



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

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

Memoria de tesis:

**"Evaluación morfológica y funcional del efecto neuroprotector
de Raloxifeno contra el daño producido
por hipoperfusión cerebral crónica en ratas ovariectomizadas".**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Médica Cirujana
Lucía Salcido Cadena

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

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

Morelia, Michoacán,
Julio, 2017.





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

SECRETARÍA ACADÉMICA

A S U N T O: INFORMACIÓN

Morelia, Mich., 10 de Febrero de 2016.

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

Le notifico que el protocolo de investigación que Usted presentó ante esta Secretaría Académica a mi cargo, y cuyo título es **"Evaluación Morfológica y Funcional del Efecto Neuroprotector de Raloxifeno contra el Daño Producido por Hipoperfusión Cerebral Crónica, en Ratas Ovariectomizadas"** y que fue sometido a la evaluación del Comité de Investigación y Ética en Investigación de esta Dependencia Universitaria, quien (es) de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación vigentes, por lo que el protocolo fue **AUTORIZADO**, habiéndose asignado el número de registro de la dependencia siguiente:

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN	ÁREA	Nº DE REGISTRO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"	POSGRADO	001/P/5/2016

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

Atentamente:

~~DR. ARTURO VALENCIA ORTIZ~~
~~SECRETARIO ACADÉMICO~~



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

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

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

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

El presente trabajo fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica,
UMSNH, convocatoria 2016-2017.

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Aprobó la memoria de tesis que presentó:

Médica Cirujana Lucía Salcido Cadena

Doctora en Ciencias Biomédicas Especialidad en Farmacología

Marcia Yvette Gauthereau Torres

Doctora en Ciencias Biomédicas

Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo

Doctora en Ciencia del Comportamiento

María Esther Olvera Cortés

Dirección de tesis:

Doctor en Ciencias Biomédicas

José Miguel Cervantes Alfaro

Co-directora de tesis:

Doctora en Ciencias (Biología)

Gabriela Morali de la Brena

Colaboradores:

Doctora en Ciencia del Comportamiento

María Esther Olvera Cortes

Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), IMSS

Doctora en Ciencias Biomédicas

Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La presente investigación se realizó en:

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

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

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



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



"EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DEL
EFECTO DE RALOXIFENO CONTRA EL DAÑO PRODUCIDO POR
HIPOPERFUSIÓN CEREBRAL CRÓNICA EN RATAS OVARIECTOMIZADAS"

RESUMEN:

Introducción: Se han utilizado Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERMs) como parte de los esquemas terapéuticos para prevenir el deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento, en el cual la deficiencia estrogénica y la posible hipoperfusión cerebral crónica pueden ocurrir en mujeres pre y posmenopáusicas.

Objetivo: Evaluar el efecto neuroprotector del Raloxifeno en un modelo experimental de hipoperfusión cerebral crónica (HCC) (oclusión de ambas arterias carótidas comunes, con una semana de diferencia), en ausencia de la influencia cerebral estrogénica dependiente principalmente de la secreción ovárica.

Material y métodos: Veinticinco ratas Sprague-Dawley (250-300 g) fueron ovariectomizadas y asignadas al azar, dos semanas después, a los siguientes grupos: Sham (procedimientos quirúrgicos para HCC sin interrupción del flujo sanguíneo cerebral, n=10); HCC+Veh (HCC+vehículo, dimetilsulfóxido al 10% en agua estéril, 0,3 ml/día, sc, n=7); HCC+Raloxifeno (HCC+Raloxifeno, 3,0 mg/kg/día, sc, n=8). Después de 60 días de tratamiento con vehículo o Raloxifeno, se evaluó el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, y se procesaron cerebros para evaluar la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo.

Resultados: Los parámetros de aprendizaje espacial y memoria (latencias de escape, longitudes de trayecto de nado) no difirieron significativamente a lo largo de los siete días sucesivos de prueba en los tres grupos experimentales. Sin embargo, durante el ensayo de transferencia (día 8), el tiempo de recorrido a través del cuadrante objetivo, así como el número de cruces sobre la ubicación exacta donde originalmente se encontraba la plataforma de escape, fueron similares en los grupos HCC+Raloxifeno y Sham y significativamente mayores ($p < 0,05$) que en el grupo HCC+Veh. La población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo se redujo significativamente ($p < 0,05$) a un 75%, en comparación con el grupo Sham (100%). El tratamiento con Raloxifeno impidió esta pérdida neuronal, y resultó en un ligero aumento, no significativo, en la población neuronal piramidal (115%).

Conclusiones: Estos resultados apoyan los efectos neuroprotectores del Raloxifeno en las estructuras cerebrales que forman parte del sustrato neural de las funciones cognitivas, afectadas por la privación estrogénica y la hipoperfusión cerebral crónica.

Palabras clave: Hipoperfusión cerebral crónica, Hipocampo, Neuroprotección, SERMs, Raloxifeno.



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



**"MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL EVALUATION OF RALOXIFENE
EFFECT AGAINST DAMAGE PROVOKED BY CHRONIC CEREBRAL
HYPOPERFUSION IN OVARIECTOMIZED RATS"**

SUMMARY:

Introduccion: Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) have been used as a part of therapeutic schedules to prevent cognitive decline associated with aging, in wich estrogenic deficiency and possible chronic cerebral hypoperfusion (CCH) may occu in pre- and post-menopausal women.

Aim: Evaluate the neuroprotective effect of Raloxifene in an experemintal model of CCH (occlusion of both common carotid arteries, one-week apart), under absence of estrogenic cerebral influence mainly dependent on ovarian secretion.

Material and Methods: Twenty-five Sprague-Dawley female rats (250-300 g bw) werw ovariectomized and randomly allotted, two weeks later, to the following groups: Sham (surgical procedures for CCH, whitout interrupting cerebral blood flow, n=10); CCH+Veh (CCH+vehicle, 10% dimethylsufoxide in water, 0.3 ml/day, sc, n=7); CCH+Raloxifene (CCH+Raloxifene, 3.0 mg/kg/day, sc, n=8). After 60 days of vehicle or Raloxifene treatment, spatial learning and memory were evaluated in the Morris water maze, and brains were processed to evaluate hippocampal CA1 pyramidal neuron population.

Results: Parameters of spatial learning and memory (escape latencies, swimming path lengths) did not significantly differ along the seven successive testing days in the three experimetal groups. However, during the probe trial (day 8) swimming through the target quadrant, as well as number of crossings over the precise former escape platform location, were similar in the CCH+Raloxifene and the Sham groups, and significantly higher ($p<0.05$) than in the CCH+Veh group. Hippocampal CA1 pyramidal neuron population was significantly reduced ($p<0.05$) to a 75%, as compared to the Sham group (100%). Raloxifene tratment prevented this neuronal loss, and resulted in a slight non-significant increase in the pyramidal neuron pupulation (115%).

Conclusions: These results support the neuroprotective effects of Raloxifene on the brain structures being a part of the neural substrate for cognitive functions, affected by estrogenic deprivation and chronic cerebral hypoperfusion.

ABREVIATURAS

ATP: Adenosín trifosfato

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico

ChAT: Colina acetil transferasa

cm: Centímetro

COX-2: Ciclo-oxigenasa-2

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ER: Receptor a estrógeno

E2: 17 β -estradiol

FSC: Flujo sanguíneo cerebral

g: Gramo

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial

GPR30: Receptor transmembranal acoplado a proteínas G

HCC: Hipoperfusión cerebral crónica

IL-1 β : Interleucina 1 β

im: Intramuscular

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

Kg: Kilogramo

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

MAPK: Proteína quinasa activada por mitogéno

min: Minuto

ml: Mililitro

OVX: Ovariectomía

PI3K/AKT: Fosfatidilinositol 3-quinasa/ proteína quinasa B

ROS: Especies reactivas de oxígeno

sc: Subcutáneo

seg: Segundo

SERMs: Moduladores Selectivos de Receptores de Estrógenos

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

Veh: Vehículo

RELACIÓN DE TABLAS:

Número	Título	Página
Tabla 1	Valores (Media \pm EE) de la longitud de las trayectorias de nado.	28
Tabla 2	Valores (Media \pm EE) de la velocidad de nado.	30

RELACIÓN DE FIGURAS

Número	Título	Página
Figura 1	Latencias de escape (mediana y rango).	27
Figura 2	Trayectorias de nado representativas de un animal de cada uno de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris.	29
Figura 3	Tiempo de recorrido (media \pm EE) en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia, en los diferentes grupos experimentales.	32
Figura 4	Número de cruces (media \pm EE) por el sitio donde se encontraba la plataforma.	33
Figura 5	Fotomicrografías de cortes histológicos representativos, que ilustran la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo.	34
Figura 6	Número de neuronas piramidales remanentes (Media \pm EE) en una extensión lineal de 250 μ m en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo de los animales de los diferentes grupos experimentales.	35

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Fenómenos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por la isquemia.	4
2.2. Síndrome de hipoperfusión cerebral crónica.	6
2.3. Acciones del 17 β estradiol en las estructuras cerebrales.	7
2.4. Receptores a estrógenos como mediadores de la neuroprotección del 17 β estradiol.	8
2.5. Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERMs).	12
2.6. Acciones neuroprotectoras de los SERMs.	14
2.7. El Modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica en ratas.	16
4. JUSTIFICACIÓN	19
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVO GENERAL	19
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7. RESULTADOS	26
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES	42
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

Número total de páginas: 56

INTRODUCCIÓN

La demencia es un problema de salud asociado al proceso de envejecimiento, en el que ciertas condiciones fisiopatológicas capaces de inducir daño en estructuras cerebrales específicas, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal, dan lugar al deterioro progresivo y eventualmente a la pérdida de funciones cognitivas.

La Organización Mundial de la Salud ha identificado a poco más de 47 millones de personas en el mundo que viven con demencia, y esta cifra se prevé que pase de 75 millones en el año de 2030 a más de 132 millones para el año 2050 (World Health Organization, 2016). Esto implica una enorme carga de atención médica y cuidados personales para las familias y los cuidadores primarios, así como un gran costo financiero que en Estados Unidos de América ha sobrepasado el costo de la atención médica por enfermedades oncológicas y cardiovasculares (Hurd y col., 2013).

En México existen cerca de 860 mil pacientes con algún tipo de demencia. Y debido a la transición demográfica el número de personas con este padecimiento continuará creciendo en los siguientes años (Mejía-Arango y Gutierrez-Robledo 2011). Un estudio de base poblacional realizado para la evaluación de la demencia indica que su prevalencia en ancianos de bajo y mediano ingreso económico es de 7.4 para las áreas urbana y rural (Llibre y col., 2008). Por otra parte, la Encuesta Nacional Sobre Salud y Envejecimiento en México (ENASEM) muestra que la incidencia de demencia es de 27.3 casos por 1,000 personas/año en personas adultas mayores de 60 años a nivel nacional (ENASEM, 2012); en otro estudio se muestra que la incidencia de demencia es de 16.9 por 1,000 personas/año para las zonas urbanas y de 34.2 por 1,000 personas/año para las zonas rurales, con una tendencia a ser mayor en las mujeres que en los hombres; tendencia que se incrementa exponencialmente con la edad (Prince y col., 2012).

La demencia forma parte de un grupo heterogéneo de trastornos cerebrales en los que el deterioro cognitivo es atribuible a patologías cerebro vasculares, que parecen ser la causa primaria de al menos el 20% de los casos de demencia

(Gorelick y col., 2011). En este sentido, varios estudios clínico-patológicos recientes han destacado el papel del trastorno cerebro vascular, no sólo como causa primaria de deterioro cognitivo, sino también como adyuvante fisiopatológico de las alteraciones cerebrales que dan lugar a la demencia que caracteriza a la enfermedad de Alzheimer y a la demencia asociada a otras patologías neurodegenerativas (Gorelick y col., 2011; Levine y Langa, 2011; Toledo y col., 2013). Asimismo, se ha mostrado la importancia de la relación funcional y la sinergia fisiopatológica entre neuronas, células gliales, y células vasculares (Iadecola, 2010; Zlokovic, 2011), como parte de los procesos de daño cerebral en los que alteraciones del flujo sanguíneo, tales como la hipoperfusión cerebral crónica en estructuras cerebrales específicas, podrían contribuir al daño cerebral subyacente al deterioro cognitivo.

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 ello, la disminución y/o la ausencia de actividad estrogénica y la hipoperfusión cerebral crónica pueden ser factores concurrentes de daño cerebral y deterioro cognoscitivo en mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, la administración de estradiol como terapia de remplazo con posibles efectos neuroprotectores en seres humanos presenta serias limitaciones, debido al riesgo de que las acciones del estradiol en tejidos periféricos den lugar a neoplasias estrógeno dependientes y trombosis (Don Carlos y col., 2009).

En estas condiciones, de deficiencia estrogénica y posible hipoperfusión cerebral crónica, se ha planteado la potencialidad de los compuestos Moduladores Selectivos de Receptores de Estrógenos (SERMs), como parte de esquemas de neuroprotección en contra del daño cerebral conducente al deterioro de las funciones cognoscitivas. Los SERMs interactúan con receptores a estrógeno modulando las acciones genómicas de tal manera que se preserven las acciones estrogénicas en estructuras celulares cerebrales, en tanto que en otras células las

antagonizan, particularmente las acciones relacionadas con efectos indeseables de la terapia de remplazo con estradiol (Paige y col., 1999).

