



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tesis:

**“Evaluación morfológica y funcional del efecto
neuroprotector del Raloxifeno sobre la corteza
prefrontal, en condiciones de hipoperfusión cerebral
crónica, en ratas ovariectomizadas”**

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

Bióloga
Alondra Ayala Sierra

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

Co-director de tesis:
Doctor en Física
Miguel Ángel López Vázquez



Morelia, Michoacán. México
Agosto, 2019.

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad – CONACYT.

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de la beca otorgada para la realización de la Maestría en Ciencias de la Salud.

Registro de Becario: 618536

CVU: 816053

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

Bióloga
Alondra Ayala Sierra

Doctora en Ciencias Biomédicas
Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo

Doctora en Ciencias Fisiológicas
Bertha Fenton Navarro

Doctora en Ciencias
Gabriela Morali de la Brena

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

A cargo de D. en C. José Miguel Cervantes Alfaro

Laboratorio de Neurofisiología Experimental

Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI)

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

A cargo de D. en C. María Esther Olvera Cortés

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, MI ALMA MÁTER**, por qué tus aulas y pasillos me han visto crecer, por qué a pesar de las circunstancias siempre me proveíste de las armas para decirle a cualquiera:
¡CREO EN MÍ, SOY ORGULLOSAMENTE NICOLAITA!

A la **División de Estudios de Posgrado** de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”.

A mi director de tesis, D. en C. **José Miguel Cervantes Alfaro**, por darme un lugar en su laboratorio, por guiarme, por todas sus consideraciones, por qué con usted aprendí a recordar. **¡Con todo cariño, lo llevare siempre en mi memoria!**

A mi director de tesis, D. en F. **Miguel Ángel López Vázquez**; gracias por su tiempo, por su apoyo, su confianza, por creer en mí, por enseñarme el don de la paciencia y la perseverancia, **para usted toda mi admiración y respeto ¡por siempre!**

A mi comité tutorial, D. en C. **M. E. Graciela Letechipía Vallejo**; D. en C. **Gabriela Morali de la Brena**; D. en C. **Bertha Fenton Navarro** y D. en C. **Marcía Yvette Gauthereau Torres**, por su disposición y todas sus atenciones prestadas durante la realización de este proyecto. **¡Gracias!**

Al laboratorio de Neurofisiología Experimental del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) a cargo de la D. en C. **María Esther Olvera Cortés**, por brindarme un espacio, por todo lo que aprendí, por sus observaciones, su tiempo. **¡Gracias!**

DEDICATORIA

A mi Padre, Biol. Rubén Ayala Flores y a mi Madre, Dra. Enna Armida Sierra Ballesteros, todo lo que hago es por ustedes y para ustedes.

Ustedes acompañan, guían y cuidan cada paso que doy. Gracias por todos sus consejos, sus luchas, sus corajes, por entregarme su vida y alma. Son mi ejemplo, mi admiración, mi fortaleza. Todas estas palabras nunca podrán expresar lo mucho que **los amo**.

A mis abuelos, Lic. J. J. Sierra Mota y la Mtra. Enna E. Ballesteros Barbosa, sé que ustedes siempre me cuidan, siempre estarán conmigo, nunca los olvidare.

A mi Paloma, nuestro orgullo y a mi Columba, mi querida güera, con todo mi amor para ustedes, las dos aves que van plasmadas en mi corazón.

A Pepe Christian, por hacer a nuestra familia más feliz.

A J. P. Oñate, por qué eres parte de nosotros y te queremos mucho.

A Ena María, Omar Jesús y José Emilio, ustedes mis niños, **son el eterno, más sincero y grande amor de mi vida,** cuando lean esto siempre recuerden que los amo y espero que se sientan orgullosos de mí.

Familia: yo soy la persona más afortunada del mundo, por qué los tengo, con ustedes no necesito más.

A M. Socorro Escamilla B., Laura García Q. y J. Luis Serna, mis queridos amigos, gracias por permitirme pasar este tiempo a su lado, los lazos que formamos sé que serán para toda la vida, fueron tantas las aventuras, las enseñanzas, compartimos días que no tenían noche, lágrimas y carcajadas, nuestra “casita” fue el encuentro de una amistad que perdurara para siempre.

¡Gracias!

A Carlos A. Molina, Arturo Castell, Diego Camargo y Victoria Valentina, a ustedes, perdón por las ausencias pero deben saber que a pesar de la lejanía, siempre están presentes en mi vida y en mi corazón. **¡Los quiero mucho!**

Índice

Listado de abreviaturas.....	i
Listado de figuras.....	iii
Listado de tablas.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 Demencia	
2.2 Hipoperfusión cerebral crónica	
2.3 Características de la corteza prefrontal	
2.3.1 Función de la corteza prefrontal en la memoria y el aprendizaje	
2.4 Estrógenos como neuroprotectores	
2.5 Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs)	
2.5.1 Efecto neuroprotector del raloxifeno	
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos.....	18
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos específicos	
6. Materiales y métodos.....	19
6.1 Animales de experimentación	
6.2 Implementación del modelo de hipoperfusión cerebral crónica (2VO) en los animales de experimentación	
6.3 Pruebas de evaluación del aprendizaje y de la memoria de trabajo espacial en el laberinto acuático en “T”	
6.3.1 Laberinto acuático en “T” y entorno de la prueba	
6.3.2 Tarea de no igualación a la muestra con retraso	
6.3.3 Tarea de igualación a la muestra con respuesta retrasada	
6.3.4 Parámetros conductuales	
6.4 Obtención de muestras de tejido cerebral y procesamiento histológico	
6.4.1 Evaluación de la densidad y proporciones de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza prefrontal	

6.5	Análisis estadístico	
7.	Resultados.....	26
7.1	Evaluación funcional de la corteza prefrontal mediante la tarea de no igualación a la muestra con retraso	
7.2	Evaluación funcional de la corteza prefrontal mediante la tarea de igualación a la muestra con respuesta retrasada	
7.3	Densidad de las espinas dendríticas	
7.4	Proporción de diferentes tipos de espinas	
8.	Discusión.....	38
9.	Conclusiones.....	43
10.	Bibliografía.....	44

Listado de abreviaturas

*Por orden alfabético

Abreviatura	Significado
AC	Adenilciclase
ACC	Corteza del cíngulo anterior
APA	American Psychiatric Association
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
BHE	Barrera hematoencefálica
CAT	Enzima catalasa
COF	Corteza orbital-frontal
COM	Corteza orbital-medial
CPF	Corteza prefrontal
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Five Edition
EE	Error estándar
E2	17 β -estradiol
GPR30 (GPER1 o R1)	Receptor de estrógeno acoplado a proteína G
GPx	Glutación peroxidasa
HCC	Hipoperfusión cerebral crónica
IA	Corteza insular agranular
ICD-11	International Classification of Diseases, 11th Revision
IL	Corteza infralímbica
MAP-2	Proteína asociada a microtúbulos-2
<i>mREα</i>	Receptor de estrógeno de membrana alfa
<i>mREβ</i>	Receptor de estrógeno de membrana beta
OL	Corteza orbital-lateral
OLV	Corteza orbital-lateral ventral
OV	Corteza orbital-ventral
OVX	Grupo experimental con ovariectomía y simulación del modelo de 2VO
PrCm	Corteza precentral

PL	Corteza prelímbica
RAX	Grupo experimental tratado con raloxifeno
RE	Receptor de estrógeno
RE α	Receptor de estrógeno alfa
RE β	Receptor de estrógeno beta
SERMs	Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SOD	Superóxido dismutasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEH	Grupo experimental tratado con vehículo (dimetilsulfóxido)
2VO	Oclusión de 2 vasos

Listado de figuras

Figura 1. Efectos fisiológicos de la hipoperfusión cerebral crónica.....	8
Figura 2. Eficiencia (número de aciertos/número de pruebas, %) del aprendizaje de la tarea de no igualación a la muestra, con retraso en los diferentes grupos experimenta.....	27
Figura 3. Eficiencia (número de aciertos/número de pruebas, %) del aprendizaje de la tarea de igualación a la muestra, con respuesta retrasada en los diferentes grupos experimentales.....	29
Figura 4. Densidad de espinas dendríticas (número de espinas/50 μ m) en las neuronas piramidales de la capa III de la corteza prefrontal.....	30
Figura 5. Fotomicrografías representativas de segmentos (50 μ m) en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical en las neuronas piramidales en la capa III en la corteza prefrontal, en los diferentes grupos experimentales.....	31
Figura 6. Densidad de espinas dendríticas (número de espinas/50 μ m) en las neuronas piramidales en la capa V de la corteza prefrontal.....	32
Figura 7. Fotomicrografías representativas de segmentos (50 μ m) en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical en las neuronas piramidales en la capa V en la corteza prefrontal, en los diferentes grupos experimentales.....	33
Figura 8. Proporción de los diferentes tipos de espinas por segmento (50 μ m) en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical en las neuronas piramidales en la capa III en la corteza prefrontal, en los diferentes grupos experimentales.....	35
Figura 9. Proporción de los diferentes tipos de espinas por segmento (50 μ m) en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical en las neuronas piramidales en la capa V en la corteza prefrontal, en los diferentes grupos experimentales.....	37

Listado de tablas

Tabla 1. Eficiencia (número de aciertos/número de pruebas, %) mostrada por las ratas de los cuatro grupos experimentales, en cada uno de los 12 días de prueba en la tarea de no igualación a la muestra, con retraso.....	26
Tabla 2. Eficiencia (número de aciertos/número de pruebas, %) mostrada por las ratas de los cuatro grupos experimentales, en cada uno de los 12 días de prueba en la tarea de igualación a la muestra, con respuesta retrasada.....	28
Tabla 3. Proporción de los tipos de espinas dendríticas de las neuronas piramidales en la capa III en la corteza prefrontal, en los cuatro grupos experimentales.....	34
Tabla 4. Proporción de los tipos de espinas dendríticas de las neuronas piramidales en la capa V en la corteza prefrontal, en los cuatro grupos experimentales.....	36

RESUMEN

Introducción. La Hipoperfusión Cerebral Crónica (HCC), induce lesiones isquémicas en regiones cerebrales críticas para la función cognitiva, particularmente la corteza prefrontal (CPF) y el hipocampo. Se ha propuesto el uso de raloxifeno, como neuroprotector de la estructura y función de la CPF. **Objetivo.** Analizar el efecto neuroprotector del raloxifeno en contra del daño inducido por HCC en la corteza prefrontal en ratas con ausencia de secreción ovárica de estrógenos. **Materiales y Métodos.** Se utilizaron ratas, hembras, de la cepa Sprague-Dawley, de 3 meses de edad (250-300 g de peso), que fueron asignadas en los siguientes grupos experimentales (n=8): Intacto, OVX, VEH y RAX. Evaluación funcional de la CPF en el laberinto acuático en "T", mediante la prueba de no igualación a la muestra con retraso y de igualación a la muestra con respuesta retrasada. Histología: se utilizó el método de impregnación argéntica de Golgi para la evaluación de las espinas dendríticas de la capa III y V de la CPF. **Resultados.** Las ratas de los grupos Intacto y RAX alcanzaron el porcentaje de eficiencia (70%) durante los primeros 7 días de prueba, el grupo VEH lo alcanzó al día 9 y los del OVX al día 10. La densidad de espinas dendríticas en las capas III y V fue menor en los grupos OVX, VEH y RAX en comparación con el grupo Intacto. La mayor proporción de espinas delgadas y en hongo las presentaron tanto el grupo RAX como el Intacto. **Conclusión.** El tratamiento con raloxifeno preservó la densidad y la proporción relativa de espinas dendríticas en las neuronas piramidales en las capas III y V y se asoció con una mayor eficiencia en el aprendizaje y la memoria de trabajo espacial dependiente de la CPF.

Palabras clave: corteza prefrontal, hipoperfusión cerebral crónica, raloxifeno, aprendizaje y memoria, espinas dendríticas.

ABSTRACT

Introduction. The permanent reduction of cerebral blood flow (Chronic Cerebral Hypoperfusion, CCH) may lead to ischemic lesions in brain regions, such as the hippocampus and the prefrontal cortex (PFCx). It has been proposed that raloxifene, may exert neuroprotective effects on the structure and function of prefrontal cortex (layers III and V) pyramidal neurons. **Objective.** The present study was aimed to evaluate the neuroprotective effects of raloxifene against brain damage elicited by chronic cerebral hypoperfusion, under absence of estrogen ovary secretion, in rats. **Materials and Methods.** Sprague-Dawley female, 3 months old, rats (230-300 g b.w.), were randomly allotted to the following experimental groups (n=8): Intact; OVX; VEH; and RAX, during 60 days. At the end of treatments or equivalent periods, functional evaluation of PFCx were performed by delayed non matched-to sample tasks (12 days, 10 trials/day, 30 sec intervals between consecutive trials) and delayed matched-to sample tasks, in the T water maze. Rats brains were obtained following cardiac perfusion. Brain slices (250 μ m thick) including prelimbic/infralimbic PFCx, were processed by a Golgi technique, in order to evaluate dendritic spine types in pyramidal neurons of cortical layers III and V. **Results.** Rats of Intact and RAX groups achieved a 70% efficiency level in both subsequent tests series on the 7th testing day; while rats of VEH and OVX groups achieved this efficiency level in the matched-to sample tasks on the 9th or the 10th days of testing, respectively. Dendritic spine density in layer III and V PFCx pyramidal neurons was significantly lower in the OVX, VEH and RAX groups, than in the Intact group. **Conclusion.** Raloxifene treatment preserved the density and the relative proportions of dendritic spines in layer III and V PFCx pyramidal neurons. These effects were related to a better efficient performance in PFCx dependent learning and working memory test.

1. Introducción

La demencia es una condición fisiopatológica que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones cognoscitivas, incluyendo el aprendizaje y la memoria. En estas condiciones se afectan otros procesos cerebrales que forman parte de los procesos conscientes como sería el caso de la planeación, la toma de decisiones, la capacidad de modificar la conducta dependiendo de las condiciones del entorno y de la experiencia, entre otros (ICD-11, World Health Organization, 2018; Denning y Sandilyan, 2015).

La demencia tiene importantes repercusiones en la salud individual, así como en los ámbitos social y económico. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud se han identificado, a nivel mundial, 50 millones de personas con demencia y se anticipa que el número de individuos que viven con estos padecimientos aumentará a 82 millones de personas para el año 2030 y podría llegar a ser mayor de 152 millones de personas para el año 2050. Anualmente se registran 10 millones de casos nuevos de demencia, lo que significa que se presentaría un nuevo caso cada 3 segundos (World Health Organization, 2017). Esto representa un problema importante en lo que se refiere a la calidad de vida de individuos afectados, en la naturaleza de los cuidados que puedan requerir por parte de los integrantes del núcleo familiar, de diversos profesionales de la salud, así como de las instituciones de atención médica (Parra *et al.*, 2018; World Health Organization, 2017).

Estudios realizados en la población mexicana han mostrado una prevalencia de 7.4 para la demencia en adultos mayores de 65 años (Parra *et al.*, 2018) y una incidencia de demencia, variable de moderada a severa, en personas adultas mayores de 60 años, de 27.3 casos/1000 personas/año, de acuerdo con la Encuesta Nacional Sobre Salud y Envejecimiento en México (ENASEM, 2013), con un promedio de 25.55/1000 personas/año con una tendencia al predominio en mujeres y al incremento de la incidencia y la gravedad con el avance de la edad (Prince *et al.*, 2012). En México, en el año 2014, habían sido identificadas cerca de 860 mil personas con algún tipo de demencia y con base en la tendencia de la

transición demográfica hacia la mayor proporción de individuos mayores de 60 años, la proyección del número de mexicanos afectados por demencia para el año 2050 alcanzará la alarmante cifra de más de 3.5 millones, por lo que el impacto de esta enfermedad en los sistemas de salud, y el entorno social y económico, será aún más grave (Gutiérrez-Robledo y Arrieta-Cruz, 2015).

La demencia puede clasificarse de acuerdo a su etiología, de tal manera que se ha identificado que las enfermedades cerebro-vasculares serían la causa de al menos el 20% de los casos de demencia (DSM-V, American Psychiatric Association (APA), 2013; Sachdev *et al.*, 2014).

La demencia de origen vascular podría ser el resultado de lesiones vasculares capaces de provocar una disminución del flujo sanguíneo cerebral que a su vez produciría alteraciones funcionales y estructurales en diversas regiones cerebrales vulnerables (van der Flier *et al.*, 2018; ICD-11, World Health Organization, 2018); en este sentido, la reducción permanente del flujo sanguíneo cerebral puede provocar lesiones isquémicas en regiones cerebrales clave para las funciones cognitivas, particularmente en el hipocampo y la corteza prefrontal (Khan *et al.*, 2016; Raz *et al.*, 2016; Morali y Cervantes, 2014; Jellinger, 2013; Kim *et al.*, 2012).

Por otra parte, varios estudios clínico-patológicos han señalado un aumento de riesgo de sufrir alteraciones cerebro-vasculares, asociadas a la presencia y curso progresivo de deterioro cognitivo, en mujeres postmenopáusicas o que han sido sometidas a ooforectomía, atribuibles a la ausencia y/o la disminución de las concentraciones sanguíneas y tisulares de hormonas gonadales secretadas por el ovario (Engler-Chiurazzi *et al.*, 2017). Sin embargo, en estas condiciones 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 estrogénicas en tejidos periféricos den lugar a neoplasias estrógeno dependientes y trombosis (Zhu *et al.*, 2017; Ellis *et al.*, 2015; Pickar y Komm, 2015; Samavat y Kurzer, 2015; Yaghjian y Colditz, 2011).

