Scheel-Krüger, Moller A and Jenssen LF. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. *Behav. Neurosci.* 1994; 108: 681-690.
161. Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW and Kogan JH. Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol. Learn. Memory* 1998; 70: 44-61.
162. Block, F. Global ischemia and behavioral deficits. *Prog. Neurobiol.* 1999; 58: 279-295.
163. OlveraCortés E, Cervantes M and González-Burgos I. Place learning, but not cue learning training modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res. Bul.* 2002; 58: 261-270.
164. Olvera-Cortés E, Guevara MA and González-Burgos I. Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Res. Bull.* 2004; 62: 379-384.
165. Hartman RE, Lee JM, Zipfel GJ and Woznia DF (2005). Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2005; 1043: 48-56.
166. Letechipía-Vallejo G, LópezLoeza E, Espinoza-González V, González-Burgos I, Olvera-Cortés ME, Morali G. and Cervantes M. Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of postischemic treatment with melatonin in rats. *J. Pineal Re.* 2007; 42: 139-146.