



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS PRESENTA:

I.BT. Carmen Alicia Viveros García

TEMA:

***“Evaluación de la expresión del ARNm de Elementos de Respuesta
Estrogénica en hipocampo, en condiciones de hipoperfusión cerebral
crónica y tratamiento neuroprotector con raloxifeno”***

EN EL ÁREA TEMATICA DE:

MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

Director de tesis: D.C. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO

MORELIA, MICH, SEPTIEMBRE 2019

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

La estudiante IBT. Carmen Alicia Viveros García recibió beca de CONACyT durante la realización de las actividades académicas y la tesis correspondiente al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas.

Registro de becario CONACyT: 435308

Numero de CVU: 736236

El presente proyecto recibió financiamiento de la Coordinación de la investigación científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Programa de Investigación 2019.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Miguel Cervantes Alfaro, gracias por la confianza que ha depositado en mí, desde mi proceso de estancia en ingeniería, aún recuerdo mis palabras de agradecimiento y sigo pensando que es un claro ejemplo de cómo ser excelente en la vida, y eso es lo que me llevo de esta oportunidad de ser su alumna. Ha sido muy valiente, se atrevió a pasar de las neuronas, su histología y el Morris, a darle una oportunidad a la biología molecular, y con ello me enseñó que no debemos tener miedo, debemos prepararnos para afrontar y entender cada elemento y cada paso que damos.

A la Dra. Elvira Núñez, ha sido pieza clave durante todo mi proceso de Maestría, algunas veces me vio totalmente quebrada, y me guio, no le importo invertir fines de semana, ni quedarse hasta tarde en el laboratorio conmigo hasta llegar a la solución de los problemas técnicos, a veces creo que le gustan esos casos difíciles y eso es admirable.

Dra. Naima Lajud Ávila, gracias por el material biológico y equipo. Es una científica muy estricta pero que practica con el ejemplo; agradezco esas veces que se acercó para detalladamente ver como pipeteaba, también las charlas motivadoras y las críticas constructivas.

A dos personajes que no había tenido la oportunidad de conocer y que con el Dr. Cervantes coincidimos, que sus aportaciones y críticas serian importantes para el desarrollo de este proyecto y así fue: Dra. Esperanza Meléndez y Dra. Alma Lilia Fuentes gracias por sus aportaciones, la guía y disponibilidad que siempre tuvieron.

A la M.C. Ma. Angélica Roque, gracias por guiarme en las extracciones de ARN, todos esos regaños fueron fructíferos al final de la historia.

Este proceso me permitió contar con grandes amistades que amortiguaron los procesos de frustración: Dra. Graciela Letechipía, Dra. Gabriela Morali y Dra. Bertha Fentón, por las frases de ánimo y guía para mi formación. Y todos esos amigos con los que compartí laboratorio, esos que para las risas y consejos son los mejores: Lucia, Alejandra, Fernando, Nohemí, Liz, Ulises, Irvin, Elena, Rafa, Alondra, Roberto, Celeste y por ultimo pero no menos importante Dora, contigo compartimos no solo el Laboratorio de Biología Molecular, compartimos frustraciones y experiencias.

DEDICATORIAS

A Dios, estuviste conmigo desde mi proceso de selección; sabías que esta era una meta importante en mi vida, y durante este proceso de formación mi concepto sobre ti es diferente... Eres más superior y perfecto de lo que imaginaba, entendí que la vida es tan perfecta y organizada, espero sigas bendiciendo mi camino y pueda ayudar a otros jóvenes a compartir esta admiración por la vida y me sigas bendiciendo en mi preparación por entenderla.

A mi familia es lo que me hace fuerte, yo quisiera tenerlos aquí siempre conmigo, han sido sacrificios para ustedes también, se preocuparon por mi cuando no tenía mi beca y siempre, aunque me extrañan quieren que sea mejor persona y profesionalista.

A mi padre José Gustavo Viveros me has enseñado el valor del trabajo y la constancia, eres un gran atleta, profesor y padre para mis hermanas y para mí. Sé que esto de que ya culminara te tenía con pendiente, pero te dije que lo haría, yo te lo prometí y cumplo mi palabra como me enseñaste, también me enseñaste que no tengo que ser la mejor, pero si debo mejorar constantemente, sé que no sería lo que soy sin todo tu trabajo por educarme.

A mi madre Rebeca García, te abandonaba cuando me concentraba en mi proyecto, ya no te preocupes que ya me acostumbré a estar sola; pero siempre tú cariño y bondad me dan ánimos.

A mis hermanas Paola Viveros, Yunuen Viveros y Marina Viveros son el ejemplo de lo que se debe y en ocasiones no se debe hacer, soy afortunada de tenerlas y tener a sus hijos como sobrinos, ellos me motivan a querer mostrarles un mudo mejor que pueden estudiar fuera de su casa y aprender muchas cosas que tal vez no puedan allá, ellos me motivan mucho.

A Jonathan Cruz se podría decir que tú has sido la persona que me ha visto en las peores etapas durante este proceso, fuiste mi hombro cuando no salían mis experimentos, a veces que no entendía algunas cosas, me ayudaste con tus consejos a sobrellevar esto, fuiste un equipo, todos fallamos no somos perfectos y sé que, aunque colmaba tu paciencia siempre procuras lo mejor para mí.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	6
4.1 Fenómenos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por la isquemia	
Isquemia cerebral, global o focal, aguda	6
4.2 Hipoperfusión cerebral crónica.	8
V. ANTECEDENTES	10
5.1 Estrógenos y neuroprotección	10
5.2 Receptores a estrógenos como mediadores de la neuroprotección del	
17 β – estradiol	11
5.3 Acciones del 17- β estradiol sobre los Elementos de respuesta	14
Estrogénica.	
5.4 Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERMs)	17
5.5 Acciones neuroprotectoras de los SERMs. Raloxifeno.	18
VI. JUSTIFICACIÓN	20
VII. HIPÓTESIS	21
VIII. OBJETIVOS	21
8.1 Objetivo General	21
8.2 Objetivos Específicos	21
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	22
9.1 Aspectos éticos del proyecto	22
9.2 Diseño Experimental	22
9.3 Modelo de hipoperfusión cerebral crónica	23

9.4 Evaluación de la expresión del ARNm de Syp, PSD-95 y Bcl-2 _____	24
9.4.1 Aislamiento de ARN _____	24
9.4.2 Cuantificación de ARN _____	25
9.4.3 Tratamiento de ARN con DNasa _____	25
9.4.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc) _____	25
9.4.5 Cuantificación de ADNc _____	25
9.4.6 PCR punto final _____	26
9.4.7 PCR tiempo real _____	27
X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	28
XI. RESULTADOS _____	29
XII. DISCUSIÓN _____	32
XIII. CONCLUSIÓN _____	37
XIV. BIBLIOGRAFÍA _____	38

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Dexoxiribonucleico.

ADNc: Ácido Dexoxiribonucleico complementario.

ANOVA: Análisis de Varianza.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero.

ATP: Adenosín Trifosfato.

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro.

E2: 17 β -Estradiol.

EE: Error Estandar.

ER: Receptores a estrógeno.

Er α : Receptor a estrógeno α .

Er β : Receptor a estrógeno β .

GABA: Acido Gamma-Aminobutírico.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa.

GPR30: Receptor a Estrógeno Acoplado a Proteína G.

HCC: Hipoperfusión Cerebral Crónica.

HIF-1: Factor 1 Inducido por Hipoxia.

IEGs: Genes de Respuesta Temprana.

MAPK: Proteína Quinasa Activada por Mitógenos.

M-MLV: Virus de la Leucemia Murina de Moloney (Transcriptasa).

NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato.

Nf κ B: Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células B Activadas.

OVX: Ovariectomía.

P53: Fosfoproteína nuclear que se une al ácido desoxirribonucleico y actúa como un regulador celular.

PI3K: Fosfatidilinositol 3 Kinasa.

PSD-95: Proteína de Densidad Post-sináptica 95.

qRT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

SERMs: Moduladores Selectivos de los Receptores estrogénicos.

SNC: Sistema Nervioso Central.

Syp: Sinaptofisina.

TFs: Factores Transcripcionales.

2VO: Oclusion Bilateral Permanente de las Arterias Carotidas Comunes.

I. RESUMEN

La disminución de las concentraciones plasmáticas y tisulares de hormonas secretadas por el ovario, y del flujo sanguíneo cerebral, y en consecuencia la reducción progresiva de las acciones estrogénicas y del aporte de oxígeno y glucosa en el cerebro, pueden ser condiciones coincidentes durante el envejecimiento, en hembras. Estos eventos pueden alterar la expresión génica de factores involucrados en procesos neuronales pro- y anti-apoptóticos, así como en la plasticidad neuronal, lo cual puede dar lugar a alteraciones morfológicas y funcionales en estructuras cerebrales vulnerables, tales como el hipocampo y corteza prefrontal involucradas en funciones cognitivas, así como formar parte de los fenómenos fisiopatológicos de enfermedades neurodegenerativas. En estas condiciones, se ha propuesto que el raloxifeno, un fármaco representativo de los moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERMs) puede ejercer efectos neuroprotectores en el hipocampo. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos del raloxifeno sobre la expresión del ARNm de los marcadores sinápticos, sinaptofisina (Syp) y la proteína de densidad posináptica 95 (PSD-95), así como el elemento de sobrevivencia neuronal Bcl-2, en condiciones de Hipoperfusión Cerebral Crónica y ausencia de secreción ovárica de estrógenos, en ratas. Ratas Sprague-Dawley, hembras, de 13-14 meses de edad (300-359 g de peso), fueron asignadas al azar a los siguientes grupos experimentales: Proestro (n=6), ratas intactas en proestro; OVX (n=6) Ovariectomía bilateral; HCC (n=6) modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica (HCC) por oclusión de las arterias carótidas (2VO); OVX+HCC+VEH (n=6), Ovariectomía, HCC, administración de vehículo (dimetilsulfoxido al 15% en solución salina), 0.1 ml/Kg/24 h sc durante 30 días; OVX+HCC+Raloxifeno (n=6), Ovariectomía, HCC, administración de raloxifeno 3.0 mg/Kg/24 h durante 30 días. Al término de los tratamientos o período equivalentes, se obtuvieron muestras de hipocampo de los cerebros de cada uno de los animales, que fueron procesados para determinar la expresión relativa de ARNm mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). En el diseño experimental se integraron los siguientes grupos de animales : Grupo proestro (n=6); Grupo OVX: (n=6), Ovariectomía bilateral; Grupo HCC (n=6), Hipoperfusión Cerebral Crónica*; Grupo OVX+HCC+Veh (n=6), Ovariectomía, Hipoperfusión Cerebral Crónica*, administración de dimetilsulfóxido 15% en agua inyectable, 0.3 ml/ día vía subcutánea, durante 30 días; Grupo OVX+HCC+ Raloxifeno (n=6), Ovariectomía, Hipoperfusión Cerebral Crónica, administración de raloxifeno 3.0 mg/kg/ día en dimetilsulfóxido 15% en agua inyectable, vía subcutánea, durante 30 días. Una vez concluidos los procedimientos anestésico-quirúrgicos y los diferentes tratamientos, se obtuvieron muestras de tejido de hipocampo, las cuales fueron procesadas para la extracción de ARN y síntesis subsecuente de ADNc para determinar la expresión del ARNm, identificándose un incremento en la expresión relativa del ARNm de Bcl-2 los grupos OVX+HCC+Veh, HCC y OVX, en el grupo OVX+HCC+ Raloxifeno se observó un efecto contrario. En el caso de PSD-95 y Syp se observó un incremento de la expresión relativa del ARNm en el grupo OVX+HCC+ Raloxifeno efecto contrario en los grupos OVX+HCC+Veh, HCC y OVX. Con ello se concluye que el raloxifeno activa Elementos de Respuesta Estrogénica involucrados en la plasticidad neuronal y en procesos celulares de sobrevivencia neuronal.

PALABRAS CLAVE: Neuroprotección, HCC, Raloxifeno, Demencia, Hipocampo.