En este sentido, se ha mostrado que SERMs tales como, Tamoxifeno, Raloxifeno o Basedoxifeno tienen efectos neuroprotectores. En particular, el Raloxifeno es un SERM derivado de benzotiofeno utilizado en la práctica clínica para mantener la densidad ósea en mujeres posmenopáusicas al actuar como agonista de receptores a estrógeno en el hueso, pero como antagonista estrogénico en el tejido endometrial y mamario ya que no induce efectos proliferativos sobre el endometrio e inhibe la proliferación celular en el cáncer de mama estrógeno-dependiente (Riggs y Hartmann, 2003). En el cerebro actúa como agonista de receptores de estrógeno, de hecho, estudios clínicos aleatorizados sugieren que el Raloxifeno previene el deterioro cognitivo en mujeres postmenopáusicas (Yaffe y col., 2005).

El potencial de estos fármacos para la prevención y el tratamiento del daño cerebral en diferentes situaciones fisiopatológicas generadas mediante modelos experimentales de isquemia cerebral aguda y otras patologías neurodegenerativas, sustenta la importancia del estudio de sus efectos neuroprotectores. Sin embargo, los efectos neuroprotectores del Raloxifeno no han sido estudiados en modelos experimentales de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de actividad estrogénica. Se esperaría que los resultados de la investigación contribuyeran 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 que normalmente ejercen los estrógenos secretados por el ovario, principalmente 17β -estradiol, sobre la estructura y las funciones de diversas estructuras cerebrales (McEwen y col., 1995; McEwen y col., 2012).

1. ANTECEDENTES

2.1. Fenómenos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por la isquemia

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 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 del aporte sanguíneo al cerebro dan lugar a una falla en el soporte metabólico que provee de energía a las células nerviosas, lo cual a su vez inicia una serie de alteraciones de los mecanismos celulares esenciales para el funcionamiento neuronal. La falla metabólica induce diversas alteraciones de los gradientes iónicos transmembranales, despolarización anóxica e incremento anormal de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ y de Na⁺, y disminución del pH. El ingreso excesivo, no regulado, de Ca²⁺ al interior de las células a través de los canales iónicos operados por voltaje y por los receptores de glutamato puede subsecuentemente activar procesos celulares anormales 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⁺. Como consecuencia, puede haber sobreproducción de radicales libres, lipoperoxidación de las membranas celulares, daño a macromoléculas y al citoesqueleto, así como activación de citocinas proinflamatorias. Adicionalmente la activación de cascadas de señalización proapoptóticas mantiene condiciones que dan lugar a daño estructural, funcional y muerte neuronal (Pulsinelli y col., 1997; Lipton, 1999).

A partir de la falla energética inicial y la liberación anormal y excitotóxica subsecuente de glutamato, la mitocondria queda alterada e involucrada permanentemente en procesos celulares de daño estructural y funcional. La captura en la mitocondria de cantidades anormalmente elevadas de

Ca²⁺ intracelular da lugar a la sobreproducción de radicales libres, a la apertura de los poros de transición mitocondriales, a la liberación de citocromo c, a la falla secundaria de la función mitocondrial y a la iniciación de la cascada de señalización proapoptótica. La cascada proapoptótica involucra vías de señalización dependientes del factor nuclear 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 DNA y de las enzimas que pueden repararlo, dando lugar a la degradación del DNA y a la muerte (Warner y col., 2004; Chan 2001; Chinopoulos y Adam, 2006; Iadecola y Alexander, 2001).

En condiciones de isquemia, la sobreproducción de radicales libres por parte de la mitocondria excede las reservas antioxidantes de las neuronas y pone en riesgo su integridad estructural y funcional (Iadecola y Alexander, 2001). El cerebro es especialmente susceptible al daño oxidativo como resultado de su alta tasa metabólica, las necesidades de oxígeno elevadas y de sus características bioquímicas particulares. Así, aunque el cerebro humano constituye sólo el 2% de peso corporal total, consume alrededor del 20% del oxígeno utilizado por el organismo (Brust, 2013) lo que favorecería la generación de radicales libres en mayores cantidades que otros tejidos. Así mismo, varias regiones del cerebro contienen altas concentraciones de hierro, un compuesto metálico que puede catalizar la generación de radicales libres; además, el cerebro con una capacidad antioxidante relativamente baja en comparación con órganos tales como el hígado o el riñón, es rico en lípidos con ácidos grasos insaturados, que pueden ser el blanco para la lipoperoxidación (Dringen, 2000).

Los radicales libres incluyendo superóxido, hidroxilo y peróxido nítrico también son mediadores importantes de daño inflamatorio al tejido cerebral, de la activación y secreción de citocinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral α , interleucina-1 e interleucina-6; así como la inducción y expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclo-oxigenasa (COX)-2. Estas alteraciones favorecen la presencia de reacciones inflamatorias inmediatamente después de la isquemia/reperfusión.

Sin embargo, la isquemia/reperfusión cerebral también puede dar lugar a mecanismos de reparación neuronal y recuperación funcional mediante procesos de plasticidad que involucran a las neuronas remanentes tanto en las estructuras mayormente afectadas por la isquemia como en aquellas que no fueron involucradas en el daño isquémico (Barone y Feurestein, 1999; Jourdain y col., 2002; Crepel y col., 2003 Bendel y col., 2005; Hurtado y col., 2006; Ruan y col., 2006). Los diferentes fenómenos celulares inducidos por la isquemia/reperfusión cerebral que dan lugar ya sea a muerte neuronal y daño cerebral o a reparación neuronal, plasticidad y recuperación funcional, pueden ocurrir en forma secuencial o de manera simultánea a partir del fenómeno isquémico. 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).

2.2. Síndrome de Hipoperfusión Cerebral Crónica

Estos fenómenos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por la isquemia, ocurren con gran intensidad y en corto tiempo en los casos de isquemia cerebral aguda global o focal; sin embargo, la isquemia cerebral también puede ocurrir de otra manera ante la reducción del flujo sanguíneo de menor magnitud, con un curso temporal a largo plazo, 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 del síndrome de Hipoperfusión Cerebral Crónica que es una alteración provocada por una reducción progresiva, a largo plazo, del flujo sanguíneo y por consiguiente del aporte de oxígeno y glucosa al cerebro (Ni y col., 1994; Farkas y col., 2007). Este síndrome es una importante causa de 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 a la pérdida de las funciones y capacidades cognitivas, de aprendizaje y de memoria (Otori y col., 2003; Tsuchiya y col., 1992). En condiciones de hipoperfusión cerebral crónica (HCC) el flujo sanguíneo cerebral se reduce a largo plazo, de manera progresiva hasta en un 30% del flujo sanguíneo cerebral normal y cabe esperar que ocurra daño, alteración funcional y muerte neuronal en las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia, entre las que destacan las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo y de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral, directamente involucradas en la integración de funciones cognitivas (Farkas y col., 2007, Pulsinelli, 1985).

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

2.3. Acciones del 17β estradiol en las estructuras cerebrales

Por otra parte, existe evidencia acerca de los efectos neuroprotectores del 17β estradiol en contra del daño cerebral provocado por la isquemia, en los que intervienen múltiples mecanismos de acción estrogénica a nivel celular y molecular, que tienen lugar en las estructuras cerebrales más vulnerables a la reducción del flujo sanguíneo (Moralí y Cervantes, 2014).

En condiciones fisiológicas el 17β -estradiol (E2) 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 cognitivas 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 (Moralí y Cervantes, 2014).

Dichas acciones estrogénicas 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 mesolímbico, la amígdala, el hipocampo, la corteza cerebral y el tallo cerebral. En estas estructuras, dichas acciones son mediadas por receptores a estrógeno (ER) y pueden afectar la comunicación celular, la generación, la codificación, la comunicación celular y el procesamiento de la información contenida en las señales eléctricas y químicas, mediante la modificación de la síntesis, liberación, biotransformación, recaptura e interacción con receptores de diversos neurotransmisores en los sistemas colinérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, glutamatérgico y neuropeptidérgicos (neuropéptido Y, péptidos opioides), determinantes de las características de la plasticidad neuronal, esencial en procesos cerebrales tales como el desarrollo cerebral, el aprendizaje, la memoria y los diversos patrones de comportamiento (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 (Wolley, 2007; Vegeto y col., 2008)

2.4. 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 primarios a estradiol, ER α y los ER β , han sido localizados en el núcleo, el citoplasma y la membrana de las neuronas, donde actúan como mediadores de activación de las vías de señalización intracelular involucradas en las acciones genómicas correspondientes a diversos efectos estrogénicos en el sistema nervioso central. Actualmente se acepta que los estrógenos, como otras hormonas esteroides, pueden actuar a través de una vía considerada clásica, una vez que han sido translocados al núcleo, como factores de transcripción mediante la unión con receptores nucleares y la interacción con sitios específicos de respuesta estrogénica en el genoma (Liu y col., 2010).

Los ER α se ubican con gran densidad en el hipocampo, el hipotálamo y el área preóptica, mientras que su densidad es baja en la corteza cerebral. En contraste, los ER 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, 2005; Woolley, 2007; Raz y col., 2008; Levin, 2005; Hammes y Levin, 2007; Pérez y col., 2003; Dubal y col., 2001; Elzer y col., 2010). En estas estructuras cerebrales se ha descrito una interacción cooperativa de los ER α y los ER β y sus coactivadores para la regulación coordinada de la codificación de genes en el DNA nuclear y en el DNA mitocondrial para las proteínas involucradas en la cadena respiratoria (Chen y col., 2009). Tanto los ER α como los ER β se expresan también en los astrocitos, en los que la síntesis y liberación de factores de crecimiento pueden ser activados, como resultado de las acciones estrogénicas, y bajo ciertas condiciones formar parte de procesos cerebrales de neuroprotección (Arévalo y col., 2009; Carswell y col., 2004; Dhandapani y col., 2005; Azcoitia y col., 2010; Dhandapani y Brann 2007). Los datos experimentales que se han acumulado indican un papel preponderante

de los ER α como mediadores de la neuroprotección del estradiol contra el daño cerebral por isquemia. Sin embargo, la participación de los ER β como mediadores de la neuroprotección del estradiol no ha sido descartada. Esta propuesta se ha sustentado principalmente en estudios de neuroprotección efectuados en animales “knockout” o “knockdown” y en estudios con agonistas o antagonistas selectivos de los ER α y de los ER β (Miller y col., 2005; Dai y col., 2007; Carswell y col., 2004; Dubal y col., 2001; Elzer y col., 2010).

Se ha descrito que el estradiol puede inducir fenómenos celulares que ocurren con mayor rapidez que los que están mediados por los receptores ER α y ER β . En efecto, ciertas acciones del estradiol, dependientes o independientes de procesos de transcripción en el cerebro pueden estar mediadas por un receptor con siete dominios trans-membranales 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). GPR30 ha sido identificado como un receptor a estrogéno membranar cuya interacción con E2 puede dar lugar a 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). Cabe destacar que el agonista (G1) selectivo del GPR30, ha mostrado efectos neuroprotectores contra el daño cerebral provocado por la reducción del flujo sanguíneo cerebral en modelos experimentales de isquemia focal o global (Lebesgue y col., 2009; Zhang y col., 2010; Lebesgue y col., 2010).

La presencia de estos diferentes tipos de receptor a estrógeno en las neuronas y las células gliales que forman parte de la estructura y los circuitos neuronales del hipocampo adquiere gran importancia debido al papel fundamental del hipocampo para la codificación de la información y el procesamiento de las señales eléctricas y químicas involucradas en los procesos cerebrales que dan lugar a las funciones

cognoscitivas. De esta manera, las acciones estrogénicas mediadas por receptores, se traducen en cambios en la densidad, la configuración y proporciones relativas de los diferentes tipos de espinas dendríticas en las células piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo y de las capas 3 y 5 de la corteza prefrontal, los cuales son parte fundamental de la generación de señales, la comunicación celular y los cambios plásticos que inciden en las características del aprendizaje y la memoria espacial (Gould y col., 1990; Ikeda y col., 2006; Zhou y col., 2007; Smith y McMahon, 2006; Mukai y col., 2007; Jelks y col., 2007; Marin y col., 2009; Garcia-Segura y col., 2010; Roepke y col., 2011).

Los receptores ER α , ER β y GPR30 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. Éste es el caso de: a) reducción del estrés oxidativo, a través de la reducción del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial, la reducción de la activación NADPH oxidasa y de la producción de ROS, la modulación de enzimas antioxidantes, la captura de ROS; b) reducción de los fenómenos proinflamatorios inducidos por la isquemia; c) incremento de los mecanismos celulares antiapoptóticos; d) promoción de la síntesis y liberación de factores tróficos por parte de los astrocitos; e) mejoramiento a corto y largo plazo del flujo sanguíneo en las zonas isquémicas; f) regulación de las vías de señalización PI3K/Akt/MAPK en favor de la supervivencia neuronal; g) preservación funcional de la barrera hematoencefálica; h) reparación de los circuitos neuronales dañados mediante sinaptogénesis y neurogénesis.

