



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS:

Evaluación del efecto neuroprotector del raloxifeno en el daño producido por hipoperfusión cerebral crónica en el hipocampo de ratas viejas.

Presenta:

**Químico Farmacobiólogo
Irving Manríquez Arzate**

Para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**DIRECCIÓN DE TESIS:
Doctor en Ciencias
José Miguel Cervantes Alfaro**

**CO- DIRECCIÓN:
Doctora en Ciencias
Gabriela Morál de la Brena**

**Comité Tutorial
Doctora en Ciencias Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo
Doctora en Ciencias Marcia Yvette Gauthereau Torres
Doctor en Ciencias Daniel Godínez Hernández**

**Morelia, Michoacán, México
Diciembre 2020**

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

El proyecto de investigación que dio lugar a esta Tesis de Maestría recibió financiamiento como parte del Programa de Investigación 2019 de la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Agradecimientos

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con orgullo *mi alma mater*, sin su apoyo este proyecto no hubiera sido posible.

A la Secretaría de Salud, en especial a Dra. Gloria Alicia Figueroa Aguilar y Dra. Wendy Vianey Padilla Cabrera, que dieron las facilidades para mi tiempo beca.

Al Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), que facilitó equipo y capacitación para la realización de este proyecto.

A la Dra Gabriel Morali de la Brena, por todo su apoyo, en forma de enseñanzas, dedicación y sobretodo tiempo, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial, por sus consejos y sugerencias que nutrieron este proyecto.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", una gran familia de la que me siento muy feliz de formar parte.

A mis compañeros de generación, a todos y cada uno de ellos los quiero y estoy muy contento de que la vida me diera la oportunidad de conocerlos y cursar esta aventura juntos; en especial a José Ulises Chijate Bazán, no pude tener mejor compañero de laboratorio.

A Jessica Aneth Vergara Hernández, solo diré que, sin ti, esto no hubiera sido lo que fue.

A María del Rosario Aguilar Álvarez, mi amiga que siempre tuvo tiempo para mis locuras y me regresó a la realidad.

A Kenia Iraí Blancas Ayala, mi pequeña mejor amiga por todos los momentos y por que las nuevas películas y nuevos restaurantes pasen por nuestra rigurosa crítica.

Dedicatoria

A mi Familia, en especial a mis padres y mi hermano, siempre me lo dieron todo y ni todas las palabras alcanzan para decir lo que significan para mí, sin ellos no soy nada.

Papá, siempre te he visto como mi pilar, mi soporte y aunque tal vez en nuestra familia no somos tan expresivos, quiero que sepas que nada me hace sentir más seguro que me des tus abrazos.

Mamá, tu eres mi corazón y mis sentimientos y aunque tengamos nuestros momentos de conflicto, siempre he pensado que pasa porque somos muy parecidos y nada me llena más de felicidad y orgullo que pensar que me parezco a ti.

A mi hermano, en el que confió más que en ninguna otra persona y aunque el camino nos ha alejado físicamente, siempre tendrás un lugar a mi lado y siempre tendremos nuestro código (haz paro).

A mis amigos Héctor Saucedo Martínez, Gerardo de Jesús Rangel Abarca, Elda Araceli Díaz Hernández y Diego Armando Marín López, mi otra familia, donde las risas nos unen mucho más que el ADN.

A los doctores: José Miguel Cervantes Alfaro; los doctores tienen diferentes formas de enseñar y usted me enseñó con todas ellas, es usted un gran ejemplo a seguir y me gustaría ser como usted y Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo, en sus consejos y enseñanzas encontré no sólo conocimiento, también un gran aprecio y me siento muy agradecido de haber sido parte de este equipo.

Índice

1. Introducción	8
2. Antecedentes	11
2.1 Hipoperfusión cerebral crónica	11
2.2 Acciones estrogénicas en el sistema nervioso central.	12
2.3 Moduladores selectivos de receptores de estrógenos	15
2.4 Efectos neuroprotectores del raloxifeno	16
3. Justificación	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivo general	20
5.1 Objetivos específicos	20
6. Materiales y métodos	21
6.1 Modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica (HCC)	22
6.2 Evaluación de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.....	22
6.3 Procesamiento histológico. Impregnación metálica de Golgi	24
6.4 Análisis estadístico	25
7. Resultados.....	26
7.1 Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.....	26
7.1.1 Aprendizaje espacial. Latencia de escape	26
7.1.2 Aprendizaje espacial. Longitud de las trayectorias de nado	28
7.1.3 Memoria espacial. Número de cruces por el sitio de la plataforma	29
7.1.4 Memoria espacial. Tiempo de permanencia en cada cuadrante	30
7.2 Evaluación de la citoarquitectura.....	32
7.2.1 Longitud de la dendrita apical.....	34
7.2.2 Número de bifurcaciones.....	35
7.2.3 Densidad y proporción de espinas dendríticas.....	36
8. Discusión	37
9. Referencias bibliográficas.....	43

Resumen

Evaluación del efecto neuroprotector del raloxifeno en el daño producido por hipoperfusión cerebral crónica en el hipocampo de ratas viejas.

Introducción. La reducción permanente del flujo sanguíneo cerebral (hipoperfusión cerebral crónica, HCC), el envejecimiento y la reducción de las acciones estrogénicas han sido consideradas como condiciones concurrentes para el daño en estructuras cerebrales, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal, involucradas en las funciones cognitivas, y como posibles causas de demencia. De ahí el interés en el estudio de los efectos de fármacos moduladores específicos de receptores de estradiol (SERMs), en contra del daño cerebral provocado por HCC. **Objetivos.** El presente estudio fue diseñado para analizar los efectos del raloxifeno, sobre el deterioro del aprendizaje y la memoria espacial, y las alteraciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, en ratas viejas con HCC y ausencia de secreción ovárica de estrógenos. **Métodos.** El estudio se realizó de acuerdo con normas y lineamientos éticos establecidos para la investigación en animales de experimentación. ratas hembra Sprague-Dawley, 18-20 meses de edad al inicio del estudio, fueron asignadas al azar a los siguientes grupos: Sham, n=6 (ratas ovariectomizadas, con simulación del modelo de HCC); VEH-PreO, n=6 (ratas ovariectomizadas con administración de dimetilsulfóxido, 0.1 ml/día, a partir de 15 días antes del inicio de HCC y durante 30 días después a ésta); VEH-PosO, n=6 (ratas ovariectomizadas con administración de dimetilsulfóxido, 0.1 ml/día, durante 30 días, a partir de HCC); RAL-PreO, n=6 (ratas ovariectomizadas con administración de raloxifeno, 3 mg/kg/día, a partir de 15 días antes del inicio de HCC y durante 30 días después a ésta); RAL-PosO, n=6 (ratas ovariectomizadas con administración de raloxifeno, 3 mg/kg/día, durante 30 días a partir de HCC). Al término de los tratamientos se evaluaron: el aprendizaje y la memoria espacial (latencia de escape, longitud de trayectorias y velocidad de nado; número de cruces y permanencia en el cuadrante objetivo donde se ubicaba la plataforma) en el laberinto acuático de Morris, así como las características de la citoarquitectura (longitud de la dendrita apical, número de bifurcaciones dendríticas, y número y proporción de espinas dendríticas) de las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo, en las diferentes condiciones experimentales. **Resultados.** La HCC provocó deterioro del aprendizaje/memoria espacial (mayores latencias de escape y longitud de trayectorias, y reducción significativa del número de cruces y tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo, en los animales tratados con vehículo; en tanto que estos parámetros fueron similares en los grupos tratados con raloxifeno y en el grupo sham. Asimismo, la HCC provocó acortamiento de la longitud de la dendrita apical, reducción del número de bifurcaciones dendríticas, del número de espinas dendríticas y cambios en la proporción de espinas anchas y en hongo en los animales tratados con vehículo; mientras que estos parámetros de citoarquitectura neuronal fueron similares en los grupos tratados con raloxifeno y el grupo sham. **Conclusiones.** Estos resultados muestran que el raloxifeno impide las alteraciones de la citoarquitectura neuronal y el deterioro cognoscitivo inducido por HCC en ratas viejas, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos; posiblemente a través de la activación de elementos de respuesta estrogénica en estructuras cerebrales involucradas en la integración de funciones cognitivas.

Palabras clave: Hipoperfusión cerebral crónica, neuroprotección, raloxifeno, citoarquitectura neuronal, aprendizaje y memoria espacial.

Abstract

Evaluation of the neuroprotective effect of raloxifene in the injury induced by chronic cerebral hypoperfusion in the hippocampus of aged female rats.