Ante la coincidencia de hipoperfusión cerebral crónica y deficiencia estrogénica, se ha planteado la potencialidad de los compuestos Moduladores Selectivos de

Receptores de Estrógenos (SERMs, por sus siglas en inglés), como parte de esquemas de neuroprotección en contra del daño cerebral conducente al deterioro de las funciones cognitivas (Arevalo *et al.*, 2011; Strom *et al.*, 2011; Espeland *et al.*, 2010; DonCarlos *et al.*, 2009; Legault *et al.*, 2009), dado que los SERMs interactúan con receptores estrogénicos modulando las acciones genómicas de tal manera que se preserven las acciones estrogénicas en estructuras celulares cerebrales, en tanto que no ocurran, en el tejido mamario y tejidos de órganos reproductores, las acciones relacionadas con los efectos indeseables de la terapia de reemplazo con estradiol (Kulkarni *et al.*, 2016). En este sentido, se ha mostrado que los SERMs tales como, tamoxifeno, raloxifeno o bazedoxifeno tienen efectos neuroprotectores; de hecho, estudios clínicos aleatorizados sugieren que el raloxifeno previene el deterioro cognitivo en mujeres postmenopáusicas (Huerta-Ramos *et al.*, 2014). 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 y otras patologías neurodegenerativas, sustenta la importancia del estudio de sus efectos neuroprotectores (Khan *et al.*, 2014; Arevalo *et al.*, 2011; Strom *et al.*, 2011; O'Neill *et al.*, 2004). Sin embargo, los efectos neuroprotectores del raloxifeno han sido poco estudiados en modelos experimentales, particularmente en lo referente a las consecuencias de la hipoperfusión cerebral crónica y la ausencia de actividad estrogénica sobre las funciones cognitivas dependientes de la integridad estructural y el funcionamiento de la corteza prefrontal.

El propósito de este trabajo es evaluar en un modelo experimental el efecto neuroprotector del raloxifeno en contra de las alteraciones morfológicas y funcionales de la corteza prefrontal, inducidas por hipoperfusión cerebral crónica y la ausencia de estrógenos ováricos en ratas.

2. Antecedentes

2.1 Demencia

La demencia, es una condición fisiopatológica, en la cual la principal característica clínica son las deficiencias de las funciones cognitivas, que se manifiestan por disminución de los procesos de aprendizaje y memoria o pérdida de estas capacidades con respecto a las condiciones previas al inicio del deterioro cognoscitivo que forma parte de la demencia (ICD-11, World Health Organization, 2018; DSM-V, (APA), 2013).

Las funciones cognoscitivas que pueden ser alteradas en el curso progresivo del deterioro cognitivo de la demencia son: la atención compleja, el aprendizaje y la memoria, el lenguaje, las funciones perceptivas-motoras, la interacción del individuo con el entorno social y las funciones ejecutivas, como la toma de decisiones, la planeación y la memoria de trabajo, (Sachdev *et al.*, 2014; DSM-V, APA, 2013).

La demencia se puede clasificar con base a las entidades etiológicas/patológicas que subyacen al deterioro cognoscitivo (DSM-V, APA, 2013). Así, se considera a la enfermedad de Alzheimer como la principal causa de deterioro cognoscitivo (80% de los casos de demencia), seguida por las enfermedades cerebro-vasculares, a las que se atribuye la etiología de aproximadamente el 20% de todos los tipos de demencia (Smith, 2017; Sachs-Ericsson y Blazer, 2015; DSM-V, APA, 2013).

La demencia de origen vascular es una entidad fisiopatológica caracterizada por el deterioro de las capacidades cognoscitivas como consecuencia de la alteración del flujo sanguíneo en las unidades neuro-vasculares (van der Flier *et al.*, 2018; Dichgans y Leys, 2017; Hu *et al.*, 2017; Raz *et al.*, 2016; Sachdev *et al.*, 2014; Gorelick y Nyenhuis, 2013). En estas condiciones, se ha considerado que la magnitud y el curso temporal del deterioro de las funciones cognoscitivas están íntimamente relacionados con deficiente suministro de oxígeno y nutrientes al tejido cerebral y las alteraciones de la estructura o de la función neuronal resultantes (Al-Qazzaz *et al.*, 2014).

2.2 Hipoperfusión cerebral crónica

En los seres humanos, la hipoperfusión cerebral crónica consiste en la reducción permanente y progresiva del flujo sanguíneo cerebral, debida a patologías, como la arterioesclerosis, que alteran la estructura de los vasos cerebrales y reducen progresivamente el calibre de las grandes arterias así como de los vasos pequeños que irrigan a las diversas estructuras cerebrales. La hipoperfusión cerebral crónica se ha vinculado con la presencia y evolución progresiva de diversos trastornos neurodegenerativos; así como con el deterioro cognoscitivo característico de la demencia (Kalaria, 2016; Iadecola, 2013; Jellinger, 2013).

El estudio de los mecanismos de daño y disfunción cerebral que resultan de la reducción crónica y permanente del flujo sanguíneo cerebral ha sido abordado mediante modelos en animales de experimentación (Duncombe *et al.*, 2017; Venkat *et al.*, 2015; Sarti *et al.*, 2002). Entre estos se incluye el modelo de hipoperfusión cerebral crónica por oclusión permanente de ambas arterias carótidas comunes, de manera simultánea o sucesiva (con un intervalo de siete días), con o sin sección de las arterias carótidas comunes. En este modelo se ha observado una reducción del flujo sanguíneo cerebral del orden del 55% en la corteza cerebral y del 40% en el hipocampo, en comparación con el flujo sanguíneo cerebral normal, esto provoca reducción de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo y deterioro del aprendizaje y la memoria espacial (Jing *et al.*, 2015, Cechetti *et al.*, 2012^a; Cechetti *et al.*, 2010; Farkas *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 1997; Ni *et al.*, 1994).

En diversos estudios se ha descrito que la reducción del flujo sanguíneo cerebral, en el modelo de hipoperfusión cerebral crónica, induce el deterioro de las funciones cognoscitivas, especialmente del aprendizaje y de la memoria espacial, debido al daño de estructuras cerebrales del hipocampo y de la corteza prefrontal, dos regiones cerebrales directamente involucradas en estas funciones cognoscitivas (Hainsworth *et al.*, 2017; Jing *et al.*, 2015; Xi *et al.*, 2014; Cechetti *et al.*, 2012^a Otori *et al.*, 2003). Así se ha mostrado, mediante estudios de inmunofluorescencia con el marcador NeuN, que la hipoperfusión cerebral crónica

reduce aproximadamente 30% la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon en el hipocampo, un resultado que ha sido confirmado recientemente en nuestro laboratorio mediante conteo de las neuronas remanentes en la misma región cerebral, identificadas mediante la tinción de Nissl, luego de 60 días de hipoperfusión cerebral crónica en ratas hembra (Cechetti *et al.*, 2012^a; Salcido-Cadena, 2017). Además de la reducción de la población de neuronas piramidales del cuerno de Ammon, la hipoperfusión cerebral crónica provoca una reducción de las ramificaciones y de las espinas dendríticas de este tipo de neuronas tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal, un fenómeno que puede dar lugar a alteraciones de la conectividad, sinaptogénesis y flujo de la información de estas estructuras (Jia *et al.*, 2012).

La hipoperfusión cerebral crónica también induce activación de los astrocitos cuya presencia y curso temporal fue identificada mediante marcaje fluorescente de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el hipocampo, en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica (Cechetti *et al.*, 2012^a). Así mismo, se ha descrito el incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el hipocampo, atribuible a la reducción del flujo sanguíneo que resulta de la hipoperfusión cerebral crónica (Azzubaidi *et al.*, 2012; Cechetti *et al.*, 2012^b). En estos estudios, la pérdida neuronal, la activación pro-inflamatoria de los astrocitos y el incremento de los radicales libres han sido considerados como posibles causas de la alteración funcional del hipocampo que darían como resultado el deterioro de las funciones cognoscitivas, aprendizaje y memoria espacial.

En una revisión reciente, se han descrito (Du *et al.*, 2016) los aspectos más relevantes de las alteraciones, de los procesos celulares y moleculares de daño neuronal inducidos por la hipoperfusión cerebral crónica. En este sentido, se ha destacado la importancia de las alteraciones de la estructura y de la función mitocondrial inducidas por hipoperfusión cerebral crónica. Esta condición fisiopatológica provoca en modelos experimentales, agregación e “hinchamiento” mitocondrial en las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo, que coincide con la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno que indican una disfunción mitocondrial que contribuye a la lipoperoxidación y a la disminución

de la capacidad antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). En presencia de estas alteraciones de la estructura mitocondrial, la pérdida de la homeostasis de calcio libre intracelular puede dar lugar a la modificación del potencial de la membrana mitocondrial, de la actividad de las enzimas respiratorias (complejos I, II y IV) que forman parte de la cadena de transferencia de electrones y de la citocromo oxidasa C (IV). Además, la alteración de la estructura y de la función mitocondrial puede modificar el balance de la expresión de proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica)/ Bax (pro-apoptótica) que puede estar involucrada en procesos de apoptosis y muerte neuronal.

Por otra parte, también se ha señalado la importancia del estrés oxidativo, asociado al incremento de especies reactivas de oxígeno y a la reducción de la presencia y actividad de diversas enzimas antioxidantes, en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, como una causa concurrente de lipoperoxidación y daño neuronal (Xi *et al.*, 2014).

Durante la hipoperfusión cerebral crónica se activan células gliales incluidas la microglía y los astrocitos, lo cual da lugar al incremento anormal en la producción de citocinas pro-inflamatorias, incluidas la interleucina-1 β (IL-1 β), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y también la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). La figura 1, ilustra diversos mecanismos fisiopatológicos que tienen lugar a nivel celular y molecular en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, que pueden ser factores concurrentes al daño de las estructuras nerviosas vulnerables involucradas en las funciones cognitivas (Völgyi *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2016).

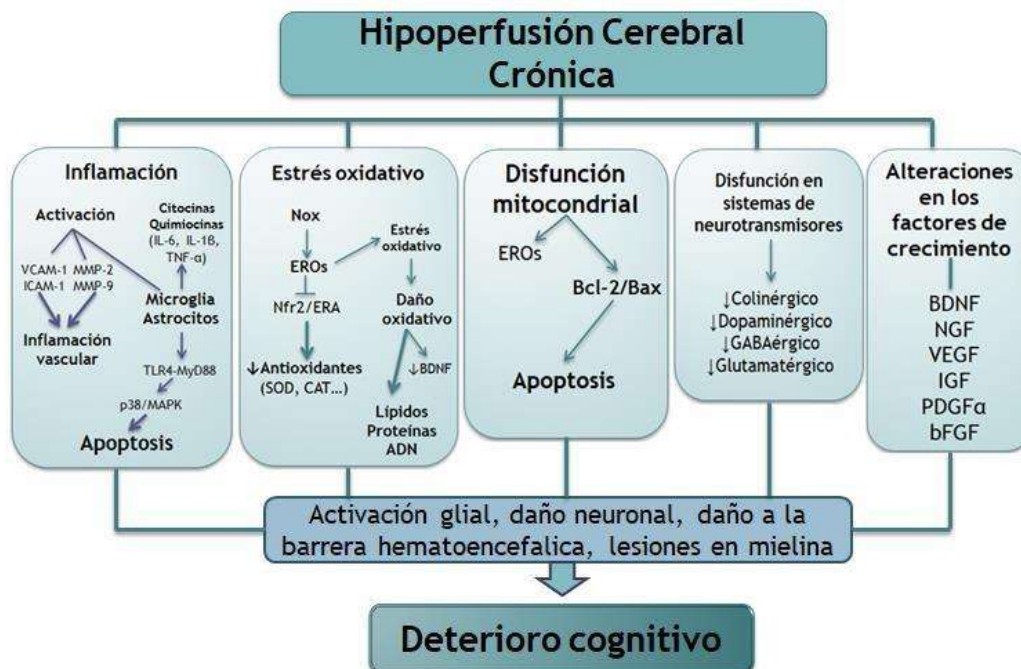


Figura 1. Efectos fisiopatológicos de la hipoperfusión cerebral crónica. Modificado de Du *et al.*, 2016.

2.3 Características de la corteza prefrontal

En los primates, incluidos los seres humanos, la corteza prefrontal (CPF) abarca la mayor parte de los lóbulos frontales, corresponde al 27-29% de la corteza cerebral, éste es el mayor porcentaje de extensión de la corteza prefrontal entre las especies de primates y de otros mamíferos. La corteza prefrontal participa en funciones complejas y altamente integradas como son las capacidades cognoscitivas por ejemplo, el aprendizaje, la memoria, la toma de decisiones, la flexibilidad del comportamiento, el razonamiento, la planeación, entre otras (Funahashi, 2017^a; Mushiake *et al.*, 2009; Seamans *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2002).

La corteza prefrontal en los seres humanos, incluye la CPF lateral, CPF medial o cingulada y la CPF orbital, también conocida como corteza orbito-frontal (COF), las cuales se encuentran ampliamente interconectadas con diversas estructuras cerebrales (Wilson *et al.*, 2010; Siddiqui *et al.*, 2008).

La corteza prefrontal establece conexiones aferentes y eferentes con regiones corticales involucradas en el procesamiento de la información sensorial; así como con estructuras subcorticales entre las que destacan la amígdala, el hipocampo y el subículo (Siddiqui *et al.*, 2008; Van Eden y Buijs, 2000). En particular, el hipocampo ventral es el origen de proyecciones neuronales que terminan directamente en estructuras nerviosas de la corteza prefrontal proporcionando el sustrato neural de una ruta muy importante para el flujo de información relacionada con las representaciones hipocampales de contextos espaciales hacia la corteza prefrontal, donde el funcionamiento de los circuitos neuronales propios de la corteza puede dar lugar al procesamiento de esta información aferente en función del desarrollo de representaciones y contextos asociados al curso de los procesos de aprendizaje y memoria (Eichenbaum, 2017).

Gran parte de la información acerca del funcionamiento de la corteza prefrontal ha sido obtenida en modelos en diversas especies de mamíferos desde roedores hasta primates, de ahí la importancia del establecimiento de homologías anatómicas entre la corteza prefrontal de los seres humanos y la corteza prefrontal de diferentes especies (Kesner y Churchwell, 2011; Seamans *et al.*, 2008; Rammani y Owen, 2004; Uyling *et al.*, 2003). En particular, en la rata las partes de la corteza prefrontal involucradas en las funciones cognoscitivas son: la región dorsal-medial que incluye la corteza precentral (CPrm), y la corteza del cíngulo anterior dorsal y ventral (CA), así como en la región ventral-medial que incluye la corteza orbital-medial (OM), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL). Estas regiones desempeñan un papel importante en la memoria de trabajo basada en la percepción visual y la ubicación de señales en el entorno. Las lesiones de estas zonas de la corteza en las ratas, producen déficits en la ejecución de tareas de memoria de trabajo espacial (Szczepanski y Knight, 2014; Ray y Zald, 2012; Kesner y Churchwell, 2011).

2.3.1 Función de la corteza prefrontal en la memoria y el aprendizaje

Una de las funciones más importantes de la corteza prefrontal es el manejo de la información proveniente de las otras regiones corticales y de estructuras subcorticales en función de la expresión de patrones de comportamiento basada en la correspondencia de circunstancias que se han dado en el pasado, con las del momento presente, y con aquellas que podrían darse en el futuro (Funahashi, 2017^a; Funahashi, 2017^b; Funahashi y Andreau, 2013).

Estos procesos neurales parecen corresponder en los seres humanos a la memoria de trabajo, término que se refiere tanto al almacenamiento como al procesamiento de la información con fines y metas específicos (Funahashi, 2017^a; Baddeley, 2012); de tal manera que permitiría la comprensión y representación mental del entorno inmediato, la retención de información sobre experiencias, la adquisición de nuevos conocimientos, la solución de problemas y la formulación de estrategias de acción de acuerdo a objetivos actuales (Funahashi, 2017^a; Funahashi, 2017^b; Riley y Constantinidis, 2016; Baddeley, 2012; Goldman- Rakic, 1995).

En el flujo y procesamiento de información en la corteza prefrontal, relacionados con el aprendizaje y la memoria, juegan un papel muy importante las conexiones aferentes que provienen de diversas estructuras cerebrales y forman conexiones sinápticas con las neuronas piramidales de la corteza prefrontal; así como la conectividad en los circuitos neuronales que forman parte de esta estructura cerebral (Eichenbaum, 2017, Siddiqui *et al.*, 2008; Van Eden and Buijs, 2000).

Así mismo, el número y características de las espinas dendríticas localizadas en las arborizaciones, basales y apicales, de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal son parte fundamental del sustrato neural de conectividad sináptica (Krügel *et al.*, 2013; Rich y Shapiro, 2009). El papel de las espinas dendríticas como estructuras post-sinápticas principales para la comunicación celular excitatoria en el sistema nervioso central ha sido descrita previamente, así como las consecuencias de las modificaciones en su densidad y configuración, para la conectividad sináptica y funcionamiento de la corteza

prefrontal (González-Burgos, 2009; González-Burgos, 2012; Kasai *et al.*, 2003). Así, la correlación entre la densidad y las proporciones relativas de diferentes tipo de espinas dendríticas con el desempeño en la ejecución de tareas cognitivas ha sido parte del abordaje experimental del funcionamiento de la corteza prefrontal (Velázquez-Zamora *et al.*, 2012; Velázquez-Zamora *et al.*, 2011; González-Burgos, 2009; García Chávez *et al.*, 2008).

2.4 Estrógenos como neuroprotectores

En diversos estudios se ha señalado la relación entre la presencia de patologías cerebrales que involucran deterioro de las funciones cognitivas y la reducción de las concentraciones sanguíneas de estradiol en mujeres pre y post-menopáusicas, lo mismo que en mujeres después de la extirpación quirúrgica de los ovarios (Devi, 2018; Huang *et al.*, 2015). Este deterioro de las funciones cognitivas, aparentemente debido a la ausencia de las acciones estrogénicas inducidas en el cerebro por los estrógenos de origen ovárico puede ser revertido mediante terapia de reemplazo hormonal, si esta terapia se inicia inmediatamente después de la pérdida de la función ovárica (Engler-Chiurazzi *et al.*, 2017; Gartlehner *et al.*, 2017; Hara *et al.*, 2015; Henderson, 2010).