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

Asimismo, se han sintetizado varios análogos químicos del estradiol que carecen de afinidad por los receptores ER α y ER β y no son feminizantes; en cambio, la adición de ciertos radicales químicos en el anillo A fenólico de estos compuestos incrementa su capacidad antioxidante, una propiedad que es esencial para sus efectos neuroprotectores, no obstante que no interaccionen con ER α y ER β . De hecho, se ha mostrado que estos compuestos pueden ejercer efectos neuroprotectores contra el daño cerebral en modelos experimentales de isquemia focal, debido a sus efectos antioxidantes, sustentados en el incremento de la capacidad donadora de electrones. Sin embargo no se ha dilucidado si los efectos neuroprotectores de estos compuestos puedan estar mediados por el receptor GPR30, ni el papel que tiene este receptor en los efectos neuroprotectores del estradiol endógeno (Simpkins y col., 2004; Yi y col., 2011).

Dado que estos análogos de estradiol no feminizantes como ZYC3, ZYC13 y ZYC26 no tienen interacción con los receptores ER α y ER β (Yi y col., 2011), se esperaría que no tuvieran acciones sobre la glándula mamaria, el útero o la coagulación sanguínea; sin embargo, pueden tener eficacia como neuroprotectores (Simpkins y col, 2013).

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

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) son agentes que se unen al receptor a estrógeno provocando su activación (agonistas) y la inducción de acciones celulares estrogénicas en ciertos tejidos, en tanto que en otros tipos celulares tienen un efecto inhibitorio (antagonistas) sobre las acciones estrogénicas inducidas por la activación de los receptores a estrógeno correspondientes (Riggs y Hartmann, 2003). La mayor parte son compuestos no esteroides con estructura terciaria que, tras unirse al ER, pueden inducir cambios específicos y únicos en la conformación del receptor influyendo en su capacidad para interactuar con otras proteínas, tales como coactivadores y correpresores,

permitiéndoles interactuar como agonistas o como antagonistas del receptor estrogénico en diferentes tejidos (Brzozowski y col. 1997; Simth y col. 2004).

Los SERMs se han clasificado por su estructura química como: derivados del Trifeniletieno, 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 fitoSERMs, como Genisteina (Terán y Teppa, 2005; 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.

Los SERMs, ya sea sintéticos o naturales, tales como fitoestrógenos, representan una alternativa al estradiol para el tratamiento o la prevención de trastornos neurodegenerativos tales como la disminución de la cognición con el envejecimiento o el desarrollo de los trastornos afectivos y cognitivos después de la menopausia (DonCarlos y col., 2009).

Los estudios acerca de los efectos del Raloxifeno sobre el desempeño cognoscitivo en animales de experimentación, en ausencia de secreción ovárica de estrógenos, son escasos y posiblemente sus resultados sean motivo de controversia. Se ha descrito que Raloxifeno no imita los efectos de los estrógenos en el desempeño cognitivo en una tarea de aprendizaje y memoria espacial, en ratas ovariectomizadas, efectuada al término de un tratamiento de 30 días con estradiol (5 µg/día) o con Raloxifeno (300 µg/día ó 1500 µg/día) administrados mediante dispositivos de liberación continua iv. (Gibbs y col., 2004). En contraste, ratas ovariectomizadas tratadas con una sola dosis de estradiol (10 µg, sc),

Tamoxifeno (1mg/kg, sc) o Raloxifeno (1 mg/kg, sc), mostraron mayor eficiencia en pruebas de memoria de trabajo en el laberinto en Y que los animales sin tratamiento; efecto que fue relacionado con un incremento significativo de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la capa III de la corteza prefrontal prelímbica/infralímbica (Velázquez-Zamora y col., 2012).

2.6. Acciones neuroprotectoras de los SERMs

Las acciones neuroprotectoras de Tamoxifeno y Raloxifeno, dos SERM que se utilizan actualmente en la práctica clínica para el tratamiento de cáncer de mama y la osteoporosis, se han evaluado en diferentes modelos experimentales de la disfunción neuronal. Estos incluyen modelos animales de lesión traumática del sistema nervioso central y 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* (Metha y col., 2003; Barreto y col., 2009; Kokiko y col., 2006; O'Neill y col., 2004; Ciriza y col., 2004) mediante diversos mecanismos de acción.

Así, se ha mostrado que el Tamoxifeno y el Raloxifeno reducen la activación de la microglia, así como la producción de mediadores inflamatorios en respuesta de la microglia a diversos estímulos inflamatorios y en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (Suuronen y col., 2005; Vegeto y col., 2006).

En diversos estudios se han obtenido resultados que sustentan el efecto neuroprotector del Raloxifeno, en diferentes modelos y condiciones experimentales de daño cerebral *in vitro* e *in vivo*, mostrando que la administración de Raloxifeno disminuye la reacción glial, facilita la recuperación funcional y reduce el deterioro de las funciones cognitivas en modelos experimentales de lesión traumática de la corteza cerebral (Kokiko y col., 2006; Barreto y col., 2009), y en lesión del nervio ciático (McMurray y col., 2003). Asimismo, el efecto neuroprotector de Raloxifeno se ha sustentado en la reducción de la secreción de

TNF- α e IL-1 β y de la cantidad de células GFAP positivas inducidas por la lesión traumática de la médula espinal en ratas macho (Ismailoglu y col., 2013).

En este sentido, se ha descrito que el Raloxifeno tiene propiedades similares a los estrógenos sobre la actividad de la colina acetil transferasa (ChAT) del hipocampo, y se ha sugerido que los SERM de benzotiofeno que pueden ejercer efectos benéficos similares a los estrógenos sobre la neurotransmisión colinérgica en el cerebro sin producir la estimulación periférica de mama o tejido uterino (Wu y col., 1999). El Raloxifeno protege las neuronas del giro dentado del hipocampo de la excitotoxicidad del ácido kaínico (Ciriza y col., 2004), así como de la toxicidad provocada por β -amiloide (Du y col., 2004); también se ha descrito que promueve el crecimiento axonal (Nilsen y col., 1998), disminuye el daño potencial mediado por oxidación (Konyalioglu y col., 2007) y reduce la activación de la microglía después de la administración de lipopolisacárido (Tapia-Gonzalez y col., 2008; Cerciati y col., 2010).

Se ha postulado que el Raloxifeno actúa en el sistema nervioso central como un agonista parcial a ER 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 (Simoncini y Genazzani, 2002; 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) e incrementa la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 en la corteza cerebral (Armagan y col., 2009).

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 numérica de las espinas dendríticas apicales de la capa III de neuronas piramidales de la corteza prefrontal pre-límbica e infra-límbica (Velazquez-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).

2.7. El modelo de hipoperfusión cerebral crónica en ratas

Se ha descrito que las ratas presentan un flujo sanguíneo cerebral regional de $179,4 \pm 38,1$ ml/100g/min en la corteza frontal, de $191,0 \pm 51,7$ ml/100g/min en la corteza parietal, de $224,2 \pm 41,4$ ml/100g/min en la temporal y de $174,7 \pm 8,0$ ml/100g/min en la corteza occipital, así como de $86,1 \pm 19,5$ ml/100g/min en la región CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo (Otori y col. 2003).

El modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica se ha desarrollado para estudiar en animales de experimentación las condiciones y consecuencias de una reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral (FSC) como podría ocurrir en seres humanos. Este modelo consiste en la oclusión bilateral permanente de ambas arterias carótidas comunes, provocando una reducción a largo plazo del FSC en las regiones corticales de hasta 55-65% y en el hipocampo de hasta 40%, en comparación con el FSC en animales sin oclusión.

Esta situación provoca la muerte de las neuronas más vulnerables a la isquemia, como son las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo y las

neuronas piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral (Pulsinelli, 1985). Estas neuronas piramidales del hipocampo forman parte fundamental del circuito trisináptico donde se realiza la adquisición y procesamiento de la información sensorial involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria. De tal manera que a partir de la oclusión de las arterias carótidas se espera, en este modelo, que ocurra una pérdida progresiva de las neuronas piramidales de CA1 y el deterioro progresivo de las funciones cognoscitivas dependientes del hipocampo como son el aprendizaje y la memoria espacial y el aprendizaje y la memoria de trabajo espacial (Ginsberg y Busto, 1989; Farkas y col., 2007; Hossmann, 2008; Ulrich y col., 1998; Pappas y col., 1996; Ohta y col., 1997).

El modelo de HCC ha sido caracterizado por diversos autores, quienes han descrito la magnitud de la pérdida de las neuronas piramidales en CA1 en función del transcurso del tiempo, desde 14 días hasta 6 meses, a partir del inicio de la isquemia. Esta pérdida neuronal se acompaña de una notable reacción de las células gliales (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., 2012).

Asimismo, la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y de memoria de trabajo espacial en el laberinto de 8 brazos de Olton se deteriora progresivamente a partir del inicio de la isquemia. En efecto, la latencia de escape en el laberinto acuático de Morris es significativamente mayor y el tiempo de permanencia en el cuadrante durante la prueba de transferencia es significativamente menor en ratas a partir de dos semanas luego de HCC en comparación con animales Sham (animales con simulación del procedimiento anestésico-quirúrgico de HCC). La ejecución en el laberinto de 8 brazos de Olton se altera permanentemente de manera significativa a partir de los 2 meses con HCC (Ni JW y col., 1994; Pappas y col., 1996; Ohta y col., 1997; Ulrich y col., 1998).

La lesión de las células piramidales del segmento CA1 del hipocampo coincide con un aumento significativo de las células gliales 6 meses después del inicio de HCC, particularmente en el estrato oriens como lo muestra el incremento de la

inmunorreacción a GFAP (Proteína Acida Fibrilar Glial). Esta reacción glial no se observó en el hilus, donde no ocurre muerte neuronal como consecuencia de la HCC (Pappas y col., 1996).

Dadas sus características, el modelo de HCC permite evaluar los efectos de fármacos potencialmente neuroprotectores, de los cuales se esperaría que impidieran o disminuyeran la muerte neuronal inducida por la hipoperfusión cerebral crónica y el deterioro subsecuente de las funciones cognitivas dependientes de la integridad morfo funcional del hipocampo. En este caso los mejores parámetros indicadores de la eficacia de un fármaco potencialmente neuroprotector serían la evaluación a largo plazo de la población neuronal en las estructuras cerebrales vulnerables (parámetro de estructura) y la evaluación de las funciones de aprendizaje y memoria espacial (parámetro de funciones), de acuerdo con los lineamientos establecidos por consenso para el estudio preclínico de fármacos neuroprotectores (Fisher y col., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La ausencia de actividad estrogénica y la hipoperfusión crónica pueden ser factores de daño cerebral y deterioro cognoscitivo en mujeres pre y post menopáusicas.

El potencial del Raloxifeno para la prevención y el tratamiento del daño cerebral en diferentes situaciones fisiopatológicas generadas mediante modelos experimentales de isquemia cerebral aguda y otras patologías neurodegenerativas, sustenta la importancia del estudio de sus efectos neuroprotectores. Sin embargo, estos efectos neuroprotectores del Raloxifeno no han sido estudiados en modelos experimentales de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de actividad estrogénica. Se esperaría que los resultados de la investigación contribuyeran a la sustentación de propuestas con posible aplicación en el manejo clínico-terapéutico de individuos con hipoperfusión cerebral crónica en ausencia de actividad estrogénica.

4. HIPÓTESIS

El Raloxifeno reduce las alteraciones morfológicas y funcionales provocadas por la hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de la actividad estrogénica que ejercería la secreción de estrógenos ováricos, en ratas ovariectomizadas.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del Raloxifeno en el modelo de hipoperfusión cerebral crónica, mediante la evaluación de la eficiencia en el aprendizaje y la memoria espacial, y de la población neuronal del hipocampo, en ratas ovariectomizadas.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 6.1.** Evaluar la eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en condiciones de Hipoperfusión Cerebral Crónica, en ausencia de tratamiento y bajo tratamiento con Raloxifeno, en ratas ovariectomizadas.

- 6.2.** Evaluar la población neuronal de células piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en condiciones de Hipoperfusión Cerebral Crónica, en ausencia de tratamiento y bajo tratamiento con Raloxifeno, en ratas ovariectomizadas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en veinticinco ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, con un peso de 250-300 g al inicio de los procedimientos experimentales, que se mantuvieron en cajas de acrílico, bajo condiciones de ciclos de luz y oscuridad (12h/ 12h), a una temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, con provisión de comida (rodent laboratory Chow, Purina) y agua *ad libitum*.

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 dolor o el sufrimiento de los animales en todos los procedimientos experimentales.

El proyecto fue autorizado por el Comité de Investigación y Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, con el número de registro: 001/P5/2016.