Introduction. Permanent reduction of cerebral blood flow (chronic cerebral hypoperfusion, CCH), aging, and a reduction of estrogenic actions, have been considered as concurrent conditions able to induce damage to brain structures such as the hippocampus and prefrontal cortex, involved in cognitive functions, and as possible causes of dementia. This has raised interest on the study of the effects of compounds acting as specific estrogen receptor modulators (SERMs), against cerebral damage induced by CCH. **Objectives.** The present study was designed to assess the effects of raloxifene on spatial learning and memory impairment, and cytoarchitectonic alterations of pyramidal neurons in the CA1 subfield of the hippocampal Ammon's horn, in aged female rats with CCH and absence of ovarian estrogen secretion. **Methods.** The study was performed in accordance with rules and ethical guidelines established for research in experimental animals. Sprague-Dawley female rats, aged 18-20 months-old at the beginning of the experiments, were randomly assigned to the following groups: Sham, n=6 (ovariectomized rats with simulated model of CCH); VEH-PreO, n=6 (ovariectomized rats with administration of dimethylsulfoxide as vehicle, 0.1 ml/day, from 15 days before and during 30 days after onset of CCH); VEH-PosO, n=6 (ovariectomized rats with administration of dimethylsulfoxide, 0.1 ml/day, during 30 days after onset of CCH); RAL-PreO, n=6 (ovariectomized rats with administration of raloxifene, 3 mg/kg/day, from 15 days before and during 30 days after onset of CCH); RAL-PosO, n=6 (ovariectomized rats with administration of raloxifene, 3 mg/kg/day during 30 days after onset of CCH). At the end of treatments, evaluations were made of: spatial learning and memory (escape latency, swimming path length, and swimming speed; number of crossings through the site where the escape platform was located on the previous days, and time spent in the target quadrant) in the Morris water maze; as well as cytoarchitectonic characteristics (length and number of bifurcations in the apical dendrite, and number and proportions of the different types of dendritic spines) of the pyramidal neurons in the CA1 subfield of the hippocampal Ammon's horn, in the different experimental conditions. **Results.** CCH impaired the spatial learning and memory (significantly longer escape latencies and swimming path lengths, and significant reduction of the number of crossings through the former location of the platform, and on the time spent in the target quadrant) in the animals treated with vehicle; while these parameters were similar in the groups treated with raloxifene, to those of the sham group. Furthermore, CCH induced a shortening of the length, reduction of the number of bifurcations, of the number of dendritic spines, and changes in the proportions of broad and mushroom spines, in the apical dendrite of the CA1 pyramidal neurons of vehicle-treated animals; while these cytoarchitectural parameters were similar in raloxifene-treated groups to those of the Sham group. **Conclusions.** These results show that raloxifene prevents the alterations of neuronal cytoarchitecture and cognitive impairment induced by CCH in aged female rats, in the absence of ovarian estrogen secretion; possibly through the activation of estrogen response elements in cerebral structures involved in the integration of cognitive functions.

Keywords: Chronic cerebral hypoperfusion, neuroprotection, raloxifene, neuronal cytoarchitecture, spatial learning and memory.

1. Introducción

La reducción permanente y progresiva del flujo sanguíneo cerebral, que ha sido identificada con el término de hipoperfusión cerebral crónica (HCC), es una condición que pone en riesgo la integridad morfológica y funcional de estructuras cerebrales vulnerables. La HCC puede estar asociada al envejecimiento, particularmente cuando este proceso transcurre con factores de riesgo y componentes fisiopatológicos de enfermedades cerebrovasculares (Iadecola 2013; Tarumi y Zhang 2018). Esta situación adquiere gran importancia si consideramos que el cerebro carece de reservas energéticas y que es un órgano con gran actividad metabólica; de tal manera que el continuo suministro de sustratos para la obtención de energía y el mantenimiento del metabolismo neuronal depende de la continuidad y suficiencia del flujo sanguíneo cerebral (Otori y cols., 2003).

La HCC puede dar lugar a procesos fisiopatológicos que resultan del insuficiente aporte de oxígeno y glucosa al cerebro; entre éstos destacan: el incremento anormal de especies reactivas de oxígeno (Chen y cols., 2011), las alteraciones del funcionamiento mitocondrial y generación de mecanismos proapoptóticos (Bennett y cols., 1998; Broughton y cols., 2009; Davila y cols., 2012), y la síntesis y expresión de citocinas proinflamatorias (León y cols., 2015), que en su conjunto pueden dar como resultado daño a los componentes estructurales de las neuronas y alteraciones del funcionamiento de estructuras muy vulnerables a la reducción de flujo sanguíneo cerebral .

El daño, en el caso del hipocampo, ocurre especialmente en las neuronas piramidales del segmento CA1 del Cuerno de Ammón y en la corteza prefrontal, especialmente en las neuronas piramidales de las capas III y V; que además de ser muy vulnerables a la reducción del flujo sanguíneo (Pulsinelli, 1985), se sabe que están directamente involucradas en la integración de las funciones cognitivas (Jarrad, 1993; Kesner y cols., 2011; Moser y cols., 2015). De esta manera, se ha involucrado a la HCC como factor causal del deterioro cognoscitivo que forma parte de la demencia de origen cerebrovascular, la cual corresponde aproximadamente al 20% del total de casos de demencia (Gorelick y cols., 2011).

La demencia, actualmente considerada como un problema prioritario de salud, es un síndrome, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, caracterizado por la alteración de diversas funciones cerebrales, tales como las funciones cognitivas: memoria y aprendizaje, pensamiento, orientación, comprensión, cálculo, lenguaje y juicio (World Health Organization, 2018).

En el año 2015 se calculó que 47 millones de personas estaban afectadas por demencia en todo el mundo, una cifra que se prevé que aumente a 75 millones en el año 2030 y a 132 millones de personas en el año 2050, con un gran costo en la calidad de vida individual y con repercusiones sociales y económicas importantes (Prince y cols., 2015). La Organización Mundial de la Salud, en estimaciones publicadas en 2018, menciona cifras equivalentes, de 50 millones de personas afectadas a nivel mundial, con una predicción a que haya 82 millones en 2030 y 152 millones en 2050; e informa que, a nivel mundial, la demencia ocupa el 5º lugar como causa de muerte y representa un gasto anual de 818,000 millones de dólares por año en EEUU (World Health Organization, 2018). Esto ha impulsado a nivel mundial el planteamiento y desarrollo de estrategias para abordar este problema (World Health Organization, 2017). En México, se ha mostrado que la prevalencia de demencia varía entre 6.8% y 7.9% en la población de adultos mayores de 65 años, y se ha considerado que es una de las principales causas de pérdida de años de vida, por discapacidad, entre las enfermedades no transmisibles; esto representa un problema prioritario de salud (Manrique-Espinoza y cols., 2013; ENASEM, 2015).

Por otra parte, se ha descrito que en el curso del envejecimiento, la reducción de las acciones estrogénicas en el hipocampo y en la corteza prefrontal, como consecuencia de la disminución o supresión de la secreción de estrógenos ováricos, puede provocar deterioro de las funciones cognitivas en animales de experimentación (Zhu y cols., 2017); sin embargo, aún está en discusión la relevancia que pueden tener las acciones estrogénicas en el deterioro cognoscitivo y la demencia asociados al envejecimiento, en mujeres postmenopáusicas (Espeland y cols., 2017).

Las acciones y los efectos neuroprotectores del estradiol en condiciones de isquemia cerebral, incluyendo la hipoperfusión cerebral crónica, han sido descritos con base en los resultados de múltiples estudios en animales de experimentación, en los que se ha

mostrado una clara relación de oposición entre las acciones estrogénicas y algunos de los principales mecanismos de daño cerebral por isquemia, así como la capacidad del estradiol para inducir fenómenos de plasticidad que pueden dar por resultado reparación del daño en circuitos neuronales, restauración de la conectividad y finalmente recuperación de las funciones deterioradas por la alteración del flujo sanguíneo cerebral (Zhu y cols., 2017). Sin embargo, la posibilidad del uso clínico de estradiol como neuroprotector ha quedado limitado ante la posibilidad de efectos indeseables, carcinogénicos y/o protrombóticos estrógeno-dependientes (Brann y cols., 2007; DonCarlos y cols., 2009).