II. ABSTRACT

Reduction of plasma and tissue levels of hormones secreted by the ovary, and progressive lowering of cerebral blood flow, leading to less estrogenic actions and oxygen and glucose supply in the brain, may be coincident conditions during aging in females. These events may alter the genic expression of factors involved in pro- and anti-apoptotic neuronal processes, as well as in neuronal plasticity; thus resulting in structural and functional derangement in vulnerable brain structures, hippocampus and prefrontal cortex, involved in cognitive functions, which may be pathophysiological components of neurodegenerative diseases. Under these conditions, it has been proposed that raloxifene, a representative compound of selective estrogen receptor modulators (SERMs), may exert neuroprotective effects on the hippocampus. The present study was aimed to evaluate the effects of raloxifene on mRNA expression of the synaptic markers Synaptophysin (Syp) and PSD-95, and the anti-apoptotic factor Bcl-2, under chronic cerebral hypoperfusion and absence of estrogen ovary secretion, in rats. Sprague-Dawley female, 13-14 months old, rats (300-350 g b.w.), were randomly allotted to the following experimental groups: Proestrus (n=6) Intact rats in Proestrus; OVX (n=6) Ovariectomy; HCC (n=6), 2 Vessel Occlusion (2VO) model of Chronic Cerebral Hypoperfusion; OVX+HCC+VEH (n=6), Ovariectomy, Chronic Cerebral Hypoperfusion and vehicle administration (15% dimethylsulfoxide in saline), 0.1 ml/Kg/24 h sc, during 30 days; OVX+HCC+Raloxifene (n=6) Ovariectomy, Chronic Cerebral Hypoperfusion and raloxifene administration, 3.0 mg/Kg/24 h during 30 days. At the end of treatments or equivalent periods, samples of dissected hippocampus from the rat brains were processed on order to determine mRNA expression (qRT-PCR). A significant decrease of the relative expression of synaptophysin mRNA, without significant changes of the relative expression of PSD-95 mRNA were observed in OVX, HCC, and OVX+HCC+VEH groups, as compared to the Proestrus group. By contrast, the relative expression of synaptophysin and PSD-95 were observed following raloxifene treatment in the OVX+HCC+ Raloxifene group. A significant increase of the relative expression of Bcl-2 mRNA was observed in OVX and OVX+HCC+VEH groups, without change in the OVX+HCC+ Raloxifene, as compared with the Proestrus group. The results suggest the activation of estrogen response elements accounting for neuronal plasticity and survival by raloxifene treatment.

III. INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del incremento de la esperanza de vida de la población y de la proporción de individuos con 65 años de edad o mayores, se ha incrementado la posibilidad de problemas de salud asociados al proceso de envejecimiento, motivo de especial atención en los últimos años. Entre estos problemas se ha destacado a nivel mundial el deterioro progresivo de las funciones cognitivas, identificado como demencia, (Royal Collage of Psychiatrists, 2018). La Organización Mundial de la Salud ha identificado a poco más de 47 millones de personas con demencia y se prevé que esta cifra se incremente a 75 millones hacia el año 2035 y a más de 132 millones para el año 2050 (WHO, 2017). En México, se reportan cerca de 860 mil pacientes con algún tipo de demencia y se prevé una tendencia al incremento de la incidencia de esta enfermedad en los siguientes años (SSA, 2018).

En estas condiciones, la reducción progresiva del flujo sanguíneo cerebral y la consiguiente reducción del aporte de oxígeno y glucosa en estructuras cerebrales específicas (Hipoperfusión Cerebral Crónica), tales como el hipocampo y corteza prefrontal puede dar lugar al deterioro progresivo y pérdida de funciones cognitivas, a las que se ha atribuido el 20% de los casos de demencia en seres humanos (Gorelick y col., 2011; Ohta y col., 1997; Ni y col., 1994; Chandra, 2017).

Por otra parte, la disminución de las concentraciones sanguíneas y tisulares de hormonas gonadales secretadas por el ovario puede propiciar modificaciones de la estructura y el funcionamiento cerebral que se han asociado al deterioro cognoscitivo y a la mayor presencia de trastornos neurodegenerativos (Azcoitia y col., 2003; Genazzani, 2007; Henderson, 2009).

Dado que la hipoperfusión cerebral crónica (HCC) asociada al envejecimiento y la disminución y/o ausencia de actividad estrogénica en el cerebro pueden coincidir en mujeres postmenopáusicas, se ha considerado que pueden ser factores concurrentes de daño cerebral y deterioro cognoscitivo en mujeres a partir de la menopausia (Henderson, 2008; Otha y col., 1997; Rollick y col., 2018).

La participación de los estrógenos en diversos procesos involucrados en la estructura y el funcionamiento cerebral, además de la conducta reproductiva, ha sido abordada en diversos estudios. Se ha mostrado que los estrógenos participan, a través de procesos celulares activados mediante su interacción con receptores estrogénicos, en la modulación de la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica, la sobrevivencia neuronal, la reparación y regeneración neuronales, la neurogénesis, así como en la regulación de la diferenciación y desarrollo neuronal. Además se ha mostrado su participación en otras funciones del Sistema Nervioso Central (SNC), entre las cuales se encuentran el control de los procesos cognitivos y el aprendizaje y la memoria (McEwen y col., 1995; González-Burgos y col., 2005; Liu y col., 2008; Spencer y col., 2008; González-Burgos, 2009; Méndez y col., 2011; Morali & Cervantes, 2014; Zhu y col., 2017; Engler-Chiurazzi y col., 2017).

Existen evidencias que indican que en concentraciones fisiológicas los estrógenos pueden regular los procesos de apoptosis y sobrevivencia neuronal en diversas estructuras cerebrales. Asimismo, las acciones de los estrógenos en el tejido cerebral, incluyendo sus acciones neuroprotectoras, se han asociado con la regulación transcripcional de Elementos de Respuesta Estrogénica, involucrados en procesos de regeneración axonal, sinaptogénesis y síntesis y secreción de factores de crecimiento (Harms y col., 2001; Ouyang y col., 2004; Chan, 2001; Wang y col., 2015; Zhang y col., 2017).

En relación con los efectos neuroprotectores de los estrógenos, se conoce que estos compuestos pueden promover la expresión del gen Bcl-2 y la síntesis subsecuente de los componentes de la familia de proteínas Bcl-2, que se ha vinculado con la regulación, a través de una acción inhibitoria, de la muerte neuronal por apoptosis y/o necrosis, en condiciones de daño cerebral (Harms y col., 2001; Ouyang y col., 2004; Chan y col., 2001; Wang y col., 2015; Zhang y col., 2017). Asimismo, el estradiol (E2) promueve la formación y maduración de espinas dendríticas en varias estructuras cerebrales, incluyendo el hipotálamo, el hipocampo y la corteza prefrontal (Gould y col., 1990; Woolley y McEwen, 1992), así como la expresión de proteínas que forman parte de la estructura y/o procesos

de regulación funcional de la sinápsis, incluyendo sinaptofisina (Syp) y PSD-95 cuya presencia y magnitud son indicadores de formación de sinapsis y conectividad sináptica (Woolley y McEwen , 1992; Spencer y col., 2008; Hao y col., 2006; Choi y col., 2003; González-Burgos y col., 2005; Hao y col., 2006; Jelks y col., 2007). La preservación del sustrato neural y conectividad sináptica en el hipocampo se han asociado a la eficiencia en el desempeño de funciones cognoscitivas en ratones (Spencer y col., 2008).

En este sentido, se ha planteado la posibilidad de que los compuestos Moduladores Selectivos de Receptores de Estrógenos (SERMs) interactúen con los receptores estrogénicos y de esta manera induzcan Elementos de Respuesta Estrogénica y procesos celulares que den lugar a fenómenos neuroprotectores, semejantes a los inducidos por E2, en estructuras cerebrales vulnerables (DonCarlos y col., 2009; Paige y col., 1999; Vesga y col., 2019).

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Fenómenos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por la isquemia Isquemia cerebral, global o focal, aguda

El suministro de oxígeno y glucosa que se requiere para satisfacer sus demandas metabólicas del cerebro en los mamíferos corresponde aproximadamente a la cantidad de dichos compuestos contenida en al menos el 20% del total del flujo sanguíneo destinado a todo el organismo (Brust, 2013). En estas condiciones, la circulación cerebral está regulada de manera muy precisa para adaptarse a los requerimientos de consumo de oxígeno y glucosa en distintas condiciones del funcionamiento cerebral. La presión arterial media, la producción de dióxido de carbono (CO₂), el pH tisular y otros mediadores químicos están involucrados en la regulación del flujo sanguíneo cerebral global y del flujo sanguíneo en estructuras cerebrales específicas (Moralí y Cervantes, 2014).

La interrupción o la reducción súbita (de manera global o focal) del aporte sanguíneo al cerebro pueden dar lugar a la falla del soporte metabólico que provee de energía a las células nerviosas, lo cual a su vez puede provocar un conjunto de alteraciones, que ocurren de manera simultánea o secuencial, en los mecanismos celulares esenciales para el funcionamiento neuronal. Tal es el caso de:

- Disminución en la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) y diversas alteraciones de los gradientes iónicos transmembranales, e incremento anormal de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ y de Na⁺, y disminución del pH.
- Ingreso excesivo, no regulado, de Ca²⁺ al interior de las células a través de los canales iónicos operados por voltaje y por la liberación excesiva de glutamato y activación anormal de receptores glutamatérgicos, (Excitotoxicidad).
- Activación de procesos celulares que promueven alteraciones mitocondriales, en el transporte membranar y en la síntesis de proteínas; así como activación directa de lipasas, proteasas y endonucleasas dependientes de Ca²⁺.

- Sobreproducción de radicales libres, lipoperoxidación de las membranas celulares, daño a macromoléculas y al citoesqueleto, así como activación de citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral α , interleucina-1 e interleucina-6; expresión y activación de la sintasa inducible óxido nítrico y la ciclo-oxigenasa-2).
- Activación de cascadas de señalización proapoptóticas (factor nuclear κ B y P53, cambios en la relación Bax/Bcl-2, liberación de citocromo c con activación de caspasas y finalmente activación de enzimas que rompen la estructura del ácido desoxirribonucleico) que mantiene condiciones que pueden dar lugar a daño estructural, funcional y muerte neuronal, principalmente en estructuras vulnerables como las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon de hipocampo y de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral. (Pulsinelli, 1985; Pulsinelli y col., 1997; Lipton, 1999; Ladecola y Alexander, 2001; Chinopulos y Adam, 2006; Warner y col., 2004; Chan, 2001).

Sin embargo, la isquemia cerebral también puede dar lugar a mecanismos de reparación neuronal y recuperación funcional mediante procesos de plasticidad que involucran a las neuronas remanentes tanto en las estructuras mayormente afectadas por la isquemia como en aquellas que no fueron involucradas en el daño isquémico (Crepel y col., 2003; Bendel y col., 2005; Hurtado y col., 2006; Ruan y col., 2006).

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

4.2. Hipoperfusión cerebral crónica

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

El abordaje de las características del daño cerebral y las alteraciones de las funciones cognoscitivas atribuibles a hipoperfusión cerebral crónica, como podría ocurrir en seres humanos, ha sido realizado en gran parte mediante modelos de dicha patología en animales de experimentación (Sarti y col., 2002). De esta manera, la oclusión permanente o la sección bilateral, simultánea o secuencial, de las arterias carótidas comunes (2VO), en ratas, dejando el suministro de sangre al cerebro dependiente solamente del flujo sanguíneo cerebral a través de las arterias vertebrales y su redistribución a partir del polígono de Willis, ha sido considerado como un modelo experimental de hipoperfusión cerebral crónica (Ginsberg y Busto, 1989; Farkas y col., 2007; Hossmann, 2008; Ulrich y col., 1998; Pappas y col., 1996; Ohta y col.1997; Cechetti y col., 2012a, 2012b).

En las condiciones de HCC inducidas por este modelo experimental se ha observado una reducción, a largo plazo, de al menos un 30% del flujo sanguíneo cerebral normal (Otori y col., 2003) así como, daño, alteración funcional y muerte neuronal en las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia, entre las que destacan las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo (las cuales son parte fundamental del circuito trisináptico, donde se realiza la adquisición y procesamiento de la información sensorial involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria) y de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral, directamente involucradas en la integración de funciones cognitivas. Este daño neuronal se ha relacionado con estrés oxidativo e incremento anormal de especies reactivas de oxígeno, procesos celulares pro-apoptóticos, fenómenos pro-inflamatorios originados por la activación glial y el deterioro progresivo de las funciones cognitivas dependientes del hipocampo como son el aprendizaje y la memoria espacial y el aprendizaje y la memoria de trabajo espacial (Ginsberg y Busto, 1989; Pappas y col. 1996; Ohta y col. 1997; Ulrich y col. 1998; Otori y col., 2003; Farkas y col., 2007; Hossman, 2008; Cechetti y col., 2012a, 2012b).

Esta pérdida neuronal se acompaña de una notable activación de las células gliales (Ginsberg y Busto., 1989; Pappas y col., 1996; Ohta y col., 1997; Ulrich y col., 1998; Farkas y col., 2007; Hossman, 2008; Cechetti y col., 2010, 2012a, 2012b).

V. ANTECEDENTES.

5.1. Estrógenos y neuroprotección

Una gran cantidad de mecanismos celulares están involucrados en procesos homeostáticos que regulan y mantienen el sustrato neural del cerebro y los procesos neuroquímicos en condiciones apropiadas, como se requiere para el funcionamiento normal de neuronas, células gliales y circuitos neuronales en estructuras cerebrales específicas, dando lugar asimismo a una conectividad eficiente entre las diversas estructuras cerebrales que participan de manera conjunta en las funciones cerebrales.