Los animales de experimentación fueron asignados al azar a los siguientes grupos experimentales: Sham (n=10); HCC+Veh (n=7); HCC+Raloxifeno (n=8). Los animales de los grupos Sham, HCC+Veh, y HCC+Raloxifeno fueron ovariectomizados bajo anestesia general (Xilazina, 10 mg/kg, im /Ketamina, 50 mg/kg, im). Catorce días después de la ovariectomía se realizaron en los grupos HCC+Veh y HCC+Raloxifeno los procedimientos anestésico/quirúrgicos del modelo de hipoperfusión cerebral crónica en ratas (Pappas y col., 1996; Farkas y col., 2007, Cechetti y Netto, 2010; Azzubaidi y col., 2012). Inmediatamente después de la oclusión de la segunda arteria carótida, se inició el tratamiento con Vehículo (Solución de dimetilsulfóxido al 10% en H₂O estéril, 0.3 ml/día, sc) o Raloxifeno (3.0 mg/kg/día, en solución de dimetilsulfóxido al 10%, sc), diariamente,

durante 60 días. Los animales del grupo Sham se sometieron a los procedimientos anestésico-quirúrgicos sin oclusión de las arterias carótidas, sin tratamiento con raloxifeno o con vehículo.

Al término del período de tratamiento con raloxifeno o con vehículo, cada uno de los animales de los 3 grupos en estudio se sometió a la prueba de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984). Un día después de haber terminado las pruebas en el laberinto acuático de Morris, se obtuvieron los cerebros de los animales de los diferentes grupos para procesamiento histológico y evaluación de la población neuronal del segmento CA1 del cuerno de Ammon.

7.1. Modelo de hipoperfusión cerebral crónica

El modelo de hipoperfusión cerebral crónica se realizó bajo anestesia general con Ketamina (50 mg/kg, im) y Xilazina (10 mg/kg, im) y condiciones asépticas, de acuerdo con los procedimientos quirúrgicos descritos previamente (Pappas y col., 1996; Farkas y col., 2007, Cechetti y Netto, 2010; Azzubaidi y col., 2012): mediante un microscopio estereoscópico (Leica Mod. S6E) se localizó la vaina carotídea de la arteria carótida común izquierda, a través de una incisión en la piel, en la línea media de la cara ventral del cuello, proximal al esternón y mediante disección roma del tejido celular subcutáneo y fibras musculares; la arteria carótida común izquierda se separó cuidadosamente del nervio vago para colocar una doble ligadura (seda 5-0) antes de la bifurcación que da origen a las arterias carótidas interna y externa; en estas condiciones se procedió al corte de la arteria carótida común entre las ligaduras. Siete días después se realizó el mismo procedimiento en la arteria carótida común derecha. Luego de cada uno de ambos procedimientos quirúrgicos se mantuvo a los animales en condiciones controladas de temperatura e hidratación. Se administró diclofenaco (1mg/kg, im) y enrofloxacin (2 mg/kg, im), como profilaxis de dolor e infección.

7.2. Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en el Laberinto acuático de Morris

Para la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial se utilizó el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984). En esta prueba, las ratas se colocaron en una piscina circular de 140 cm de diámetro y 50 cm de altura, con agua teñida de color azul oscuro, a una temperatura de 25 °C, hasta una profundidad de 25 cm, ubicada en un cuarto con una variedad de señales (puerta, figuras, el investigador, etc.,) en lugares fijos del entorno, las cuales permitían la orientación espacial de la rata. El laberinto se dividió de manera virtual en cuatro cuadrantes designados como 1, 2, 3 y 4. En el cuadrante 1 se colocó una plataforma de escape (13 x 13 cm) sumergida 2 cm por debajo de la superficie del agua, a 28 cm, hacia el centro, de la pared de la piscina. Tanto la plataforma como las señales espaciales alrededor del laberinto se mantuvieron en el mismo sitio durante las pruebas de evaluación del aprendizaje espacial. En cada una de estas pruebas la rata se colocó dentro del agua con la cabeza frente a la pared de la piscina en cualquiera de los cuatro cuadrantes seleccionados al azar en cada día de prueba (7 días). Cada prueba terminó cuando la rata encontró la plataforma en menos de 60 segundos (latencia de escape); en caso contrario la rata fue guiada hasta la plataforma y en este caso se le asignó una latencia de escape de 60 segundos. En el diseño experimental se utilizó un periodo de aprendizaje de 7 días, con dos ensayos diarios, con un intervalo de 20 minutos; se permitió la permanencia de la rata en la plataforma durante 15 segundos con objeto de propiciar la ubicación de su posición con respecto al entorno. Al día siguiente de haber completado el periodo de aprendizaje (día 8) se realizó en cada rata una prueba de memoria espacial (30 segundos) en la que se retiró la plataforma y se midió el tiempo que la rata recorrió el cuadrante donde se localizaba originalmente la plataforma, en comparación con el tiempo de recorrido por los otros tres cuadrantes, y el número de veces que cruzó por el sitio donde se encontraba la plataforma. La ejecución del animal en cada prueba se registró mediante video grabación. En cada prueba se evaluaron: la latencia de escape (el tiempo que tardó la rata en localizar la plataforma), la distancia recorrida (cm) hasta encontrar la plataforma, la velocidad

de nado (cm/s), el tiempo de recorrido a través de cada cuadrante y el número de cruces por el sitio donde originalmente se encontraba la plataforma.

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

Al término de las pruebas en el laberinto acuático de Morris, los animales fueron anestesiados con Éter y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con 180cc de solución amortiguadora de fosfatos, seguida de 180cc de solución de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos. Los cerebros fueron retirados del cráneo y se conservaron en el mismo fijador durante 2-4 días antes del procesamiento histológico. Se obtuvo de cada cerebro una rebanada coronal (7,0 mm de espesor) de la región que contiene el hipocampo dorsal, para ello se utilizó una matriz de acrílico para cortes coronales de cerebro de rata (Stoelting mod. 51384). Dichas rebanadas de tejido cerebral se deshidrataron mediante inmersión en alcohol etílico, en concentraciones crecientes y en alcohol amílico, posteriormente fueron aclaradas en aceite de madera de cedro y en cloroformo, para su inclusión en parafina. De estos bloques de tejido cerebral incluido en parafina se obtuvieron por medio de un microtomo (MICROTOM Mod. HM 325), series de cortes coronales de 10 μ m de espesor, del hipocampo dorsal localizados entre -2.52mm y -4.56mm a partir de bregma, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas de Paxinos, (Paxinos y Watson, 2009). Uno de cada 5 cortes coronales fueron teñidos con violeta de Cresílo al 0,5%, pH 3.9 (Luna, 1960; González-Burgos y col., 1992). Se contó el número de neuronas piramidales remanentes (neuronas con morfología normal, integridad de la membrana y nucléolo claramente visible) en 4 cortes de ambos hemisferios cerebrales, de cada animal en los diferentes grupos experimentales, en una extensión lineal de 250 μ m del estrato piramidal del segmento CA1, del cuerno de Ammon del hipocampo, mediante microscopio óptico (Leica Mod. DM 1000) con un aumento de 400x y un sistema computarizado de análisis de imágenes histológicas (Leica Microsystems Mod. LAS06886).

7.4. Análisis estadístico

Se evaluaron los siguientes parámetros de eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial: latencia de escape (seg), distancia recorrida (cm) para localizar la plataforma, velocidad de nado (cm/seg), tiempo de recorrido en el cuadrante objetivo (seg) y en los otros tres cuadrantes; y número de cruces por el sitio donde se encontraba la plataforma. Las comparaciones intragrupalas de los valores de latencia de escape (mediana) entre el día 1 y los 6 días subsecuentes de prueba, se realizaron mediante análisis de varianza no paramétrica, ANOVA de Friedman y la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon, *post hoc*; las comparaciones intergrupales de las latencias de escape durante los 7 días de prueba, fueron realizadas mediante ANOVA de Kruskal-Wallis y prueba U de Mann-Whitney, *post hoc*; la longitud de las trayectorias y la velocidad de nado durante el período de 7 días de prueba así como el número de cruces y el tiempo de recorrido en el cuadrante donde debería estar la plataforma (día 8) fue comparado entre los diferentes grupos mediante ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni, *post hoc*; para las comparaciones intragrupalas de los valores de la longitud de las trayectorias y la velocidad de nado durante el período de 7 días de prueba, así como el número de cruces y el tiempo de recorrido en el cuadrante donde debería estar la plataforma y en los otros tres cuadrantes (día 8) se empleó ANOVA y prueba de Bonferroni, *post hoc* (Downie y Heath, 1983; Siegel, 1956).

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

8. RESULTADOS

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

8.1.1. Aprendizaje espacial. Latencia de escape

Los valores (mediana y rango) de las latencias de escape de los diferentes grupos experimentales obtenidos cada día, durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris se muestran en la Figura 1, donde se indican la mediana, los cuartiles alrededor de la mediana (barra) y el rango absoluto (línea de dispersión). Puede observarse la reducción significativa de los valores de latencia de escape en comparación con los valores obtenidos en el 1er día de prueba (comparación intragrupal), en varios días a partir del día 2 (día 2 $p=0.032$, día 5 $p=0.012$, día 6 $p=0.005$, día 7 $p=0.007$) en el grupo Sham, y a partir del día 3 (día 3 $p=0.043$, día 4 $p=0.018$, día 5 $p=0.012$, día 6 $p=0.046$, día 7 $p=0.018$) en el grupo HCC+Raloxifeno. En cambio, los valores de latencia de escape fueron significativamente menores solamente los días 2 y 6 (día 2 $p=0.043$, día 6 $p=0.028$), en comparación con el primer día de prueba, en el grupo HCC+Veh.

En la comparación intergrupala, los valores de latencia de escape fueron significativamente mayores los días de prueba 5 y 6 (día 5 $p=0.015$, día 6 $p=0.005$) en el grupo HCC+Veh en comparación con el grupo Sham, sin diferencias significativas de los valores de latencia de escape entre los grupos HCC+Veh y HCC+Raloxifeno, durante los 7 días de prueba. Las latencias de escape en el grupo HCC+Raloxifeno fueron significativamente mayores los días 1, 2 y 6 de prueba (día 1 $p=0.026$, día 2 $p=0.017$, día 6 $p=0.04$), en comparación con los valores de latencia de escape en el grupo Sham.

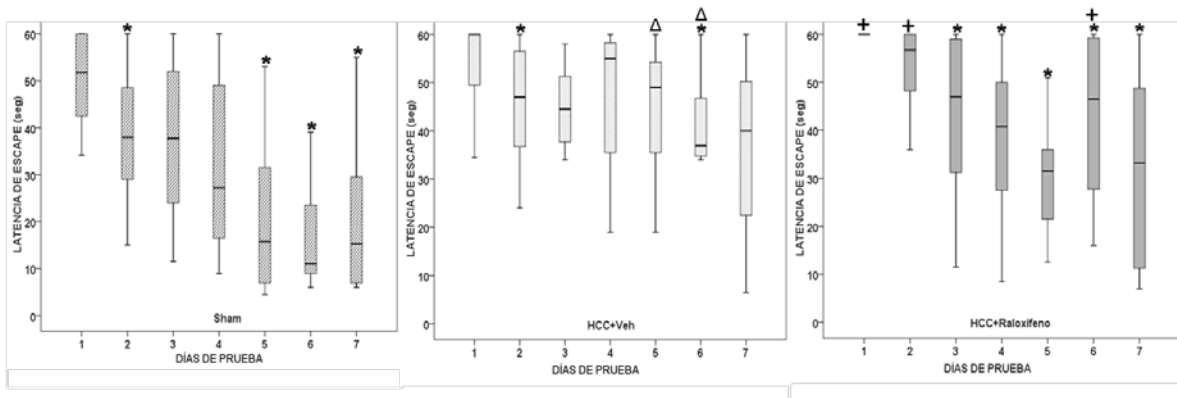


Figura 1. Latencias de escape (mediana y rango) de los grupos Sham, HCC+Veh y HCC+Raloxifeno, durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris. Puede observarse la reducción significativa de la latencia de escape a partir del segundo o tercer día de prueba en cada uno de los diferentes grupos experimentales, (* $p < 0.05$, día 1 vs. días subsecuentes,); así como las diferencias intergrupales del grupo HCC+Veh con respecto al grupo Sham ($\Delta p < 0.05$) los días 5 y 6; y entre el grupo HCC+Raloxifeno y el Sham (* $p < 0.05$) los días 1, 2 y 6 de prueba.

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

Los valores de la distancia de nado (cm) que recorrieron los animales de los diferentes grupos experimentales para llegar a la plataforma sumergida mostraron una tendencia a disminuir progresivamente en comparación con el 1er día de prueba (Tabla 1). En el grupo Sham hubo diferencias significativas a partir del 6º día de prueba (día 6 $p = 0.006$, día 7 $p = 0.015$), y a partir del 2º día en el grupo HCC+Raloxifeno (día 2 $p = 0.016$, día 3 $p = 0.009$, día 4 $p = 0.002$, día 5 $p = 0.000$, día 6 $p = 0.007$, día 7 $p = 0.001$). En cambio en el grupo HCC+Veh no se observaron diferencias significativas durante los 7 días de prueba.