De esta manera, la propuesta de los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs, por sus siglas en inglés) como una estrategia alternativa para inducir acciones estrogénicas neuroprotectoras con potencial uso clínico, se ha sustentado en los resultados de diferentes estudios en modelos de daño cerebral inducido por isquemia o por otras situaciones fisiopatológicas (Zhao y cols., 2005; DonCarlos y cols., 2009; Arevalo y cols., 2011; Rzemieniec y cols., 2015; Khan y cols., 2015; Rzemieniec y cols., 2018). De hecho, los efectos neuroprotectores del raloxifeno, un compuesto representativo de los SERMs de segunda generación, mediados por receptores estrogénicos (ER) alfa, (ER α) y el receptor de membrana acoplado a proteína G (GPR30), en diversas estructuras cerebrales incluyendo aquellas involucradas en las funciones cognitivas (Rzemieniec y cols., 2015; Zhou y cols., 2018), han sido considerados como parte de las características farmacológicas de este tipo de compuestos.

En el presente proyecto, se aborda el estudio de los posibles efectos neuroprotectores del raloxifeno en un modelo experimental en ratas viejas en el que coexisten la reducción permanente a largo plazo del flujo sanguíneo cerebral y la ausencia de las acciones del estradiol secretado por el ovario en estructuras cerebrales involucradas en la integración de las funciones cognitivas.

2. Antecedentes

2.1 Hipoperfusión cerebral crónica

La HCC es la reducción permanente y progresiva del flujo sanguíneo cerebral y se puede presentar por: procesos fisiopatológicos que lesionen la estructura vascular cerebral, como aterosclerosis de grandes arterias cerebrales, arteriosclerosis de pequeños vasos y angiopatía cerebral amiloidea; por cambios en la hemodinámica cerebral, como la reducción del gasto cardiaco secundario a falla cardiaca; o por cambios en los componentes sanguíneos que alteren propiedades, como la viscosidad de la sangre, tal es el caso de la hiperlipidemia. (Sarti y cols., 2002; Jellinger, 2013; Venkat y cols., 2015). Los factores de riesgo asociados a HCC son diabetes mellitus, hipertensión, síndrome metabólico, obesidad, edad avanzada (Sarti y cols., 2002; Venkat y cols., 2015; Duncombe y cols., 2017). Existen estudios que sustentan la vinculación entre HCC y la presencia y severidad de trastornos neurodegenerativos (Alsop y cols., 2010; Zhao y Gong, 2014), incluso la presencia de HCC parece tener un valor predictivo en cuanto al deterioro cognoscitivo (Chao y cols., 2010); por ello se ha considerado importante a la HCC como parte de las características fisiopatológicas de las enfermedades neurodegenerativas.

La hipoperfusión cerebral crónica puede inducir mecanismos de daño en estructuras cerebrales, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal, que están involucradas en las funciones cognitivas, como el aprendizaje y la memoria espacial (Pappas y cols., 1996; Farkas y cols., 2007; Cechetti y cols. 2012; Castaño-Guerrero y cols., 2013; Mansour y cols., 2018), en consecuencia, puede asociarse a deterioro cognitivo.

El estudio de las consecuencias de la reducción crónica y permanente del flujo sanguíneo cerebral ha sido abordado mediante modelos en animales de experimentación. Uno de los más usuales es el modelo de hipoperfusión cerebral crónica por la oclusión (en algunos modelos, la sección) bilateral, permanente, de ambas arterias carótidas comunes (2VO). En estas condiciones, se ha observado que el flujo sanguíneo puede llegar a reducirse en 55% en la corteza cerebral y en 40% en el hipocampo, en comparación con el flujo sanguíneo cerebral normal (Farkas y cols., 2007); esto provoca la pérdida de una cantidad importante de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo y deterioro del aprendizaje y de la memoria espacial. Entre los mecanismos de daño neuronal que se han

descrito en la HCC se destacan procesos proinflamatorios (Cechetti y cols., 2012; León y cols., 2015), estrés oxidativo (Chen y cols., 2011) y activación de cascadas de señalización proapoptóticas (Bennett y cols., 1998; Broughton y cols., 2009; Davila y cols., 2012). Asimismo, se ha identificado que la HCC provoca una reducción significativa de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal y del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, un fenómeno que puede corresponder a disminución de la conectividad, de la sinaptogénesis y del flujo de información en estas estructuras (Jia y cols., 2012).

En particular, se ha señalado que la reducción a largo plazo del flujo sanguíneo cerebral incrementa el deterioro cognoscitivo que podría esperarse por el proceso de envejecimiento, en animales de experimentación (Sopala y Danysz, 2001)

2.2 Acciones estrogénicas en el sistema nervioso central.

Existe evidencia acerca de los efectos neuroprotectores del 17β estradiol (E2) en contra del daño cerebral provocado por la isquemia, entre los que intervienen múltiples mecanismos de acción estrogénica a nivel celular y molecular, que tienen lugar en las estructuras cerebrales más vulnerables a la reducción del flujo sanguíneo (Moralí y Cervantes, 2014).

Adicionalmente, se ha mostrado la participación relevante del E2 en la regulación de la expresión génica, la supervivencia neuronal, la diferenciación neuronal y glial y la transmisión sináptica; así como bajo ciertas condiciones, en procesos antiinflamatorios, de neuroprotección, de reparación de daño neuronal y de recuperación de funciones cerebrales mediante mecanismos de plasticidad en circuitos neuronales de estructuras cerebrales específicas (Vegeto y cols., 2006; Woolley, 2007).

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

Los receptores primarios a estradiol, ER α y los ER β , han sido localizados en el núcleo, en el citoplasma y en la membrana de las neuronas, donde actúan como mediadores de activación de las vías de señalización intracelular involucradas en las acciones genómicas correspondientes a diversos efectos estrogénicos en el sistema nervioso central. Actualmente se acepta que los estrógenos, como otras hormonas esteroideas, pueden actuar a través de una vía considerada clásica, en la que se unen a sus receptores intracelulares, éstos se dimerizan y una vez que han sido translocados al núcleo, actúan como factores de transcripción mediante la interacción con sitios específicos de respuesta a estrógenos en el genoma (Fuentes y Silveyra, 2019). Hay gran densidad de ER α en el hipocampo, en el hipotálamo y en el área preóptica, mientras que su densidad es baja en la corteza cerebral. En contraste, los ER β se ubican predominantemente en la corteza cerebral, aunque también son abundantes en el hipocampo, el bulbo olfatorio, el septum, el área preóptica, el núcleo de la *estria terminalis*, la amígdala, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el tálamo, el área tegmental ventral, la sustancia negra y el cerebelo (Dubal y cols., 2001; Milner y cols., 2001; Pérez y cols., 2003; Kalita y cols., 2005; Milner, 2005; Levin, 2005; Woolley, 2007; Hammes y Levin, 2007; Raz y cols., 2008; Elzer y cols., 2010). En estas estructuras cerebrales se ha descrito una interacción cooperativa de los ER α y los ER β y sus coactivadores, para la regulación coordinada de la codificación de genes en el DNA nuclear y en el DNA mitocondrial para las proteínas involucradas en la cadena respiratoria (Chen y cols., 2009). Tanto los ER α como los ER β se expresan también en los astrocitos, en los que se puede activar la síntesis y liberación de factores de crecimiento como resultado de las acciones estrogénicas y, bajo ciertas condiciones, formar parte de procesos cerebrales de neuroprotección (Carswell y cols., 2004; Dhandapani y cols., 2005; Dhandapani y Brann, 2007; Arévalo y cols., 2009; Azcoitia y cols., 2010;).

Los datos experimentales que se han acumulado indican un papel preponderante de los ER α como mediadores de la neuroprotección del estradiol contra el daño cerebral por isquemia. Sin embargo, la participación de los ER β como mediadores de la neuroprotección por estradiol no ha sido descartada. Esta propuesta se ha sustentado principalmente en estudios de neuroprotección efectuados en animales "knockout" o "knockdown" para estos receptores y en estudios con agonistas o

antagonistas selectivos de los ER α y de los ER β (Dubal y cols., 2001; Carswell y cols., 2004; Miller y cols., 2005; Dai y cols., 2007; Elzer y cols., 2010).

Se ha descrito que el estradiol puede inducir fenómenos celulares que ocurren con mayor rapidez que los que están mediados por los receptores ER α y ER β . En efecto, ciertas acciones del estradiol, dependientes o independientes de procesos de transcripción en el cerebro, pueden estar mediadas por un receptor acoplado a proteínas G, denominado GPR30, localizado en la membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplásmico de las neuronas en varias estructuras cerebrales, incluyendo el hipocampo, el hipotálamo y el cuerpo estriado, entre otras (Funakoshi y cols., 2006; Matsuda y cols., 2008). El GPR30 ha sido identificado como un receptor a estrógeno cuya interacción con el estradiol puede dar lugar a la activación de vías de señalización, con un periodo de latencia muy breve e incluyen modificaciones de la fosforilación de proteínas y cambios en la concentración de segundos mensajeros intracelulares como el adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y el calcio (Liu y cols., 2010). Cabe destacar que el agonista (G1) selectivo del GPR30, ha mostrado efectos neuroprotectores contra el daño cerebral provocado por la reducción del flujo sanguíneo cerebral en modelos experimentales de isquemia focal o global (Lebesgue y cols., 2009; Zhang y cols., 2010; Lebesgue y cols., 2010; Tang y cols., 2014; Pan y cols., 2018).