Entre los factores endógenos que pueden influir sobre dichos mecanismos homeostáticos se encuentran las hormonas esteroides cuya secreción y concentraciones sanguíneas son el resultado de la actividad cíclica del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, en individuos del sexo femenino. Se ha mostrado que en las hembras, en condiciones fisiológicas el cerebro es un “blanco” importante de las acciones reguladoras y tróficas del 17β -Estradiol (E2) sintetizado en el ovario, así como en estructuras cerebrales tales como el hipotálamo, el hipocampo y la corteza cerebral (Brann y col., 2007; Hojo y col., 2008; Mukai y col., 2010; McEwen y col., 2012).

En condiciones fisiológicas el 17β -estradiol regula diversos procesos cerebrales involucrados en el control neuroendocrino de las funciones reproductivas y el comportamiento sexual femenino en diversas especies de mamíferos y en seres humanos; sin embargo, otros procesos cerebrales involucrados en diversas funciones tales como el control del movimiento fino, la coordinación motora, la percepción del dolor, la regulación del estado de ánimo, las funciones cognoscitivas y otras actividades conscientes, así como el control cerebral del sistema nervioso autónomo y la regulación del funcionamiento cardiovascular y de otros sistemas viscerales pueden ser también modificados de manera importante por las acciones del E2 en el Sistema Nervioso Central (Raghava y col., 2017).

Las acciones estrogénicas que dan lugar a estos fenómenos tienen lugar en los circuitos neuronales de un conjunto de estructuras cerebrales que incluyen a: la

médula espinal, el hipotálamo, el cerebelo, las estructuras de los sistemas nigro-estriatal y meso-límbico, la amígdala, el hipocampo, la corteza cerebral y el tallo cerebral. En estas estructuras, dichas acciones están mediadas por receptores a estrógeno (ER) y pueden afectar la comunicación celular, la generación, la codificación, y el procesamiento de la información contenida en las señales eléctricas y químicas, mediante la modificación de la síntesis, liberación, biotransformación, recaptura e interacción con receptores de diversos neurotransmisores en los sistemas colinérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, glutamatérgico y neuropeptidérgicos, determinantes de las características de la plasticidad neuronal, esencial en procesos cerebrales tales como el desarrollo cerebral, el aprendizaje, la memoria y los diversos patrones de comportamiento (McEwen y col., 2012).

Adicionalmente, se ha mostrado la participación relevante del 17β -estradiol en la regulación de la expresión génica, la supervivencia neuronal, la diferenciación neuronal y glial, y la transmisión sináptica; así como, bajo ciertas condiciones, en procesos antiinflamatorios, de neuroprotección, de reparación de daño neuronal y de recuperación de funciones cerebrales mediante mecanismos de plasticidad en circuitos neuronales de estructuras cerebrales específicas (Woolley, 2007; Vegeto y col., 2006; Raghava y col. 2017; Zhu y col., 2017).

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

Se ha mostrado que las acciones de E2 en el cerebro están mediadas por varios tipos de receptores a estrógeno (ER) situados en la membrana o en el citoplasma y otras estructuras subcelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico) del soma, las dendritas, las estructuras especializadas pre y post sinápticas en las neuronas y en las células gliales que conforman las diversas estructuras cerebrales (McEwen y col., 2012).

Los receptores a estradiol llamados clásicos, ER α y ER β , han sido localizados en el núcleo, el citoplasma y la membrana de las neuronas, donde actúan como mediadores de activación de las acciones genómicas correspondientes a diversos

efectos estrogénicos en el Sistema Nervioso Central. Los ER α se localizan con gran densidad en el hipocampo, el hipotálamo y el área preóptica, mientras que su densidad es relativamente baja en la corteza cerebral. En contraste, los ER β se ubican predominantemente en la corteza cerebral, aunque también son abundantes en el hipocampo, el bulbo olfatorio, el septum, el área preóptica, el núcleo de la estria terminalis, la amígdala, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el tálamo, el área tegmental ventral, la sustancia negra y el cerebelo (Kalita y col., 2005; Milner y col., 2001; Milner y col. 2005; Woolley, 2007; Levin, 2005; Hammes y Levin 2007; Pérez y col., 2003; Dubal y col., 2001; Elzer y col., 2010).

Los ER α y los ER β se expresan también en los astrocitos, en los que las acciones estrogénicas pueden activar la síntesis y liberación de factores de crecimiento y bajo ciertas condiciones formar parte de procesos cerebrales de neuroprotección (Arévalo M.A. y col., 2011; Carswell H.V. y col., 2004; Dhandapani K.M. y col., 2005; Azcoitia I. y col., 2010; Dhandapani K.M. y Brann D.W. 2007). En este sentido, las modificaciones de las acciones etrogénicas en animales “knockout” o “knockdown” o bajo tratamiento con agonistas o antagonistas selectivos de los ER α y de los ER β , sustentan la participación relevante de los ER α como mediadores de las acciones estrogénicas neuroprotectoras contra el daño cerebral por isquemia, aunque no se ha descartado la participación de los ER β en esto procesos (Miller y col., 2005; Dai y col., 2007; Carswell y col., 2004; Dubal y col., 2001; Elzer y col., 2010).

Los receptores estrogénicos clásicos, ER α y los ER β , son factores de transcripción dependientes de ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares a esteroides (Nilsson y col., 2001) que una vez activados, forman homo- o heterodímeros e interaccionan con el ADN, cofactores trancipcionales y regiones reguladoras de trancipción de genes. Además, los receptores de estrógenos activados pueden interaccionar con otros factores de transcripción para estabilizar la unión de dichos factores trancipcionales, con elementos específicos de respuesta en el ADN, así como coactivadores o correpresores que finalmente determinan la activación de procesos de transcripción, dando lugar a la transcripción

de genes como Elementos de Respuesta Estrogénica (Liu y col., 2010). Asimismo, se ha descrito una interacción cooperativa de los ER α y los ER β y sus coactivadores para procesos que involucran regulación de la expresión genética a nivel nuclear y mitocondrial (Chen y col. 2009).

Los receptores ER α y los ER β pueden ser fosforilados por receptores de tirosina cinasa y de esta manera quedar activados y translocados al núcleo, aún en ausencia de ligando. Así mismo, tanto los receptores citosólicos como los receptores membranales a estrógenos pueden transactivar al receptor de tirosina cinasa o a receptores asociados a cinasas, modulando de así cascadas de señalización intracelular (Yaşar y col. 2016).

Por otra parte, diversas acciones estrogénicas en el cerebro no dependen de acciones transcripcionales directas inducidas por ER α y los ER β , sino de la activación de receptores membranales a estrógenos. Estos son estructuras macromoleculares ancladas en la membrana, que pueden interactuar con proteínas G, receptores de tirosina cinasa, cinasas ligadas o no ligadas a receptores (P13K, MAPs), y otras vías de señalización intracelular (Marin y col., 2009, Yaşar y col. 2016).

Además, entre los receptores membranales a estrógenos se ha descrito un receptor estrogénico acoplado a Proteínas G denominado GPR30, localizado en la membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplásmico de las neuronas en varias estructuras cerebrales, incluyendo el hipocampo, el hipotálamo y el cuerpo estriado, entre otras (Funakoshi y col. 2006; Matsuda y col. 2008; Yaşar y col. 2016).

De la interacción de E2 y GPR30 resulta la activación de vías de señalización de procesos celulares no genómicos, los cuales pueden iniciarse con un periodo de latencia muy breve e incluyen modificaciones de la fosforilación de proteínas y cambios en la concentración de segundos mensajeros intracelulares como Adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y calcio (Liu y col., 2010).

Todas estas vías de señalización mediadas por la interacción de estrógenos con receptores membranales, pueden dar como resultado final la activación de factores de transcripción y cofactores que modulan la expresión génica. Los compuestos con actividad estrogénica pueden encontrar receptores en estructuras sub-celulares específicas, tales como la mitocondria o las sinapsis o pueden ejercer efectos directos, (efectos antioxidantes) sobre otros procesos celulares (Prossnitz y Barton 2011).

5.3. Acciones del 17- β estradiol sobre los Elementos de respuesta Estrogénica.

Las acciones de los estrógenos en el tejido cerebral, incluyendo sus acciones neuroprotectoras, se han asociado con la regulación transcripcional de Elementos de Respuesta Estrogénica involucrados en procesos de regeneración axonal, sinaptogénesis, síntesis y secreción de factores de crecimiento, regulación de los procesos de apoptosis y sobrevivencia neuronal (Harms y col., 2001; Wu y col., 2003; Ouyang y Giffard 2004; Wang y col., 2015; Zhu y col., 2017)

En relación con los efectos neuroprotectores de los estrógenos, se conoce que estos compuestos pueden promover la expresión del gen Bcl-2 y la síntesis subsecuente de los componentes de la familia de proteínas Bcl-2, que se ha vinculado con la regulación, a través de una acción inhibitoria, de la muerte neuronal por apoptosis y/o necrosis, en condiciones de daño cerebral (Harms C. y col., 2001; Wu y col., 2003; Ouyang y col., 2004; Wang y col., 2015; Zhu y col., 2017).

Así mismo, el estradiol promueve la expresión de genes que codifican para proteínas que forman parte de la estructura y/o procesos de regulación funcional de la sinápsis, incluyendo Syp y PSD-95 cuya presencia y magnitud son indicadores de formación de sinapsis y conectividad sináptica en diversas estructuras cerebrales, incluyendo el hipotálamo, el hipocampo y la corteza prefrontal (Woolley y McEwen 1992; Spencer y col., 2008; Hao y col., 2006; Choi y col., 2003; González-Burgos y col., 2005; Hao y col., 2006; Jelks y col., 2007; Crispino y col., 1999)

Se ha mostrado que la expresión del ARNm de proteínas consideradas como marcadores de estructuras pre-sinápticas: sinaptotagmina I, sinaptotagmina IV, Syp, en el segmento CA3 del cuerno de Ammon del hipocampo varía en relación directa con las concentraciones de estradiol durante el ciclo estral en la rata (Crispino y col., 1999). Además, la participación del E2 sintetizado localmente en el cerebro, para la síntesis de proteínas sinápticas (espinofilina y Syp), ha sido sustentado mediante estudios en cultivos primarios de neuronas de los segmentos CA1 y CA3 del cuerno de Ammon del hipocampo, en las que el inhibidor de la aromatización de testosterona, y de la síntesis de estradiol, letrozol, indujo una reducción a la baja de la expresión de dichas proteínas sinápticas (Kiel y col. 2006).

Así mismo, la administración de estradiol incrementa la síntesis de proteínas pre- y post-sinápticas, incluyendo Syp, en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en primates hembra; lo cual fue interpretado como un indicador de fenómenos de plasticidad neuronal, dependiente de E2 (Choi y col., 2003)

La expresión de ARNm de PSD-95 en el hipocampo dorsal también varía en relación con las concentraciones de estradiol durante el ciclo estral en la rata; este fenómeno parece estar asociado con la activación rápida de la vía de señalización Akt que podría estar involucrada en la sinaptogénesis dependiente de estradiol (Keith, 2003).

El efecto neuroprotector del estradiol, también ha sido sustentado por el análisis de la expresión de proteínas pre- y post-sinápticas (Syp y PSD-95) y su relación con la preservación de espinas dendríticas en forma de hongo en el segmento CA1 del hipocampo en un modelo de demencia vascular en ratas (Zhu y col., 2017).

La importancia de las acciones estrogénicas, mediadas por estos diferentes tipos de receptores en neuronas y células gliales, para determinados aspectos del funcionamiento cerebral en hembras de varias especies, incluso en seres humanos, puede ser ejemplificada por los cambios en la densidad, la configuración y proporciones relativas de los diferentes tipos de espinas dendríticas en las células piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, los cuales son

parte fundamental de la generación de señales, la comunicación celular y los cambios plásticos que inciden en las características del aprendizaje y la memoria espacial. Las características de estos fenómenos se relacionan directamente con las fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas y cerebrales de E2, durante el ciclo estral, y en otras condiciones que afectan la síntesis y secreción de E2 en el ovario o el cerebro de las hembras (Gould y col., 1990; Ikeda y col., 2006; Mukai y col., 2010; Jelks y col., 2007; Marin y col., 2009)

Dado que el hipocampo es una estructura cerebral muy vulnerable a la reducción del flujo sanguíneo, cabe destacar que en el hipocampo los receptores ER α , ER β GPR30 y otros receptores membranales, parecen estar involucrados en diversas acciones estrogénicas que pueden dar lugar a neuroprotección, al inducir procesos celulares que guardan una relación de oposición con los mecanismos fisiopatológicos del daño cerebral por isquemia. En estas condiciones diversos fenómenos, tales como: a) reducción del estrés oxidativo, a través de la reducción del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial, la reducción de la activación NADPH oxidasa y de la producción de ROS, la modulación de enzimas antioxidantes, la captura de ROS; b) reducción de los fenómenos proinflamatorios inducidos por la isquemia; c) incremento de los mecanismos celulares antiapoptóticos; d) promoción de la síntesis y liberación de factores tróficos (BDNF, IGF) por parte de los astrocitos; e) mejoramiento a corto y largo plazo del flujo sanguíneo en las zonas isquémicas; f) regulación de las vías de señalización PI3K/Akt/MAPK en favor de la supervivencia neuronal; g) preservación de la estructura y la función de la barrera hematoencefálica; h) reparación de los circuitos neuronales dañados mediante sinaptogénesis y neurogénesis, han sido identificados como acciones estrogénicas de neuroprotección (Moralí y Cervantes, 2014; Zhu y col., 2017).