En cuanto a las diferencias de las distancias de nado entre grupos se observó que este parámetro fue significativamente mayor en el grupo HCC+Raloxifeno en comparación con el grupo Sham los días 1º y 6º de prueba (día 1 $p = 0.012$, día 6

p=0.008). Los valores de la distancia de nado del grupo HCC+Veh no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo Sham ni HCC+Raloxifeno.

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

	Sham	HCC+Veh	HCC+Raloxifeno
DÍA 1	1073 \pm 88	1195 \pm 113	1469 \pm 88 ^Δ
DÍA 2	825 \pm 120	786 \pm 82	916 \pm 120*
DÍA 3	687 \pm 129	872 \pm 150	873 \pm 129*
DÍA 4	674 \pm 153	760 \pm 62	686 \pm 152*
DÍA 5	432 \pm 129	668 \pm 94	517 \pm 129*
DÍA 6	312 \pm 104*	624 \pm 78	752 \pm 104* ^Δ
DÍA 7	479 \pm 128*	670 \pm 116	537 \pm 128*

*p<0.05 día 1 vs. días subsecuentes; ^Δp<0.05 vs Sham.

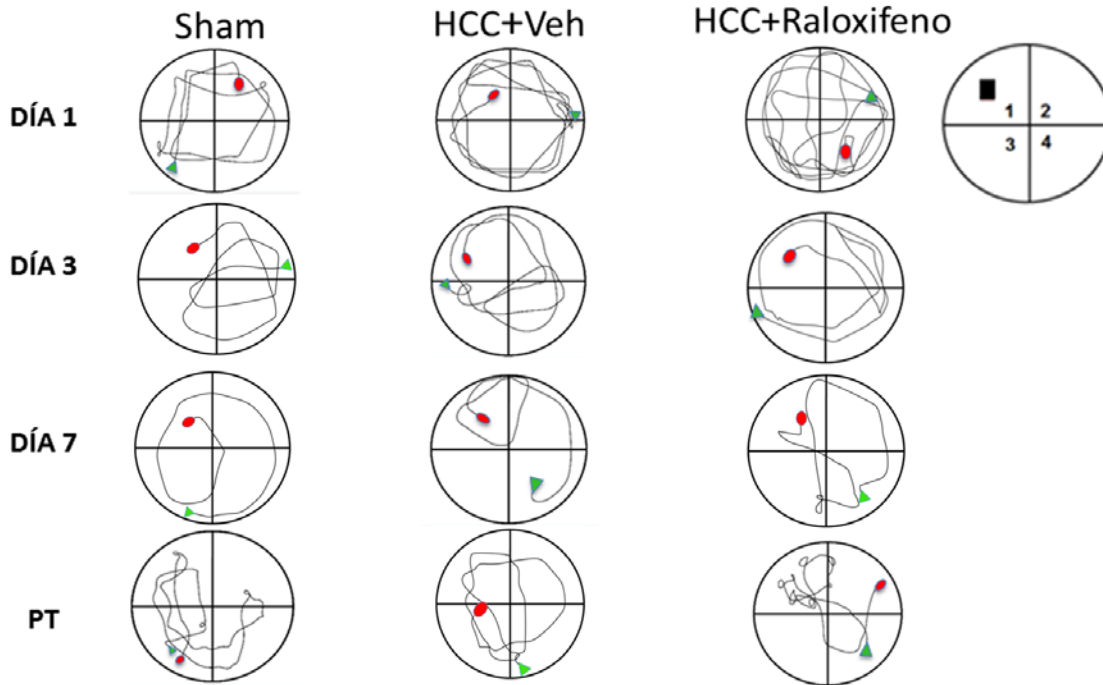


Figura 2. Trayectorias de nado representativas de un animal de cada uno de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris en los días de prueba 1, 3 y 7; así como durante la prueba de transferencia el día 8. La trayectoria de nado circular cerca de la pared de la tina (tigmotaxis) se observa en el grupo HCC+Veh el primer día; posteriormente las trayectorias se orientan hacia el sitio de ubicación de la plataforma sumergida en todos los grupos. Los triángulos verdes indican el sitio de inicio de la trayectoria, los óvalos rojos indican el sitio de terminación de la trayectoria. La figura en el ángulo superior derecho indica la división en cuadrantes del laberinto acuático de Morris así como el sitio donde se ubicó la plataforma (cuadrante 1).

La figura 2 ilustra trayectorias representativas de los grupos Sham, HCC+Veh y HCC+Raloxifeno, los días 1, 3 y 7 de prueba y en la prueba de transferencia el día 8. Se destaca el cambio de la trayectoria de nado, circular y cercano a la pared de la tina (tigmotaxis), observado el primer día de prueba, hacia rutas más cortas y mejor orientadas hacia el sitio de la plataforma en los días sucesivos en todos los grupos experimentales.

8.1.3. Aprendizaje espacial. Velocidad de nado

La Tabla 2 muestra los valores de la velocidad de nado (cm/s), en los diferentes grupos experimentales, durante los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris. La velocidad de nado fue significativamente menor en los días 6 y 7 en el grupo Sham, así como en los días 2 a 7 en el grupo HCC+Raloxifeno, en comparación con el día 1 de prueba; sin diferencias entre los 7 días de prueba en el grupo HCC+Veh.

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

	Sham	HCC+Veh	HCC+Raloxifeno
DÍA 1	10.73 \pm 0.88	11.95 \pm 1.13	14.69 \pm 0.66 ^Δ
DÍA 2	8.25 \pm 1.19	7.85 \pm 0.82	9.15 \pm 1.34*
DÍA 3	6.87 \pm 1.29	8.72 \pm 1.50	8.72 \pm 1.01*
DÍA 4	6.74 \pm 1.52	7.60 \pm 0.62	6.86 \pm 0.93*
DÍA 5	4.32 \pm 1.28	6.69 \pm 0.94	5.17 \pm 0.49*
DÍA 6	3.20 \pm 1.03*	6.23 \pm 0.78	7.51 \pm 0.89 ^Δ
DÍA 7	4.79 \pm 1.27*	6.69 \pm 1.16	5.36 \pm 1.07*

*p \leq 0.05 día 1 vs. días subsecuentes; ^Δp \leq 0.05 vs Sham.

8.1.4. Memoria espacial

En la prueba de transferencia efectuada al día 8, se observó un recorrido de búsqueda de la plataforma por los cuadrantes del laberinto acuático de Morris distinto en los animales de experimentación de cada grupo (Figura 2). Este recorrido fue predominante en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma (cuadrante 1) en los grupos Sham y HCC+Raloxifeno, con mayor certeza en la estrategia de búsqueda y un menor recorrido por los otros cuadrantes; a diferencia del recorrido del grupo HCC+Veh, predominantemente por el cuadrante 3.

8.1.5. Tiempo de recorrido por los diferentes cuadrantes

En la figura 3 se muestran los valores del tiempo de recorrido (seg) por los cuadrantes del laberinto acuático de Morris en los diferentes grupos y condiciones experimentales. El tiempo de recorrido en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma (cuadrante 1) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con los tiempos de recorrido en los cuadrantes 2 y 4, en el grupo Sham y en los cuadrantes 2, 3 y 4 en el grupo HCC+Raloxifeno; a diferencia de lo observado en el grupo HCC+Veh, en el que el tiempo de recorrido por el cuadrante 1, donde se encontraba originalmente la plataforma fue menor.

Por otra parte, los resultados de un análisis intergrupar mostraron que no existen diferencias significativas en el tiempo de recorrido en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma entre los grupos Sham y HCC+Raloxifeno, pero sí una reducción significativa ($p < 0.05$) del tiempo de dicho tiempo de recorrido en el grupo HCC+Veh, en comparación con el grupo Sham y el grupo HCC+Raloxifeno.

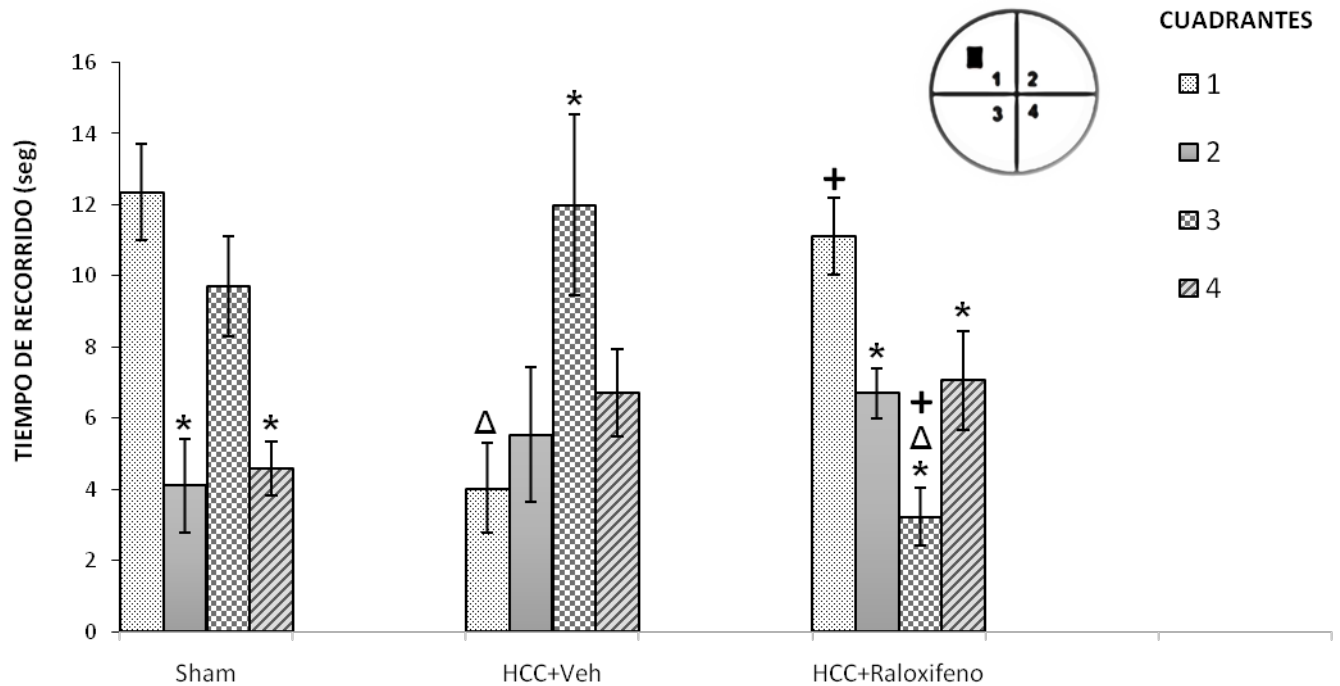


Figura 3. Tiempo (seg) de recorrido (media \pm EE) en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia (30 seg de prueba), en los diferentes grupos experimentales. Puede observarse el tiempo de permanencia significativamente mayor en el cuadrante 1 (donde originalmente se encontraba la plataforma) en los grupos Sham y HCC+Raloxifeno, pero no en el grupo HCC+Veh, en comparación con el tiempo de recorrido en los otros cuadrantes. * $p < 0.05$, otros cuadrantes vs. cuadrante 1, $\Delta p < 0.05$ vs. Sham, $\dagger p < 0.05$ vs. HCC+Veh.

8.1.6. Número de cruces por el sitio de la plataforma

La figura 4 ilustra el desempeño de los diferentes grupos experimentales durante la prueba de transferencia, en cuanto al número de cruces por el sitio donde debería estar la plataforma; el cual es significativamente menor en el grupo HCC+Veh, en comparación con el grupo Sham ($p = 0.044$); el grupo HCC+Raloxifeno no es diferente del grupo Sham ($p = 0.999$), sin embargo el número de cruces es significativamente mayor en comparación con el grupo HCC+Veh ($p = 0.052$).

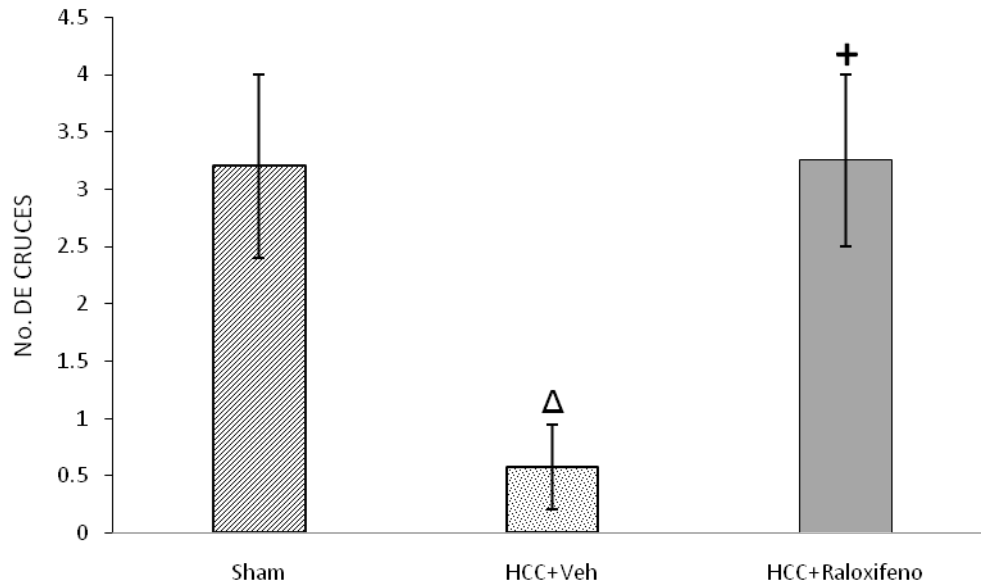


Figura 4. Número de cruces (media \pm EE) por el sitio donde se encontraba la plataforma. $\Delta p < 0.05$ vs. Sham, $+p < 0.05$ vs. HCC+Veh.