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

2007;Marín y cols., 2009; García-Segura y cols., 2010; Roepke y cols., 2011; Murakami y cols., 2018).

Los receptores ER α , ER β y GPR30 parecen estar involucrados en diversas acciones estrogénicas que pueden dar lugar a neuroprotección, al inducir procesos celulares que guardan una relación de oposición con los mecanismos fisiopatológicos del daño cerebral por isquemia. Éste es el caso de: a) reducción del estrés oxidativo, a través de la reducción del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial, la reducción de la activación de la NADPH oxidasa y de la producción de ROS, la modulación de enzimas antioxidantes, y la captura de ROS; b) reducción de los fenómenos proinflamatorios inducidos por la isquemia; c) incremento de los mecanismos celulares antiapoptóticos; d) promoción de la síntesis y liberación de factores tróficos por parte de los astrocitos; e) mejoramiento a corto y largo plazo del flujo sanguíneo en las zonas isquémicas; f) regulación de las vías de señalización PI3K/Akt/MAPK en favor de la supervivencia neuronal; g) preservación funcional de la barrera hematoencefálica; h) reparación de los circuitos neuronales dañados mediante sinaptogénesis y neurogénesis (McEwen y cols. 2012; Morali y Cervantes, 2014).

2.3 Moduladores selectivos de receptores de estrógenos

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) son agentes que se unen al receptor estrogénico provocando su activación (agonistas) y la inducción de acciones celulares estrogénicas en ciertos tejidos; en tanto que en otros tipos celulares tienen un efecto inhibitorio (antagonistas) sobre las acciones estrogénicas inducidas por la activación de los receptores correspondientes (Riggs y Hartmann, 2003). La mayor parte son compuestos no esteroideos con estructura tridimensional que, tras unirse al ER, pueden inducir cambios específicos en la conformación del receptor influyendo en su capacidad para interactuar con otras proteínas, tales como coactivadores y correpresores, permitiéndoles interactuar como agonistas o como antagonistas del receptor estrogénico en diferentes tejidos (Brzozowski y cols., 1997; Smith y cols., 2004).

Los SERMs se han clasificado por su estructura química como: derivados del trifeniletileno, tales como el tamoxifeno y el citrato de clomifeno, que son

identificados también como SERMs de primera generación; derivados del benzotiofeno que incluyen a los SERMs de segunda generación, tales como el raloxifeno, toremifeno, droloxifeno, idoxifeno y derivados del benzopirano; SERMs de tercera generación: arzoxifeno, ospemifeno; y SERMs de cuarta generación: ormeloxifeno, lasofoxifeno, pependoxifeno y bazedoxifeno y fulvestrant (Dowers y cols., 2006). Además, deben ser incluidos en el grupo los fitoSERMs, como genisteína (Terán y Teppa, 2005).

Los SERMs se desarrollaron inicialmente como antagonistas de receptores a estrógenos en los tejidos de la glándula mamaria, para el tratamiento del cáncer de mama (Pickar and Komm, 2015). Sin embargo, sus efectos agonistas sobre receptores a estrógenos en el hueso sustentaron su uso clínico en el tratamiento de la osteoporosis (Ettinger y col., 1999; Anagnostis y col., 2018; Barrionuevo y cols., 2019) y otros trastornos a partir de la menopausia. Sin embargo, se ha mostrado que poseen otras propiedades que justificarían su prescripción para el tratamiento y prevención de otras enfermedades. Los SERMs, ya sea sintéticos o naturales, tales como los fitoestrógenos, han sido considerados una alternativa del estradiol para el tratamiento o la prevención de trastornos neurodegenerativos, tales como la disminución de la cognición con el envejecimiento o el desarrollo de los trastornos afectivos y cognitivos después de la menopausia (Yaffe y cols., 2005; DonCarlos y cols., 2009; Weickert y cols., 2015; Ji y cols., 2016).

2.4 Efectos neuroprotectores del raloxifeno

Las acciones y los efectos neuroprotectores del raloxifeno se han evaluado en diferentes modelos experimentales de daño neuronal, asumiendo que el raloxifeno es un compuesto representativo de los SERMs, en cuanto al mecanismo de acción de sus efectos neuroprotectores, mediados por receptores estrogénicos.

En modelos de neuroprotección *in vitro* se ha mostrado que el raloxifeno protege las neuronas del giro dentado del hipocampo de la excitotoxicidad inducida por el ácido kaínico (Ciriza y cols., 2004), así como del daño neuronal provocado por la proteína β -amiloide (Du y cols., 2004). En otros estudios, se han identificado las acciones antiapoptóticas del raloxifeno como uno de los mecanismos principales que sustentarían su efecto neuroprotector contra el daño provocado en condiciones de

hipoxia o en modelos *in vitro* de esclerosis lateral amiotrófica (Rzemieniec y cols., 2014; Rzemieniec y cols., 2018; Zhou y cols., 2018). También se ha mostrado que el raloxifeno preserva la función mitocondrial y previene el estrés oxidativo en astrocitos, bajo condiciones de privación de glucosa (Vesga-Jiménez y cols., 2018).

En diversos estudios, *in vivo*, se han obtenido resultados que sustentan el efecto neuroprotector del raloxifeno. Así, en diferentes modelos y condiciones experimentales de lesión traumática de la corteza cerebral o de la médula espinal, se ha mostrado que la administración de raloxifeno disminuye la reacción glial, la secreción de TNF- α e IL- β , facilita la recuperación funcional y reduce el deterioro de las funciones cognitivas (Kokiko y cols., 2006; Barreto y cols., 2009; Ismailoglu y cols., 2013). Asimismo, el tratamiento con raloxifeno preserva las concentraciones de dopamina en el cuerpo estriado e incrementa la expresión de Bcl-2, mediante la activación de vías de señalización ligadas al receptor GPR30, en un modelo de enfermedad de Parkinson en el ratón (Bourque y cols., 2014).

En otras condiciones experimentales, el raloxifeno ha mostrado que revierte las alteraciones en las oscilaciones de la actividad eléctrica del hipocampo en la banda de frecuencia gamma, que están asociadas a la eficiencia de la ejecución de tareas cognitivas, en ratas hembra ovariectomizadas (Schroeder y cols., 2017).

Otras acciones del raloxifeno que han sido señaladas como sustento de sus efectos neuroprotectores son: la preservación de la integridad del citoesqueleto neuronal (Segura-Urbe y cols., 2017), la reducción del daño inducido por estrés oxidativo (Konyalioglu y cols., 2007) y la activación glial inducida por la administración de lipolisacárido (Tapia-González y cols., 2008; Cerciat y cols., 2010).

Por otra parte, el raloxifeno es capaz de inducir mecanismos de neuroplasticidad, tales como el crecimiento axonal (Nilsen y cols., 1998), incremento de la neurogénesis y modificaciones de la densidad y proporciones relativas de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza prefrontal, que pueden estar relacionadas con la preservación de funciones cognitivas en condiciones de daño cerebral (Khan y cols., 2015; Velázquez-Zamora y cols., 2012).

Se ha postulado que las acciones neuroprotectoras del raloxifeno están mediadas por su interacción como un agonista de ER y por la activación del receptor GPR30

(Armagan y cols., 2009; Abdelhamid y cols., 2011; Rzemieniec y cols., 2018). De hecho, el potencial neuroprotector del raloxifeno ha sido descrito por estudios clínicos que muestran su eficacia en contra de procesos neurodegenerativos y del deterioro cognitivo en hombres ancianos (Goekoop y cols., 2005; Goekoop y cols., 2006) y en mujeres posmenopáusicas (Yaffe y cols., 2005; Jacobsen y cols., 2009).

Estos datos experimentales sustentan la potencialidad del uso clínico del raloxifeno y la posibilidad de desarrollo de otros SERMs con características farmacológicas neuroprotectoras similares, cuyas acciones estarían mediadas por la modulación de receptores estrogénicos en estructuras cerebrales.