Estos hallazgos, sustentan la importancia de las acciones estrogénicas para el mantenimiento de la estructura y del funcionamiento cerebral en condiciones fisiológicas, que dependen tanto del estradiol sintetizado en el ovario como del estradiol sintetizado localmente en el cerebro, como resultado de la aromatización de la testosterona (Almey *et al.*, 2015; Hara *et al.*, 2015; Bean *et al.*, 2014; Morali y Cervantes, 2014). Así mismo, dichos estudios señalan al cerebro como un órgano “blanco” del tratamiento farmacológico a base de compuestos químicos con actividad estrogénica, en la terapia con reemplazo y en otras condiciones fisiopatológicas.

El 17 β -estradiol, el estrógeno endógeno con mayor actividad, ejerce la mayoría de sus efectos biológicos a través de su interacción con dos receptores de estrógeno de localización intracelular o membranal: el receptor estrogénico alfa (RE α , mRE α) y el receptor de estrógeno beta (RE β , mRE β) (Borrow y Handa, 2017). Además el

E2 puede interactuar con el receptor membranal de estrógeno acoplado a proteína G (GPER30 o GPER1) (Alexander *et al.*, 2017; Hadjimarkou y Vasudevan, 2017; Almey *et al.*, 2015; Morali y Cervantes, 2014).

La densidad y distribución de los receptores RE α , RE β y GPER1, varían en las regiones del cerebro. Así en el hipocampo del ser humano y de la rata, la cantidad de RE β es mayor que la cantidad de RE α (Borrow y Handa, 2017; Almey *et al.*, 2015; Bean *et al.*, 2014).

Con respecto al receptor GPER1, existe un patrón de distribución similar entre el cerebro de la rata y del cerebro humano. En el cerebro humano, el receptor GPER1 es el más abundante en la corteza prefrontal, se localiza en la membrana plasmática, en el retículo endoplásmico (Hadjimarkou y Vasudevan, 2017) y en los filamentos intermedios de queratina del citoesqueleto (Borrow y Handa, 2017). En la corteza prefrontal medial de las ratas hembras, el receptor GPER1 es el más abundante, se ha estimado que su cantidad es dos veces mayor que el mRE α , y cuatro veces mayor que el receptor mRE β (Almey *et al.*, 2015).

Se ha mostrado que la interacción de E2 con el receptor GPER1, induce la activación de vías de señalización intracelular en las que puede estar involucrado el Ca²⁺, la fosfolipasa C (PLC), la adenilciclase (AC), y una gran cantidad de cinasas: MAPK, B-RAF, IP3K, Src, ERK, AKt, PKA y PKC; así como factores de transcripción (CREB) que pueden dar lugar a la expresión de diversos elementos de respuesta estrogénica que se traducen en cambios en la estructura (ramificaciones dendríticas, espinas dendríticas y sinaptogénesis en las células piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo y de las capas III y V de la corteza prefrontal) y en la función neuronal (eficiencia mitocondrial, cadena de transporte de electrones, balance entre factores pre y anti-apoptótica), dando lugar a condiciones que favorecen la existencia de un sustrato neural adecuado para el flujo y codificación de información involucrada en las funciones cognitivas, entre otros (Borrow y Handa, 2017; Almey *et al.*, 2015; Bean *et al.*, 2014; Morali y Cervantes, 2014; Mukai *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2006; Smith y McMahon, 2006; Gould *et al.*, 1990).

Se ha señalado la participación del 17 β -estradiol en la regulación de la expresión génica relacionada con la supervivencia neuronal, la diferenciación neuronal y glial así como, con la transmisión sináptica. Además, bajo ciertas condiciones, puede ejercer acciones que den por resultados efectos anti-inflamatorios, así como de reparación del daño neuronal y fenómenos plásticos en circuitos neuronales (Woolley, 2007; Vegeto *et al.*, 2006).

Sin embargo, la administración de estradiol como terapia de reemplazo, con sus posibles efectos neuroprotectores en contra del daño cerebral que conduce al curso progresivo del deterioro cognitivo por la disminución y/o ausencia de la actividad estrogénica en mujeres pre y post-menopáusicas, puede tener inconvenientes, debido a las acciones del esteroide en tejidos periféricos con, posible desarrollo de neoplasias estrógeno dependientes y trombo-embolismo (Dallal *et al.*, 2016; Brown y Hankinson, 2015). Por ello, se ha planteado el uso de los compuestos moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs, por sus siglas en inglés) como parte de esquemas de neuroprotección, basados en acciones estrogénicas, en contra del daño cerebral conducente al deterioro de las funciones cognoscitivas (An, 2016; Khan, 2016; Arevalo *et al.*, 2011; DonCarlos *et al.*, 2009).

2.5 Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs)

A la fecha, se han desarrollado varias generaciones de SERMs. Los compuestos derivados del trifeniletileno, como el tamoxifeno y sus derivados, se conocen como SERMs de primera generación. Los SERMs derivados del benzotiofeno pertenecen a la segunda generación en el que se incluye al raloxifeno y de tercera generación como, el bazedoxifeno derivado del benzopirano (An, 2016; Arevalo *et al.*, 2011).

Los SERMs se utilizan en esquemas de terapia de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas, en la prevención y tratamiento de la osteoporosis y en la prevención y tratamiento del cáncer de mama (Ellis *et al.*, 2015; Gambacciani y Levancini, 2014; Gizzo *et al.*, 2013; Gennari *et al.*, 2008; Gennari *et al.*, 2007). Además, varios estudios clínicos han reportado el uso del raloxifeno como posible

tratamiento del deterioro de las funciones cognitivas en mujeres postmenopáusicas (Khan, 2016; Huerta-Ramos *et al.*, 2014; Berent-Spilson *et al.*, 2012; Simpkins *et al.*, 2009).

Los SERMs deben sus efectos farmacológicos a la interacción con receptores a estrógenos, cuyas características particulares dan lugar a la activación (agonistas) o a la inhibición (antagonistas) de procesos estrogénicos, en diversos tipos celulares. En el sistema nervioso central a diferencia de lo que ocurre en tejidos periféricos, los SERMs son promotores de acciones y efectos estrogénicos en las neuronas y en las células gliales (Borrow y Handa, 2017; Bean *et al.*, 2014; Arevalo *et al.*, 2011; DonCarlos *et al.*, 2009).

2.5.1 Efecto neuroprotector del raloxifeno

Los resultados de diversos estudios, sustentan el efecto neuroprotector de los SERMs, en modelos experimentales de daño neuronal: daño traumático, lesión de nervios periféricos, isquemia cerebral, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognoscitivo y trastornos afectivos (Lamas *et al.*, 2017; Khan, 2016; Arevalo *et al.*, 2011).

En el cerebro, el raloxifeno actúa como agonista de los receptores estrogénicos, incluyendo GPER1, los cuales son muy abundantes tanto en la corteza prefrontal de los seres humanos y en el cerebro de la rata, por lo que se espera que la administración sistemática del raloxifeno induzca acciones estrogénicas en estas estructuras (Khan, 2016; Rzemieniec *et al.*, 2014; Abdelhamid *et al.*, 2011).

Los efectos neuroprotectores del raloxifeno parecen deberse a la disminución de la reacción glial y de la secreción de TNF- α e interleucinas (Du *et al.*, 2016); preservación de la integridad del citoesqueleto neuronal (Segura-Urbe *et al.*, 2017); reducción del daño oxidativo e incremento de la expresión de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx) (Konyalioglu *et al.*, 2007).; regulación de la expresión de factores tróficos (BDNF) y de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas como Bcl2 y Bax; lo cual generaría las condiciones para la

preservación del sustrato neural involucrado en las funciones cognoscitivas (Du *et al.*, 2016).

Así mismo, el raloxifeno, puede inducir mecanismos de neuroplasticidad, tales como el crecimiento axonal (Nilsen *et al.*, 1998), el incremento de la neurogénesis, incremento de la densidad y modificación de las proporciones relativas de los diferentes tipos de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza prefrontal, que pueden estar relacionadas con la preservación de las funciones cognoscitivas en condiciones de daño cerebral (Khan, 2016; Khan *et al.*, 2013; Velázquez-Zamora *et al.*, 2012).

3. Justificación

En el proceso de envejecimiento, la reducción del flujo sanguíneo cerebral y la disminución de las concentraciones sanguíneas y tisulares de hormonas gonadales secretadas por el ovario, son factores concurrentes que propician alteraciones funcionales y estructurales en regiones cerebrales clave para las funciones cognoscitivas, particularmente en el hipocampo y la corteza prefrontal.

Ante la coincidencia de la ausencia de la actividad estrogénica y la hipoperfusión cerebral crónica, la administración de la terapia de reemplazo con estradiol con sus posibles efectos neuroprotectores en contra del daño cerebral conducente al deterioro de las funciones cognoscitivas en mujeres pre y post-menopáusicas, presenta serias limitaciones debido al riesgo de que las acciones estrogénicas en tejidos periféricos den lugar a neoplasias estrógeno dependientes y trombosis.

Se ha propuesto, el uso de Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERMs), como parte de los esquemas de neuroprotección en contra del daño cerebral inducido en diferentes modelos experimentales. De esta forma, se han identificado que las acciones neuroprotectoras del raloxifeno, un compuesto representativo de los SERMs, debidas a su interacción con receptores de estrógeno RE α RE β y GPER1, que promueven fenómenos plásticos de preservación y recuperación del sustrato neural y de la función, en estructuras cerebrales vulnerables al daño por hipoperfusión cerebral crónica como, el hipocampo y la corteza prefrontal.

Resultados de estudios recientes realizados en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con raloxifeno impide la deficiencia en la ejecución de tareas de memoria de trabajo espacial (dependiente en gran medida de la integridad morfológica y funcional de la corteza prefrontal y de su conectividad con el cuerno de Ammon en el hipocampo), inducida por la hipoperfusión cerebral crónica y la ausencia de estrógenos ováricos, en ratas. A este respecto, se ha mostrado que la adecuada ejecución de tareas de memoria de trabajo espacial depende de manera importante de la integridad morfológica y funcional de la corteza prefrontal.

En estas condiciones la evaluación a largo plazo de las características de la estructura (cito-arquitectura neuronal) y el funcionamiento (pruebas específicas de memoria de trabajo espacial) de la corteza prefrontal constituyen parámetros adecuados indicadores del daño cerebral y en su caso de la eficacia y mecanismos de acción de un fármaco potencialmente neuroprotector, de acuerdo con los lineamientos establecidos por consenso para el estudio pre-clínico de fármacos neuroprotectores (Fisher *et al.*, 2009).

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

4. Hipótesis

El raloxifeno ejerce un efecto neuroprotector en la estructura y función de la corteza prefrontal bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, en ratas ovariectomizadas.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Analizar el efecto neuroprotector, a largo plazo, del raloxifeno en contra del daño cerebral inducido por reducción permanente del flujo sanguíneo en la corteza prefrontal de ratas, con la ausencia de secreción ovárica de estrógenos.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Evaluar las funciones cognitivas (aprendizaje y memoria de trabajo espacial), dependientes de la corteza prefrontal en ratas ovariectomizadas con reducción permanente del flujo sanguíneo cerebral, con y sin tratamiento con raloxifeno.

5.2.2 Evaluar la densidad y proporción relativa de espinas dendríticas de las neuronas piramidales en las capas III y V en la corteza prefrontal, en ratas ovariectomizadas con reducción permanente del flujo sanguíneo cerebral, con y sin tratamiento con raloxifeno.

6. Materiales y métodos

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas, hembras, de la cepa Sprague-Dawley, con una edad de 3 meses y un peso de 250-300 g. Los animales de experimentación fueron alojados en cajas de acrílico, bajo condiciones de ciclos de luz y oscuridad (12hr/12hr), a una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con provisión de comida (Rodent laboratory Chow) y agua ad libitum. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos establecidos en normas internacionales (NIH, Publication 80-23), y en normas vigentes 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).

Los animales de experimentación fueron asignados al azar a los siguientes grupos experimentales (n= 8): Intacto; OVX: ratas ovariectomizadas (Ovx) con simulación del modelo de hipoperfusión cerebral crónica por 2VO pero sin reducción del flujo sanguíneo; VEH: ratas ovariectomizadas, con modelo de 2VO (oclusión permanente y sección de las arterias carótidas comunes) y administración de vehículo, dimetilsulfóxido (DMSO) al 15% en agua en un volumen de 0.1 ml/Kg/24 h sc, durante 60 días; RAX: ratas ovariectomizadas con modelo de 2VO y administración de raloxifeno a una dosis de 3.0 mg/Kg/24 h sc, durante 60 días.

Los procedimientos anestésico/quirúrgicos requeridos para la ovariectomía y el modelo de hipoperfusión cerebral crónica (Azzubaidi *et al.*, 2012; Cechetti *et al.*, 2010) se realizaron bajo anestesia general con ketamina/xilacina 50/10 mg/kg im.

El tratamiento con raloxifeno o con vehículo dimetilsulfóxido se inició inmediatamente después de la oclusión permanente de la segunda arteria carótida común.

Al término de los primeros 30 días de tratamiento (vehículo o raloxifeno) o de períodos equivalentes en los grupos Intacto y OVX, los animales de los diferentes grupos fueron sometidos a evaluación funcional de la corteza prefrontal, en el laberinto acuático en "T" mediante la tarea de no igualación a la muestra con

retraso y con la tarea de igualación a la muestra con respuesta retrasada. Los resultados se expresan como porcentaje de eficiencia (número de aciertos en cada 10 ensayos) y se considera eficiente un valor de 70% (Aguayo-Del Castillo *et al.*, 2016; Dudchenko, 2004).

Una vez finalizadas las evaluaciones en el laberinto acuático en “T”, se obtuvieron los cerebros de las ratas luego de perfusión intracardiaca y fijación con solución amortiguadora de fosfatos, con formaldehído al 10%.

El procesamiento histológico del cerebro se realizó mediante la técnica de Golgi modificada (González-Burgos *et al.*, 1992), para la evaluación de la densidad y proporción de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal ventral-medial (Paxinos y Watson, 2009), y procedimientos convencionales utilizados previamente en nuestro laboratorio (García-Chávez *et al.*, 2008; Letechipía-Vallejo, 2007).

6.2 Implementación del modelo de hipoperfusión cerebral crónica (2VO) en los animales de experimentación

El modelo de hipoperfusión cerebral crónica se realizó en los grupos vehículo y raloxifeno (de acuerdo con los procedimientos quirúrgicos descritos en: Azzubaidi *et al.*, 2012; Cechetti *et al.*, 2010, bajo anestesia general con ketamina (50 mg/kg de peso, im) y xilacina (10 mg/kg de peso, im) en condiciones asépticas, bajo microscopio estereoscópico (Leica Mod. S6E). Se localizó la arteria carótida común izquierda, la cual fue separada del nervio vago, se colocó una doble ligadura (seda 3-0) proximal a la bifurcación que da origen a las arterias carótidas interna y externa, una vez interrumpido el flujo sanguíneo por las ligaduras se realizó el corte de la carótida entre ambas ligaduras. Siete días después de la oclusión de la arteria carótida común izquierda se ocluyó la arteria carótida común derecha siguiendo el mismo procedimiento anestésico-quirúrgico utilizado para la ligadura y sección de la arteria carótida izquierda.

Al finalizar ambos procedimientos quirúrgicos se administró una dosis de diclofenaco (1 mg/kg de peso, im) y oxitetraciclina (2 mg/kg de peso, im).

6.3 Pruebas de evaluación del aprendizaje y de la memoria de trabajo espacial en el laberinto acuático en “T”

6.3.1 Laberinto acuático en “T” y entorno de la prueba

Para la evaluación del aprendizaje y de la memoria de trabajo espacial se utilizó un laberinto acuático en “T” (Fidalgo *et al.*, 2014; Del Arco *et al.*, 2007; Dudchenko, 2004; Aultman y Moghaddam, 2001). El laberinto consta de paredes de material acrílico de 1 cm de espesor, en el que se distinguen tres zonas básicas: compartimiento de inicio o salida, corredor central o principal y dos brazos, derecho e izquierdo, denominados meta (Aguayo-Del Castillo *et al.*, 2016). El corredor principal (100 cm x 20 cm x 40 cm) se conecta a los dos brazos laterales (45 cm x 20 cm x 40 cm) mediante dos puertas deslizantes de material acrílico que se accionan manualmente para cerrar cualquiera de los brazos (Fidalgo *et al.*, 2014). El laberinto se colocó dentro de una tina circular (140 cm de diámetro, 50 cm de altura) con agua teñida de azul (21±1°C). Al final de cada brazo se colocó una plataforma de escape (15 cm x 18 cm) sumergida 2 cm debajo de la superficie del agua. El laberinto se situó en un laboratorio en el que se colocaron objetos (señales espaciales) en lugares fijos del entorno, los cuales permitieron la orientación espacial de la rata (Modificado de: Del Arco *et al.*, 2007).

6.3.2 Tarea de no igualación a la muestra con retraso

La tarea de no igualación a la muestra con retraso (Dudchenko, 2004) tuvo como finalidad evaluar el aprendizaje mediante la adquisición de una regla (regla de la alternancia). La tarea tuvo una duración de doce días, en una secuencia pseudo-aleatoria de 10 ensayos por día. Cada ensayos consistió en una prueba “de muestra” y de una prueba “de elección”, y se realizaron de la siguiente manera: en la prueba “de muestra” se bloqueó el acceso a uno de los brazos de tal manera

que la rata solo tuvo acceso al otro de los brazos (brazo meta con plataforma de escape), una vez que la rata ingresó al brazo meta y encontró la plataforma de escape se cerró el brazo meta y se mantuvo a la rata en la plataforma durante 10 segundos. Transcurrido este tiempo, la rata fue retirada de la plataforma y colocada en una caja de acrílico ubicada por fuera del laberinto, donde la rata permaneció por 10 segundos más. Al finalizar este tiempo la rata fue colocada nuevamente en el compartimiento de inicio dentro del laberinto, para proceder a la “prueba de elección”. En la “prueba de elección” los accesos a los dos brazos se mantuvieron abiertos, de manera que la rata podía elegir el ingreso a uno u otro brazo, sin embargo, la plataforma de escape se colocó en el brazo meta que ahora fue el brazo opuesto al que la rata había accedido durante la primera prueba (“prueba de muestra”). Si durante esta “prueba de elección” la rata ingresaba al brazo meta que contenía la plataforma de escape y subía en ella, se le consideraba como un acierto y se mantenía en esa posición durante 10 segundos, pero, si la rata ingresaba al brazo sin la plataforma, el brazo se cerraba y se le mantenía en el agua durante 10 segundos. En ambos casos, al finalizar estos últimos 10 segundos se retiró al animal del brazo y fue alojado nuevamente en la caja de acrílico, en esta ocasión durante 30 segundos (intervalo interensayo), para posteriormente dar inicio al siguiente par de pruebas correspondientes al siguiente ensayo (Modificado de: Del Arco *et al.*, 2007).