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

En la figura 5 se muestran fotomicrografías que ilustran el aspecto general de las estructuras del hipocampo visibles mediante la tinción de violeta de cresilo y a mayor aumento imágenes del estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, donde se observa la preservación de dicha población neuronal con características histológicas semejantes a las del grupo Sham en el grupo HCC+Raloxifeno y la reducción de la población de neuronas piramidales en el grupo HCC+Veh.

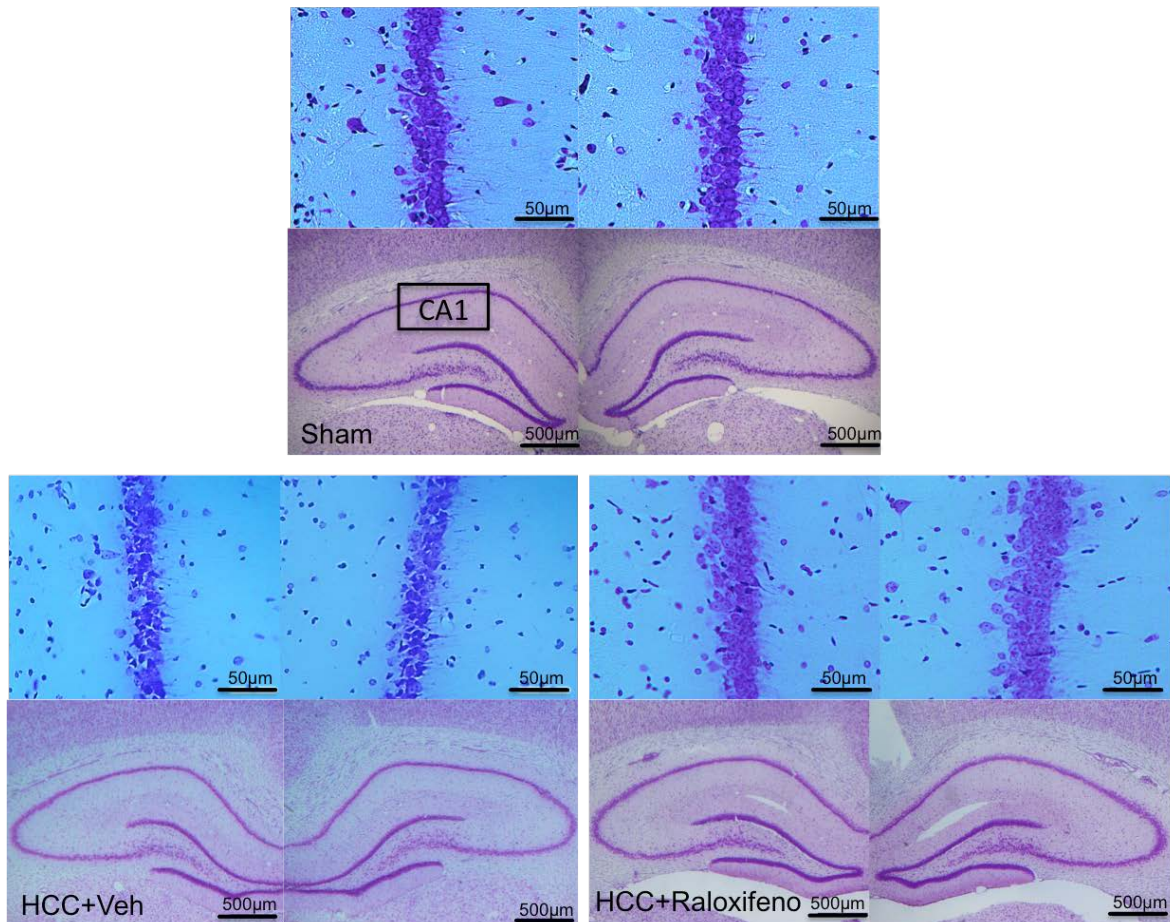


Figura 5. Fotomicrografías de cortes histológicos representativos, que ilustran a dos diferentes aumentos (40x, 400x) la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales, en los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo. Puede observarse una reducción parcial del número de neuronas por efecto de la HCC en la imagen correspondiente al grupo HCC+Veh, y su preservación en el grupo HCC+Raloxifeno, comparados con el grupo Sham. Barra de calibración: 40x: 500µm, 400x: 50µm.

La HCC provocó una reducción significativa ($p=0.047$), de un 25%, en la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en el grupo HCC+Veh, con un 75% de neuronas remanentes en comparación con el grupo Sham (100%) en una extensión lineal de 250 µm en el estrato piramidal.

En el grupo HCC+Raloxifeno la población neuronal fue significativamente mayor ($p=0.002$) a la del grupo HCC+Veh y correspondió al 115% en comparación con la población neuronal del grupo Sham, sin diferencia significativa (Figura 6).

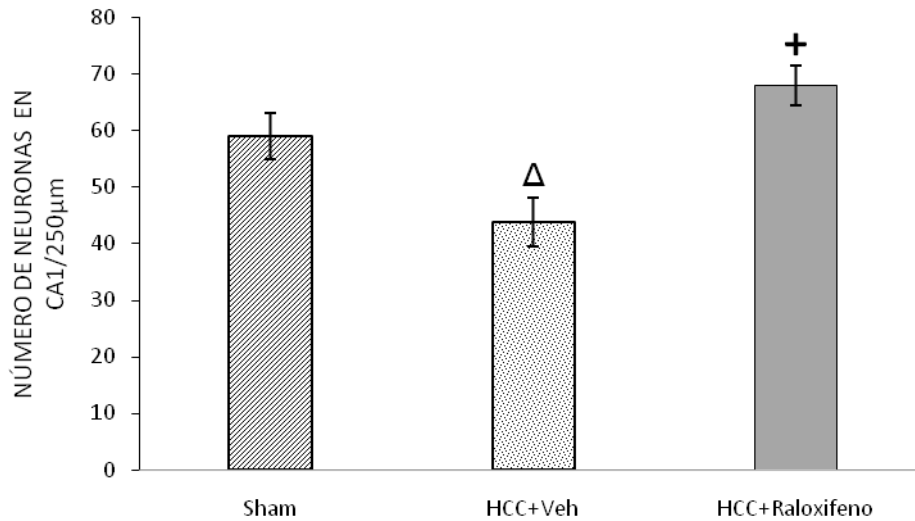


Figura 6. Número de neuronas piramidales remanentes (Media \pm EE) en una extensión lineal de 250 μ m en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo de los animales de los grupos Sham, HCC+Veh y HCC+Raloxifeno. $\Delta p < 0.05$ vs. Sham, $+ p < 0.05$ vs. HCC+Veh.

9. DISCUSIÓN

En diversos estudios se han descrito las consecuencias de la hipoperfusión cerebral crónica en ratas macho; en las que la ligadura y/o la sección bilateral de las arterias carótidas comunes da lugar a una reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral, particularmente acentuada, en el hipocampo y la corteza prefrontal, dos estructuras directamente involucradas en las funciones cognoscitivas (Otori y col. 2003; Ulrich y col., 1998; Pappas y col., 1996; Ohta y col., 1997; Cechetti y col., 2012; Farkas y col., 2007).

Las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral provocadas por la hipoperfusión cerebral crónica pueden inducir mecanismos fisiopatológicos de daño neuronal (Du y col. 2017) tales como: estrés oxidativo (He y col., 2009; Choi y col., 2014), inflamación (Farkas y col., 2007), disfunción de sistemas de neurotransmisores tales como el colinérgico y GABAérgico (Xi y col., 2014; Li y col., 2014), disfunción mitocondrial y procesos pro-apotóticos (Du y col., 2013), lipoperoxidación (Wang y col., 2014) y alteración de la secreción de factores tróficos (Schmidt y col., 2001), en estructuras cerebrales especialmente vulnerables tales como el hipocampo y la corteza prefrontal.

De hecho, cuando la interrupción del flujo sanguíneo en las arterias carótidas comunes se realiza de manera secuencial con un intervalo de siete días, la hipoperfusión cerebral crónica resultante da lugar a la pérdida de la capacidad de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, tres meses y seis meses después de la oclusión de las carótidas; así como un deterioro de la memoria espacial, expresado por reducción significativa del número de cruces y del tiempo de recorrido en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma, durante la prueba de transferencia (Cechetti y col. 2012).

La integridad morfológica y funcional del circuito hipocampal es esencial para el establecimiento y la recuperación de la memoria declarativa de tipo episódica en humanos y de la memoria espacial en roedores (Squire, 1992). Asimismo, la corteza prefrontal es determinante para la orientación de acciones aprendidas

dirigidas a objetivos (Hasselmo, 2005). De esta manera, la relación y funcionamiento coordinados entre el hipocampo y la corteza prefrontal son fundamentales para el aprendizaje y la memoria espacial (Lee y Kesner, 2003; Gordon, 2011).

En este sentido, la corteza prefrontal medial recibe proyecciones directamente desde la zona intermedia de la región CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo y este enlace puede ser crítico para la navegación espacial (López-Vázquez y col., 2012). Estudios en modelos animales de desconexión, sugieren que el hipocampo interactúa con la corteza prefrontal medial para la codificación espacial y la recuperación en la memoria de trabajo espacial (Churchwell y col. 2010, Churchwell y Kesner 2011).

Así, el modelo clásico en la consolidación y la recuperación de la memoria espacial propone que los recuerdos dependen inicialmente del hipocampo y que regiones neocorticales están implicadas en la recuperación de memorias remotas, proceso que requiere de la plasticidad sináptica. Se ha investigado la activación de una vía requerida para la potenciación de larga duración, la de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), en la adquisición de la memoria, la consolidación y su reciente recuperación en la tarea del laberinto acuático de Morris, tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal, y los hallazgos indican que la información adquirida se consolida en la corteza prefrontal medial y que esta región del cerebro es necesaria para la recuperación de recuerdos espaciales recientes (Leon y col. 2010). Así mismo, se observó síntesis de proteínas de novo implicadas en la consolidación de la memoria a largo plazo, en la corteza prefrontal medial, durante las estrategias de aprendizaje a largo plazo utilizadas en la memoria de trabajo (Touzani y col. 2007). Otros resultados sugieren fuertemente que la corteza prefrontal medial participa en la recuperación de la información espacial mantenida en el hipocampo para una navegación eficiente (Jo y col. 2007).

En el presente estudio se confirmaron parcialmente las alteraciones de las funciones cognoscitivas inducidas por la hipoperfusión cerebral crónica provocada

por la interrupción permanente del flujo sanguíneo cerebral, de manera secuencial, en ambas arterias carótidas comunes. En efecto, la ejecución de los animales, en el laberinto acuático de Morris, dos meses después de haber sido inducida la hipoperfusión cerebral crónica (grupo HCC+Veh) no mostró diferencias estadísticamente significativas en la latencia de escape y la magnitud de las trayectorias de nado para localizar la plataforma, con respecto a la ejecución de los animales del grupo Sham durante los siete días de prueba; no obstante, bajo hipoperfusión cerebral crónica estos parámetros mostraron una clara tendencia a tener valores mayores que los observados en el grupo Sham. Sin embargo, los resultados en la prueba de transferencia coinciden con reportes previos (Cechetti y col. 2012), en el sentido de que el número de cruces y el tiempo de recorrido por el cuadrante donde se encontraba originalmente la plataforma fueron significativamente menores en los animales con hipoperfusión cerebral crónica, en comparación con el grupo Sham. Estos resultados sugieren que la hipoperfusión cerebral crónica provocó alteraciones en los mecanismos del aprendizaje y especialmente de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, posiblemente atribuibles al conjunto de mecanismos fisiopatológicos inducidos por la HCC y que pueden dar lugar a la lesión y/o alteración funcional de las estructuras cerebrales involucradas en el aprendizaje y memoria espacial, las cuales han sido descritas como especialmente vulnerables a la isquemia.

En comparación con este deterioro cognoscitivo de los animales bajo hipoperfusión cerebral crónica (grupo HCC+Veh), los cuales, durante la prueba de transferencia, no conservaron la capacidad de recordar el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma, los animales con hipoperfusión cerebral crónica tratados con Raloxifeno (grupo HCC+Raloxifeno), tuvieron un desempeño similar a los animales sin hipoperfusión cerebral crónica (Sham) en esta prueba, en la que el mayor número de cruces y tiempo de recorrido por el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma sustentan que la capacidad de integración neural del aprendizaje espacial y la memoria espacial está conservado en las ratas que recibieron tratamiento con Raloxifeno durante 60 días posteriores a la reducción crónica y permanente del flujo sanguíneo cerebral.