3. Justificación

La reducción permanente a largo plazo del flujo sanguíneo cerebral, el envejecimiento y la ausencia de acciones estrogénicas en el cerebro como consecuencia de la supresión de la secreción de estrógenos ováricos, son fenómenos concurrentes en mujeres postmenopáusicas, que usualmente están asociados con el deterioro cognoscitivo. Los efectos de estos tres factores han podido ser analizados en modelos experimentales, en los que, siendo inducidos o presentándose de manera concurrente, provocan daño neuronal y alteraciones morfológicas y/o funcionales en estructuras cerebrales vulnerables, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal, así como un deterioro de las funciones cognoscitivas, comparable al que puede observarse en la mujer en estas condiciones. De este modo, los modelos experimentales que reúnen estas tres condiciones, además de permitir el análisis detallado de los fenómenos de daño y/o de reparación cerebral, permiten también evaluar el efecto de posibles compuestos neuroprotectores.

Con base en los resultados de diferentes estudios en modelos de daño cerebral inducido por isquemia y por otras situaciones fisiopatológicas, se ha propuesto a los fármacos SERMs, como base de una estrategia para inducir acciones estrogénicas neuroprotectoras con potencialidad de uso clínico. Así, se han identificado acciones neuroprotectoras del raloxifeno, mediadas por receptores estrogénicos ER α y GPR30 en diversas estructuras cerebrales, con una clara relación de oposición con los principales mecanismos de daño cerebral por isquemia, así como promoviendo fenómenos plásticos de reparación y recuperación morfológica y funcional en estructuras cerebrales vulnerables, incluyendo aquellas involucradas en funciones cognoscitivas. Estas acciones neuroprotectoras han sido incluidas en las características farmacológicas de este tipo de compuestos.

Es importante estudiar los posibles efectos neuroprotectores del raloxifeno en un modelo experimental en el que coexisten: la reducción permanente del flujo sanguíneo cerebral, el envejecimiento y la ausencia de acciones estrogénicas inducidas por estradiol de origen ovárico, sobre la estructura y función de regiones cerebrales involucradas en la integración de funciones cognoscitivas.

4. Hipótesis

El raloxifeno ejerce un efecto neuroprotector y un efecto promotor de fenómenos plásticos de reparación neuronal y recuperación funcional del hipocampo en un modelo de hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos, en ratas viejas.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto neuroprotector y promotor de la plasticidad neuronal del raloxifeno en un modelo de hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos, en ratas viejas.

5.1 Objetivos específicos

- Evaluar las alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de secreción de estrógenos ováricos en ratas viejas.
- Evaluar las alteraciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de secreción de estrógenos ováricos en ratas viejas.
- Evaluar los efectos de dos esquemas de tratamiento con raloxifeno, pre- y post- hipoperfusión cerebral crónica, sobre las alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos, en ratas viejas.
- Evaluar los efectos de dos esquemas de tratamiento con raloxifeno, pre- y post- hipoperfusión cerebral crónica, sobre las alteraciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de secreción de estrógenos ováricos en ratas viejas.

6. Materiales y métodos

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, con una edad de 16-20 meses (330-370 g de peso) al inicio del estudio, alojadas en cajas de acrílico, bajo condiciones de ciclos de luz y oscuridad (12h/12h), a una temperatura de 21 ± 2 °C, con provisión de comida (Rodent Laboratory Chow, Purina) y agua *ad libitum*.

El manejo de los animales y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las normas vigentes, tanto internacionales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010) como de 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). Además, se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o el sufrimiento de los animales en todos los procedimientos experimentales.

Los animales de experimentación fueron asignados al azar a los siguientes grupos: Sham, n=6 (ratas ovariectomizadas, con simulación del modelo de hipoperfusión cerebral crónica); VehPreO, n=6 (ratas ovariectomizadas, con administración de vehículo, 0.1 ml/día sc, desde 15 días antes del inicio de hipoperfusión cerebral crónica y durante 30 días después del inicio de ésta); RalPreO, n=6 (ratas ovariectomizadas, con administración de raloxifeno, 3.0 mg/kg/día sc, desde 15 días antes del inicio de la hipoperfusión cerebral crónica y durante 30 días después del inicio de ésta); VehPosO, n=6 (ratas ovariectomizadas, con administración de vehículo, 0.1 ml/día sc, durante 30 días a partir del inicio de la hipoperfusión cerebral crónica); RalPosO, n=6 (ratas ovariectomizadas, con administración de raloxifeno, 3.0 mg/Kg/día sc, durante 30 días a partir del inicio de la hipoperfusión cerebral crónica).

Para los tratamientos mencionados, el raloxifeno se disolvió en dimetilsulfóxido y se diluyó al 10 % en agua. Como vehículo se utilizó dimetilsulfóxido al 10 % en agua.

Los procedimientos quirúrgicos requeridos para la ovariectomía y el modelo de hipoperfusión cerebral crónica se realizaron bajo anestesia general con ketamina/xilacina, 50/10 mg/kg, im. La hipoperfusión cerebral crónica se inició 15 días después de la ovariectomía.

Al término del tratamiento (vehículo o raloxifeno) o de períodos equivalentes en el grupo Sham, los animales de los diferentes grupos fueron sometidos durante ocho días a la prueba de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984). Una vez finalizadas las pruebas en el laberinto acuático de Morris, se obtuvieron los cerebros de los animales de los diferentes grupos para procesamiento histológico y evaluación de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo.

6.1 Modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica (HCC)

El modelo de hipoperfusión cerebral crónica se realizó bajo anestesia general con ketamina (50 mg/kg, im) y xilazina (10 mg/kg, im) y condiciones asépticas, de acuerdo con los procedimientos quirúrgicos descritos previamente (Cechetti y cols., 2010; Cechetti y cols., 2012, Azzubaidi y cols., 2012). Utilizando un microscopio estereoscópico, se colocó una doble ligadura con seda 5-0 en la arteria carótida común izquierda; en estas condiciones se llevó a cabo la sección de la arteria carótida, entre las ligaduras. Siete días después se realizó el mismo procedimiento en la arteria carótida común derecha. Luego de cada uno de ambos procedimientos quirúrgicos se mantuvo a los animales en condiciones controladas de temperatura e hidratación. Se administró diclofenaco (1 mg/kg, IM) y enrofloxacin (2 mg/kg, IM), como profilaxis de dolor e infección, respectivamente. El momento de la segunda oclusión y sección de la arteria carótida se consideró como el inicio de la HCC. En el grupo Sham se realizaron procedimientos anestésico-quirúrgicos similares a los de los otros grupos, sin la ligadura ni el corte de las arterias carótidas.

6.2 Evaluación de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

Para la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial se utilizó el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984).

Este dispositivo consiste en una tina circular (140 cm de diámetro, 50 cm de altura), con agua teñida de color oscuro, a una temperatura de 25° C, hasta un nivel de 25 cm de profundidad, dividida de manera virtual en 4 cuadrantes, en el centro de uno de los cuales se coloca una plataforma de escape (13 cm x 13 cm), sumergida 2 cm

bajo la superficie del agua, con una ubicación fija, a una distancia de 28 cm de la pared de la tina. El laberinto acuático se encuentra rodeado de objetos visibles para que puedan ser identificados como señales espaciales.

Se realizaron diariamente 2 ensayos, con un intervalo de 20 minutos entre ellos, durante 7 días. En cada uno de los ensayos cada rata se colocó en el agua, frente a la pared de la tina, en sitios diferentes (al azar) en cualquiera de los cuadrantes, a partir de donde nadó libremente durante 60 segundos en búsqueda de la plataforma de escape. Cada ensayo se dio por terminado con la localización de la plataforma antes de 60 segundos; en caso contrario, al cumplir 60 segundos, la rata fue guiada manualmente hasta la plataforma, donde permaneció 15 segundos. Se evaluó en cada ensayo el tiempo que tarda la rata en localizar la plataforma (latencia de escape) y la longitud de la trayectoria de nado desde el sitio de partida hasta la plataforma.

Al octavo día de prueba se realizó una prueba de transferencia, que consiste en retirar la plataforma del laberinto acuático y permitir a la rata la búsqueda de ésta durante un periodo de 30 segundos. Se evaluó el número de cruces realizado por la rata por el sitio exacto donde se encontraba la plataforma, así como el tiempo de permanencia y la distancia recorrida en cada uno de los cuadrantes.

Para la evaluación de éstos y otros parámetros se utilizaron videograbaciones del recorrido de cada rata en el laberinto acuático de Morris y un software diseñado especialmente para ello (ImageJ, Animaltracker).