6.3.3 Tarea de igualación a la muestra con respuesta retrasada

Al finalizar los doce días de la tarea de no igualación a la muestra con retraso, los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sometidos a la tarea de igualación a la muestra con respuesta retrasada, la cual tuvo como finalidad evaluar de manera indirecta el control inhibitor (inhibición de un conocimiento) de la corteza prefrontal mediante la respuesta de la memoria de trabajo espacial en la prueba. La tarea se realizó durante doce días en una secuencia pseudo-aleatoria de 10 ensayos por día. Cada ensayos consistió de una prueba “de muestra” y de una prueba “de elección”, y se realizaron de la siguiente manera: en la prueba “de muestra” se bloqueó el acceso a uno de los brazos de tal manera que el animal

solo tuvo acceso al otro de los brazos (brazo meta con plataforma de escape), una vez que el animal ingresó al brazo meta y encontró la plataforma de escape, se cerró el brazo meta y se mantuvo al animal en la plataforma durante 10 segundos. Transcurrido este tiempo, la rata fue retirada de la plataforma y colocada en una caja de acrílico ubicada por fuera del laberinto y donde el animal permaneció durante 10 segundos más. Al finalizar este tiempo el animal fue colocado nuevamente en el compartimiento de inicio dentro del laberinto, para proceder a la “prueba de elección”. En la “prueba de elección” los accesos a los dos brazos se mantuvieron abiertos, de manera que el animal podía elegir el ingreso a uno de los dos brazos; sin embargo, la plataforma de escape se colocó en el brazo meta que ahora fue el mismo brazo al que había ingresado durante la “prueba de muestra”. Si durante esta “prueba de elección” la rata ingresaba al brazo meta que contenía la plataforma de escape y subía en ella, se le consideraba como un acierto y se mantenía en esa posición durante 10 segundos pero, si la rata ingresaba al brazo sin la plataforma, el acceso a este brazo se cerraba y se mantenía al animal en el agua durante 10 segundos. En ambos casos, al finalizar estos últimos 10 segundos se retiró la rata del brazo y fue alojada nuevamente en la caja de acrílico, en esta ocasión durante 30 segundos (intervalo interensayo), para posteriormente dar inicio al par de pruebas correspondiente al siguiente ensayo (Modificado de: Del Arco *et al.*, 2007).

6.3.4 Parámetros conductuales

En ambas pruebas se registraron el número de ensayos resueltos apropiadamente o erróneamente (aciertos y errores) durante cada secuencia, durante los doce días de ensayos. Los resultados se expresaron como porcentaje de eficiencia (número de aciertos/número de ensayos). Se utilizó como criterio de aprendizaje una eficiencia de 70% (7 aciertos en cada 10 ensayos) por día (Modificado de: Del Arco *et al.*, 2007).

6.4 Obtención de muestras de tejido cerebral y procesamiento histológico

Al finalizar el periodo de evaluación en el laberinto acuático en “T”, los cerebros de cada uno de los animales de los diferentes grupos experimentales, se obtuvieron luego de perfusión intracardiaca de solución fijadora (solución amortiguadora de fosfatos a pH= 7.4, y formaldehído al 10%). La perfusión intracardiaca se realizó en los animales de experimentación bajo anestesia profunda. Después de la perfusión, los cerebros se retiraron de la cavidad craneal y se mantuvieron en inmersión en la misma solución de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos, durante al menos 2 días antes del procesamiento histológico.

6.4.1 Evaluación de la densidad y proporciones de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza prefrontal

Se obtuvieron muestras de tejido de la corteza prefrontal prelímbica/infralímbica (ventral-medial) (Paxinos y Watson, 2009), que fueron procesados mediante el método de Golgi modificado (González-Burgos *et al.*, 1992), para obtener 14 cortes seriados (250 μm de espesor) de cada cerebro. Se eligieron 5 neuronas en los cortes seriados correspondientes a la muestra de tejido obtenida de cada rata, en los diferentes grupos experimentales. En cada neurona, se evaluaron (analizador de imágenes histológicas Leica DM 100): el número de espinas dendríticas, en un segmento de 50 μm , en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical, así como la proporción de los diferentes tipos de espinas dendríticas, delgadas, hongos, gordas, anchas, ramificadas y dobles (Velázquez-Zamora *et al.*, 2012; González-Burgos, 2009; García-Chávez *et al.*, 2008).

6.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico para las tareas de no igualdad a la muestra con retraso y de la tarea de igualdad de la muestra con respuesta retrasada se realizaron mediante análisis de varianza de medidas repetidas, seguido de una prueba de Tukey post hoc. Los datos se expresaron como medias $\pm$ EE. Diferencias significativas: $p \leq 0.05$ (Downie y Heath, 1983; Siegel, 1956).

La densidad de espinas dendríticas de las capas III y V de la corteza prefrontal se realizó mediante un análisis de varianza de una vía, seguido por una prueba de Tukey post hoc. La proporción de los distintos tipos de espinas dendríticas se realizó mediante análisis de varianza y prueba de Bonferroni post-hoc. Los datos se expresaron como medias $\pm$ EE. Diferencias significativas: $p \leq 0.05$ (Downie y Heath, 1983; Siegel, 1956).

7. Resultados

7.1 Evaluación funcional de la corteza prefrontal mediante la tarea de no igualación a la muestra con retraso

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en esta prueba.

Tabla 1. Eficiencia (número de aciertos/número de pruebas, %) mostrada por las ratas de los cuatro grupos experimentales, en cada uno de los 12 días de prueba en la tarea de no igualación a la muestra, con retraso.

	Intacto	OVX	VEH	RAX
1	33.8 ± 4.2	17.5 ± 4.1 *	25.0 ± 3.8	28.8 ± 4.0
2	50.0 ± 3.8	26.3 ± 2.6 *	42.5 ± 6.2	35.0 ± 4.2
3	52.5 ± 5.3	28.8 ± 4.0 *♦	52.5 ± 4.5	47.5 ± 5.9
4	58.8 ± 3.0	36.3 ± 3.2 *#	50.0 ± 3.8	52.5 ± 5.6
5	61.3 ± 4.0	46.3 ± 4.2 ♦	68.8 ± 4.4	56.3 ± 5.7
6	66.3 ± 4.2	61.3 ± 2.3	68.0 ± 5.3	63.8 ± 3.2
7	71.3 ± 3.5	60.0 ± 4.6	69.0 ± 5.5	71.3 ± 3.5
8	72.5 ± 5.6	67.5 ± 3.1	76.3 ± 4.9	78.8 ± 3.0
9	88.8 ± 3.5	73.8 ± 5.0	78.8 ± 5.2	83.8 ± 4.2
10	82.5 ± 3.7	76.3 ± 1.8	78.8 ± 4.4	86.3 ± 2.6
11	86.3 ± 3.8	83.8 ± 2.6	85.0 ± 3.3	76.3 ± 4.6
12	87.5 ± 3.7	80.0 ± 3.3	83.8 ± 2.6	82.5 ± 3.7

Media ± EE, n= 8 en cada grupo. Diferencias significativas: p ≤0.05.

*vs Intacto; #vs RAX; ♦vs VEH.

Los datos obtenidos en esta tarea muestran que, tanto el grupo Intacto como el grupo RAX alcanzaron el 70% de eficiencia a partir del séptimo día y sus porcentajes se mantuvieron por arriba de este valor hasta finalizar los doce días

de pruebas (figura 2). El grupo tratado con vehículo (VEH) alcanzó el 70% de eficiencia en el octavo día y el grupo OVX, en el noveno día de prueba (figura 2). Puede observarse (tabla 1) que la eficiencia en el desempeño de la tarea en el grupo OVX fue significativamente menor que la del Intacto, durante los primeros cuatro días de prueba, significativamente menor que la del grupo VEH en los días 3 y 5, y significativamente menor que la del grupo RAX en el día 4.

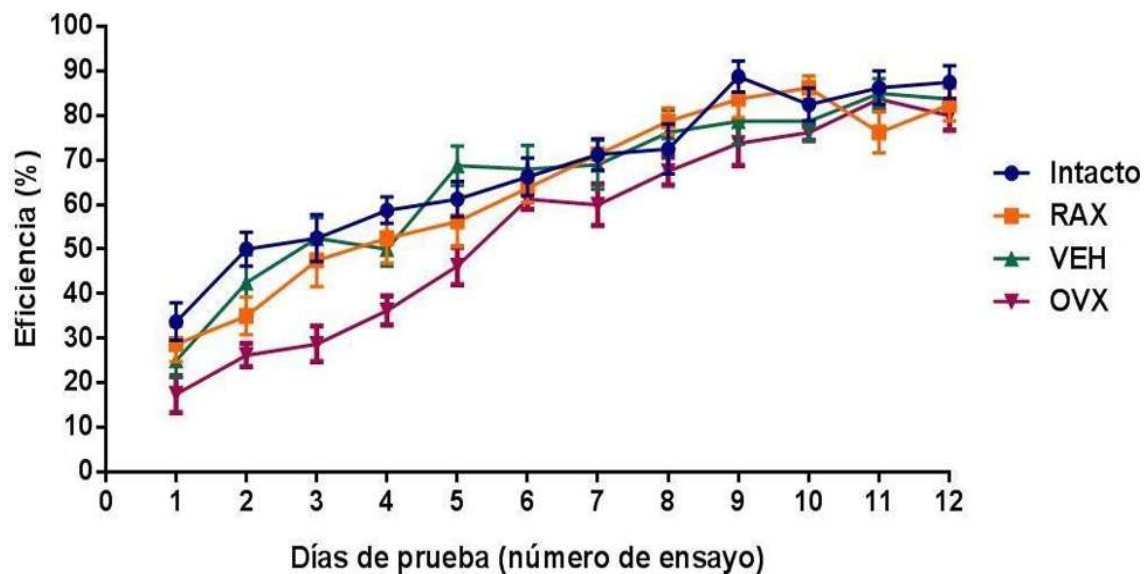


Figura 2. Eficiencia (número de aciertos/número de pruebas, %) del aprendizaje de la tarea de no igualación a la muestra, con retraso en los diferentes grupos experimentales. Los datos se muestran como media $\pm$ EE ($n=8$ en cada grupo).

7.2 Evaluación funcional de la corteza prefrontal mediante la tarea de igualación a la muestra con respuesta retrasada

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en esta prueba.

Tabla 2. Eficiencia (número de aciertos/número de pruebas, %) mostrada por las ratas de los cuatro grupos experimentales, en cada uno de los 12 días de prueba en la tarea de igualación a la muestra, con respuesta retrasada.

	Intacto	OVX	VEH	RAX
1	30.0 ± 3.3	17.5 ± 3.1*	26.3 ± 4.2	18.8 ± 4.0
2	35.0 ± 3.3	22.5 ± 3.1*	23.8 ± 3.2	33.8 ± 4.2
3	45.0 ± 2.7	25.0 ± 5.0*	28.8 ± 3.5*	28.8 ± 4.0*
4	48.8 ± 2.3	42.5 ± 3.1	30.0 ± 2.7*	42.5 ± 4.9
5	63.8 ± 3.2	32.5 ± 3.7*	36.3 ± 5.0*	45.0 ± 3.3*
6	71.3 ± 3.0	41.3 ± 4.4*	40.0 ± 3.8*	60.0 ± 6.0 [#]
7	72.5 ± 3.7	51.1 ± 4.8*	41.3 ± 3.0*	68.8 ± 1.33 [#]
8	80.0 ± 3.8	53.8 ± 3.8*	56.3 ± 3.8*	73.8 ± 1.8 [#]
9	81.3 ± 3.0	71.3 ± 4.4 [♦]	55.0 ± 4.2*	81.3 ± 2.3
10	86.3 ± 3.8	73.8 ± 1.8*	71.3 ± 4.0*	85.0 ± 2.7 [#]
11	82.5 ± 1.6	75.0 ± 4.2	67.5 ± 3.7*	81.1 ± 3.0
12	85.0 ± 2.7	73.8 ± 5.0	81.3 ± 3.5	83.8 ± 1.8

Media ± EE, n= 8 en cada grupo. Diferencias significativas: p ≤0.05.

*vs Intacto; [♦]vs VEH; [#]vs OVX

Los datos obtenidos en esta tarea muestran que, el grupo Intacto alcanzó el 70% de eficiencia al sexto día de prueba. El grupo RAX alcanzo el 70% de eficiencia al séptimo día de prueba. En cuanto al grupo VEH, el 70% de eficiencia lo alcanzó a partir del décimo día de prueba, por último, el grupo OVX obtuvo el porcentaje de eficiencia en el noveno día de prueba (figura 3). Puede observarse (tabla 1) que la eficiencia en el desempeño de la tarea en el grupo OVX fue significativamente

menor que la del Intacto, a excepción de los días 4, 11 y 12. Además el grupo OVX únicamente presentó diferencias significativas con el grupo VEH al noveno día de prueba. En cuanto al grupo RAX, no tuvo diferencias significativas con el grupo Intacto, a excepción del tercer y quinto día de prueba. Por último, el grupo RAX tuvo diferencias significativas con el grupo OVX del sexto al noveno días de pruebas.

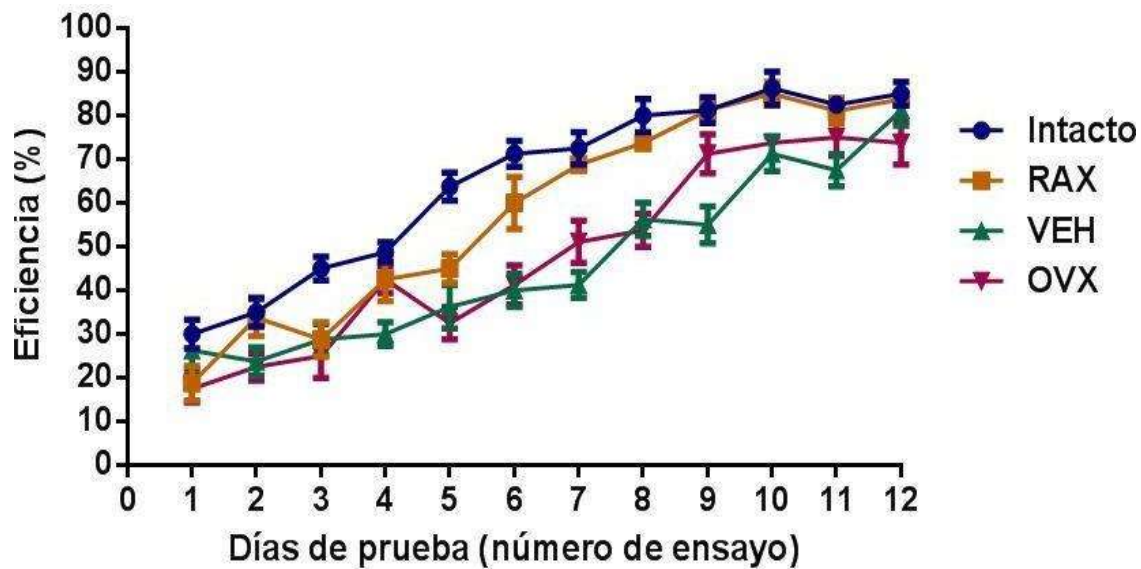


Figura 3. Eficiencia (número de aciertos/número de pruebas, %) del aprendizaje de la tarea de igualación a la muestra, con respuesta retrasada en los diferentes grupos experimentales. Los datos se muestran como media $\pm$ EE ($n=8$, en cada grupo).

7.3 Densidad de las espinas dendríticas

Los valores de la densidad de espinas (número de espinas /50 μm) en neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza prefrontal se muestran en la figura 4 y 5, respectivamente. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, con reducción significativa del número de espinas de los grupos OVX, VEH, y RAX, en comparación con el grupo Intacto. En la capa III, la menor densidad de espinas correspondió al grupo OVX.