Por otra parte, se ha descrito que la hipoperfusión cerebral crónica provoca la reducción de la población neuronal de células piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, de tal manera que tres a seis meses después del inicio de la hipoperfusión cerebral crónica el número de neuronas piramidales de dicho segmento disminuye de manera significativa en una proporción de 25% a 30% en comparación con animales intactos, tanto si la población neuronal fue evaluada directamente contando el número de neuronas remanentes; como a través de la intensidad de la señal fluorescente de las neuronas inmunopositivas a NeuN, en relación con el grupo control (Ni y col. 1995; Pappas y col. 1996, Cechetti y col. 2012). Esta pérdida de neuronas piramidales en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo estuvo asociada a una mayor inmunoreacción a GFAP como indicador de activación glial, en comparación con ratas control. Dichas alteraciones celulares inducidas por la hipoperfusión cerebral crónica fueron relacionadas con el deterioro cognoscitivo (Cechetti y col. 2012), dada la relevancia del hipocampo en la integración neural del aprendizaje y la memoria espacial.

Los resultados del presente estudio coinciden con los datos reportados en los estudios referidos (Ni y col. 1995; Pappas y col. 1996, Cechetti y col. 2012), dado que la evaluación directa del número de neuronas piramidales en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo mostró una reducción del 25% de dicha población neuronal en comparación con el grupo Sham.

Por otro lado, uno de los aspectos más relevantes de los resultados del presente estudio fue que el tratamiento con Raloxifeno (grupo HCC+Raloxifeno) dio lugar a la completa preservación de las neuronas piramidales en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo y posiblemente favoreció el funcionamiento coordinado del hipocampo y estructuras corticales prefrontales, como lo indica el desempeño de los animales de este grupo en la prueba de memoria espacial (transferencia) en el laberinto acuático de Morris.

El Raloxifeno es un Modulador Selectivo del Receptor de Estrógeno (SERM) que a partir de su unión al receptor de estrógeno (ER) induce un cambio conformacional

único que puede resultar en un patrón distinto de reclutamiento de cofactores; esta interacción con proteínas coactivadoras o correpresoras resulta en su efecto agonista o antagonista dependiendo del tejido diana (Brzozowsky 1997; Smith y O'Malley, 2004).

Diversos estudios han evaluado la actividad neuroprotectora del Raloxifeno e indican que es capaz de disminuir el daño causado en diferentes formas de lesión neural en modelos de traumatismo craneo encefálico o enfermedad de Alzheimer en animales de experimentación (Kokiko y col., 2006; Du y col., 2004), así como en modelos de encefalitis autoinmune (Li y col., 2014) y en lesión del nervio ciático (McMurray y col., 2003). De igual manera, los efectos del Raloxifeno han sido estudiados en investigaciones clínicas de manejo del deterioro cognoscitivo y de trastornos afectivos, en individuos viejos tanto del sexo femenino como del sexo masculino (Yaffe y col., 2005; Jacobsen y col., 2009; Goekoop y col., 2005; Goekoop y col., 2006).

Otros hallazgos sugieren que el Raloxifeno mejora el rendimiento cognitivo relacionado con la actividad de la corteza prefrontal y provoca un aumento significativo en la densidad de las espinas dendríticas en las dendritas apicales de neuronas piramidales ubicadas en la capa III de la corteza prefrontal pre-límbica e infra-límbica, involucradas en los procesos cerebrales del aprendizaje y la memoria espacial (Velazquez-Zamora y col., 2012).

Las acciones del Raloxifeno que se han propuesto para explicar su efecto neuroprotector incluyen: efectos sobre la conectividad sináptica (O'Neill y col., 2004; Nilsen y col., 1998; Velazquez-Zamora y col., 2012; Khan y col., 2015); así como, la reducción del estrés oxidativo (Armagan y col., 2009; Konyalioglu y col., 2007), de la excitotoxicidad (Ciriza y col., 2004), de la apoptosis (Armagan y col., 2009; Du y col., 2004; Abdelhamid y col., 2011), y de la inflamación (Li y col., 2014; Suuronen y col., 2005; Tapia-Gonzalez y col., 2008; Ismailoglu y col., 2013; Cerciat y col., 2010; Simoncini y Genazzani, 2002), en estructuras cerebrales específicas. Es importante comentar que la dosis de Raloxifeno que fue utilizada en el presente estudio (3 mg/kg/día, sc) fue similar a la utilizada en otros estudios

de neuroprotección, de hecho esta dosis de Raloxifeno durante 3 semanas aceleró la regeneración nerviosa y la recuperación funcional del nervio ciático, luego de la lesión por aplastamiento en ratones hembra ovariectomizados (McMurray y col., 2003); asimismo, la dosis de 3 mg/kg, sc, de Raloxifeno a los 15 min, 24, 48 y 72 h redujo significativamente el deterioro cognoscitivo en la memoria de trabajo, así como facilitó la recuperación del déficit sensori-motor, luego de una lesión traumática bilateral de la corteza cerebral en ratas macho (Kokiko y col., 2006).

Cabe la posibilidad de que la relación de oposición entre los mecanismos descritos para los efectos del Raloxifeno y los mecanismos fisiopatológicos de daño inducidos por la hipoperfusión cerebral crónica, en lo que respecta a reducción del estrés oxidativo, de fenómenos pro-inflamatorios así como de la apoptosis, forme parte importante de la neuroprotección, evaluada mediante parámetros morfológicos y funcionales; atribuible a la administración del Raloxifeno en el presente estudio.

El hipocampo es un objetivo importante para las acciones estrogénicas (Moralí y Cervantes, 2014); se ha mostrado que el estradiol aumenta la densidad de las espinas en las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo a través de procesos que inducen nuevos filopodios y su posterior maduración para formar nuevas conexiones sinápticas funcionales en los circuitos neuronales del hipocampo, en los roedores (Waters y col., 2009; Yankova y col., 2001). Esta sinaptogénesis inducida por el estradiol en el segmento CA1 y su remodelación sináptica es un fenómeno transitorio relativamente rápido que se puede modificar a lo largo del ciclo estral de cinco días en ratas hembra, así mismo, el estradiol puede aumentar de forma transitoria el número de sinapsis que contienen receptores NMDA excitatorios (McEwen y col., 1995; Srivastava y Penzes, 2011). Además, el estradiol aumenta el número de espinas dendríticas en las dendritas apicales de neuronas piramidales ubicadas en la capa III de la corteza prefrontal en monos hembra viejos (Hao y col., 2006) y en ratas ovariectomizadas (Velázquez-Zamora y col., 2012). Dichos cambios en la citoarquitectura neuronal

han sido relacionados con la eficiencia en el desempeño cognitivo espacial (González-Burgos y col., 2005).

Estos efectos del estradiol o el Raloxifeno en las neuronas podrían estar mediados por sus interacciones con diferentes tipos de receptores estrogénicos (Liu y col., 2010); así, se ha sugerido que los receptores GPR30 estarían involucrados preferentemente en los efectos neuroprotectores del Raloxifeno, en tanto que los RE clásicos α y β estarían mediando los efectos neuroprotectores del estradiol (Abdelhamid y col., 2011), incluyendo el mantenimiento de la estructura y el funcionamiento mitocondrial en las neuronas (Chen y col, 2009).

10. CONCLUSIONES

Los resultados del tratamiento con Raloxifeno (grupo HCC+Raloxifeno) durante sesenta días en animales hembra con hipoperfusión cerebral crónica sustentan el efecto neuroprotector que se ha descrito de este compuesto en contra del daño cerebral inducido por hipoperfusión cerebral crónica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhamid R, Luo J, VandeVrede L, Kundu I, Michalsen B, Litosh VA, Schiefr IT, Gherezghiher T, Yao P, Qin Z, Thatcher GRJ. Benzothiophene Selective Estrogen Receptor Modulators Provide Neuroprotection by a Novel GPR30-Dependent Mechanism. *ACS Chem Neurosci* 2011; 2: 256–268.
- Arévalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Actions of estrogens on glial cells: implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1800: 1106-12.
- Arevalo MA, Santos-Galindo M, Lagunas N, Azcoitia I, 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 MA, Garcia-Segura LM. Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Eur J Neurosci* 2010; 32: 1995–2002.
- Azzubaidi MS, Saxena AK, Talib NA, Ahmed QU, Dogarai BB. Protective effect of treatment with black cumin oil on spatial cognitive functions of rats that suffered global cerebrovascular hypoperfusion. *Acta Neurobiol Exp* 2012; 72: 154–165.
- Barone FC, Feurestein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 819–834.
- Barreto G, Santos-Galindo M, Díaz-Chaves Y, Pernia O, Carrero P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 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: 1586–1595.
- Brust JCM. Appendix C / Circulation of the Brain. Disponible en: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (editors). *Principles of Neural Science*, 5th Edition. McGraw Hill, 2013. ISBN: 978-0-07-139011-8, pp 1550–1564.

- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997; 389: 753–8.
- Carswell HV, Macrae IM, Gallagher L, Harrop E, Horsburgh KJ. Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: 1501–1504.
- Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, Elsner VR, Ben J, Siveira da Costa M, Mestriner R, Weis SD, Netto CA. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull* 2012; 87: 109–116.
- Cechetti FR, 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.
- Cerciat M, Unkila M, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-g-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia* 2010; 58: 93–102.
- Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 2–14.
- Chen J-Q, Cammarata PR, Baines CP, Yaguer JD. Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Biogenesis by Estrogens/Estrogen Receptors and Physiological, Pathological and Pharmacological Implications. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(10): 1540–1570.
- Chen JQ, Cammarata PR, Baines CP, Yaguer JD. Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Biogenesis by Estrogens/Estrogen Receptors and Physiological, Pathological and Pharmacological Implications. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 1540–1570.
- Chinopoulos C, Adam V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J* 2006; 273: 433–450.
- Choi DH, Lee KH, Kim JH, et al. NADPH oxidase 1, a novel molecular source of ROS in hippocampal neuronal death in vascular dementia. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 533–550.
- Churchwell JC, Kesner RP. Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: Interactions and independent parallel processing. *Behav Brain Res*. 2011; 225(2): 389–395.

- Churchwell JC, Morris AM, Musso ND, Kesner RP. Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 2010; 93: 415–421.
- Ciriza I, Carrero P, Azcoitia I, Lundeen SG, Garcia-Segura LM. Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *Journal of Neurobiology* 2004; 61: 209–221.
- 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: 401–407.
- Dai X, Chen L, Sokabe M. Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacology* 2007; 52: 1124–1138.
- Dhandapani KM, Brann DW. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol* 2007; 42: 70–75.
- Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, Brann DW. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology* 2005; 146: 2749–2759.
- DonCarlos L, Azcoitia I, Garcia-Segura L. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psyneuen* 2009; 34: 113-122.
- Dowers TS, Qin ZH, Thatcher GR, Bolton JL. Bioactivation of selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 1125–1137.
- Downie MM, Heath RW. *Basic statistical methods*. Harper & Row. New York 1983.
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 649–671.
- Du B, Ohmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohshima C, Igarashi H, Mori-Abe A, Saitoh M, Ohta T, Ohishi A, et al. Both estrogen and raloxifene protect against b-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor α -transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade. *Journal of Endocrinology* 2004; 183: 605–615.
- Du J, Ma M, Zhao Q, et al. Mitochondrial bioenergetics deficits in the hippocampi of rats with chronic ischemia-induced vascular dementia. *Neuroscience* 2013; 231: 345–352.

- Du SQ, Wang XR, Xiao LY, Tu JF, Zhu W, He T, Liu CZ. Molecular Mechanisms of Vascular Dementia: What Can Be Learned from Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion?. *Molecul Neurobiol* 2017; 54: 3670–3682.
- Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1952–1957.
- Elzer JG, Muhammad S, Wintermantel TM, Regnier-Vigouroux A, Ludwig J, Schutz G, Schwaninger M. Neuronal estrogen receptor-alpha mediates neuroprotection by 17beta-estradiol. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 935–942.
- ENASEM, Estudio Nacional de Salud y Envejecimiento en México: ENASEM Descripción de los Archivos de Datos, Version 1, Septiembre 2013 Disponible en: www.ENASEM.org el 28/10/2016.
- Farkas E, Luiten PGM, Baric F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res* 2007; 54:162–180.
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH. Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke* (2009; 40: 2244–2250.
- Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 904–10.
- Garcia-Segura LM, Arévalo MA, Azcoitia I. Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signalling in the nervous system: new advances. *Prog Brain Res* 2010; 181: 251–272.
- Gibbs RB, Gabor R, Cox T, Johnson DA. Effects of raloxifene and estradiol on hippocampal acetylcholine release and spatial learning in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29(6): 741-748.
- Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20: 1627–1642.
- Goekoop R, Barkhof F, Duschek EJ, Netelenbos C, Knol DL, Scheltens P, Rombouts SA. Raloxifene treatment enhances brain activation during recognition of familiar items: a pharmacological fMRI study in healthy elderly males. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 1508–1518.