Los parámetros que se evaluaron en el laberinto acuático de Morris fueron los siguientes:

- Latencia de escape (s)
- Longitud de la trayectoria de nado (cm)
- Número de cruces
- Tiempo de permanencia en cada cuadrante (s)
- Longitud de la trayectoria de nado en cada cuadrante (cm)

6.3 Procesamiento histológico. Impregnación metálica de Golgi

Al finalizar el periodo de evaluación en el laberinto acuático de Morris, los cerebros de las ratas fueron fijados, bajo anestesia profunda, mediante perfusión intracardiaca a través del ventrículo izquierdo (solución amortiguadora de fosfatos [PBS 0.2 M, pH 7.4] seguida de una solución fijadora de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos). Los cerebros fueron extraídos del cráneo y se post-fijaron por inmersión en el mismo tipo de solución fijadora, durante al menos 2 días antes del procesamiento histológico (Carter y Shieh, 2010).

Para el procesamiento histológico de las muestras, se separaron y procesaron 5 hipocampos de hemisferios derechos y 5 hipocampos de hemisferios izquierdos por grupo de experimentación, utilizando la técnica de impregnación metálica de Golgi, modificada (González-Burgos y cols., 1992).

Esta técnica consiste en indurar/fijar las muestras en solución indurante durante 24 h en ausencia de luz (solución indurante: 50 mL de agua desionizada con dicromato de potasio al 2 %, 10 mL de formaldehído al 40 % y 5 mL de ácido acético glacial) y en agitación constante. Una vez transcurridas las 24 h se reemplaza la solución y se dejan las muestras durante otras 24 h, al cabo de las cuales, las muestras son lavadas con agua desionizada durante varios ciclos de 10 min, reemplazando el agua en cada ciclo hasta aclarar. Una vez aclarado el tejido, las muestras son sumergidas en solución de impregnación durante 24 h en ausencia de luz (solución de impregnación: nitrato de plata al 0.75 % en agua desionizada a la que se agregan 2 μ L de ácido fórmico).

Una vez terminada la impregnación, el tejido fue incluido en parafina para obtener cortes coronales de 200 μ m de espesor, los cuales fueron colocados en laminillas para ser observados al microscopio.

Se estudiaron las características citoarquitectónicas de 10 neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, en cada animal.

Para la evaluación de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo se seleccionaron 5 neuronas del

hipocampo derecho y 5 neuronas del hipocampo izquierdo de cada animal. Se evaluaron:

- Longitud de la dendrita apical.
- Número de bifurcaciones dendríticas en el estrato radiado
- Número de espinas dendríticas en un segmento de 50 μm de una dendrita oblicua de 2° orden, proximal a la dendrita apical, ubicada en el estrato radiado.
- Proporción de espinas delgadas, anchas, en hongo y ramificadas, en ese segmento.

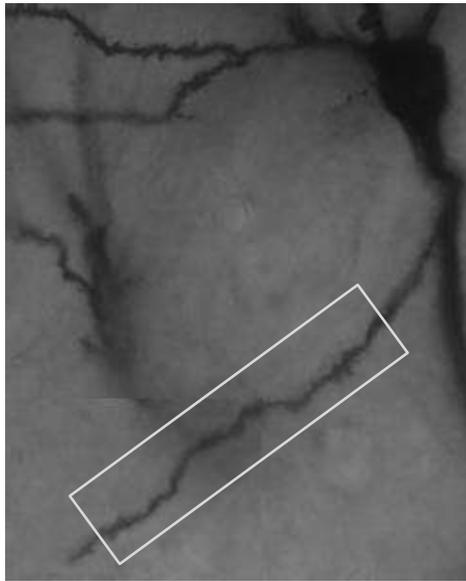


Figura 1. Fotomicrografía de una neurona piramidal de CA1, donde se muestra una imagen representativa del segmento de 50 μm de una dendrita oblicua de 2° orden, donde se realizó el conteo de espinas dendríticas.

6.4 Análisis estadístico

Los valores de latencia de escape (s), longitud de trayectorias de nado (cm) para la localización de la plataforma, número de cruces por el cuadrante de la plataforma, tiempo de permanencia en cada cuadrante (s) y longitud de trayectoria de nado en cada cuadrante (cm) en el laberinto acuático de Morris, fueron objeto de análisis estadístico. Los datos se expresaron como mediana \pm rango. Se consideraron diferencias significativas cuando los resultados del análisis estadístico indicaron una $p \leq 0.05$ (Downey y Heath, 1983; Siegel, 1956).

El análisis intragrupal de los valores de latencia de escape, así como de la longitud de la trayectoria de nado en los días 2, 3, 4, 5, 6 y 7 comparados con el día 1, se realizó mediante ANOVA de Friedman seguido por una prueba *post-hoc* de Wilcoxon. Para el análisis intergrupalo de los valores de latencia de escape, así como de las longitudes de trayectoria de nado entre los diferentes grupos para cada día, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba *post-hoc* U de Mann-Whitney. El número de cruces por el sitio de la plataforma y el tiempo de permanencia en cada cuadrante, así como la longitud de la trayectoria de nado en cada cuadrante, en la prueba de transferencia, se compararon usando ANOVA de una vía con pruebas *post-hoc* de Tukey.

Los resultados obtenidos de la medición de la longitud de la dendrita apical, el número de bifurcaciones y el número de espinas dendríticas en el análisis de la citoarquitectura de las neuronas piramidales se expresaron como media \pm error estándar de la media (media \pm EE.). Las comparaciones estadísticas de los valores entre grupos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey.

Las proporciones de los diferentes tipos de espinas dendríticas (hongo, delgadas, anchas y bifurcadas) observadas en las neuronas piramidales se expresaron en porcentaje. Para comparar estas proporciones entre los diferentes grupos experimentales se utilizó la prueba estadística Xi-cuadrada (X^2).

7. Resultados

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

7.1.1 Aprendizaje espacial. Latencia de escape

Los valores de la latencia de escape (mediana y rango) de los diferentes grupos experimentales, registrados en cada uno de los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris, se muestran en la figura 2. Puede observarse la reducción progresiva de la latencia de escape de los animales del grupo Sham en los días de prueba sucesivos, con diferencias significativas los días 6 ($p=0.001$) y 7 ($p=0.002$) con respecto al primer día de prueba. Un patrón semejante de reducción de la latencia de escape, con diferencias significativas con respecto al primer día de prueba se observó en los grupos: VehPreO los días 5 ($p=0.01$), 6 ($p=0.004$) y 7 ($p=0.017$); RaiPreO los días de

prueba 5 ($p=0.041$), 6 ($p<0.047$) y 7 ($p=0.011$); y RalPosO el día de prueba 7 ($p=0.049$). En el grupo VehPosO no se observó reducción significativa de la latencia de escape en los diferentes días de prueba con respecto al primer día. No se observaron diferencias significativas de las latencias de escape entre los grupos, en los diferentes días de prueba.