A este respecto, el hecho de que varios análogos químicos del estradiol no feminizantes que carecen de afinidad por los receptores ER α y ER β , pueden ejercer efectos neuroprotectores contra el daño cerebral en modelos experimentales de isquemia focal, ha orientado la atención hacia la posibilidad de que estos efectos

estén mediados por otros receptores estrogénicos, incluyendo el receptor GPR30 (Simpkins y col., 2013). De hecho, la activación del GPR30 mediante el agonista selectivo G1, da lugar a efectos neuroprotectores contra el daño cerebral provocado por la reducción del flujo sanguíneo cerebral en modelos experimentales de isquemia focal o global (Lebesgue y col., 2009; Zhang y col., 2010; Lebesgue y col., 2010).

5.4. Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERMs)

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) son compuestos químicos no esteroideos capaces de unirse a los receptores estrogénicos e inducir cambios en su conformación tridimensional, de tal manera que pueden actuar como agonistas en determinados tejidos (hueso, cerebro), o como antagonistas en otros tejidos (glándula mamaria) con la consecuente activación o inhibición de procesos celulares que dan lugar a las acciones estrogénicas en esos diferentes tejidos (Riggs y Hartmann, 2003; Brzozowski y col. 1997; Simth y col. 2004).

Los SERMs se han clasificado por su estructura química como: derivados del Trifeniletileno, tales como el Tamoxifeno y citrato de Clomifeno, que son identificados también como SERMs de primera generación; derivados del Benzotiofeno que incluyen a los SERMs de segunda generación, tales como el Raloxifeno, Toremifeno, Droloxifeno, Idoxifeno y derivados del Benzopirano SERMs de tercera generación, Arzoxifeno, Ospemifeno y SERMs de cuarta generación, Ormeloxifeno, Lasofoxifeno, Pipendoxifeno y Bazedoxifeno y Fulvestrant. Además, deben ser incluidos en el grupo los fito SERMs, como Genisteina. (Dowers y col., 2006).

Los SERMs se desarrollaron inicialmente como antiestrógenos para el tratamiento del cáncer de mama; sin embargo, se ha mostrado que poseen otras propiedades que justificarían su prescripción para el tratamiento y prevención de otras enfermedades. Así se ha propuesto que los SERMs, ya sea sintéticos o naturales, tales como fitoestrógenos, representan una alternativa del estradiol para el tratamiento o la prevención de trastornos neurodegenerativos tales como la

disminución de las capacidades cognoscitivas asociada con el envejecimiento o el desarrollo de los trastornos afectivos y cognitivos después de la menopausia (DonCarlos y col., 2009; Liu y Yang, 2013).

5.5. Acciones neuroprotectoras de los SERMs. Raloxifeno.

Ante la perspectiva de que los SERMs tengan acciones y efectos neuroprotectores mediante su interacción con receptores estrogénicos, se han realizado estudios en diferentes modelos experimentales de daño cerebral y neuronal. Estos incluyen modelos de lesión traumática del sistema nervioso central y de los nervios periféricos, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo y los trastornos del estado de ánimo (Arévalo y col., 2011).

Varios estudios han mostrado que SERMs como el Tamoxifeno, el raloxifeno y el Bazedoxifeno son neuroprotectores *in vivo* e *in vitro* (Barreto y col., 2009; Kokiko y col., 2006; O'Neill y col., 2004) mediante diversos mecanismos de acción.

En particular, se ha descrito que el raloxifeno reduce la activación glial, así como la producción de mediadores inflamatorios en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Vegeto E. y col., 2006), lesión traumática de la corteza cerebral (Kokiko y col., 2006; Barreto y col., 2009), de la médula espinal (Ismailoglu y col., 2013) y del nervio ciático (McMurray y col., 2003). En el hipocampo, el raloxifeno tiene propiedades similares a los estrógenos sobre la actividad de la colina acetil transferasa ChAT del hipocampo y la neurotransmisión colinérgica, protege las neuronas del giro dentado de la toxicidad inducida por ácido caínico y por β -amiloide (Du y col., 2004); también se ha descrito que promueve el crecimiento axonal (Nilsen y col., 1998), disminuye el daño mediado por lipo-oxidación (Konyalioglu y col., 2007) y reduce la activación de la microglía después de la administración de lipopolisacárido (Tapia-Gonzalez y col., 2008).

Se ha postulado que el raloxifeno actúa en el sistema nervioso central como un agonista de los receptores estrogénicos y que las acciones neuroprotectoras del

raloxifeno están mediadas, al menos en parte, por la activación del receptor GPR30 (Abdelhamid y col., 2011). De esta manera, el raloxifeno activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) a través de una vía PI3K / Akt (O'Neill y col., 2004), induce la actividad de la telomerasa, a través de la misma vía (Du y col., 2004), reduce la inflamación a través de una acción inhibitoria sobre la expresión de CCL20 y las vías de NF- κ B en astrocitos reactivos (Li y col., 2014).

También se han identificado al incremento de la neurogénesis en la zona sub-ventricular del cerebro y a la reducción de la pérdida de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la corteza en ratas ovariectomizadas con oclusión de la arteria cerebral media, como mecanismos de la acción neuroprotectora de raloxifeno (Khan y col., 2015). Otros hallazgos sugieren que el raloxifeno mejora el rendimiento cognitivo relacionado con la corteza prefrontal y provocan un aumento significativo en la densidad de las espinas dendríticas apicales de neuronas piramidales, de la capa III de la corteza prefrontal pre-límbica e infra-límbica (Velázquez-Zamora y col., 2012).

Estos datos experimentales son importantes, porque sustentan la posibilidad de desarrollo y potencialidad de uso clínico de los SERMs como neuroprotectores, cuyas acciones estarían mediadas por la modulación de receptor a estrógeno cuya activación no induciría acciones y efectos estrogénicos indeseables. De hecho, el potencial neuroprotector del raloxifeno ha sido mostrado por estudios clínicos que muestran su eficacia en contra de procesos neurodegenerativos y del deterioro cognitivo en hombres ancianos (Goekoop y col., 2005; Goekoop y col. 2006) y en mujeres posmenopáusicas (Yaffe y col., 2005; Jacobsen y col., 2009; Baez-Jurado E. y col., 2019).

VI. JUSTIFICACIÓN

En el proceso de envejecimiento, la disminución de las concentraciones sanguíneas y tisulares de hormonas gonadales secretadas por el ovario puede propiciar modificaciones de la estructura y el funcionamiento cerebral que favorezcan la presencia y progresión de trastornos neurodegenerativos. Por lo que la disminución y/o la ausencia de actividad estrogénica y la HCC pueden ser factores concurrentes de daño cerebral y deterioro cognoscitivo en mujeres pre y postmenopáusicas. Se ha mostrado que el raloxifeno, un compuesto representativo de los fármacos moduladores específicos de receptores a estradiol (SERMs) actúa con gran selectividad como agonista de receptores específicos de estrógenos en el cerebro. Resultados de estudios recientes realizados en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con raloxifeno impide el deterioro de la ejecución de tareas de memoria de trabajo espacial (dependiente en gran medida de la integridad morfológica y funcional del hipocampo), inducida por la hipoperfusión cerebral crónica, (reducción del orden de 35-45% del flujo sanguíneo cerebral) y la ausencia de estrógenos ováricos, en ratas. En estos procesos de deterioro funcional y de neuroprotección pueden estar involucradas modificaciones de la expresión y actividad de los Elementos de Respuesta Estrogénica (Syp, PSD-95 y Bcl-2), en el hipocampo por la reducción del flujo sanguíneo y/o por el efecto del raloxifeno.

En estas condiciones la evaluación a largo plazo de la expresión del ARNm de los Elementos de Respuesta Estrogénica (Syp, PSD-95 y Bcl-2), en el hipocampo (una de las regiones más vulnerables del cerebro) constituye un parámetro indicador de mecanismos moleculares en repuesta contra el daño cerebral y en su caso de la eficacia y mecanismos de acción de un fármaco potencialmente neuroprotector, de acuerdo con los lineamientos establecidos por consenso para el estudio pre-clínico de fármacos neuroprotectores contra el daño.

Se espera que los resultados de la investigación contribuyan a la sustentación de propuestas con posible aplicación en el manejo clínico-terapéutico de individuos expuestos a hipoperfusión cerebral crónica en ausencia de la actividad estrogénica durante el proceso de envejecimiento.

VII. HIPÓTESIS

La administración de raloxifeno modifica la expresión del ARNm de Elementos de Respuesta Estrogénica (Syp, PSD-95 y Bcl-2) en hipocampo, en condiciones de Hipoperfusión Cerebral Crónica y ovariectomía, en ratas.

VIII. OBJETIVOS

8.1. Objetivo General

Determinar si la administración de raloxifeno tiene un efecto sobre la expresión del ARNm de Elementos de Respuesta Estrogénica (Syp, PSD-95 y Bcl-2) en hipocampo, en condiciones de Hipoperfusión Cerebral Crónica y ovariectomía.

8.2. Objetivos Específicos

- Determinar la expresión del ARNm de Elementos de Respuesta Estrogénica (Syp, PSD-95 y Bcl-2) en hipocampo, en la fase del ciclo estral de la rata con mayor actividad estrogénica (Proestro).
- Determinar la expresión del ARNm de Elementos de Respuesta Estrogénica (Syp, PSD-95 y Bcl-2) en hipocampo, en condiciones de ovariectomía.
- Determinar la expresión del ARNm de Elementos de Respuesta Estrogénica (Syp, PSD-95 y Bcl-2) en hipocampo, en condiciones de ovariectomía e hipoperfusión cerebral crónica.
- Determinar la expresión del ARNm de Elementos de Respuesta Estrogénica (Syp, PSD-95 y Bcl-2) en hipocampo, en condiciones de ovariectomía, hipoperfusión cerebral crónica y tratamiento con raloxifeno.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en 30 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley, de 13-14 meses de edad, con un peso de 250-300 g al inicio de los procedimientos experimentales, que fueron mantenidas en cajas de acrílico, bajo condiciones de ciclos de luz y oscuridad (12h/ 12h), a una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}$ C, con provisión de comida (Rodent Laboratory Chow, Purina) y agua *ad libitum*.

9.1. Aspectos éticos del proyecto

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos establecidos en normas internacionales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011) y en las normas oficiales y lineamientos para el uso y cuidado de los animales de laboratorio en los Estados Unidos Mexicanos (Norma Oficial Mexicana 062-ZOO, 1999; 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). Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el riesgo de dolor y/o el sufrimiento de los animales en el curso de los procedimientos experimentales.

9.2. Diseño Experimental

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

Grupo Proestro (n=6), se evaluó la expresión del ARNm de Bcl-2, PSD-95 y Syp, durante la fase de Proestro del ciclo estral.

Grupo OVX (n=6), se evaluó la expresión del ARNm de Bcl-2, PSD-95 y Syp, 60 días después de ovariectomía bilateral.

Grupo HCC (n=6) se evaluó la expresión del ARNm de Bcl-2, PSD-95 y Syp, 30 días después de oclusión y sección bilateral de las arterias carótidas comunes.

Grupo OVX+HCC+Veh (n=6), se evaluó la expresión del ARNm de Bcl-2, PSD-95 y Syp, después de ovariectomía bilateral, Hipoperfusión Cerebral Crónica y administración de dimetil sulfóxido al 15% en H₂O estéril, 0.3 ml/día/ 30 días.

Grupo OVX+HCC+ Raloxifeno (n=6), se evaluó la expresión del ARNm de Bcl-2, PSD-95 y Syp, después de ovariectomía bilateral, Hipoperfusión Cerebral Crónica y administración de raloxifeno, 3.0 mg/kg/día/ 30 días, en solución de dimetil sulfóxido al 15%.