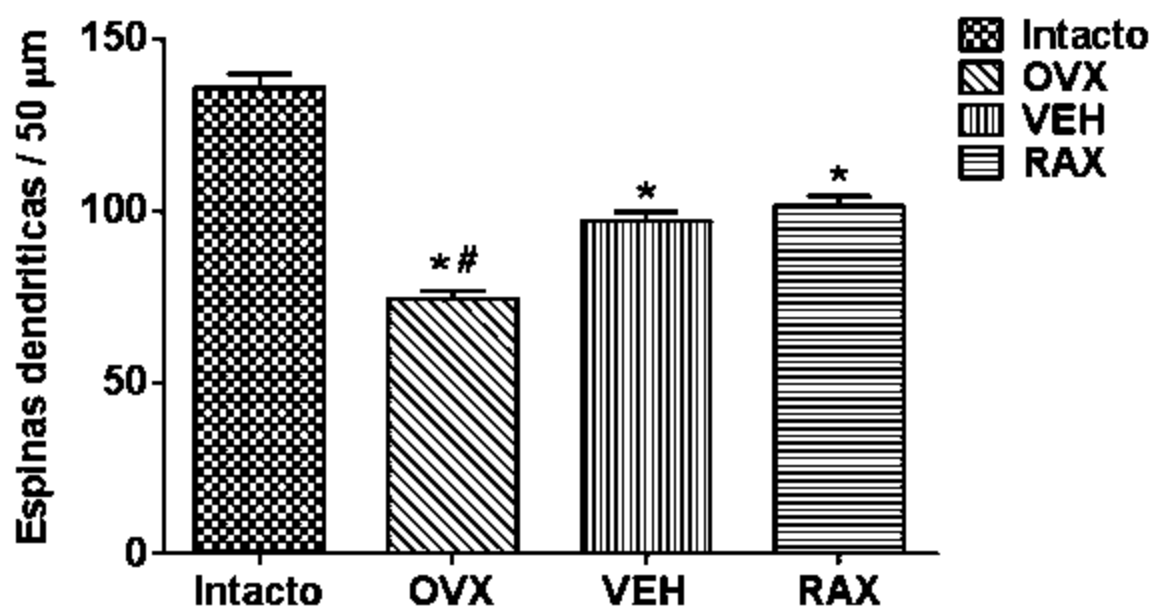


Figura 4. Densidad de espinas dendríticas (número de espinas/50 μm) en las neuronas piramidales en la capa III de la corteza prefrontal. Puede observarse la reducción significativa del número de espinas en los grupos RAX, OVX, y VEH en comparación con el grupo Intacto; así como del grupo OVX en comparación con el grupo VEH. Los datos se muestran como media $\pm$ EE, $n = 4$ en cada grupo. Diferencias significativas $p \leq 0.05$. *vs Intacto; #vs VEH.

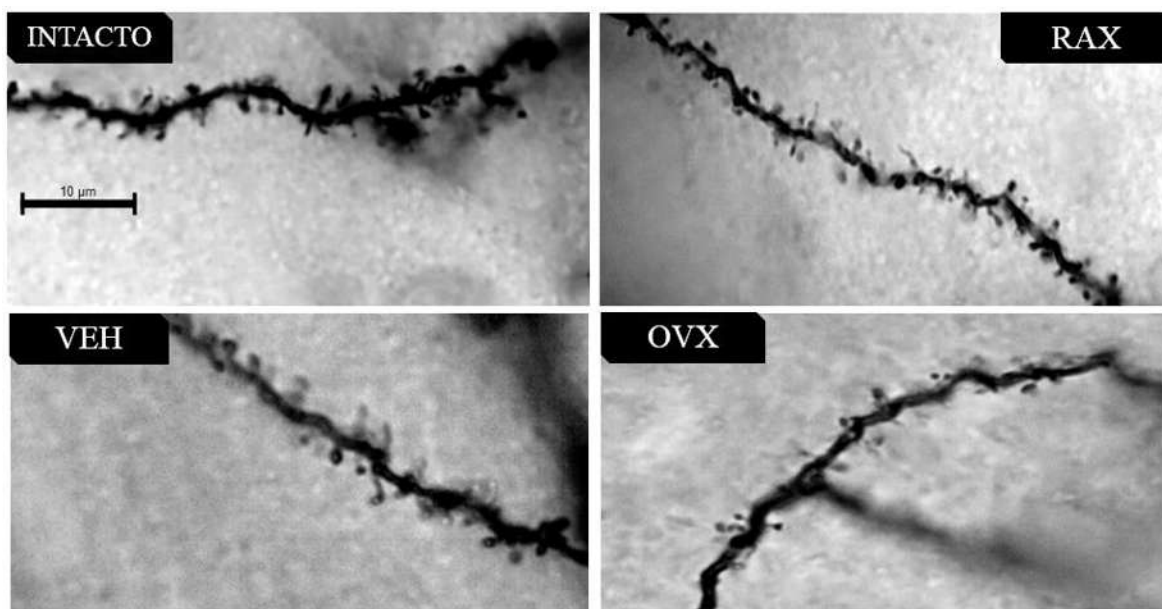


Figura 5. Fotomicrografías representativas de segmentos (50 μm) en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical en las neuronas piramidales en la capa III en la corteza prefrontal, en los diferentes grupos experimentales. Intacto; RAX: ratas ovariectomizadas con modelo de 2VO y administración de raloxifeno; VEH: ratas ovariectomizadas, con modelo de 2VO y administración de vehículo dimetilsulfóxido; OVX: ratas ovariectomizadas con simulación del modelo de 2VO. Se puede observar una menor cantidad de espinas y la estructura más delgada de la dendrita en los grupos OVX y VEH en comparación con el grupo Intacto. Barra de calibración = 10 μm .

En la capa V también la menor densidad de espinas se encontró en los grupos OVX, VEH y RAX. Los grupos OVX y VEH mostraron una cantidad de espinas similares.

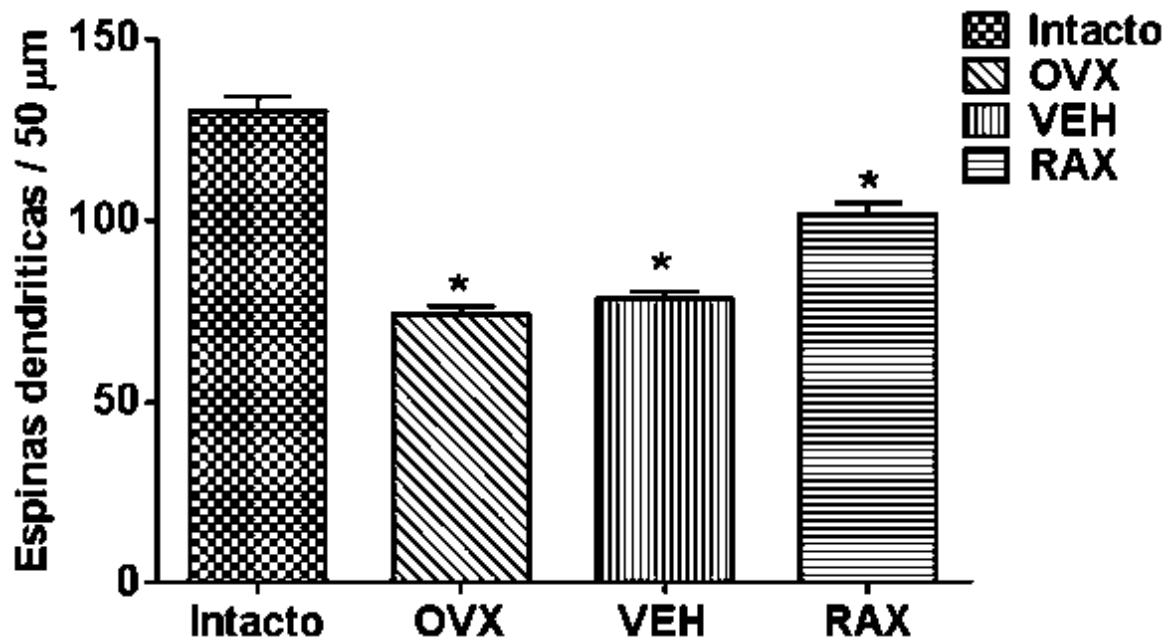


Figura 6. Densidad de espinas dendríticas (número de espinas/50 μm) en las neuronas piramidales en la capa V de la corteza prefrontal. Puede observarse la reducción significativa del número de espinas en los grupos RAX, OVX, y VEH en comparación con el grupo Intacto; Los datos se muestran como media ± EE, n= 4 en cada grupo. Diferencias significativas $p \leq 0.05$ *vs Intacto.

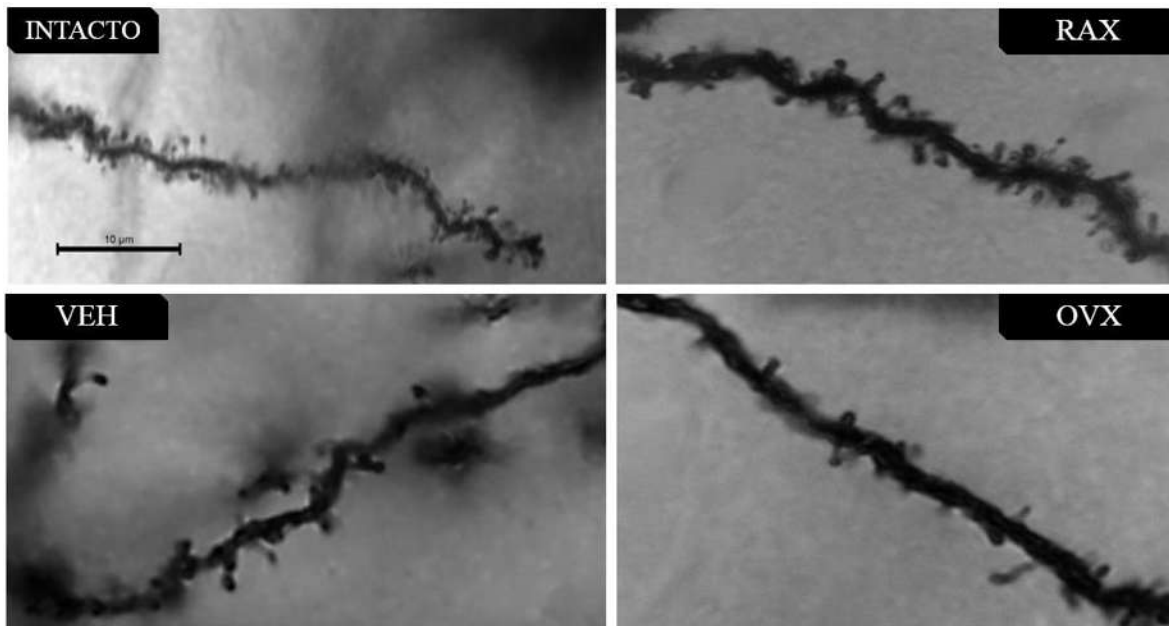


Figura 7. Fotomicrografías representativas de segmentos (50 μm) en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical en las neuronas piramidales en la capa V en la corteza prefrontal, en los diferentes grupos experimentales. Intacto; RAX: ratas ovariectomizadas con modelo de 2VO y administración de raloxifeno; VEH: ratas ovariectomizadas, con modelo de 2VO y administración de vehículo dimetilsulfóxido; OVX: ratas ovariectomizadas con simulación del modelo de 2VO. Se puede observar una menor cantidad de espinas y la estructura más delgada de la dendrita en los grupos OVX y VEH en comparación con el grupo Intacto. Barra de calibración = 10 μm .

7.4 Proporción de diferentes tipos de espinas

Los valores correspondientes a las proporciones de los diferentes tipos de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la capa III de la corteza prefrontal se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Proporción de los tipos de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa III en la corteza prefrontal, en los cuatro grupos experimentales.

	Intacto	%	OVX	%	VEH	%	RAX	%
Total de espinas	135.8 ± 4.0	100	74.4 ± 2.4	100	97.2 ± 2.5	100	101.4 ± 3.0	100
Delgada	42.8 ± 3.6	31.5	35.2 ± 2.6 [*]	47.3	37.4 ± 1.2 [*]	38.5	29.2 ± 0.7 ^{*♦}	28.8
Hongo	80.8 ± 1.4	59.5	28.0 ± 1.8 [*]	37.6	43.6 ± 1.3 [*]	44.9	59.4 ± 0.7 ^{**#}	58.6
Ancha	7.6 ± 0.7	5.6	4.6 ± 0.2	6.2	8.2 ± 0.4	8.4	8.2 ± 0.3	8.1
Gorda	4.4 ± 0.7	3.2	6.0 ± 0.4	8.1	6.6 ± 0.6	6.8	4.0 ± 0.4	3.9
Bifurcada	0.0 ± 0.0	0.0	0.2 ± 0.1	0.3	0.2 ± 0.1	0.2	0.4 ± 0.1	0.4
Doble	0.2 ± 0.1	0.1	0.4 ± 0.1	0.5	1.2 ± 0.3	1.2	0.2 ± 0.1	0.2

Media ± EE. Diferencias significativas: $p \leq 0.05$ ^{*}vs Intacto; [#]vs OVX; [♦]vs VEH.

La proporción de espinas delgadas fue mayor en el grupo Intacto en comparación con cualquiera de los otros grupos experimentales, la menor proporción en los grupos en los grupos OVX y RAX ($p \leq 0.05$ en comparación con el grupo Intacto). La proporción de las espinas en hongo fue significativamente menor en los grupos OVX y VEH, en comparación con el grupo Intacto; no se observaron diferencias en las proporciones de otros tipos de espinas.

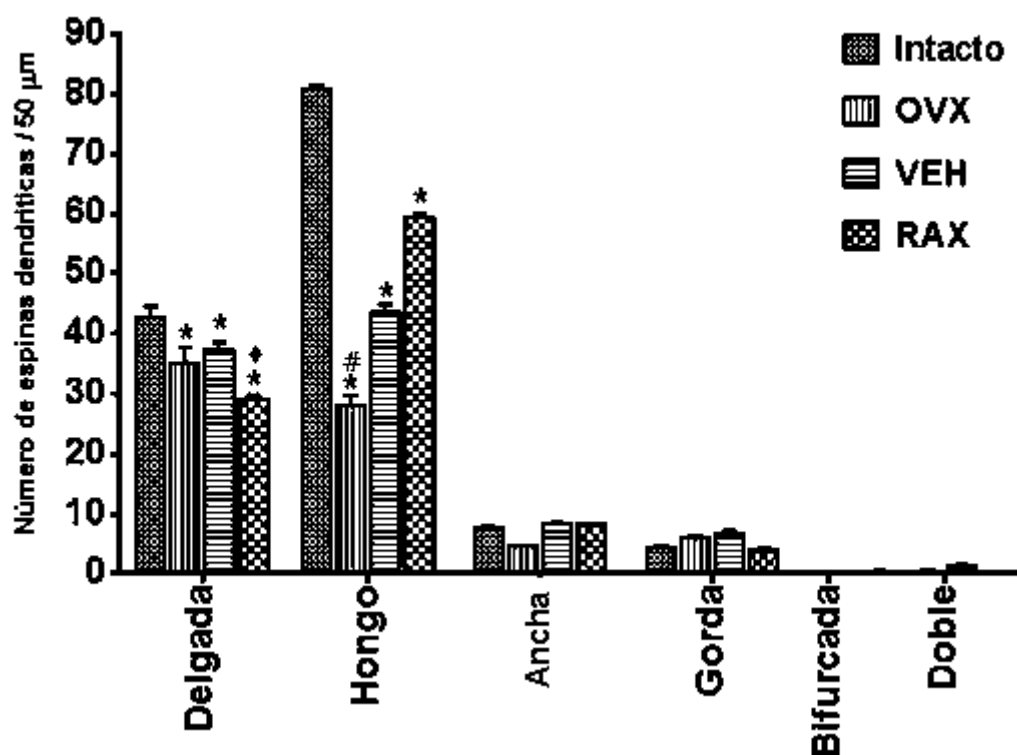


Figura 8. Proporción de los diferentes tipos de espinas por segmento (50 μ m) en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical en las neuronas piramidales en la capa III en la corteza prefrontal, en los diferentes grupos experimentales. Intacto; RAX: ratas ovariectomizadas con modelo de 2VO y administración de raloxifeno; VEH: ratas ovariectomizadas, con modelo de 2VO y administración de vehículo dimetilsulfóxido; OVX: ratas ovariectomizadas con simulación del modelo de 2VO. La proporción de espinas delgadas y en hongo fue menor en los grupos OVX, VEH y RAX que en el grupo Intacto. La proporción de espinas en hongo fue también menor en el grupo OVX que en el grupo VEH. Los datos se presentan como media $\pm$ EE. Diferencias significativas: $p \leq 0.05$ *vs Intacto; #vs RAX; ♦vs VEH.

En las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal la proporción de espinas delgadas fue mayor en el grupo Intacto en comparación con cualquiera de los otros grupos experimentales (tabla 4), la menor proporción en los grupos RAX y OVX ($p \leq 0.05$) en comparación con el Intacto con diferencias significativas con respecto al grupo VEH $p \leq 0.05$ en comparación con el grupo RAX); la proporción

de espinas en hongo fue mayor en el grupo Intacto en comparación con los otros grupos experimentales, la menor proporción VEH y OVX ($p \leq 0.05$ en comparación con el Intacto), con valores significativamente mayores en el grupo RAX en comparación con los grupos VEH y OVX ($p \leq 0.05$).

Tabla 4. Proporción de los tipos de espinas dendríticas de las neuronas piramidales en la capa V en la corteza prefrontal, en los cuatro grupos experimentales.

	Intacto	%	OVX	%	VEH	%	RAX	%
Total de espinas	130.2 ± 4.0	100	74.2 ± 2.1	100	78.4 ± 2.2	100	101.8 ± 3.1	100
Delgada	39.4 ± 1.6	30.3	24.4 ± 1.2 ^{*♦}	32.9	32.0 ± 1.6 [*]	40.8	23.6 ± 1.1 ^{*♦}	23.2
Hongo	78.8 ± 2.5	60.5	38.8 ± 0.2 [*]	52.3	33.0 ± 2.0 [*]	42.1	60.8 ± 2.1 ^{*♦}	59.7
Ancha	7.0 ± 0.3	5.4	5.8 ± 0.3	7.8	7.2 ± 0.8	9.2	8.8 ± 0.3	8.6
Gorda	4.4 ± 0.4	3.4	5.0 ± 0.3	6.7	5.6 ± 0.8	7.1	7.8 ± 0.9	7.7
Bifurcada	0.2 ± 0.1	0.2	0.2 ± 0.1	0.3	0.2 ± 0.1	0.3	0.6 ± 0.1	0.6
Doble	0.4 ± 0.1	0.3	0.0 ± 0.0	0.0	0.4 ± 0.1	0.5	0.2 ± 0.1	0.2

Media ± EE. Diferencias significativas: $p \leq 0.05$ ^{*}vs Intacto; [♦]vs VEH.