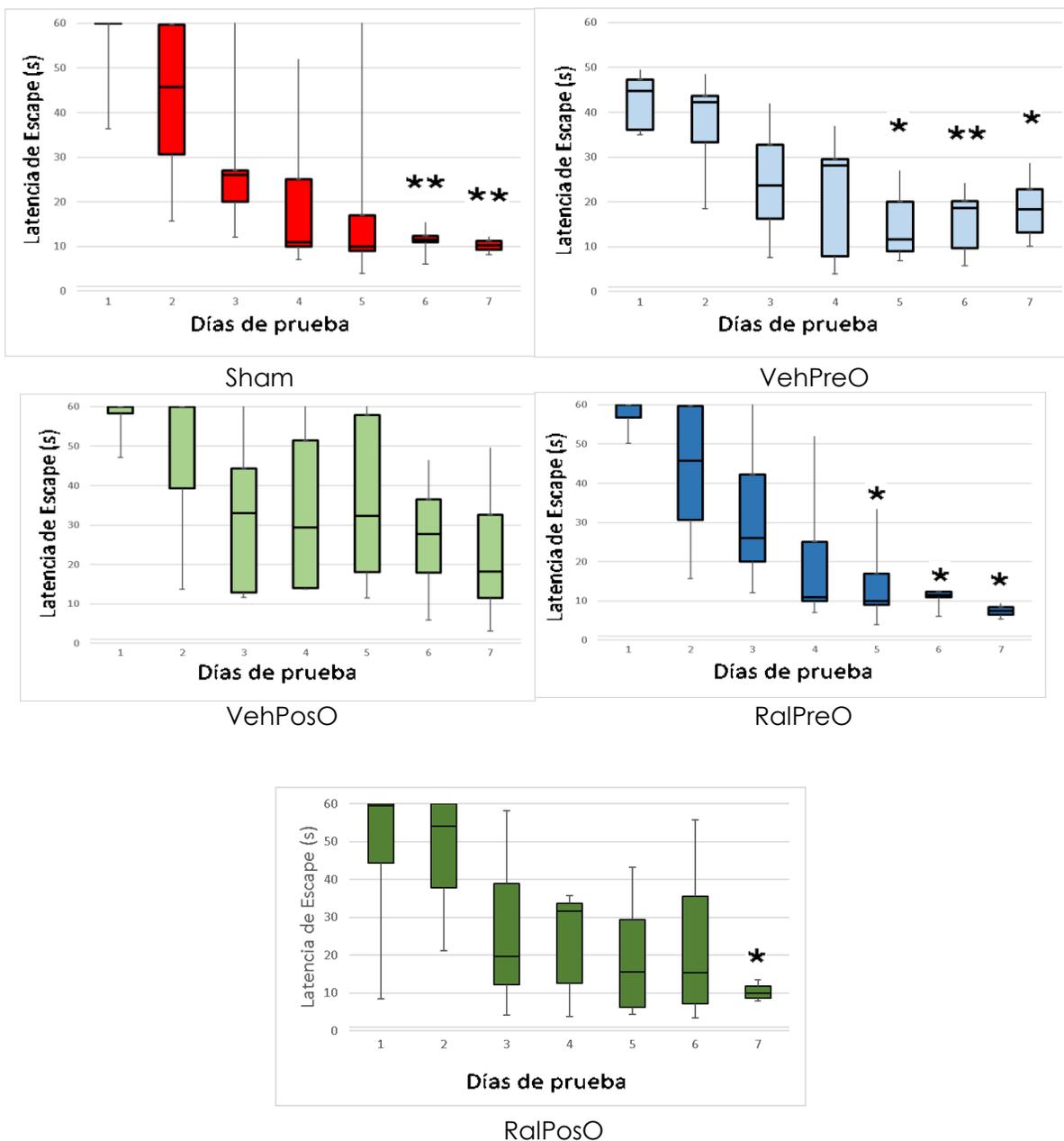
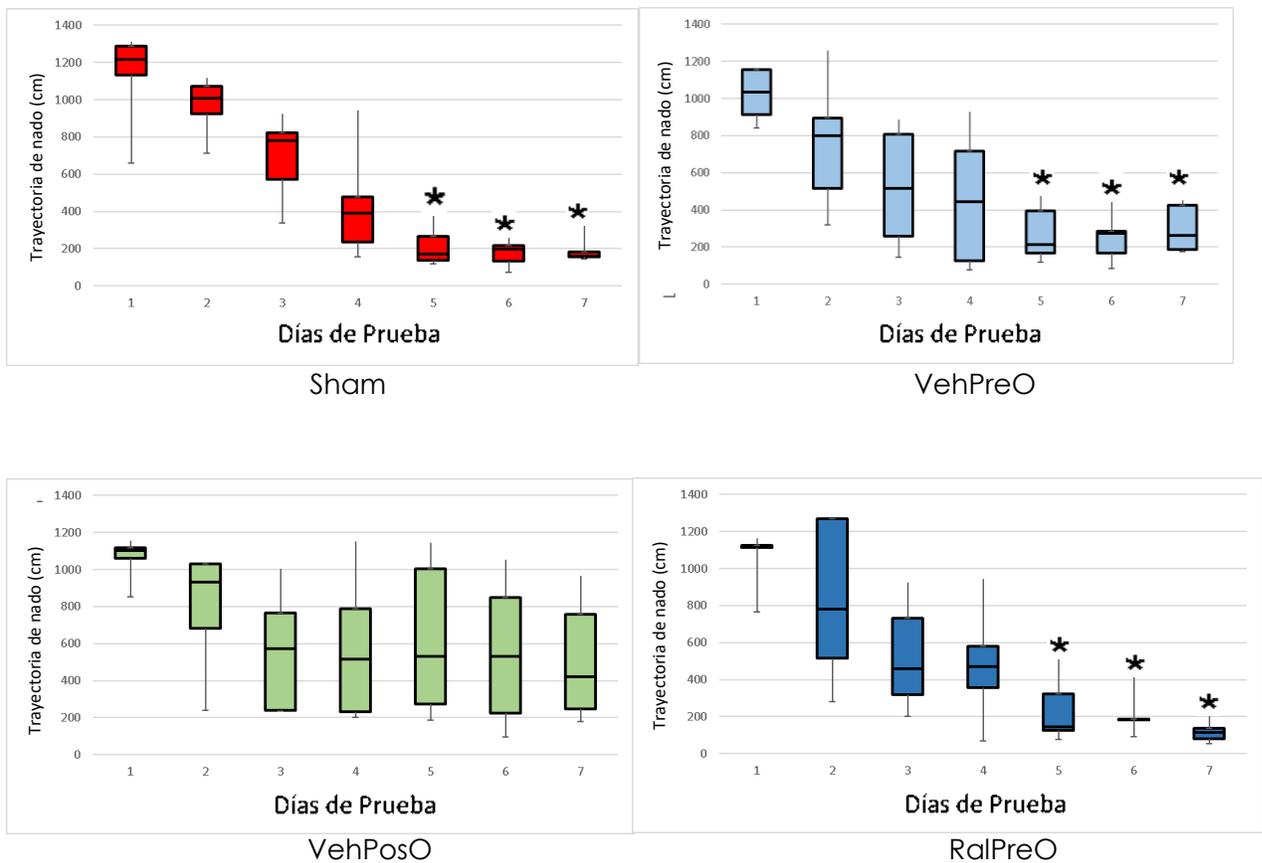


Figura 2. Latencias de escape (Mediana y Rango) de los diferentes grupos experimentales durante los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, con respecto al primer día de prueba.

7.1.2 Aprendizaje espacial. Longitud de las trayectorias de nado

Los valores de longitud (cm) de las trayectorias de nado (mediana y rango) recorridas por los animales de los diferentes grupos experimentales en cada uno de los días de prueba en el laberinto acuático de Morris se muestran en la figura 3. Puede observarse la reducción progresiva de la longitud de las trayectorias de escape en los días sucesivos de prueba, con diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir del día 5, en los grupos Sham, RalPreO y VehPreO, así como en el grupo RalPosO el día 7, con respecto al primer día de prueba. No se observaron diferencias significativas en los valores de las trayectorias de nado entre los grupos, en los diferentes días de prueba.



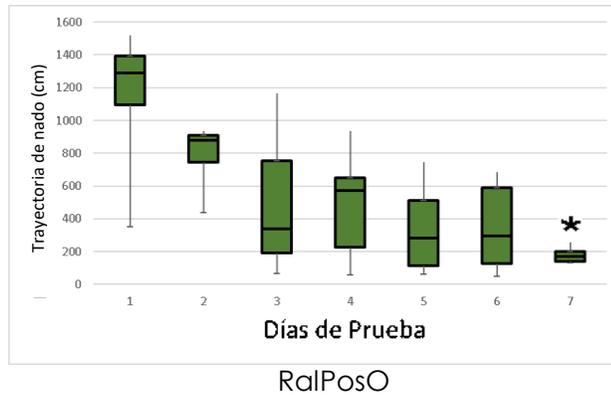


Figura 3. Longitud de la trayectoria de nado (Mediana y Rango) de los animales de los diferentes grupos experimentales durante los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris. * $p < 0.05$ con respecto al primer día de prueba.

7.1.3 Memoria espacial. Número de cruces por el sitio de la plataforma

En la figura 4 se muestra el número de cruces (media \pm error estándar), efectuados por los animales de los diferentes grupos experimentales, durante la prueba de transferencia, por el sitio donde se ubicaba la plataforma. Puede observarse la reducción significativa del número de cruces del grupo VehPreO ($p=0.007$) y VehPosO ($p=0.003$) en comparación con el grupo Sham; y el mayor número de cruces de los grupos tratados con raloxifeno en comparación con los grupos tratados con vehículo: RalPreO vs. VehPreO ($p=0.047$); RalPreO vs. VehPosO ($p=0.046$); RalPosO vs. VehPreO ($p=0.044$) y RalPosO vs. VehPosO ($p=0.028$).