Los procedimientos quirúrgicos correspondientes a las distintas situaciones y grupos experimentales se realizaron bajo anestesia general (Xilazina, 10 mg/kg, IM /Ketamina, 50 mg/kg, IM).

En particular los animales de los grupos OVX+HCC+Veh y OVX+HCC+Ralox fueron ovariectomizados y catorce días después de la ovariectomía se realizaron los procedimientos anestésico/quirúrgicos del modelo de hipoperfusión cerebral crónica (Pappas B. y col., 1996; Farkas E. y col., 2007; Cechetti F. y col., 2010, 2012a; 2012b): interrupción permanente del flujo sanguíneo mediante ligadura y sección de la arteria carótida común izquierda y siete días después, de la arteria carótida común derecha.

En los animales del grupo OVX solamente se realizó ovariectomía. En los animales del grupo HCC se realizaron únicamente los procedimientos anestésico-quirúrgicos del modelo de hipoperfusión cerebral crónica. Luego de los procedimientos quirúrgicos se mantuvieron a los animales en condiciones controladas de temperatura e hidratación, y profilaxis de dolor e infección.

9.3. Modelo de hipoperfusión cerebral crónica

El modelo de hipoperfusión cerebral crónica se realizó, de acuerdo con los procedimientos quirúrgicos descritos previamente (Pappas y col., 1996; Farkas y col., 2007; Cechetti y col., 2010, 2012a; 2012b): bajo anestesia general y condiciones asépticas. Se localizó (microscopio estereoscópico Leica Mod. S6E) la arteria carótida común izquierda, la cual fue separada cuidadosamente del nervio vago, para colocar una doble ligadura (seda 5-0) antes de la bifurcación que da origen a las arterias carótidas interna y externa; en estas condiciones se cortó la arteria carótida común entre las ligaduras. Siete días después se repitió el procedimiento en la arteria carótida común derecha.

9.4. Evaluación de la expresión del ARNm de Syp, PSD-95 y Bcl-2

Una vez realizados los procedimientos experimentales en los diferentes grupos se extrajeron los cerebros de cada uno de los animales y se procedió a la disección de las regiones cerebrales de interés, para el análisis de la expresión del ARNm (Tabatadze y Sato, 2014).

Se disecó el tejido cerebral correspondiente al hipocampo, a partir de secciones del cerebro obtenidas mediante cortes coronales entre -2.50 mm y -4.50 mm hacia atrás del bregma, de acuerdo con las coordenadas esterotáxicas del Atlas de Paxinos, G. & Watson, (Paxinos y Watson, 2009).

Las muestras de tejido cerebral obtenidas fueron colocadas dentro de crio-tubos de 1,5 ml libres ARNasas, congeladas y almacenadas a -20°C para su análisis posterior, siguiendo los procedimientos correspondientes descritos previamente (Tabatadze y Sato, 2014).

9.4.1. Aislamiento de ARN.

Las muestras de tejido fueron procesadas de acuerdo con el protocolo TRIzol Reagent Invitrogen: las muestras fueron descongeladas en 700µl de TRIzol Reagent (Ambion) y homogeneizadas (3 pulsos) mediante un sonicador de tejido, se agregaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol, para después centrifugar a 12,000 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo libre de ARNasas, se agregó a dicho sobrenadante 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol y se centrifugó a 12,000 x g durante 10 minutos.

Una vez centrifugado se retiró la fase acuosa del contenido del tubo y se re-suspendió el contenido restante (pellet), en etanol al 75%, se centrifugó a 7500 x g durante 10 minutos a 4°C, se decantó el etanol, y re-disolvió el pellet en 30µl de solución (15%) de dicarbonato de dietilo en agua, se incubó durante 10 minutos a 60 °C, y se almacenaron las muestras (-20° C).

9.4.2. Cuantificación de ARN

La concentración de ARN, en las diferentes condiciones experimentales, se midió usando el NANODROP 2000 (Thermo scientific) con una absorbancia de 260 nm para evaluar el contenido total de ácido nucleico, a una absorbancia de 280 nm para determinar la pureza de la muestra, respecto a un “blanco”. Se calculó la relación A260 / A280 considerándose un valor de 2 como indicador de pureza (Tabatadze y Sato, 2014).

9.4.3. Tratamiento de ARN con DNasa

Las muestras de ARN obtenidas fueron procesadas para eliminar residuos de ADN genómico con DNasa (Promega), para la reacción se incubaron 2µg de RNA de la muestra con 1µl de buffer de DNasa y 1 µl de DNasa (1 U/µl, Promega) durante 30 minutos a 37°C; al término de la incubación se agregó 1µl de solución Stop (Promega) para la DNasa y se incubaron nuevamente las muestras 10 minutos a 65°C.

9.4.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Una vez procesadas las muestras de ARN con el sistema DNasa, estas fueron usadas en la síntesis de ADNc mediante el sistema GoScript (Promega). Por cada 2 µg de ARN se agregaron 2 µl de Oligo DT 10 ng/µl (Promega) y se incubó durante 5 minutos a 70°C, a continuación las muestras fueron colocadas en hielo. Las muestras se incubaron con un Mix (por cada 2 µg de RNA: 1µl de Buffer M-MLV (5x), 1µl de dNTPs 10 Mm (Promega) 0.25 µl de inhibidor de RNasa 40 U/µl (Promega), 0.5 µl de MMVV Retrotranscriptasa 20 U/µl (Promega) aforando a un volumen final de 5 µl con agua libre de RNasas), durante 60 minutos a 37°C, a continuación se inactivó la Retrotranscriptasa mediante incubación a 70°C durante 10 minutos (Tabatadze y Sato, 2014).

9.4.5. Cuantificación de ADNc

La concentración de ADNc, en las diferentes condiciones experimentales, se midió usando el NANODROP 2000 (Thermo scientific) con una absorbancia de 260 nm para evaluar el total contenido de ácido nucleico, y a una absorbancia de 280 nm para determinar la pureza de la muestra, respecto a un “blanco”. Las muestras

fueron diluidas en agua de grado molecular. Se calculó la relación A260 / A280 considerándose una proporción de 1.9 como indicador de pureza.

9.4.6. PCR punto final

Se diseñaron las secuencias de oligonucleótidos para la determinación de la expresión de Syp, PSD-95 y Bcl-2 en hipocampo de rata (Tabla 1), con el programa DNASTAR (Primer desing). Para ello se utilizaron las secuencias del ARNm de la base de datos del Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias de oligonucleótidos se validaron por medio de la técnica de PCR punto final, para lo cual se utilizó lo siguiente: 12.5 µl de TB Green Premix Ex Taq (Takara, Tli RNaseH Plus), 1 µl de oligo directo, 1 µl de oligo reverso, 1 µl de ADNc y 9.5 µl de agua de grado molecular. Las mezclas de los diferentes oligos se colocaron en un termociclador de gradiente de temperaturas (Applied Biosystems Veriti 96) en donde la temperatura de desnaturalización fue de 94°C durante 1 min, seguido por 30 s de desnaturalización a 94°C; 35 ciclos de 40 s de alineamiento a 62°C para cada uno de los genes analizados, y 1 min de extensión a 72°C, finalmente un paso de extensión de 7 minutos a 72°C. Al término del proceso se mantuvieron a 4°C. Posteriormente se verificó que el producto de amplificación correspondiera con el tamaño esperado, en un gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 1. Tabla de secuencias Oligonucleotidos.

Gen	Secuencia 5' 3'	Tm	Producto de Amplificación
GAPDH	Directo CACGGCAAGTTCAACGGCACAGT Reverso TCAGCGGAAGGGGCGGAGAT	62°C	210 pb
PSD95	Directo GATAGACGGCCGGGATTACCACTT Reverso AGGGAGCGGGGACGATGA	62°C	300 pb
Syp	Directo TCGGCTGAGCGTGGAGTGTGC Reverso CAGGGCCCCCATGGAGTAGAGG	62°C	200 pb
Bcl-2	Directo 5'-CCTGAGAGCAACCGAACGCCC-3' Reverso 5'-CCACAAAGGCATCCCAGCCTC-3'	69°C	433 pb

9.4.7. PCR tiempo real

La expresión relativa del ARNm se determinó mediante PCR en tiempo real. En esta técnica se utilizaron 1 µl (250 ng) de ADNc, 5 µl TB Green Premix Ex Taq (Takara, Tli RNaseH Plus), 1 µl de oligonucleótido directo (10 µM/µl, OPERON, EUROFIMS), 1 µl de oligonucleótido inverso (10 µM/µl, OPERON, EUROFIMS), y 2 µl de agua grado biología molecular, para obtener un volumen final de 10 µl por reacción. Se utilizó un termociclador para tiempo real (Bio-Rad CFX96). La temperatura inicial de desnaturalización fue de 95°C durante 5 min, seguido de 39 ciclos con 10 s de desnaturalización a 94°C; 30 s de alineamiento a 62 °C para cada uno de los genes analizados; y 30 s de extensión a 72°C. Se normalizaron los datos y se analizaron por el método delta-delta CT. Se realizaron triplicados de cada muestra.

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se obtuvieron por triplicado y fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía), seguido por la comparación múltiple de Tukey Post Hoc con el paquete estadístico GraphPad Prism 5. Los resultados se reportaron como el promedio $\pm$ el error estándar (EE), con nivel de significancia estadística de $p < 0.05$ para la comparación entre los grupos experimentales.

XI. RESULTADOS

En la figura 1 se muestran los resultados de la expresión relativa del ARNm de Syp en homogenados de hipocampo de los distintos grupos experimentales. Puede observarse una reducción significativa de la expresión del ARNm de Syp en los grupos con HCC, OVX así como OVX+HCC+Veh, con respecto al grupo Proestro. Así mismo en el grupo OVX+HCC+Raloxifeno la expresión relativa del ARNm de Syp fue similar a la observada en el grupo Proestro y significativamente mayor que la observada en los grupos HCC, OVX así como OVX+HCC+Veh.

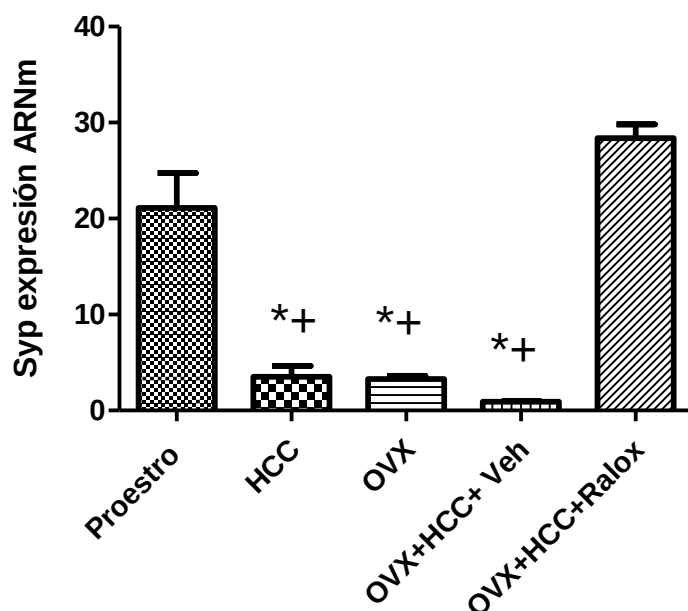


Fig. 1. Expresión relativa del ARNm de Syp en el hipocampo, en distintas condiciones experimentales. Los valores en la ordenada corresponden al porcentaje de cambio en la expresión del ARNm con respecto a la expresión del ARNm del gen de referencia (GAPDH). Media $\pm$ Desviación Estándar. Prueba Tukey Post Hoc. * $p < 0,0005$ Vs Proestro; + $p < 0,0005$ Vs Raloxifeno.

En la figura 2 se muestran los resultados de la expresión relativa del ARNm de PSD-95 en homogenados de hipocampo de los distintos grupos experimentales. Se observó un incremento significativo de expresión relativa del ARNm en el grupo OVX+HCC+Raloxifeno, con respecto a los demás grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos Proestro, HCC, OVX así como OVX+HCC+Veh.