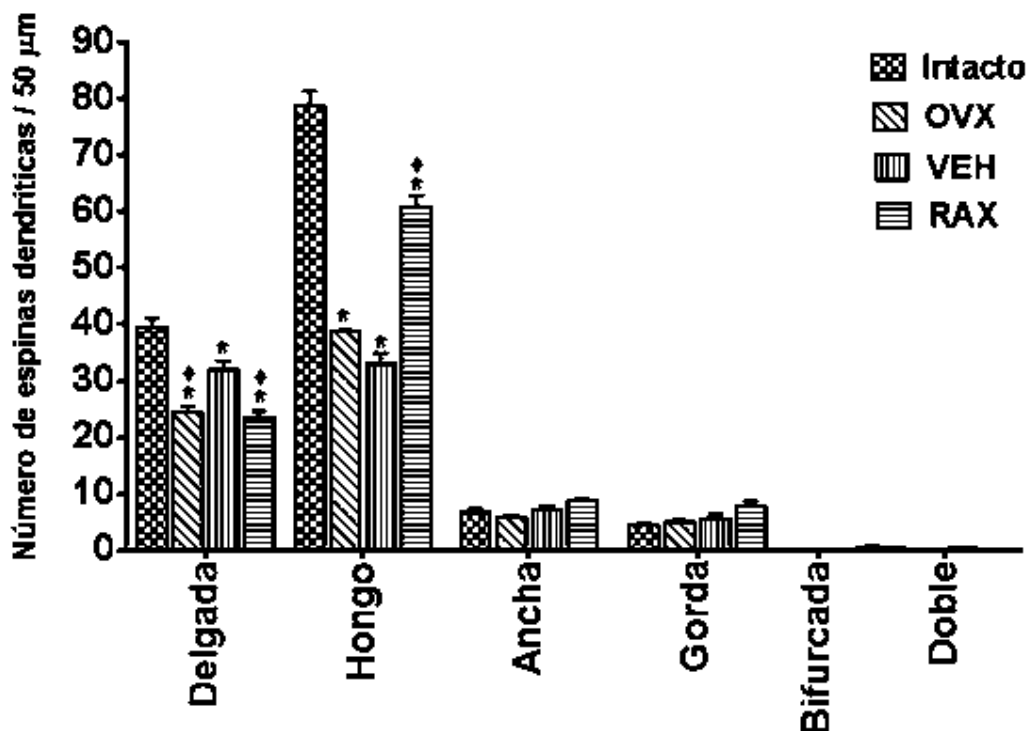


Figura 9. Proporción de los diferentes tipos de espinas por segmento (50 μm) en la primera ramificación secundaria de la dendrita apical en las neuronas piramidales en la capa V en la corteza prefrontal, en los diferentes grupos experimentales. Intacto; RAX: ratas ovariectomizadas con modelo de 2VO y administración de raloxifeno; VEH: ratas ovariectomizadas, con modelo de 2VO y administración de vehículo dimetilsulfóxido; OVX: ratas ovariectomizadas con simulación del modelo de 2VO. Los grupos OVX, VEH y RAX presentaron una menor proporción de espinas delgadas y en hongo que el grupo Intacto. El grupo RAX presentó menor cantidad de espinas delgadas y mayor proporción de espinas en hongo, que el grupo VEH. Los datos se presentan como media $\pm$ EE. Diferencias significativas: $p \leq 0.05$ *vs Intacto; ♦vs VEH.

8. Discusión

La participación fundamental de la corteza prefrontal en procesos cerebrales complejos que dan lugar al desarrollo y mantenimiento de las capacidades cognitivas, aprendizaje, memoria; así como la toma de decisiones, la flexibilidad del comportamiento, el razonamiento, la planeación, entre otras, ha sido descrita en diversos estudios (Funahashi, 2017^a; Mushiake *et al.*, 2009; Seamans *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2002).

En este sentido, las conexiones aferentes de otras estructuras cerebrales (hipocampo, amígdala, entre otras) mediante terminales axónicas que establecen sinapsis con las neuronas piramidales de la corteza prefrontal; así como la conectividad de las neuronas en los propios circuitos neuronales de esta estructura, proveen el sustrato neural para el flujo y procesamiento de información, relacionados con los procesos de aprendizaje y memoria (Eichenbaum, 2017; Siddiqui *et al.*, 2008; Van Eden y Buijs, 2000;).

Entre las estructuras celulares que forman parte del sustrato neural de estos procesos de conectividad sináptica, tiene un papel muy importante el número y características de las espinas dendríticas localizadas en las arborizaciones, basales y apicales, de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal (Kruögel *et al.*, 2013; Rich y Shapiro, 2009). Las espinas dendríticas son las estructuras post-sinápticas principales para la comunicación celular excitatoria en el sistema nervioso central, en la que están involucradas de varias maneras en la recepción y procesamiento de estímulos aferentes, dependiendo de su densidad y configuración (González-Burgos, 2012; González-Burgos, 2009; Kasai *et al.*, 2003). De hecho, la correlación entre estas características y la eficiencia en la ejecución de tareas cognitivas forma parte del abordaje experimental del funcionamiento de la corteza prefrontal (Velázquez-Zamora *et al.*, 2012; Velázquez-Zamora *et al.*, 2011; González-Burgos, 2009; García-Chávez *et al.*, 2008).

Así mismo, se ha descrito que las acciones estrogénicas constituyen un factor importante para la regulación del número y características de espinas dendríticas

en las neuronas piramidales y para la conectividad sináptica de los circuitos neuronales de la corteza prefrontal, en roedores (Galvin y Ninan, 2014; Khan *et al.*, 2013). Se ha mostrado que las espinas dendríticas en las neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza prefrontal, así como en neuronas hipotalámicas, varían en relación directa con las concentraciones plasmáticas del estradiol sintetizado en el ovario y con la síntesis de estradiol en estructuras cerebrales (González-Burgos *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2009; Prange-Kiel *et al.*, 2009; Hojo *et al.*, 2008; González-Burgos *et al.*, 2005).

Los resultados del presente estudio sustentan la participación relevante de las acciones estrogénicas en la regulación del número y características de las espinas dendríticas y en la conectividad de los circuitos neuronales de la corteza prefrontal. En efecto, las consecuencias de la ovariectomía (grupo OVX, sin 2VO) fueron la reducción significativa del número de espinas en las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal; así como la modificación de las proporciones relativas de las espinas en hongo y delgadas (37% y 47%, respectivamente) en comparación con las proporciones relativas en los animales intactos (59% y 31% respectivamente), en las neuronas piramidales de la capa III de la corteza prefrontal. El significado de estas alteraciones podría ser una disminución en la eficiencia de la conectividad sináptica por efecto de la ovariectomía, dado que la densidad de espinas dendríticas y en particular las espinas en hongo han sido consideradas como parte del sustrato neuronal con mayor eficiencia en la comunicación sináptica excitatoria (Harris, 1999; Harris y Kater 1994).

Las alteraciones de la densidad y proporciones relativas de las espinas dendríticas que ocurrieron en las capas III y V de la corteza prefrontal, en los animales ovariectomizados, así como sus posibles consecuencias en la conectividad sináptica, pueden estar relacionadas, en el presente estudio, con su ejecución deficiente en las pruebas en el laberinto acuático en T. En este sentido, se ha descrito que las características de las espinas dendríticas dependientes de las acciones estrogénicas representan cambios en la conectividad y flujo de información (aferente y en los propios circuitos neuronales) requeridas para el

adecuado desempeño de las funciones cognoscitivas (Frankfurt y Luine, 2015; Velázquez-Zamora *et al.*, 2014; Luine y Frankfurt, 2013; González-Burgos, 2012; Luine y Frankfurt, 2012; Bailey *et al.*, 2011; Bourne y Harris, 2007).

A este respecto, en el diseño experimental utilizado en el presente estudio, la prueba de no igualación a la muestra tuvo como objeto mostrar la capacidad de los animales de los diferentes grupos experimentales en el aprendizaje y utilización de la información aprendida en una tarea con reglas definidas (alternancia en el acceso a los brazos de la T); en tanto que la prueba subsecuente de igualación a la muestra debe ser la expresión de la capacidad de los animales para dejar de utilizar la información aprendida previamente y utilizar nueva información para resolver la tarea bajo nuevas reglas (no alternancia en el acceso a los brazos de la T). Los procesos neurales involucrados en el cambio de estrategias de acuerdo a las nuevas circunstancias en que debe darse el desempeño conductual y la ejecución adecuada de ambas pruebas depende de la integridad morfológica y funcional de la corteza prefrontal (Eichenbaum, 2017; Funahashi, 2017^a, Funahashi, 2017^b; Aguayo-Del Castillo *et al.*, 2016; Rich y Shapiro, 2009; Dudchenko, 2004).

De hecho, en el presente estudio, la ausencia de estrógenos de origen ovárico con o sin hipoperfusión cerebral crónica (grupo VEH, grupo OVX), dio lugar al desempeño deficiente en el laberinto acuático en T, coincidente con la reducción importante de la densidad y cambios en las proporciones relativas de espinas dendríticas en las capas III y V (especialmente en la capa V) de la corteza prefrontal, en comparación con los mismos parámetros observados en los animales del grupo intacto. Estos resultados sustentarían la participación relevante de las acciones estrogénicas en el mantenimiento del sustrato neural subyacente a la expresión de funciones cognoscitivas dependientes de la corteza prefrontal.

La posibilidad, planteada en el presente estudio, de que la hipoperfusión cerebral crónica agregara componentes de daño cerebral y deterioro cognoscitivo a las consecuencias de la supresión de acciones estrogénicas dependientes de la secreción ovárica de estrógenos, no ha sido sustentada con base en los presentes

resultados. En efecto las alteraciones de la densidad y proporciones relativas de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, así como el deterioro cognoscitivo no fueron significativamente diferentes en los animales ovariectomizados con hipoperfusión cerebral crónica (grupo VEH) en comparación con las observadas en los animales solamente ovariectomizados (grupo OVX). Cabría la posibilidad de que algunos mecanismos de angiogénesis y neuroplasticidad, inducidos por la propia reducción del flujo sanguíneo, hubieran operado a largo plazo en contra de procesos fisiopatológicos, en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, que de otra manera se habrían agregado a la reducción de acciones estrogénicas, como causas de alteraciones de las espinas dendríticas y deterioro de funciones cognoscitivas y (Cho *et al.*, 2017).

Por otra parte, los resultados del presente estudio muestran el efecto del tratamiento a largo plazo con raloxifeno en contra de las alteraciones de la densidad y proporciones relativas de las espinas dendríticas en la corteza prefrontal, asociadas a deterioro cognoscitivo, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos y condiciones de hipoperfusión cerebral crónica. A este respecto, se ha descrito que los SERMs pueden regular el número y características de las espinas dendríticas en estructuras cerebrales, tales como hipocampo y corteza prefrontal, involucradas en funciones cognoscitivas dependientes de estrógenos (González-Burgos *et al.*, 2012; Velázquez-Zamora *et al.*, 2012). Se ha propuesto que, para estos efectos, los moduladores selectivos de receptores a estrógenos activan los elementos de respuesta estrogénica, mediados por diferentes tipos de receptores estrogénicos en neuronas y en células gliales, que pueden dar lugar a la preservación de la conectividad y la promoción de cambios plásticos, ante variaciones de las concentraciones y acciones de estrógenos ováricos y en condiciones de daño cerebral, en estructuras cerebrales involucradas en la integración de funciones cognoscitivas (Borrow y Handa, 2017; González-Flores *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2014; Kramár *et al.*, 2009; Sharma y Mehra, 2008; Zhou *et al.*, 2002).

También se han descrito los efectos de raloxifeno en contra de mecanismos fisiopatológicos de daño y muerte neuronal en condiciones de hipoperfusión

cerebral crónica, tales como: fenómenos pro-inflamatorios, activación glial, secreción de TNF α e interleucinas; daño oxidativo, lesión del citoesqueleto; así como favoreciendo la regulación de la expresión de factores tróficos como BDNF y de proteínas pro-y anti apoptóticas, Bcl 2 y Bax (Segura-Uribe *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2016; Khan, 2016; Khan *et al.*, 2014; Konyalioglu *et al.*, 2007). Estos efectos generarían condiciones para la preservación del sustrato neural involucrado en las funciones cognoscitivas, en contra de fenómenos fisiopatológicos de daño y alteración funcional inducidos por la reducción del flujo sanguíneo bajo hipoperfusión cerebral crónica (Du *et al.*, 2016; Azzubaidi *et al.*, 2012; Cechetti *et al.*, 2012^a; Cechetti *et al.*, 2012^b; Jia *et al.*, 2012;).

Así, en el presente estudio, al término del tratamiento con raloxifeno, la densidad de espinas dendríticas fue significativamente mayor en las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal, en comparación con los animales ovariectomizados, con o sin hipoperfusión cerebral crónica (grupos OVX, VEH); con proporciones relativas de espinas delgadas y en hongo similares a las observadas en los animales intactos. Estas características del sustrato neural de conectividad sináptica, en los animales tratados con raloxifeno, podrían estar relacionadas con su eficiencia en la ejecución de las pruebas cognoscitivas (no igualación e igualación a la muestra en el laberinto acuático en T), dependientes de la corteza prefrontal, semejante a la de los animales intactos.

9. Conclusiones

- La supresión de los estrógenos sintetizados en el ovario, y de sus acciones estrogénicas en cerebro, en presencia o ausencia de hipoperfusión cerebral crónica, provoca reducción de la densidad de espinas dendríticas y alteración de las proporciones relativas de las espinas dendríticas delgadas y en hongo en las capas III y V de la corteza prefrontal.
- Estas alteraciones de la estructura de conectividad sináptica de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal se relacionan con deterioro de la eficiencia en la ejecución de funciones cognitivas dependientes del funcionamiento de la corteza prefrontal.
- El tratamiento a largo plazo con raloxifeno, un fármaco representativo de moduladores selectivos de receptores a estradiol, preserva la eficiencia de las funciones cognitivas dependientes del funcionamiento de la corteza prefrontal, con características similares a la observada en los animales intactos, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos y/o hipoperfusión cerebral crónica.
- Los efectos del tratamiento a largo plazo con raloxifeno sobre la eficiencia de funciones cognitivas de la corteza prefrontal se asocia con reducción de la alteración de la densidad de las espinas dendríticas y de la modificación de las proporciones relativas de espinas delgadas y en hongo, en las células piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos y/o hipoperfusión cerebral crónica.
- Los resultados del presente estudio sustentan el efecto neuroprotector del raloxifeno, en contra de las alteraciones estructurales de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal, así como el deterioro cognoscitivo atribuibles a la supresión de los estrógenos sintetizados en el ovario, y de sus acciones estrogénicas en cerebro, así como a posibles mecanismos fisiopatológicos de daño cerebral inducidos por hipoperfusión cerebral crónica.

10. Bibliografía

- Abdelhamid, R., Luo, J., VandeVrede, L., Kundu, I., Michalsen, B., Litosh, V. A., Schiefr, I. T., Gherezghiher, T., Yao, P., Qin, Z., and Thatcher G. R. J. (2011). Benzothiophene selective estrogen receptor modulators provide neuroprotection by a novel GPR30-dependent mechanism. *ACS Chem Neurosci*, 2(5), 256–268. doi: [10.102/cn100106a](https://doi.org/10.102/cn100106a)
- Aguayo-Del Castillo, A., Sánchez-Castillo, H., y Casasola-Castro, C. (2016). Alternancia espacial: el laberinto en forma de T, sus procedimientos y procesos. *Rev Mex Neuroci*, 17(5), 36-48.
- Alexander, A., Irving, A. J., and Harvey J. (2017). Emerging roles for the novel estrogen-sensing receptor GPER1 in the CNS. *Neuropharmacology*, 113(partB), 652-660. doi: [10.1016/j.neuropharm.2016.07.003](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.003)
- Almey, A., Milner, T. A., and Brake, W. G. (2015). Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Horm Behav*, 74, 125-138. doi: [10.1016/j.yhbeh.2015.06.010](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.010)
- Al-Qazzaz, N. K., Ali, S. H., Ahmad, S. A., Islam, S., and Mohamad, K. (2014). Cognitive impairment and memory dysfunction after stroke diagnosis: a post-stroke memory assessment. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 9(10), 1677-1691. doi: [10.2147/NDT.S67184](https://doi.org/10.2147/NDT.S67184)
- An, K-C. (2016). Selective estrogen receptor modulators. *Asian Spine J*, 10(4), 787-791. doi: [10.4184/asj.2016.10.4.787](https://doi.org/10.4184/asj.2016.10.4.787)
- Arevalo, M. A., Santos-Galindo, M., Lagunas, N., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. (2011). Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents. *J Mol Endocrinol*, 46(1), 1–9. doi: [10.1677 / JME-10-0122](https://doi.org/10.1677 / JME-10-0122)

- Aultman, M. J., and Moghaddam, B. (2001). Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology*, 153(3), 353-364. doi: [10.1007/s002130000590](https://doi.org/10.1007/s002130000590)
- Azzubaidi, M. S., Saxena, A. K., Talib, N. A., Ahmed, Q. U., and Dogarai, B. B. (2012). Protective effect of treatment with black cumin oil on spatial cognitive functions of rats that suffered global cerebrovascular hypoperfusion. *Acta Neurobiol Exp*, 72(2), 154-165.
- Baddeley, A. (2012). Working memory: Theories, models, and controversies. *Annu Rev Psychol*, 63, 1-29. doi: [10.1146/annurev-psych-120710-100422](https://doi.org/10.1146/annurev-psych-120710-100422)
- Bailey, M. E., Wang, A. C., Hao, J., Janssen, W. G., Hara, Y., Dumitriu, D., Hof, P. R., and Morrison, J. H. (2011). Interactive effects of age and estrogen on cortical neurons: implications for cognitive aging. *Neuroscience* 191, 148–158. doi: [10.1016/j.neuroscience.2011.05.045](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.045)
- Bean, L. A., Iancov, L., and Foster, T. C. (2014). Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist*, 20(5), 534-545. doi: [10.1177/1073858413519865](https://doi.org/10.1177/1073858413519865)
- Berent-Spillson, A., Persad, C. C., Love, T., Sowers, M., Randolph, J. F., Zubieta, K. J., and Smith, R. Y. (2012). Hormonal environment affects cognition independent of age during the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(9), 1686-1694. doi: [10.1210/jc.2012-1365](https://doi.org/10.1210/jc.2012-1365)
- Borrow, A. P., and Handa, R. J. (2017). Estrogen receptors modulation of anxiety-like behavior. *Vitam Horm*, 103, 27-52. doi: [10.1016/bs.vh.2016.08.004](https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.08.004)
- Bourne, J., and Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17(3), 381–386. doi: [10.1016/j.conb.2007.04.009](https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009)