- Goekoop R, Duschek E J, Knol DL, Barkhof F, Netelenbos C, Scheltens P, and Rombouts SA. Raloxifene exposure enhances brain activation during memory performance in healthy elderly males; its possible relevance to behavior. *Neuroimage* 2005; 25: 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.
- Gonzalez-Burgos I, Alejandre-Gómez M, Cervantes M. Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci Lett* 2005; 379: 52-54.
- Gordon JA. Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. *Current Opinion in Neurobiology* 2011; 21(3): 486-91.
- 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, Selkoe 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, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 1990; 10: 1286–1291.
- Guía Para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Instituto de Recursos Animales de Laboratorio. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Academia Nacional de Medicina México 2002; pp 148.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8th Edition. Washington, DC: The National Academies Press. National Research Council 2011. doi:<https://doi.org/10.17226/12910>.
- Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 2007; 28: 726–741.
- Hao J, Rapp PR, Leffler AE, Leffler SR, Janssen WG, Lou W, McKay H, Roberts JA, Wearne SL, Hof PR, Morrison JH. Estrogen alters spine number and morphology in prefrontal cortex of aged female rhesus monkeys. *J Neurosci* 2006; 26: 2571–2578.
- Hasselmo ME. A model of prefrontal cortical mechanisms for goal-directed behavior. *Journal of Cognitive Neuroscience* 2005; 17(7): 1115–1129.

- He XL, Wang YH, Gao M, et al. Baicalein protects rat brain mitochondria against chronic cerebral hypoperfusion-induced oxidative damage. *Brain Res* 2009; 1249: 212–221.
- Hossmann KA. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 2008; 55: 257-270.
- Hurd MD, Martorell P, Delavande A, Mullen KJ, Langa KM. Monetary costs of dementia in the United States. *N Engl J Med* 2013; 368: 1326–1334.
- Hurtado O, Pradillo JM, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc Di* 2006; 21:54–63.
- Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 89–94.
- Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol* 2010; 120: 287–296.
- Ikeda T, Matsuki N, Yamada MK. Estrogen produced in cultured hippocampal neurons is a functional regulator of a GABAergic machinery. *J Neurosci Res* 2006; 84: 1771–1777.
- Ismailoglu O, Oral B, Sutcu 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 DE, Samson MM, Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJ. Raloxifene improves verbal memory in late postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Menopause* 2009; 17: 309-14.
- Jelks KB, Wylie R, Floyd CL, McAllister AK, Wise P. Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-alpha. *J Neurosci* 2007; 27: 6903–6913.
- Jo YS, Park EH, Kim IH, Park SK, Kim H, Kim HT, et al. The medial prefrontal cortex is involved in spatial memory retrieval under partial-cue conditions. *J Neurosci* 2007; 27(49): 13567-13578.
- Jourdain P, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci*. 2002; 22(8): 3108-16.

- Kalita K, Szymczak S, Kaczmarek L. Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus* 2005; 15: 404–412.
- Khan MM, Wakade C, de Sevilla L, Brann DW. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) enhance neurogenesis and spine density following focal cerebral ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 146: 38–47.
- Kokiko ON, Murashov AK, Hoane MR. Administration of raloxifene reduces sensorimotor and working memory deficits following traumatic brain injury. *Behav Brain Res* 2006; 170: 233–240.
- 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 Biochemistry and Function* 2007; 25: 259–266.
- Lebesgue D, Chevalere V, Zukin RS, Etgen AM. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 2009; 74: 555–561.
- Lebesgue D, Traub M, de Butte-Smith M, Chen C, Zukin RS, Kelly MJ, Etgen AM. Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PLoS One* 2010; 5(1): e8642.
- Lee I, Kesner RP. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23: 1517-1523.
- Leon WC, Bruno MA, Allard S, Nader K, Cuello AC. Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learning & Memory* 2010; 17: 297-305.
- Levine DA, Langa KM. Vascular cognitive impairment: disease mechanisms and therapeutic implications. *Neurother* 2011; 8: 361–373.
- Levin ER. Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *MolEndocrinol* 2005; 19: 1951–1959.
- Li CJ, Lu Y, Zhou M, et al. Activation of GABAB receptors ameliorates cognitive impairment via restoring the balance of HCN1/HCN2 surface expression in the hippocampal CA1 area in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Mol Neurobiol* 2014; 50: 704–720.

- 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: 1431–1568.
- Liu M, Kelley MH, Herson PS, Hurn PD. Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinology* 2010; 35: 127–143.
- Llibre JJ, Ferri CP, Acosta D, Guerra M, Huang Y, Jacob KS, Krishnamoorthy ES, Salas A, Sosa AL, Acosta I, Dewey ME, Gaona C, Jotheeswaran AT, Li S, Rodríguez D, Rodríguez G, Kumar PS, Valhuerdi A, Prince M. Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: A population-based cross-sectional survey. *Lancet* 2008; 372: 464-474.
- López-Vázquez MA, Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Pérez JJ, Olvera-Cortés ME. La comunicación entre el hipocampo y la corteza prefrontal en la expresión de procesos cognitivos. Disponible en: Hernández-González M, Guevara-Pérez MA, Amezcua-Gutiérrez CC, Sanz Martín A (editores). *Aproximaciones al estudio del procesamiento sensorial, emocional y cognoscitivo*. Universidad Veracruzana, 2012, pp 199–241.
- Luna G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd ed. McGraw-Hill. New York 1960.
- Marin R, Díaz M, Alonso R, Sanz A, Arévalo MA, Garcia-Segura LM. Role of estrogen receptor alpha in membrane-initiated signaling in neural cells: interaction with IGF-1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 114: 2–7.
- Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, Hosokawa K, Kawamura A, Itose M, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neurosci Lett* 2008; 441: 94–99.
- McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *BehavNeurosci* 2012; 126: 4–16.
- McEwen BS, Gould E, Orchinik M, Weiland NG, Woolley CS. Oestrogens and the structural and functional plasticity of neurons: implications for memory, ageing and neurodegenerative processes. In: Goode J (editor). *Ciba Foundation Symposium. The Non-reproductive Actions of Sex Steroids*. CIBA Foundation. London 1995; 191:52–73.

- McMurray R, Islamov R, Murashov AK. Raloxifene analog LY117018 enhances the regeneration of sciatic nerve in ovariectomized female mice. *Brain Res* 2003; 980: 140–5.
- Mehta SH, Dhandapani KM, de Sevilla LM, Webb RC, Mahesh VB, Brann DW. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, reduces ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the ovariectomized female rat. *Neuroendocrinology* 2003; 77: 44–50.
- Mejia-Arango S, Gutierrez-Robledo LM. Prevalence and incidence rates of dementia and cognitive impairment no dementia in the Mexican population: data from the Mexican Health and Aging Study. *J Aging Health* 2011; 23(7): 1050-74.
- Miller NR, Jover T, Cohen HW, Zukin RS, Etgen AM. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology* 2005; 146: 3070–3079.
- Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 2005; 491: 81–95.
- Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP, Alves SE. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol* 2001; 429: 355–371.
- Moralí G, Cervantes M. Neuroprotective effects of estrogens against cerebral ischemia. In: Gonzalez-Burgos I (editor). *Estrogens and Cognition. Psychobiological and Clinical Aspects* 2014. ISBN 978-81-308-0550-4. pp 153-186.
- Morris RGM. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Met* 1984; 11: 47-60.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 2007; 100: 950–967.
- Ni JW, Matsumoto K, Li HB, Murakami Y, Watanabe H. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat. *Brain Res* 1995; 673: 290–296.

- 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 J, Mor G, Naftolin F. Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause* 1998; 5: 211–216.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- O'Neill K, 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.
- Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, Anayama H, Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience* 1997; 4: 1039–1050.
- Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurements of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 266-272.
- Paige LA, Christensen DJ, Grøn H, Norris JD, Gottlin EB, Padilla KM, Chang CY, Ballas LM, Hamilton PT, McDonnell DP. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER α and ER β . *PNAS* 1999; 96: 3999–4004.
- Pappas BA, de la Torre JC, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res* 1996; 708: 50-58.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 6th edition. Elsevier, 2009.
- Perez SE, Chen EY, Mufson EJ. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; 145: 117–139.
- Prince M, Acosta D, Ferri CP, et al. Dementia incidence and mortality in middle-income countries, and associations with indicators of cognitive reserve: a 10/66 Dementia Research Group population-based cohort study. *Lancet* 2012; 380: 50-8.

- Pulsinelli WA, Jacewicz M, Levy DE, Petito CK, Plum F. Ischemic brain injury and the therapeutic window. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 835:187–192.
- Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. In: Kogure K, Hossmann KA, Siesjo, Welsh FA, editors. *Molecular mechanisms of ischemic brain damage. Progress in Brain Research* 1985; 63: 29-37
- Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals* 2008; 16: 140–153.
- Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators—mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003; 348: 618–629.
- Roepke TA, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Physiological consequences of membrane-initiated estrogen signaling in the brain. *Front Biosci* 2011; 16: 1560–1573.
- 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: 191–201.
- Schmidt-Kastner R, Truettner J, Lin B, et al. Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 92: 157–166.
- Siegel S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw Hill. New York 1956.
- Simoncini T, Genazzani A R, Liao JK. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation* 2002; 105: 1368–1373.
- 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.
- Simpkins JW, Yang SH, Liu R, Perez E, Cai ZY, Covey DF, Green PS. Estrogen-like compounds for ischemic neuroprotection. *Stroke* 2004; 35: 2648–2651.
- Smith CC, McMahon LL. Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci* 2006; 26: 8517–8522.

- Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 2004; 25: 45–71.
- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Reviews* 1992; 99: 195-231.
- Srivastava DP, Penzes P. Rapid estradiol modulation of neuronal connectivity and its implications for disease. *Front Endocrinol* 2011; 2(77): 9.
- Suuronen T, Nuutinen T, Huuskonen J, Ojala J, Thornell A, Salminen A. Anti-inflammatory effect of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in microglial cells. *Inflamm Res* 2005; 54: 194–203.
- Tapia-Gonzalez S, Carrero P, Pernia O, García-Segura LM, Díaz-Chavez Y. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *Journal of Endocrinology* 2008; 198: 219–230.
- Terán J, Teppa A. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs): bioquímica, farmacología y aplicación clínica en ginecología. *Ginecol Obstet* 2005; 73: 424-435.
- Toledo JB, Arnold SE, Raible K, Brettschneider J, Xie SX, Grossman M, Monsell SE, Kukull WA, Trojanowsk JQ. Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain* 2013; 136: 2697–2706.
- Touzani K, Puthanveetil SV, Kandel ER. Consolidation of learning strategies during spatial working memory task requires protein synthesis in the prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2007; 104: 5632-5637.
- Tsuchiya M, Sako K, Yura S, Yonemasu Y. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Brain Res* 1992; 89: 87–92.
- Ulrich PT, Kroppenstedt S, Heimann A, Kempfski O. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats. *Stroke* 1998; 29: 2412–2420.
- Velázquez-Zamora DA, García-Segura LM, Gonzalez-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. *Hormones and Behavior* 2012; 61: 512–517.

- Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Etteri S, Maggi A. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology* 2006; 147: 2263–2272.
- Wang L, Zhang X, LuY, Tian M, LiY. Dynamic changes of Apo A1 mediated by LXR/RXR/ABCA1 pathway in brains of the aging rats with cerebral hypoperfusion. *Brain Res Bull* 2014; 100: 84–92.
- Warner DS, Sheng H, Batinie-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3221–3231.
- Waters EM, Mitterling K, Spencer JL, Mazid S, McEwen BS, Milner TA. Estrogen receptor alpha and beta specific agonists regulate expression of synaptic proteins in rat hippocampus. *Brain Res* 2009; 1290: 1–11.
- Woolley CS. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 657–680.
- 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 X, Glinn MA, Ostrowski NL, Su Y, Ni B, Cole HW, Bryant HU, Paul SM. Raloxifene and estradiol benzoate both fully restore hippocampal choline acetyltransferase activity in ovariectomized rats. *Brain Res* 1999; 847: 98–104.
- Xi Y, Wang M, Zhang W et al. Neuronal damage, central cholinergic dysfunction and oxidative damage correlate with cognitive deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Neurobiol Learn Mem* 2014; 109: 7–19
- Yaffe K, 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.
- Yankova M, Hart SA, Woolley CS. Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: A serial electron-microscopic study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 3525–30.
- Yi KD, Perez E, Yang S, Liu R, Covey DF, Simpkins JW. The assessment of non-feminizing estrogens for use in neuroprotection. *Brain Res* 2011; 1379: 61–70.

Zhang B, Subramanian S, Dziennis S, Jia J, Uchida M, Akiyoshi K, Migliati E, Lewis AD, Vandenbark AA, Offner H, Hurn PD. Estradiol and G1 reduce infarct size and improve immunosuppression after experimental stroke. *J Immunol* 2010; 184: 4087–4094.

Zhou L, Lehan N, Wehrenberg U, Disteldorf E, von Lossow R, Mares U, Jarry H, Rune GM. Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA (A) receptors. *ExpNeurol* 2007; 203: 72–81.

Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12: 723–738.