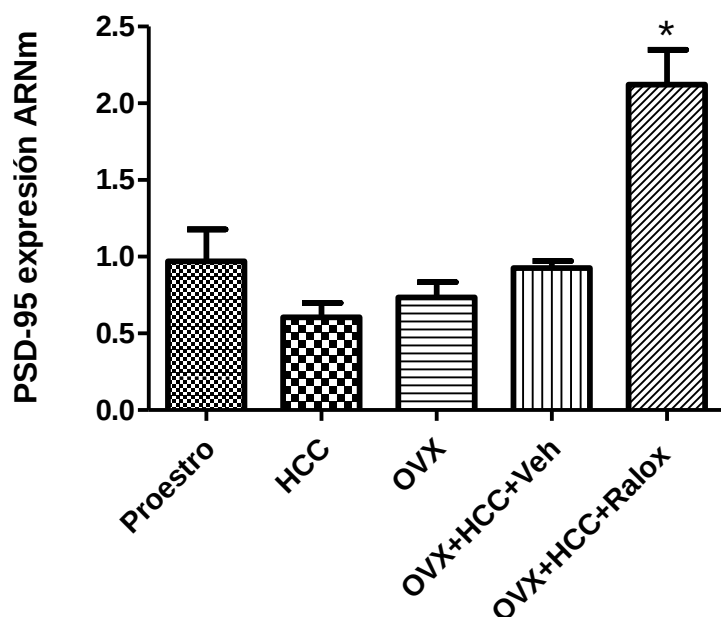


Fig. 2. Expresión relativa del ARNm de PSD-95 en el hipocampo, en distintas condiciones experimentales. Los valores corresponden al porcentaje de cambio en la expresión del ARNm con respecto a la expresión del ARNm del gen de referencia (GAPDH). Media $\pm$ Desviación Estándar. Prueba Tukey Post Hoc. * $p < 0,0005$ Vs Cualquiera de las otras condiciones experimentales.

En la figura 3 se muestran los resultados de la expresión relativa del ARNm de Bcl-2 en homogenados de hipocampo de los distintos grupos experimentales. Se observó un incremento significativo de expresión relativa del ARNm en el grupo OVX con respecto a los grupos Proestro y Raloxifeno. Así mismo la expresión del ARNm en el grupo OVX+HCC+Veh fue significativamente mayor en comparación con los grupos Proestro, HCC, OVX y OVX+HCC+Raloxifeno.

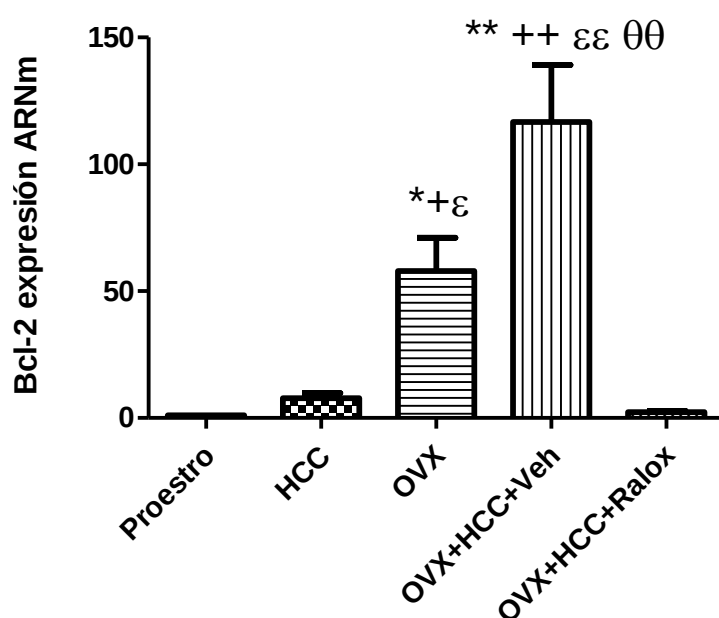


Fig. 3. Expresión relativa del ARNm de Bcl-2 en el hipocampo, en distintas condiciones experimentales. Los valores corresponden al porcentaje de cambio en la expresión del ARNm con respecto a la expresión del ARNm del gen de referencia (GAPDH). Media $\pm$ Desviación Estándar. Prueba Tukey Post Hoc. * $p < 0,05$ Vs Proestro; ** $p < 0,0005$ Vs Proestro; + $p < 0,05$ Vs Raloxifeno; ++ $p < 0,0005$ Vs Raloxifeno. ε $p < 0,05$ Vs HCC; ε ε $p < 0,0005$ Vs HCC; θ $p < 0,05$ Vs OVX;

XII. DISCUSIÓN

Las funciones cognoscitivas constituyen una de las formas de expresión más importantes de la actividad cerebral; así, la incorporación y el almacenamiento de información acerca de las propias características individuales y de los acontecimientos del entorno a través de las distintas modalidades sensoriales, forma parte de procesos cerebrales que dan lugar a patrones de conducta, formas de pensamiento, toma de decisiones, juicios de valor, entre otros. En estas condiciones, las alteraciones de la estructura y/o del funcionamiento cerebral pueden dar lugar a diferentes grados de alteración de las funciones cognoscitivas, desde el deterioro cognoscitivo leve hasta formas graves de demencia (Siegelbaum y Kandel, 2013).

Los circuitos neuronales del hipocampo dorsal, incluyendo el cuerno de Amón y el giro dentado son estructuras cerebrales de cuya integridad morfológica y funcional depende la codificación de la información durante el aprendizaje, para la formación de la memoria espacial, la memoria episódica y la memoria declarativa (Siegelbaum y Kandel, 2013; Amaral y Lavenex, 2007).

En estas estructuras el flujo de información aferente y en los propios circuitos neuronales del hipocampo, a través de procesos de comunicación celular sináptica excitatoria e inhibitoria (Glutamato, GABA, Acetilcolina) constituye un aspecto fundamental para su funcionamiento y su relación, a través de conexiones eferentes, con otras estructuras cerebrales involucradas en las funciones cognoscitivas (Tsien, 2006, Klausberger, 2009).

En este sentido, se ha mostrado que, en condiciones fisiológicas, diversos factores endógenos y exógenos pueden influir sobre la estructura y el funcionamiento del hipocampo dando lugar a modificaciones de la eficiencia de las funciones cognoscitivas (Gould, 2007). Tal es el caso de los efectos de los estrógenos en los procesos de plasticidad y conectividad sináptica en estructuras cerebrales tales como el hipocampo, el hipotálamo y la corteza cerebral (McEwen y col, 1995; González-Burgos y col, 2005; Liu y col, 2008; Spencer et al, 2008; González-Burgos, 2009; Méndez y col, 2011; Morali y Cervantes, 2014; Zhu, 2017; Engler-Chiurazzi

y col. 2017). En estas condiciones se ha descrito entre los Elementos de Respuesta Estrogénica, la activación de procesos genómicos que culminan con la síntesis de proteínas estructurales y/o reguladoras, que finalmente quedarían ubicadas en las sinapsis. De hecho las variaciones en la expresión génica y en la síntesis de las proteínas Syp, PSD-95 y otras consideradas como marcadores de sinaptogénesis, durante el ciclo estral en la rata se han atribuido a las variaciones de la secreción de E2 por el ovario y por el tejido cerebral y su interacción con receptores estrogénicos en las células nerviosas (Kretz y col. 2004, Zhu y col. 2017, Liu y col. 2008, Akama y col. 2003). En cambio, la supresión de la secreción de estrógenos por el ovario y la consiguiente reducción de acciones estrogénicas en el tejido cerebral, en ratas ovariectomizadas, da lugar a la reducción de la síntesis de estos marcadores de sinaptogénesis (Liu y col. 2008, Sharma y col. 2007).

Por otra parte, las consecuencias de la reducción del flujo sanguíneo sobre la conectividad de los circuitos neuronales en estructuras cerebrales vulnerables, como el hipocampo (Araki y col., 1989; Kogure, 1993; Lipton, 1999), ha sido estudiada, en modelos experimentales mediante marcadores de conectividad (Synaptofisina y PSD-95) ubicados en estructuras celulares pre- y post-sinápticas (Zhu y col., 2017; Neumann y col., 2013; Ishimaru y col., 2001; Liu y col., 2018; Yan y col., 2013). Los resultados de estos estudios sustentan el deterioro de la conectividad sináptica del hipocampo y la corteza cerebral en condiciones de isquemia cerebral global aguda, isquemia focal aguda, o hipoperfusión cerebral crónica.

La relación de los elementos de respuesta estrogénica, con procesos celulares que dan lugar a la síntesis de proteínas estructurales y/o reguladoras involucradas en la sinaptogénesis y la eficiencia de la ejecución de funciones cognitivas dependientes del hipocampo ha sido planteada como un fenómeno relevante en la influencia estrogénica sobre los procesos neurales (Moralí y Cervantes, 2014; Raghava y col., 2017)

Los resultados del presente estudio coinciden con la reducción de la expresión de Syp reportada en la literatura, luego de ovariectomía (Zhu y col., 2017; Liu y col., 2008, Sharma y col., 2007) o hipoperfusión cerebral crónica (Wang y col., 2010; Zhu y col., 2011; Zhao y col., 2012; Wang y col., 2019; Zhu y col., 2011). En efecto, la ovariectomía, la hipoperfusión cerebral crónica, así como la ovariectomía seguida de hipoperfusión cerebral crónica provocaron una reducción significativa en la expresión del ARNm de Syp, en comparación con expresión del mismo marcador en ratas durante el proestro.

Entre los resultados del presente estudio destaca el efecto de la administración a largo plazo de raloxifeno, en condiciones de ovariectomía e hipoperfusión cerebral crónica. En este grupo la expresión de ARNm de Syp es prácticamente la misma que en ratas intactas en proestro y significativamente mayor (el doble de magnitud) que la observada luego de ovariectomía, en el curso de hipoperfusión cerebral crónica, o cuando coinciden ambas situaciones.

Estos resultados sugieren la posible activación de elementos de respuesta estrogénica por la interacción del raloxifeno con receptores a estradiol en el hipocampo, con posibles consecuencias en la preservación de componentes pre- y post-sinápticos en los circuitos neuronales de esta estructura, así como la posible interferencia del raloxifeno con los mecanismos de daño atribuibles a la reducción del flujo sanguíneo. Sin embargo, estas posibles interpretaciones quedarían limitadas, dado que en el presente estudio la expresión de ARNm de Syp y PSD-95 no fue complementada por la determinación de la proteína correspondiente.

A este respecto, puede comentarse que el incremento de la sinaptogénesis descrito como un efecto de raloxifeno en las neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza prefrontal (González-Burgos y col., 2012; Velázquez-Zamora y col., 2012), usando como indicadores la densidad, morfología y proporciones relativas de distintos tipos de espinas dendríticas, implica procesos genómicos que deben culminar con la síntesis, de componentes de las estructuras sinápticas.

Por otra parte, en el presente estudio se observó un notable incremento de la expresión de ARNm de Bcl-2 en el hipocampo, en condiciones de hipoperfusión

cerebral crónica y ausencia de secreción de estrógenos ováricos. A este respecto, se ha descrito que la reducción del flujo sanguíneo puede provocar la activación de genes que dan lugar a complejas alteraciones en la actividad de factores transcripcionales (TFs) y genes de respuesta temprana (IEGs) que pueden dar por resultado no solo daño y muerte neuronal sino procesos de supervivencia, reparación neuronal y remodelación del tejido nervioso, en los que están involucrados factores tales como BDNF, NF- κ B, HIF-1, CREB (Kitagawa y col., 1998; Meller y col., 2005; Rickhag y col., 2007). Entre estos mecanismos de supervivencia neuronal destacan la modulación de genes involucrados en el balance de procesos celulares pro- y anti-apoptóticos, en favor de la expresión de genes de la familia Bcl-2 y la síntesis de proteínas correspondientes, con actividad anti-apoptótica (Rami y col., 2008; Kased y col., 2002; König y col., 2005; Duckworth y col., 2006; Meller y col., 2005).

En este sentido, los resultados del presente estudio podrían ser interpretados como parte de posibles mecanismos de supervivencia y preservación de la integridad del sustrato neural, inducidos por la reducción del flujo sanguíneo. De hecho, la sobreexpresión de Bcl-2 ha sido descrita en diversos modelos experimentales de isquemia cerebral (Chen y col., 1997; Wang y col., 2015; Zhao y col., 2003). Sin embargo, en el presente estudio, la sola reducción del flujo sanguíneo por hipoperfusión cerebral crónica no dio lugar a modificaciones significativas en la expresión del ARNm de Bcl-2, en comparación con los animales intactos en proestro.

En cambio, la sola ovariectomía provocó un incremento significativo de la expresión del ARNm de Bcl-2 en comparación con animales intactos bajo las acciones estrogénicas en cerebro, atribuibles a concentraciones plasmáticas elevadas de estradiol, durante el ciclo estral (proestro). Este resultado no podría ser explicado con base en los datos disponibles en la literatura, en los cuales se ha descrito la reducción significativa de la expresión del ARNm de Bcl-2 atribuible a la carencia de estrógenos ováricos luego de ovariectomía (García Segura y col., 1998; Armagan y col., 2009; Zhang y col., 2017).