- Brown, S. B., and Hankinson, S. E. (2015). Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids*, 99(Part A), 8-10. doi: [10.1016/j.steroids.2014.12.013](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.013)
- Cechetti, F., Worm, P. V., Pereira, L. O., Siqueira, I. R., and Netto, C. A. (2010). 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*, 43(12), 1178-1183. doi: [10.1590/S0100-879X2010007500124](https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500124)
- Cechetti, F., Pagnussat, A. S., Worm, P. V., Elsner, V. R., Ben, J., Siveira da Costa, M., Mestriber, R., Weis, S. D., and Netto, C. A. (2012^a). Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull*, 87(1), 109-116. doi: [10.1016/j.brainresbull.2011.10.006](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.006)
- Cechetti, F., Valdeci, W. P., Lovatel, G., Moysés, F., Rodrigues, S. I., and Netto, C. A. (2012^b). Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sciences*, 91(1-2), 29-36. doi: [10.1016/j.lfs.2012.05.013](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.05.013)
- Chen, J. R., Yan, Y. T., Wang, T. J., Chen, L. J., Wang, Y. J., and Tseng, G. F. (2009). Gonadal hormones modulate the dendritic spine densities of primary cortical pyramidal neurons in adult female rat. *Cereb Cortex* 19(11), 2719–2727. doi: [10.1093/cercor/bhp048](https://doi.org/10.1093/cercor/bhp048)
- Cho, K. O., Kim, S. K., and Kim, S. Y. (2017). Chronic cerebral hypoperfusion and plasticity of the posterior cerebral artery following permanent bilateral common carotid artery occlusion. *Korean J Physiol Pharmacol*, 21(6), 643-650. doi: [10.4196/kjpp.2017.21.6.643](https://doi.org/10.4196/kjpp.2017.21.6.643)

- Dallal, C. M., Lacey, J. V. Jr., Pfeiffer, R. M., Bauer, D. C., Falk, R. T., Buist, D. S., Cauley, J. A., Hue, T. F., LaCroix, A. Z., Tice, J. A., Veenstra, T. D., Xu, X., and Brinton, L. A. (2016). Estrogen Metabolism and Risk of Postmenopausal Endometria and Ovarian Cancer: the B-FIT Cohort. *Horm Cancer*, 7(1), 49-64. doi: [10.1007/s12672-015-0237-y](https://doi.org/10.1007/s12672-015-0237-y)
- Del Arco, A., Segovia, G., Garrido, P., De Blas, M., and Mora, F. (2007). Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res*, 176(2), 267-273. doi: [10.1016/j.bbr.2006.10.006](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.006)
- Dening, T., and Sandilyan, M. B. (2015). Dementia: definitions and types. *Nurs Stand*, 29(37), 37-42. doi: [10.7748/ns.29.37.37.e9405](https://doi.org/10.7748/ns.29.37.37.e9405)
- Devi, G. (2018). Menopausal-Related Cognitive Impairment. *Obstet Gynecol*, 132(6), 1325-1327. doi: [10.1097/AOG.0000000000002963](https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002963)
- Dichgans, M., and Leys, D. (2017). Vascular Cognitive Impairment. *Circ Res*, 120(3), 573-591. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.116.308426](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308426)
- DonCarlos, L. L., Azcoitia, I., and García-Segura, L. M. (2009). Neuroprotective actions of selective, estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology* 34S1 113-122. doi: [10.1016/j.psyneuen.2009.04.012](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.04.012)
- Downie, M. M., and Heath, R. W. (1983). Basic statistical methods. Harper & Row, 54, 816-817.
- DSM-V. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th edition, (DSM-V). APA. 2013.
- Du, S. Q., Wang, X. R., Xiao, L. Y., Tu, J. F., Zhu, W., He, T., and Liu, C. Z. (2016). Molecular mechanism of vascular dementia: what can be learned from animal models of chronic cerebral hypoperfusion?. *Mol Neurobiol*, 54(5), 3670-3682. doi: [10.1007/s12035-016-9915-1](https://doi.org/10.1007/s12035-016-9915-1)

- Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(7), 699-709. doi: [10.1016/j.neubiorev.2004.09.002](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.002)
- Duncombe, J., Kitamura, A., Hase, Y., Ihara, M., Kalaria, R. N., and Horsburgh, K. (2017). Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clin Sci (Lond)*, 131(19), 2451-2468. doi: [10.1042/CS20160727](https://doi.org/10.1042/CS20160727)
- Eichenbaum, H. (2017). Memory: organization and control. *Annu Rev Psychol*, 68, 19-45. doi: [10.1146/annurev-psych-010416-044131](https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010416-044131)
- Ellis, A. J., Hendrick, V. M., Williams, R., and Komm, B. S. (2015). Selective estrogen receptor modulators in clinical practice: a safety overview. *Expert Opin Drug Saf*, 14(6), 921-934. doi: [10.1517/14740338.2015.1014799](https://doi.org/10.1517/14740338.2015.1014799)
- ENASEM, Estudio Nacional de Salud y Envejecimiento en México: ENASEM Descripción de los Archivos de Datos, Versión 1, Septiembre 2013 Disponible en: www.ENASEM.org el 28/10/2017.
- Engler-Chiurazzi, E. B., Brown, C. M., Povroznik, J. M., and Simpkins, J. W. (2017). Estrogens as neuroprotectants: estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. *Prog Neurobiol*, 157, 188-211. doi: [10.1016/j.pneurobio.2015.12.008](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.008)
- Espeland, M. A., Brunner, R. L., Hogan, P. E., Rapp, S. R., Coker, L. H., Legault, C., Granek, I., and Resnick, S. M.; Women's Health Initiative Study of Cognitive Aging Study Group. (2010). Long-term effects of conjugated equine estrogen therapies on domain-specific cognitive function: results from the Women's Health Initiative study of cognitive aging extensión. *J Am Geriatr Soc*, 58(7), 1263-1271. doi: [10.1111/j.1532-5415.2010.02953.x](https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.02953.x).

- Frankfurt, M., and Luine, V. (2015). The evolving role of dendritic spines and memory: Interaction(s) with estradiol. *Horm Behav*, 74, 28-36. doi: [10.1016/j.yhbeh.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.004).
- Farkas, E., Luiten, P. G. M., and Baric, F. (2007). Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 54(1), 162–180. doi: [10.1016/j.brainresrev.2007.01.003](https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.003)
- Fidalgo, C., Conejo, N. M., González-Pardo, H., and Arias, J. L. (2014). Dynamic functional brain networks involved in simple visual discrimination learning. *Neurobiol Learn Mem*, 114, 165-170. doi: [10.1016/j.nlm.2014.06.001](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.06.001)
- Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D. W., Hurn, P. D., Kent, T. A., Savitz, S. I., Lo, E. H. (2009). Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*, 40(6), 2244–2250. doi: [10.1161/STROKEAHA.108.541128](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.541128)
- Funahashi, S. (2017^a). Working memory in the prefrontal cortex. *Brain Sci*, 7(5), 49. doi: [10.3390/brainsci7050049](https://doi.org/10.3390/brainsci7050049)
- Funahashi, S. (2017^b). Prefrontal contribution to decision-making under free-choice conditions. *Front Neurosci*, 11, 431. doi: [10.3389/fnins.2017.00431](https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00431)
- Funahashi, S., and Andreau, M. (2013). Prefrontal cortex and neural mechanisms of executive function. *J Physiol Paris*, 107(6), 471-482. doi: [10.1016/j.jphysparis.2013.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2013.05.001)
- Gambacciani, M., and Levancini, M. (2014). Hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Prz Menopauzalny*, 13(4), 213- 220. doi: [10.5114/pm.2014.44996](https://doi.org/10.5114/pm.2014.44996)

- Galvin, C., and Ninan, I. (2014). Regulation of the mouse medial prefrontal cortical synapses by endogenous estradiol. *Neuropsychopharmacology* 39(9): 2086-2094. doi: [10.1038/npp.2014.56](https://doi.org/10.1038/npp.2014.56).
- García-Chavez, D., González-Burgos, I., Letechipía-Vallejo G., López-Loeza, E., Morali, G., and Cervantes, M. (2008). Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neurosci Lett*, 448(1), 148-152. doi: [10.1016/j.neulet.2008.10.043](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.043)
- Gartlehner, G., Patel, S. V., Feltner, C., Weber, R. P., Long, R., Mullican, K., Boland, E., Lux, L., and Viswanathan, M. (2017). Hormone Therapy for the primary prevention of chronic conditions in postmenopausal women: evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *JAMA*, 318(22), 2234-2249. doi: [10.1001/jama.2017.16952](https://doi.org/10.1001/jama.2017.16952)
- Gennari, L., Merlotti, D., Paola, V. D., and Nuti, R. (2008). Raloxifene in breast cancer prevention. *Expert Opin Drug Saf*, 7(3), 259-270. doi: [10.1517/14740338.7.3.259](https://doi.org/10.1517/14740338.7.3.259)
- Gennari, L., Merlotti, D., Valleggi, F., Martini, G., and Nuti, R. (2007). Selective estrogen receptor modulators for postmenopausal osteoporosis: current state of development. *Drugs Aging*, 24(5), 361-379. doi: [10.2165/00002512-200724050-00002](https://doi.org/10.2165/00002512-200724050-00002)
- Gizzo, S., Saccardi, C., Patrelli, T. S., Berretta, R., Capobianco, G., Di Gangi, S., Vacilotto, A., Bertocco, A., Noventa, M., Ancona, E., D'Antona, D., and Nardelli, G. B. (2013). Update on raloxifene: mechanism of action, clinical efficacy, adverse effects, and contraindications. *Obstet Gynecol Surv*, 68(6), 467-481. doi: [10.1097/OGX.0b013e31828baef9](https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e31828baef9)

- Goldman-Rakic, S. P. (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14(3), 477-485.
- González-Burgos I. (2009). Dendritic spine plasticity and learning/memory processes: theory, evidence and perspectives, in *Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties*, L. R. Baylog, Ed., pp. 163–186, Nova Science Publishers, Huntington, NY, USA.
- González-Burgos, I. (2012). From synaptic transmission to cognition: an intermediary role for dendritic spines. *Brain Cogn* 80(1): 177-183. doi: [10.1016/j.bandc.2012.03.002](https://doi.org/10.1016/j.bandc.2012.03.002)
- González-Burgos, I., Alejandre-Gómez, M., and Cervantes, M. (2005). Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci Lett*, 379(1), 52–54. doi: [10.1016/j.neulet.2004.12.043](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.12.043)
- González-Burgos, I., Rivera- Cervantes, M. C., Velázquez-Zamora, D. A., Feria-Velasco, A., García-Segura, L. M. (2012). Selective estrogen receptor modulators regulate dendritic spine plasticity in the hippocampus of male rats. *Neural Plast*, 309494. doi: [10.1155/2012/309494](https://doi.org/10.1155/2012/309494)
- González-Burgos, I., Velázquez-Zamora, D. A., González-Tapia, D., Cervantes, M. (2015). A Golgi study of the plasticity of dendritic spines in the hypothalamic ventromedial nucleus during the estrous cycle of female rats. *Neuroscience*, 298, 74–80. doi: [10.1016/j.neuroscience.2015.04.019](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.019)
- González-Burgos, I., Tapia-Arizmendi, G., and Feria-Velasco, A. (1992). Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *Biotech Histochem*, 67(5), 288–296. doi: [10.3109/10520299209110037](https://doi.org/10.3109/10520299209110037)

- González-Flores, O., Domínguez-Ordóñez, R., González-Burgos, I. (2015). The cellular and molecular mechanisms driving the estrogenic modulation of synaptic activity in mnemonic information processing: Synaptic fundamentals in memory performance. Neuroscience Research Progress. Nova Science Publishers.
- Gorelick, P. B., and Nyenhuis, D. (2013). Understanding and treating vascular cognitive impairment. Continuum (Minneap Minn), 19(2 Dementia), 425-437. doi [10.1212/01.CON.0000429174.29601.de](https://doi.org/10.1212/01.CON.0000429174.29601.de)
- Gould, E., Woolley, C. S., Frankfurt, M., and McEwen, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. J Neurosci, 10(4), 1286-1291. doi: [10.1523/JNEUROSCI.10-04-01286.1990](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-04-01286.1990)
- Gutiérrez-Robledo, L. M., y Arrieta-Cruz, I. (2015). Demencias en México: la necesidad de un Plan de Acción. Gac Med Mex. 151(5), 667-673.
- Hadjimarkou, M. M., and Vasudevan, N. (2017). GPER1/GPR30 in the brain: crosstalk with classical estrogen receptors and implications for behavior. J Steroid Biochem Mol Biol, 176, 57-64. doi: [10.1016/j.jsbmb.2017.04.012](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.04.012)
- Hainsworth, A. H., Allan, S. M., Boltze, J., Cunningham, C., Farris, C., Head, E., Ihara, M., Isaacs, J. D., Kalaria, R. N., Lesnik, Oberstein, S. A., Moss, M. B., Nitzsche, B., Rosenberg, G. A., Rutten, J. W., Salkovic-Petrisic, M., and Troen, A. M. (2017). Translational models for vascular cognitive impairment: a review including larger species. BMC Med, 15(1), 16. doi: [10.1186/s12916-017-0793-9](https://doi.org/10.1186/s12916-017-0793-9)
- Hampson, E., and Morley, E. E. (2013). Estradiol concentrations and working memory performance in women of reproductive age. Psychoneuroendocrinology, 38(12), 2897-2904. doi: [10.1016/j.psyneuen.2013.07.020](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.07.020).

- Hara, Y., Waters, M. E., McEwen, S. B., and Morrison, J. H. (2015). Estrogen effects on cognitive and synaptic health over the lifecourse. *Physiol Rev*, 95(3), 785-807. doi: [10.1152/physrev.00036.2014](https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2014)
- Harris, K. M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 9(3), 343-348.
- Henderson, V. W. (2010). Action of estrogens in the aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochim Biophys Acta*, 1800(10), 1077-1083. doi: [10.1016/j.bbagen.2009.11.005](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.11.005)
- Hojo, Y., Murakami, G., Mukai, H., Higo, S., Hatanaka, Y., Ogiue-Ikeda, M., Ishii, H., Kimoto, T., Kawato, S. (2008). Estrogen synthesis in the brain—role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol* 290(1-2), 31-43. doi: [10.1016/j.mce.2008.04.017](https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.017)
- Hu, X., Michael De Silva, T., Chen, J., and Faraci, M. F. (2017). Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke. *Circ Res*, 120(3), 449- 471. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.116.308427](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308427)
- Huang, J., Bai, F., Yang, X., Chen, C., Bao, X., and Zhang, Y. (2015). Identifying brain functional alterations in postmenopausal women with cognitive impairment. *Maturitas*, 81(39), 371-376. doi: [10.1016/j.maturitas.2015.04.006](https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.04.006)
- Huerta-Ramos, E., Iniesta, R., Ochoa, S., Cobo, J., Miquel, E., Roca, M., Serrano- Blanco, A., Teba, F., and Usall, J. (2014). Effects of raloxifene on cognition in postmenopausal women with schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24(2), 223-231. doi: [10.1016/j.euroneuro.2013.11.012](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.11.012)
- Iadecola, C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*, 80(4), 844- 866. doi: [10.1016/j.neuron.2013.10.008](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008)
- ICD-11, International Classification of Diseases 11th Revision. 2018. World Health Organization. Disponible en: <https://icd.who.int/en/>

- Ikeda, T., Matsuki, N., and Yamada, M. K. (2006). Estrogen produced in cultured hippocampal neurons is a functional regulator of a GABAergic machinery. *J Neurosci Res*, 84(8), 1771-1777. doi: [10.1002/jnr.21083](https://doi.org/10.1002/jnr.21083)
- Jellinger, K. A. (2013). Pathology and pathogenesis of vascular cognitive impairment a critical update. *Front Aging Neurosci*, 5(17), 1-19. doi: [10.3389/fnagi.2013.00017](https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00017)
- Jia, H., Zhang, M. X., Zhang, A. B., Liu, Y., and Li, M. J. (2012). Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex and hippocampus in 2VO rats. *Neurol Sci*, 33, 1063-1070. doi: [10.1007/s10072-011-0898-4](https://doi.org/10.1007/s10072-011-0898-4)
- Jing, Z., Shi, C., Zhu, L., Xiang, Y., Chen, P., Xiong, Z., Li, W., Ruan, Y., and Huang, L. (2015). Chronic cerebral hypoperfusion induces vascular plasticity and hemodynamics but also neuronal degeneration and cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35(8), 1249-1259. doi: [10.1038/jcbfm.2015.55](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.55)
- Kalaria, R. N. (2016). Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 131(5), 659-685. doi: [10.1007/s00401-016-1571-z](https://doi.org/10.1007/s00401-016-1571-z)
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., and Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 26(7), 360-368. doi: [10.1016/S0166-2236\(03\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00162-0)
- Kesner, R. P., and Churchwell, J. C. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem*, 96(3), 417-431. doi: [10.1016/j.nlm.2011.07.002](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.07.002)