Asumiendo que el incremento de la expresión del ARNm de Bcl-2 esté relacionado con la activación de mecanismos de sobrevivencia celular, inducidos por las alteraciones resultantes de la reducción del flujo sanguíneo y/o la reducción de acciones estrogénicas dependientes de la secreción ovárica de estradiol, cabría la posibilidad de que el tratamiento con raloxifeno ejerciera efectos neuroprotectores previniendo o reduciendo las consecuencias de los mecanismos de daño neuronal y de esta manera mantuviera, en el presente estudio, la expresión del ARNm de Bcl-2 en los mismos niveles observados en los animales intactos en proestro.

XIII. CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio sugieren:

- La activación de Elementos de Respuesta Estrogénica, involucrados en procesos de conectividad sináptica en los circuitos neuronales del hipocampo, en condiciones de HCC y/o ausencia de secreción ovárica de estrógenos.
- El raloxifeno mantiene condiciones de supervivencia neuronal, dependientes de las acciones antiapoptóticas de Bcl-2, semejantes a las de los animales intactos en proestro, en condiciones de HCC y ausencia de secreción ovárica de estrógenos.
- En contraste, la ausencia de secreción de estrógenos ováricos coincidente o no con HCC, promueve mecanismos de supervivencia neuronal a través del incremento de procesos antiapoptóticos dependientes de Bcl-2.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Akama K.T. y McEwen B.S. Estrogen stimulates postsynaptic density-95 rapid protein synthesis via the Akt/protein kinase B pathway. *J Neurosci.* 2003; 23: 2333-2339.
- Amaral D. and Lavenex P. Chapter 3. Hippocampal neuroanatomy. En Per A., Morris A., Amaral D., Bliss T., O' Keefe (Eds.). 2007. *The Hipocampus Book*. Oxford University Press, Oxford. pp 37-114.
- Araki T, Kato H, Kogure K. Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. *Acta Neurol Scand.* 1989; 80:548-553.
- Arévalo M.A., Santos-Galindo M., Lagunas N., Azcoitia I. y Garcia-Segura L. Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents. *J Mol Endocrinol* 2011; 46: 1–9.
- Armagan G, Kanit L, Terek CM, Sozmen EY, Yalcin A. The levels of glutathione and nitrite–nitrate and the expression of Bcl-2 mRNA in ovariectomized rats treated by raloxifene against kainic acid. *Int J Neurosci* 2009; 119: 227–239.
- Azcoitia I., Santos-Galindo M., Arevalo M.A., Garcia-Segura L.M.. Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Eur J Neurosci* 2010; 32: 1995–2002.
- Azcoitia, Lydia L. DonCarlos, Luis M. Garcia-Segura. Are gonadal steroid hormones involved in disorders of brain aging? *Aging Cell* 2003; 2: 31–37.
- Baez-Jurado E., Rincón-Benavides MA., Hidalgo-Lanussa O., Guio-Vega G., Ashraf GM., Sahebkar A., Echeverria V., Garcia-Segura LM. Y Barreto GE. Molecular mechanisms involved in the protective actions of Selective

- Estrogen Receptor Modulators in brain cells. *Front Neuroendocrinol*; 2019; 52:44-64.
- Bakker FC, Klijn CJM, Jennekens-Schinkel A, Kappelle LJ. Cognitive disorders in patients with occlusive disease of the carotid artery: a systematic review of the literature. *J Neurol*. 2000. 247(9):669-676.
- Barreto G., Santos-Galindo M., Diz-Chaves Y., Pernía O., Carrero P., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M. Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured brain: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones. *Endocrinology*. 2009; 150: 5010-5015.
- Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J, von Euler G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005. 25(12):1586-95.
- Brann D. W., Dhandapani K., Wakade C., Mahesh V.B. y Khan M.M. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*. 2007; 72(5): 381–405.
- Brust J.C.M. Appendix C. Circulation of the Brain. En. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A.J. (editors). *Principles of Neural Science*, 5th Edition. McGraw Hill, 2013. ISBN: 978-0-07-139011-8, pp 1550-1564.
- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997; 389: 753–758.
- Carswell H.V., Macrae I.M., Gallagher L., Harrop E. y Horsburgh K.J. 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.

Cechetti F. y 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.

Cechetti F., Pagnussat A.S., Worm P.V., Elsner V.R., Ben J., Siveira da Costa M, Mestriner R, Weis SD (a). Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull.* 2012; 87:109116.

Cechetti F., Valdeci Worm P., Lovatel G., Moysés F., Rodrigues Siqueira I., Netto C.A. (b). Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sci* 2012; 91: 29–36

Cechetti F., Worm P, Pereira L, Siqueira I, Netto C. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43:1178-1183.

Chan P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21:2-14.

Chandra A. Stone C. R., Du X., Li W. A., Huber M., Bremer R., Geng X, Ding Y. The cerebral circulation and cerebrovascular disease III: Stroke. *Brain circulation.* 2017; 3; 66-77

Chen J., Graham S.H., Nakayama M., Zhu R.L., Jin K., Stetler R.A. y Simon R. P. Apoptosis Repressor Genes Bcl-2 and Bcl-x-long are Expressed in the Rat Brain Following Global Ischemia. *J. Cerebral Blood Flow and Metab.* 1997; 17:2-10

Chen J.Q., Cammarata P.R., Baines C.P. y Yaguer J.D. Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Biogenesis by Estrogens/Estrogen Receptors and

- Physiological, Pathological and Pharmacological Implications. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 1540–1570.
- Chinopoulos C. y Adam V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J.* 2006. 273: 433-450.
- Choi J.M., Romeo R.D., Brake W., Bethea C., Rosenwaks Z y McEwen B.S. Estradiol Increases Pre- and Post-Synaptic Proteins in the CA1 Region of the Hippocampus in Female Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*. 2003; 144: 4734–4738.
- Crepel V, Epsztein J, Ben-Ari Y. Ischemia induces short- and long-term remodeling of synaptic activity in the hippocampus. *J Cell Mol Med*. 2003. 7:401-7.
- Crispino M., Stone D. J., Wei M., Anderson C. P., Tocco G., Finch C. E. y Baudry M. Variations of Synaptotagmin I, Synaptotagmin IV, and Synaptophysin mRNA Levels in Rat Hippocampus during the Estrous Cycle. *Experimental Neurology*. 1999; 159: 574–583.
- Dai X., Chen L. y Sokabe M. Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacology* 2007; 52: 1124–1138.
- Dhandapani K.M. y Brann D.W. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol* 2007; 42: 70–75.
- Dhandapani K.M., Wade F.M., Mahesh V.B., Brann D.W. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology* 2005; 146: 2749–2759.
- DonCarlos L., Azcoitia I. y Garcia-Segura L. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psyneuen* 2009; 34: 113-122

- Dowers T.S., Qin Z.H., Thatcher G.R., Bolton J.L. Bioactivation of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Chem Res Toxicol.* 2006; 19:1125-1137.
- Du B., Ohmichi M., Takahashi K., Kawagoe J., Ohshima C., Igarashi H., Mori-Abe A., Saitoh M., Ohta T., Ohishi A., Doshida M., Tezuka N., Takahashi T., Kurachi H. Both estrogen and raloxifene protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor alpha-transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade. *J Endocrinol.* 2004; 183: 605-615.
- Dubal D.B., Zhu H., Yu J., Rau S.W., Shughrue P.J., Merchenthaler I., Kindy M.S., Wise P.M. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1952–1957.
- Duckworth, E.A., Butler, T., Collier, L., Collier, S., Pennypacker, K.R., NF-kappa B protects neurons from ischemic injury after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 2006; 1088: 167–175.
- Elzer J.G., Muhammad S., Wintermantel T.M., Regnier-Vigouroux A., Ludwig J., Schutz G., Schwaninger M. Neuronal estrogen receptor-alpha mediates neuroprotection by 17beta-estradiol. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 935–942.
- Engler-Chiurazzi, E. B., Brown, C. M., Povroznik, J. M., and Simpkins, J. W. (2017). Estrogens as neuroprotectants: estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. *Prog Neurobiol*, 157, 188-211. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.12.008
- Farkas E., Luiten P.G.M. y 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.

- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH. (2009). Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke*. 40:2244–2250.
- Funakoshi T., Yanai A., Shinoda K., Kawano M.M. y Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 904–910.
- Garcia-Segura L.M. Cardona-Gomez P., Naftolin F. y Chowen J. A. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport*. 1998; 9:593-597.
- Genazzani A. R., Pluchino N., Luisi S., Luisi M. Estrogen, cognition and female ageing. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 175–187.
- Ginsberg M.D. y Busto R. (1989). Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 20:1627-1642.
- Goekoop R., Barkhof F, Duschek E.J., Netelenbos C., Knol D.L., Scheltens P., Rombouts S.A. Raloxifene treatment enhances brain activation during recognition of familiar items: a pharmacological fMRI study in healthy elderly males. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 7: 1508-1518.
- Goekoop R., Duschek E.J., Knol D.L., Barkhof F., Netelenbos C., Scheltens P., Rombouts S.A. Raloxifene exposure enhances brain activation during memory performance in healthy elderly males; its possible relevance to behavior. *Neuroimage*. 2005; 1: 63-75.
- González-Burgos I, Tapia-Arizmendi G, Feria-Velasco A. Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *Biotech. Histochem* 1992; 67: 288–296.
- González-Burgos I. (2009). Dendritic spine plasticity and learning/memory processes: theory, evidence and perspectives, in *Dendritic Spines:*

Biochemistry, Modeling and Properties, L. R. Baylog, Ed., pp. 163–186, Nova Science Publishers, Huntington, NY, USA.

González-Burgos I., Alexandre-Gómez M., Cervantes M. Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci Lett* 2005; 379: 52-54.

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, Seshadri S. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke* 2011; 42: 2672–713.

Gould E. Chapter 9. Structural plasticity. En Per A., Morris A., Amaral D., Bliss T., O' Keefe (Eds.). 2007. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, Oxford. pp 321-341.

Gould E., Woolley C.S., Frankfurt M. y McEwen B.S. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 1990; 10: 1286–1291.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011

Hammes S.R. y Levin E.R. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 2007; 28: 726–741

Hao J., Rapp P.R., Leffler A.E., Leffler S.R., Janssen W.G., Lou W., McKay H., Roberts J.A., Wearne S.L., Hof P.R., Morrison J.H. Estrogen alters spine number and morphology in prefrontal cortex of aged female rhesus monkeys. *J Neurosci* 2006; 26: 2571–2578.

Harms C., Lautenschlager M., Bergk A., Katchanov J., Freyer D. Kapinya K., Herwig U., Megow D., Dirnagl U., Weber J.R. Y Höfner H. Differential Mechanisms of Neuroprotection by 17 β -Estradiol in Apoptotic versus Necrotic Neurodegeneration. *J Neurosci.* 2001; 21:2600–260.

Henderson V.W. Cognitive Changes after Menopause: Influence of Estrogen *Clin Obstet Gynecol* 2008; 51(3): 618–626.

Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka Y., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T., Kawato S. Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 290: 31–43.

Hossmann K. (2008). Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology.* 55(3):257-70.

Hurtado O, Pradillo JM, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2006. 21:54-63.

Ikeda T., Matsuki N. y Yamada M.K. Estrogen produced in cultured hippocampal neurons is a functional regulator of a GABAergic machinery. *J Neurosci Res* 2006; 84: 1771–1777.

Ismailoğlu Ö., Oral B., Sütcü R., Kara Y., Tomruk O., Demir N.. Neuroprotective effects of raloxifene on experimental spinal cord injury in rats. *Am J Med Sci.* 2013; 345:39-44.

Jacobsen D.E., Samson M.M., Emmelot-Vonk M.H., Verhaar H.J. Raloxifene and body composition and muscle strength in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Endocrinol.* 2010; 162: 371-376.

Jelks K.B., Wylie R., Floyd C.L., McAllister A.K., Wise P. Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal

- neurons: critical role of estrogen receptor- α . *J Neurosci* 2007; 27: 6903–6913.
- Kalita K., Szymczak S. y Kaczmarek L. Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus* 2005; 15: 404–412.
- Kassed, C.A., Willing, A.E., Garbuzova-Davis, S., Sanberg, P.R., Pennypacker, K.R. Lack of NF-kappa B p50 exacerbates degeneration of hippocampal neurons after chemical exposure and impairs learning. *Exp. Neurol.* 2002 176; 277–288.
- Keith T. Akama and Bruce S. McEwen. Estrogen Stimulates Postsynaptic Density-95 Rapid Protein Synthesis via the Akt/Protein Kinase B Pathway. *The Journal of Neuroscience.* 2003; 23: 2333–2339.
- Khan M.M., Wakade C., de Sevilla L., Brann D.W. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) enhance neurogenesis and spine density following focal cerebral ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 146: 8-47.
- Kiel J. P., Fester L., Zhou L., Lauke H., Carretero J. y Rune G. Inhibition of Hippocampal Estrogen Synthesis Causes Region-Specific Downregulation of Synaptic Protein Expression in Hippocampal Neurons. *Hippocampus.* 2006; 16:464–471.
- Kitagawa, K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS J.* 274. 2007; 3210–3217.
- Klausberger T. GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2009; 30: 947–957.
- Kogure K, Kato H. Altered gene expression in cerebral ischemia. *Stroke.* 1993; 24(12):2121-2127.

- Kokiko ON1, Murashov AK, Hoane MR. Administration of raloxifene reduces sensorimotor and working memory deficits following traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* 2006; 170: 233-240.
- König, H.G., Kogel, D., Rami, A., Prehn, J.H. TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- κ B signaling. *J. Cell Biol.* 2005. 168, 1077–1086.
- Konyalioglu S., Durmaz G., Yalcin A. The potential antioxidant effect of raloxifene treatment: a study on heart, liver and brain cortex of ovariectomized female rats. *Cell Biochem Funct.* 2007; 2: 259-266.
- Kretz O., Fester L., Wehrenberg O., Zhou L., Brauckmann S., Zhao S., Prange-Kiel J., Naumann T., Jarry H., Frotscher M., Rune G.M. Hippocampal Synapses Depend on Hippocampal Estrogen Synthesis. *J. of Neurosci.* 2004; 24: 5913–5921.
- Ladecola C. y Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol.* 2001. 14: 89-94.
- Levin E.R. Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 1951–1959.
- Li R., Xu W., Chen Y., Qiu W., Shu Y., Wu A., Dai Y., Bao J., Lu Z., Hu X. Raloxifene suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis and NF- κ B-dependent CCL20 expression in reactive astrocytes. *PLoS One.* 2014; 9: e94320.
- Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol Rev.* 1999. 79(4): 1431-568.
- Liu M., Kelley M.H., Herson P.S., Hurn P.D. Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinology.* 2010; 35: 127–143.

- Marin R., Díaz M., Alonso R., Sanz A., Arévalo M.A. y Garcia-Segura L.M. Role of estrogen receptor alpha in membrane-initiated signaling in neural cells: interaction with IGF-1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 114: 2–7.
- Matsuda K., Sakamoto H., Mori H., Hosokawa K., Kawamura A., Itose M., Nishi M., Prossnitz E.R. y Kawata M. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neurosci Lett* 2008; 441: 94–99.
- McEwen B.S., Akama K.T., Spencer-Segal J.L., Milner T.A. and Waters E.M. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neurosci.* 2012; 126(1): 4-16.
- McEwen B.S., Gould E, Orchinik M, Weiland NG, Woolley CS. Estrogens and the structural and functional plasticity of neurons: implications for memory, ageing and neurodegenerative processes. In: Goode J (editor). *Ciba Foundation Symposium. The Non-reproductive Actions of Sex Steroids.* CIBA Foundation. London 1995; 191:52–73.
- McMurray R., Islamov R. Murashov A.K. Raloxifene analog LY117018 enhances the regeneration of sciatic nerve in ovariectomized female mice. *Brain Res.* 2003; 980: 140-145.
- Meller, R., Minami, M., Cameron, J.A., Impey, S., Chen, D., Lan, J.Q., Henshall, D.C., Simon, R.P., CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25:234-46.
- Méndez P., García-Segura L.M. y Müller D. Estradiol pro-motes spine growth and synapse formation without affecting pre-established networks. *Hippocampus.* 2011. 21(12):1263–7.

- Miller N.R., Jover T., Cohen H.W., Zukin R.S. y Etgen A.M. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology* 2005; 146: 3070–3079.
- Milner T.A., Ayoola K., Drake C.T., Herrick S.P., Tabori N.E., McEwen B.S., Warriar S., Alves S.E. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 2005; 491: 81–95.
- Milner T.A., McEwen B.S., Hayashi S., Li C.J., Reagan L.P., Alves S.E. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol* 2001; 429: 355–371.
- Moralí G. y Cervantes M. Neuroprotective effects of estrogens against cerebral ischemia. In: González-Burgos I (editor). *Estrogens and Cognition. Psychobiological and Clinical Aspects* 2014. ISBN 978-81-308-0550-4. pp 153-186.
- Mukai H., Kimoto T., Hojo Y., Kawato S., Murakami G., Higo S., Hatanaka Y., Ogiue-Ikeda M. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800: 1030-44.
- Ni JW, Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res* 1994; 653: 231–236.
- Nilsen J1, Mor G, Naftolin F. Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause*. 1998; 5: 211-216.
- Nilsson S., Mäkelä S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson J.A. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001; 81:1535-65.

Norma Oficial Mexicana 062-ZOO, 1999; 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.

Ohta H., Nishikawa H., Kimura H., Anayama H. y Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience* 1997; 4: 1039–1050.

O'Neill K1, Chen S, Brinton RD. Impact of the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, on neuronal survival and outgrowth following toxic insults associated with aging and Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2004; 185:63-80.

Otori T., Katsumata T., Muramatsu H., Kashiwagi F., Katayama Y. y Terashi A. Long-term measurements of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003. 30:266-72.

Ouyang, Y. B. y Giffard R. G., zhu Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial Niunction. *Cell Calcium*. 2004; 36: 303-11.

Paige L.A., Christensen D.J., Gron H., Norris J.D., Gottlin E.B., Padilla K.M., Chang C.Y., Ballas L.M., Hamilton P.T., McDonnell DP. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER α and ER β . *PNAS* 1999; 96: 3999–4004.

Pappas B., De la Torre J., Davidson C., Keyes M. y Fortin T. (1996). Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res*. 708:50-58.

Paxinos G. y Watson C. (2009). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney; Academic Press.

- Pérez S.E., Chen E.Y., Mufson E.J. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; 145: 117–139.
- Prossnitz E.R. y Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011; 7(12):715-26.
- Pulsinelli W.A. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Progress in Brain Research.* 1985; 63:29-37.
- Pulsinelli W.A., Jacewicz M., Levy D.E., Petito C.K., Plum F. Ischemic brain injury and the therapeutic window. *Ann N Y Acad Sci.* 1997. 19;835:187-92.
- Raghava N., Das B. C. y Ray S. K. Neuroprotective effects of estrogen in CNS injuries: insights from animal models. *Neurosci Neuroecon.* 2017; 6: 15-29.
- Rami A, Bechmann I, Stehle JH. Exploiting endogenous anti-apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Progr Neurobiol.* 2008; 85; 273–296.
- Rao AK, Dietrich AK, Ziegler YS, Nardulli AM. 17 β -Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: A mechanism to protect neurons from ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011. 127(3-5):382-89.
- Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators—mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003; 348: 618–629.
- Rollick N. C., Lemmex D. B., Ono Y., Reno C.R., Hart D. A., Lo K.Y., Thornton G. M. Gene-expression changes in knee-joint tissues with aging and menopause: implications for the joint as an organ. *Clinical Interventions in Aging.* 2018;13 365–375.
- Royal College of Psychiatrists. Dementia, 2018 <http://www.rcpsych.ac.uk/files/samplechapter/dementiasc.pdf> .

Ruan YW, Zou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, Gao TM, Yao Z, Xu ZC. Dendritic plasticity of CA1 neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*. 2006. 140(1):191-201.

Secretaria de Salud Pública 2018 <https://www.proceso.com.mx/534234/con-demencia-alrededor-de-800-mil-adultos-mayores-en-mexico-8-de-cada-10-es-por-alzheimer-ssa>.

Sharma K, Mehra RD, Dhar P, Vij U. Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus. *Brain Res*. 2007; 1132:10-19.

Siegelbaum S.A and Kandel E. R. Chapter 67. Prefrontal cortex, hippocampus, and the biology of explicit memory storage. En: Kandel R. K., Schwartz J. H., Jessell M. T., Siegelbaum S.A., Hudspeth A.J (Eds.) 2013. *Principles of Neural Science*. Fifth edition. McGraw Hill. New York. pp 1487-1519.

Simpkins JW, Richardson TE, Yi KD, Perez E, Covey D. Neuroprotection with non-feminizing estrogen analogues: an overlooked possible therapeutic strategy. *Horm Behav* 2013; 63(2): 278-283.

Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 2004; 25: 45–71.

Spencer J.L., Waters E.M., Romeo R.D., Wood G.E., Milner T.A., McEwen B.S. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol*. 2008. 29(2):219-237.

Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim G, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier C, Chan P. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 2004. 1(1):17-25.

- Tabatadze N. y Sato S.M., Quantitative Analysis of Long-Form Aromatase mRNA in the Male and Female Rat Brain. 2014. PLoS ONE 9(7): e100628
- Tapia-Gonzalez S., Carrero P., Pernia O., Garcia-Segura L.M., Diz-Chaves Y. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. J Endocrinol. 2008; 198: 219-230.
- Tsien J.Z. Learning and memory. In: Siegel G.J., Alberts R.W., Brady S.T., Price D.L. (Eds.). Basic Neurochemistry. (2006). Seventh edition. Elsevier, New York. pp 859-874.
- Ulrich P.T., Kroppenstedt S., Heimann A. y Kempfski O. (1998). 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. 29:2412–20.
- Vegeto E., Belcredito S., Ghisletti S., Meda C., Etteri S. y Maggi A. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. Endocrinology. 2006: 147: 2263–2272.
- Velázquez-Zamora D.A., García-Segura L.M., González-Burgos I. Effects of selective estrogen receptor modulators on allocentric working memory performance and on dendritic spines in medial prefrontal cortex pyramidal neurons of ovariectomized rats. Horm Behav. 2012; 61: 512-517.
- Vesga D.J., Hidalgo O., Baez E, Echeverria V., Ashraf G.M., Sahebka A. Lo G.E. Raloxifene attenuates oxidative stress and preserves mitochondrial function in astrocytic cells upon glucose deprivation. J Cell Physiol. 2019; 234: 2051–2057.

- Wang X., Luo Y., Sun H., Feng J. y J.Huang, B. Dynamic expression changes of Bcl-2, Caspase-3 and Hsp70 in middle cerebral artery occlusion rats. *Brain Inj.* 2015; 29: 93-97.
- Wang X., Xing A., Xu C, Cai Q., Liu H., Li L. Cerebrovascular hypoperfusion induces spatial memory impairment, synaptic changes, and amyloid- β oligomerization in rats. *J Alzheimers Dis.* 2010; 21: 813-822.
- Warner D., Sheng H. y Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol.* 2004; 207(Pt 18):3221-3231.
- Woolley C.S. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 657–680.
- Woolley C.S. y McEwen B.S. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci.* 1992; 7:2549-54.
- World Health Organization. Dementia. Fact sheet Updated May 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/> □visitado el 12 de Junio de 2017.
- Wu C., Fujihara H., Jian Y., Qi S., Li H., Shimoji K., Baba H. Different Expression Patterns of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax Proteins After Sublethal Forebrain Ischemia in C57Black/Crj6 Mouse Striatum. *Stroke*; 2003; 34: 1803-1808
- Yaffe K1, Krueger K, Cummings SR, Blackwell T, Henderson VW, Sarkar S, Ensrud K, Grady D. Effect of Raloxifene on prevention of dementia and cognitive impairment in older women: the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) randomized trial. *Am J Psychiatry.* 2005; 162: 683-690.
- Yaşar P., Ayaz G., Damla S., Güpür G. y Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol* 2016; 16: 4–20.

- Zárate S., Stevnsner T. y Gredilla R. Role of Estrogen and Other Sex Hormones in Brain Aging. Neuroprotection and DNA Repair. Front. Aging Neurosci. 2017; 9:430.
- Zhang Z., Yuhong P. Q., Zhang L.L., Guo H., Deng Y. L., Hou Y., Wang L., Miao Y., Ma Y., Hou W. Alleviation of Ischaemia-reperfusion Injury by Endogenous Estrogen Involves Maintaining Bcl-2 Expression via the ER α Signalling Pathway. Brain Reserch. 2017: 15-23.
- Zhao H., Yenari M.A., Cheng D., Sapolsky R. y Steinberg G. K. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. J. Neurochemistry. 2003; 85: 026–1036
- Zhao H., Li Z., Wang Y., Zhang Q. Hippocampal expression of synaptic structural proteins and phosphorylated cAMP response element-binding protein in a rat model of vascular dementia induced by chronic cerebralhypoperfusion. Neural Regen Res. 2012. 7: 821-6.
- Zhu H., Zhang J., Sun H., Zhang L., Liu H., Zeng X., Yang Y., Yao Z. An enriched environment reverses the synaptic plasticity deficit induced by chronic cerebralhypoperfusion. Neurosci Lett. 2011.502:71-5.
- Zhu Y., Zhang Q., Zhang W., Li N., Dai Y., Tu J., Yang F., Brann D. W. y Wang, R. Protective Effect of 17 beta-Estradiol Upon Hippocampal Spine Density and Cognitive Function in an Animal Model of Vascular Dementia. Sci Rep. 2017; 7: 42660.