- Khan, M. M. (2016). Neurocognitive, neuroprotective, and cardiometabolic effects of raloxifeno: potential for improving therapeutic outcomes in schizophrenia. *CNS Drugs*, 30(7), 589-601. doi: [10.1007/s40263-016-0343-6](https://doi.org/10.1007/s40263-016-0343-6)
- Khan, M. M., Dhandapani, K. M., Zhang, Q. G., and Brann, D. W. (2013). Estrogen regulation of spine density and excitatory synapses in rat prefrontal and somatosensory cerebral cortex. *Steroids* 78(6), 614-623. doi: [10.1016/j.steroids.2012.12.005](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.12.005)
- Khan, M. M., Kalaria, R. N., Corbett, A., and Ballard, C. (2016). Update on vascular dementia. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 29(5), 281-301. doi: [10.1177/0891988716654987](https://doi.org/10.1177/0891988716654987)
- Khan, M. M., Wakade, C., de Sevilla, L., and Brann, D. W. (2014). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) enhance neurogenesis and spine density following focal cerebral ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 146, 38–47. doi: [10.1016/j.jsbmb.2014.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.001)
- Kramár, E. A., Chen, L. Y., Brandon, N. J., Rex, C. S., Liu, F., Gall, C. M., and Lynch, G. (2009). Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci*, 29(41), 12982–12993. doi:[10.1523/JNEUROSCI.3059-09.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3059-09.2009).
- Krügel, U., Köles, L., and Illés, P. (2013). Integration of neuronal and glial signaling by pyramidal cells of the rat prefrontal cortex; control of cognitive functions and addictive behavior by purinergic mechanisms. *Neuropsychopharmacol Hung*, 15(4), 206-213.
- Kim, H. A., Miller, A. A., Drummond, G. R., Thrift, A. G., Arumugam, T. V., Phan, T. G., Srikanth, V. K., and Sobey, C. G. (2012). Vascular cognitive impairment and Alzheimer's disease: role of cerebral hypoperfusion and oxidative stress. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 385(10), 953-959. doi: [10.1007/s00210-012-0790-7](https://doi.org/10.1007/s00210-012-0790-7)

- Konyalioglu, S., Durmaz, G., and Yalcin, A. (2007). The potential antioxidant effect of raloxifene treatment: study on heart, liver and brain cortex of ovariectomized female rats. *Cell Biochem Funct*, 25(3), 259-266. doi: [10.1002/cbf.1328](https://doi.org/10.1002/cbf.1328)
- Kulkarni, J., Gavrilidis, E., Gwini, S. M., Worsley, R., Grigg, J., Warren, A., Gurvich, C., Gilbert, H., Berk, M., and Davis, S. R. (2016). Effect of adjunctive raloxifene therapy on severity of refractory schizophrenia in women: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*, 73(9), 947-954. doi: [10.1001/jamapsychiatry.2016.1383](https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.1383)
- Lamas, A. Z., Nascimento, A. M., Medeiros, A. R. S., Caliman, I. F., Dalpiaz, P. L. M., Firmes, L. B., Sousa, G. J., Oliveira, P. W. C., Andrade, T. U., Reis, A. M., Gouvea, S. A., and Bissoli, N. S. (2017). The selective estrogen receptor modulators (SERMs) raloxifene and tamoxifen improve ANP levels and decrease nuclear translocation of NF-kB in estrogen-deficient rats. *Pharmacol Rep*, 69(4), 798-805. doi: [10.1016/j.pharep.2017.03.004](https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.004)
- Legault, C., Maki, P. M., Resnick, S. M., Coker, L., Hogan, P., Bevers, T. B., and Shumaker, S. A. (2009). Effects of tamoxifen and raloxifene on memory and other cognitive abilities: cognition in the study of tamoxifen and raloxifene. *J Clin Oncol*, 27(31), 5144-5152. doi: [10.1200/JCO.2008.21.0716](https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.0716)
- Letchipia-Vallejo, G., López-Loeza, E., Espinoza-Gonzalez, V., González-Burgos, I., Olvera-Cortés, M. E., Moralí, G., and Cervantes, M. (2007). Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J. Pineal Res*, 42, 139-146. doi: [10.1111/j.1600-079X.2006.00395.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00395.x)

- Luine, V. N., and Frankfurt, M. (2012). Estrogens facilitate memory processing through membrane mediated mechanisms and alterations in spine density. *Front Neuroendocrinol* 33(4), 388–402. doi: [10.1016/j.yfrne.2012.07.004](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.07.004)
- Luine, V., and Frankfurt, M. (2013). Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. *Neuroscience*, 239, 34–45. doi: [10.1016/j.neuroscience.2012.10.019](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.019).
- Miller, K. E., Freedman, J. D., and Wallis, D. J. (2002). The prefrontal cortex: categories, concepts and cognition. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Series B.*, 357(1424), 1123-1136. doi: [10.1098/rstb.2002.1099](https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1099)
- Moralí, G., and Cervantes, M. (2014). Neuroprotective effects of estrogens against cerebral ischemia. Editor: González-Burgos, I. *Estrogens and Cognition. Psychobiological and Clinical Aspects*, 153-186. ISBN: [978-81-308-0550-4](https://doi.org/978-81-308-0550-4)
- Mukai, H., Tsurugizawa, T., Murakami, G., Kominami, S., Ishii, H., Ogiue-Ikeda, M., Takata, N., Tanabe, N., Furukawa, A., Hojo, Y., Ooishi, Y., Morrison, J. H., Janssen, W. G., Rose, J. A., Chambon, P., Kato, S., Izumi, S., Yamazaki, T., Kimoto, T., and Kawato, S. (2007). Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem*, 100(4), 950-967. doi: [10.1111/j.1471-4159.2006.04264.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04264.x)
- Mushiake, H., Sakamoto, K., Saito, N., Inui, T., Aihara, K., and Tanji, J. (2009). Involvement of the prefrontal cortex in problem solving. *Int Rev Neurobiol*, 85, 1-11. doi: [10.1016/S0074-7742\(09\)85001-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)85001-0)
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th edition. Washington, DC. The national academies press. doi: [10.17226/12910](https://doi.org/10.17226/12910)

- Ni, J., Ohta, H., Matsumoto, K., and Watanabe, H. (1994). Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res*, 653(1), 231-236. doi: [10.1016/0006-8993\(94\)90394-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90394-8)
- Nilsen, J., Mor, G., and Naftolin, F. (1998). Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause*, 5(4), 211-216.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Academia Nacional de Investigación Mexicana. México. 2002. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- Ohta, H., Nishikawa, H., Kimura, H., Anayama, H., and Miyamoto, M. (1997). Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience*, 79(4), 1039-1050. doi: [10.1016/S0306-4522\(97\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00037-7)
- O'Neill, K., Chen, S., and Brinton, R. D. (2004). 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*, 185(1), 63–80. doi: [10.1016/j.expneurol.2003.09.005](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.09.005)
- Otori, T., Katsumata, T., Muramatsu, H., Kashiwagi, F., Katayama, Y., Terashi, A. (2003). Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(4), 266-272. doi: [10.1046/j.1440-1681.2003.03825.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03825.x)

- Parra, M. A., Baez, S., Allegri, R., Nitrini, R., Lopera, F., Slachevsky, A., Custodio, N., Lira, D., Piquet, O., Kumfor, F., Huepe, D., Cogram, P., Bak, T., Manes, F., and Ibanez, A. (2018). Dementia in Latin America: Assessing the present and envisioning the future. *Neurology*, 90(5), 222-231. doi: [10.1212/WNL.0000000000004897](https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004897)
- Paxinos, G., and Watson, C. (2009). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th edition. Elsevier.
- Pickar, J. H., and Komm, B. S. (2015). Selective estrogen receptor modulators and the combination therapy conjugated estrogens/bazedoxifene: a review of effects on the breast. *Post Reprod Health*, 21(3), 112-121. doi: [10.1177/2053369115599090](https://doi.org/10.1177/2053369115599090)
- Prange-Kiel, J., Fester, L., Zhou, L., Jarry, H., and Rune, G. M. (2009). Estrous cyclicity of spinogenesis: underlying mechanisms. *J Neural Transm (Vienna)*. 116(11), 1417–1425. doi: [10.1007/s00702-009-0294-x](https://doi.org/10.1007/s00702-009-0294-x).
- Prince, M., Acosta, D., Ferri, C. P., Guerra, M., Huang, Y., Llibre, Rodriguez, J. J., Salas, A., Sosa, A. L., Williams, J. D., Dewey, M. E., Acosta, I., Jotheeswaran, A. T., and Liu, Z. (2012). 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*, 380(9836), 50-58. doi: [10.1016/S0140-6736\(12\)60399-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60399-7)
- Rammani, N., and Owen, A. M. (2004). Anterior prefrontal cortex: insights into function from anatomy and neuroimaging. *Nat Rev Neurosci*, 5(3), 184-194. doi: [10.1038/nrn1343](https://doi.org/10.1038/nrn1343)
- Ray, R. D., and Zald, D. H. (2012). Anatomical insights into the interaction of emotion and cognition in the prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev*, 36(1), 479-501. doi: [10.1016/j.neubiorev.2011.08.005](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.08.005)

- Raz, L., Knoefel, J., and Bhaskar, K. (2016). The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(1), 172-186. doi: [10.1038/jcbfm.2015.164](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.164)
- Rich, E. L., and Shapiro, M. (2009). Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches. *J Neurosci* 29(22), 7208-7219. doi: [10.1523/JNEUROSCI.6068-08.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6068-08.2009).
- Riley, M. R., and Constantinidis, C. (2016). Role of prefrontal persistent activity working memory. *Front Syst Neurosci*, 9, 181. doi: [10.3389/fnsys.2015.00181](https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00181)
- Rzemieniec, J., Litwa, E., Wnuk, A., Lason, W., Golas, A., Krzeptowski, W., and Kajta, M. (2014). Neuroprotective action of raloxifene against hypoxia- induced damage in mouse hippocampal cells depends on ER α but not ER β or GPR30 signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 146, 26-37. doi: [10.1016/j.jsbmb.2014.05.005](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.005)
- Sachdev, P. S., Blacker, D., Blazer, D. G., Ganguli, M., Jeste, D. V., Paulsen, J. S., and Petersen, R. C. (2014). Classifying neurocognitive disorders; the DSM-5 approach. *Nat Rev Neurol*, 10(11), 634-642. doi: [10.1038/nrneurol.2014.181](https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.181)
- Sachs-Ericsson, N., and Blazer, D. G. (2015). The new DSM-5 diagnosis of mild neurocognitive disorder and its relation to research in mild cognitive impairment. *Aging Ment Health*, 19(1), 2-12. doi: [10.1080/13607863.2014.920303](https://doi.org/10.1080/13607863.2014.920303)
- Salcido-Cadena, L. (2017). Evaluación morfológica y funcional del efecto neuroprotector de raloxifeno contra el daño producido por hipoperfusión cerebral crónica en ratas ovariectomizadas. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez".

- Samavat, H., and Kurzer, M. S. (2015). Estrogen metabolism and breast cáncer. *Cancer Lett*, 356(2PtA), 231-243. doi: [10.1016/j.canlet.2014.04.018](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018)
- Sarti, C., Pantoni, L., Bartolini, L., and Inzitari, D. (2002). Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J Neurol Sci*, 203-204. doi: [10.1016/S0022-510X\(02\)00302-7](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(02)00302-7)
- Seamans, J. K., Lapish, C. C., and Durstewitz, D. (2008). Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: Insights from electrophysiology. *Neurotox Res*, 14(2-3), 249-262. doi: [10.1007/BF03033814](https://doi.org/10.1007/BF03033814)
- Sharma, K., and Mehra, R. D. (2008). Long-term administration of estrogen or tamoxifen to ovariectomized rats affords neuroprotection to hippocampal neurons by modulating the expression of Bcl-2 and Bax. *Brain Res*, 1204, 1-15. doi: [10.1016/j.brainres.2008.01.080](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.080)
- Segura-Urbe, J. J., Pinto-Almazán, R., Coyoy-Salgado, A., Fuentes-Venado, C. E., and Guerra-Araiza, C. (2017). Effects of estrogen receptor modulators on cytoskeletal proteins in the central nervous system. *Neural Regen Res*, 12(8), 1231-1240. doi: [10.4103/1673-5374.213536](https://doi.org/10.4103/1673-5374.213536)
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87(Pt 4), 387- 406.
- Siddiqui, S. V., Chatterjee, U., Kumar, D., Siddiqui, A., and Goyal, N. (2008). Neuropsychology of prefrontal cortex. *Indian J Psychiatry*, 50(3), 202-208. doi: [10.4103/0019-5545.43634](https://doi.org/10.4103/0019-5545.43634)
- Siegel, S. (1956). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw Hill. New York.

- Simpkins, J. W., Perez, E., Wang, X., Yang, S., Wen, Y., and Singh, M. (2009). The potential for estrogens in preventing Alzheimer's disease and vascular dementia. *The Adv Neurol Disord*, 2(1), 31-49. doi: [10.1177/1756285608100427](https://doi.org/10.1177/1756285608100427)
- Smith, E. E. (2017). Clinical presentations and epidemiology of vascular dementia *Clin Sci (Lond)*, 13 1(11), 1059-1068. doi: [10.1042/CS20160607](https://doi.org/10.1042/CS20160607)
- Smith, C. C., and McMahon, L. L. (2006). Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci*, 26(33), 8517-8522. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5279-05.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5279-05.2006)
- Strom, J. O., Theodorsson, A., and Theodorsson, E. (2011). Mechanism of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*, 12(3), 1533-1562. doi: [10.3390/ijms12031533](https://doi.org/10.3390/ijms12031533)
- Szczepanski, S. M., and Knight, R. T. (2014). Insights into human behavior from lesions to the prefrontal cortex. *Neuron*, 83(5), 1002-1018. doi: [10.1016/j.neuron.2014.08.011](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.011)
- Uylings, H. B., Groenewegen, H. J., and Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex?. *Behav Brain Res*, 146(1-2), 3-17. doi: [10.1016/j.bbr.2003.09.028](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028)
- van der Flier, W. M., Skoog, I., Schneider, J. A., Pantoni, L., Mok, V., Chen, C. L. H., and Scheltens, P. (2018). Vascular cognitive impairment. *Nat Rev Dis Primers*, 4:18003. doi: [10.1038/nrdp.2018.3](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.3)
- Van Eden, C. G., and Buijs, R. M. (2000). Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions. *Prog Brain Res*, 126, 49-62. doi: [10.1016/S0079-6123\(00\)26006-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26006-8)

- Vegeto, E., Belcredito, S., Ghisletti, S., Meda, C., Etteri, S., and Maggi, A. (2006). The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology*, 147(5), 2263-2272. doi: [10.1210/en.2005-1330](https://doi.org/10.1210/en.2005-1330)
- Velázquez-Zamora, D. A., González-Tapia, D., Feria-Velasco, A., González-Burgos, I. (2014). Estrogenic modulation of memory-associated neuroplasticity. In: González-Burgos, I. Editor. *Estrogens and cognition. Psychobiological and clinical aspects. Research Signpost* 1-23.
- Velázquez-Zamora, D. A., García-Segura, L. M., and González-Burgos, I. (2012). Effects of selective estrogen receptor modulators on allocentric working memory performance and on dendritic spines in medial prefrontal cortex pyramidal neurons of ovariectomized rats. *Horm Behav*, 61(4), 512–517. doi: [10.1016/j.yhbeh.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.01.010)
- Velázquez-Zamora, D. A., González-Ramírez, M. M., Beas-Zárate, C., and González-Burgos, I. (2011). Egocentric working memory impairment and dendritic spine plastic changes in prefrontal neurons after NMDA receptor blockade in rats. *Brain Res* 1402, 101–108. doi: [10.1016/j.brainres.2011.06.018](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.018).
- Venkat, P., Chopp, M., and Chen, J. (2015). Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol*, 272, 97-108. doi: [10.1016/j.expneurol.2015.05.006](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.006)
- Völgyi, K., Gulyácssy, P., Todorov, M. I., Puska, G., Badics, K., Klatky, D., Kékesi, K. A., Nyitrai, G., Czurkó, A., Drahos, L., and Dobolyi, A. (2018). Chronic Cerebral Hypoperfusion Induced Synaptic Proteome Changes in the rat Cerebral Cortex. *Mol Neurobiol*, 55(5), 4253-4266. doi: [10.1007/s12035-017-0641-0](https://doi.org/10.1007/s12035-017-0641-0)

- Wilson, C. R., Gaffan, D., Browning, P. G., and Baxter, M. G. (2010). Functional localization within the prefrontal cortex: missing the forest for the trees? *Trends Neurosci*, 33(12), 533-540. doi: [10.1016/j.tins.2010.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.08.001)
- Woolley, C. S. (2007). Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 657-680. doi: [10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105219](https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105219)
- World Health Organization. Dementia. Fact sheet Updated May 2017. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/ accesado el 9 de Octubre de 2017.
- Xi, Y., Wang, M., Zhang, W., Bai, M., Du, Y., Zhang, Z., Li, Z., and Miao, J. (2014). Neuronal damage, central cholinergic dysfunction and oxidative damage correlate with cognitive deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Neurobiol Learn Mem*, 109: 7-19.
- Yaghjian, L., and Colditz, G. A. (2011). Estrogens in the breast tissue: a systematic review. *Cancer Causes Control*. 22(4), 529-540. doi: [10.1007/s10552-011-9729-4](https://doi.org/10.1007/s10552-011-9729-4)
- Zhou, W., Koldzic-Zivanovic, N., Clarke, C. H., de Beun, R., Wassermann, K., Bury, P. S., Cunningham, K. A., and Thomas, M. L. (2002). Selective estrogen receptor modulator effects in the rat brain. *Neuroendocrinology*. 75(1), 24-33. doi: [10.1159/000048218](https://doi.org/10.1159/000048218)
- Zhou, L., Lehan, N., Wehrenberg, U., Disteldorf, E., von Lossow, R., Mares, U., Jarry, H., and Rune, G. M. (2007). Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors. *Exp Nuerol*, 203(1), 72-81. doi: [10.1016/j.expneurol.2006.07.020](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.020)

Zhu, Y., Zhang, Q., Zhang, W., Li, N., Dai, Y., Tu, J., Yang, F., Brann, D. W., and Wang, R. (2017). Protective effect of 17β -Estradiol upon hippocampal spine density and cognitive function in an animal model of vascular dementia. Sci Rep, 7:42660. doi: [10.1038/srep42660](https://doi.org/10.1038/srep42660)