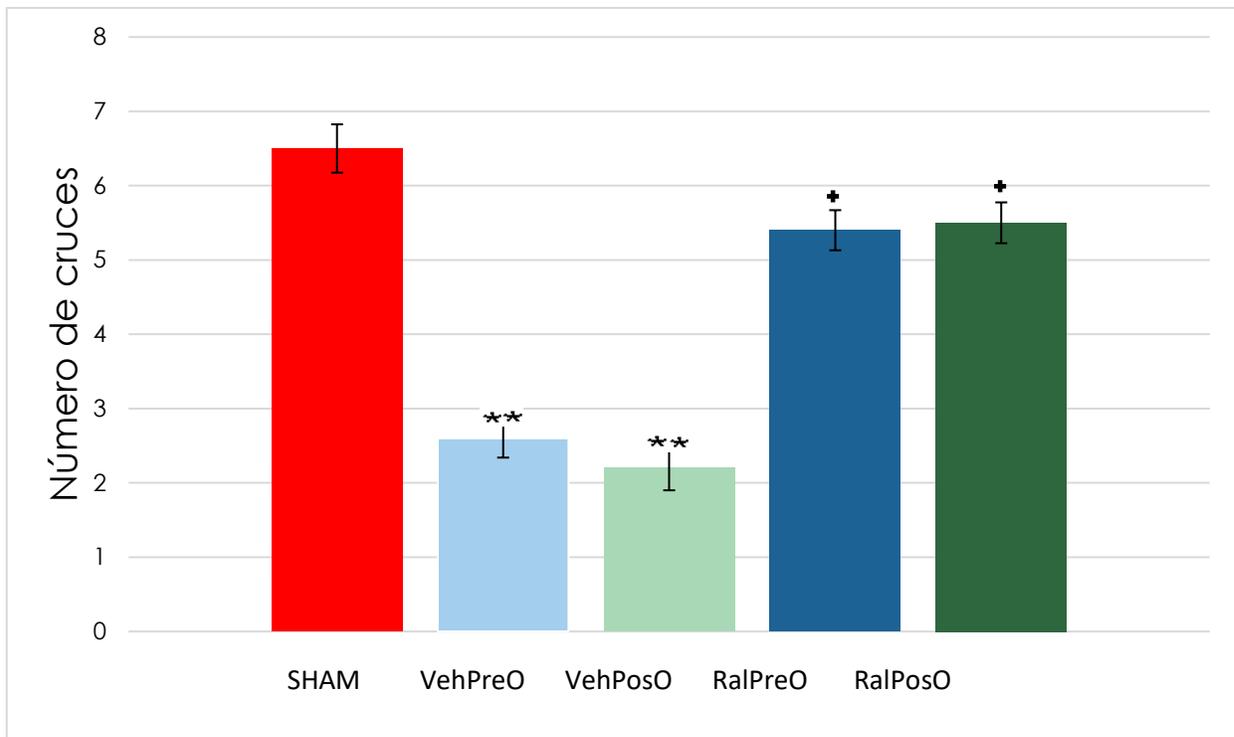


Figura 4. Número de cruces (media \pm EE) por el sitio donde se encontraba la plataforma. ** $p < 0.01$ vs Sham; + $p < 0.05$ vs. VehPreO y VehPosO.

7.1.4 Memoria espacial. Tiempo de permanencia en cada cuadrante

La figura 5 muestra los valores (media \pm error estándar) del tiempo de permanencia (s) de los animales de los diferentes grupos experimentales, nadando en cada uno de los cuadrantes, durante la prueba de transferencia, habiendo retirado la plataforma de su ubicación original (cuadrante B). En el grupo Sham, el tiempo de permanencia en el cuadrante donde, durante los 7 días de prueba, se encontraba la plataforma (cuadrante B), fue significativamente mayor que el tiempo de permanencia en los otros cuadrantes (A, C, D) ($p = 0.042$ para B vs. A, $p = 0.046$ para B vs. C y $p = 0.040$ para B vs. D); el mismo patrón de permanencia en los cuadrantes fue observado en los grupos RalPreO ($p = 0.039$ para B vs. A, $p = 0.018$ para B vs. C y $p = 0.030$ para B vs. D) y RalPosO ($p = 0.031$ para B vs. A, $p = 0.028$ para B vs. C y $p = 0.042$ para B vs. D). En cambio, en los grupos VehPreO y VehPosO, no se observaron diferencias en el tiempo de permanencia en los diferentes cuadrantes.

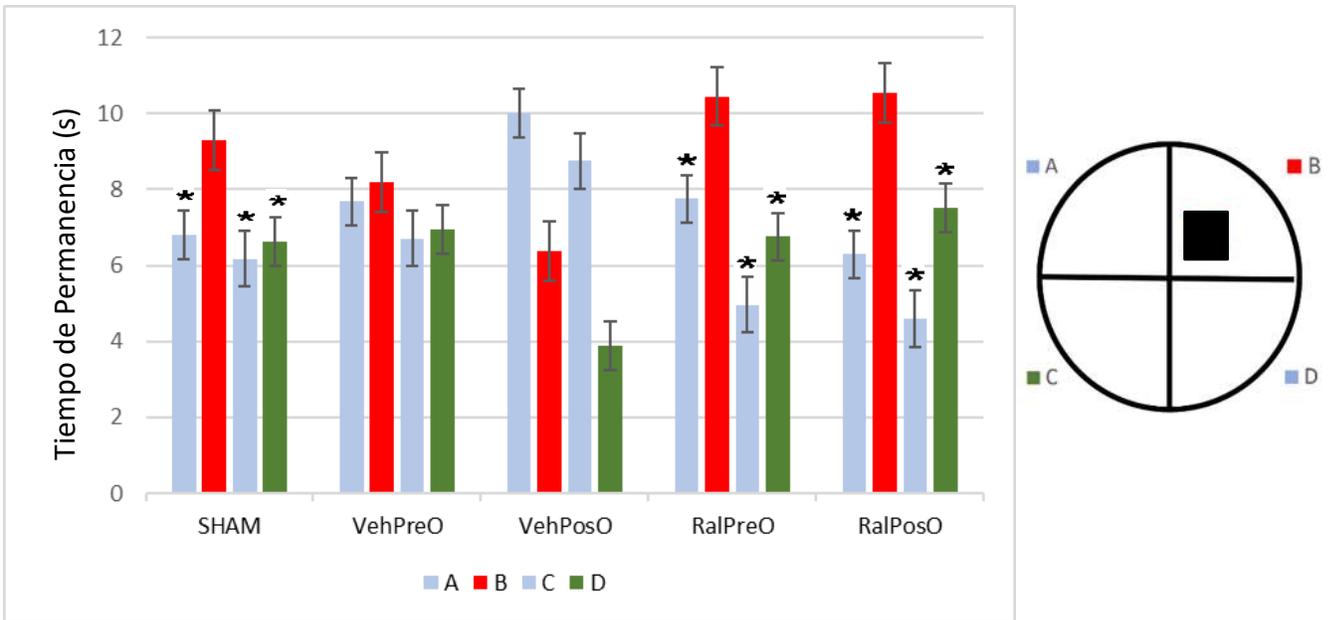


Figura 5. Tiempo (s) de permanencia (Media \pm EE) en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia, en los diferentes grupos experimentales. Se encontraron mayores tiempos de permanencia en el cuadrante B (donde se encontraba originalmente la plataforma), en comparación con los cuadrantes A, C y D, en los grupos Sham, RalPreO y RalPosO, pero no en los grupos VehPreO y VehPosO. * $p < 0.05$ vs. el cuadrante B.

7.1.5 Memoria espacial. Longitud de la trayectoria de nado en cada cuadrante.

La figura 6 muestra los valores de la longitud (cm) de la trayectoria de nado de los animales de los diferentes grupos experimentales en cada uno de los cuadrantes (media \pm Error Estándar) durante la prueba de transferencia, habiendo retirado la plataforma de su ubicación original (cuadrante B). En el grupo Sham, la longitud de la trayectoria de nado en el cuadrante donde se encontraba la plataforma (cuadrante B) durante los 7 días de prueba, fue significativamente mayor que la longitud de la trayectoria en cada uno de los otros cuadrantes (A, C, D) ($p=0.042$ para B vs. A, $p=0.036$ para B vs. C y $p=0.030$ para B vs. D); el mismo patrón de longitud de trayectoria en los cuadrantes fue observado en los grupos RalPreO ($p=0.038$ para B vs. A, $p=0.018$ para B vs. C y $p=0.028$ para B vs. D) y RalPosO ($p=0.032$ para B vs. A, $p=0.026$ para B vs. C y $p=0.040$ para B vs. D). En cambio, en los grupos VehPreO y VehPosO, no se observaron diferencias en la longitud de la trayectoria en los diferentes cuadrantes.

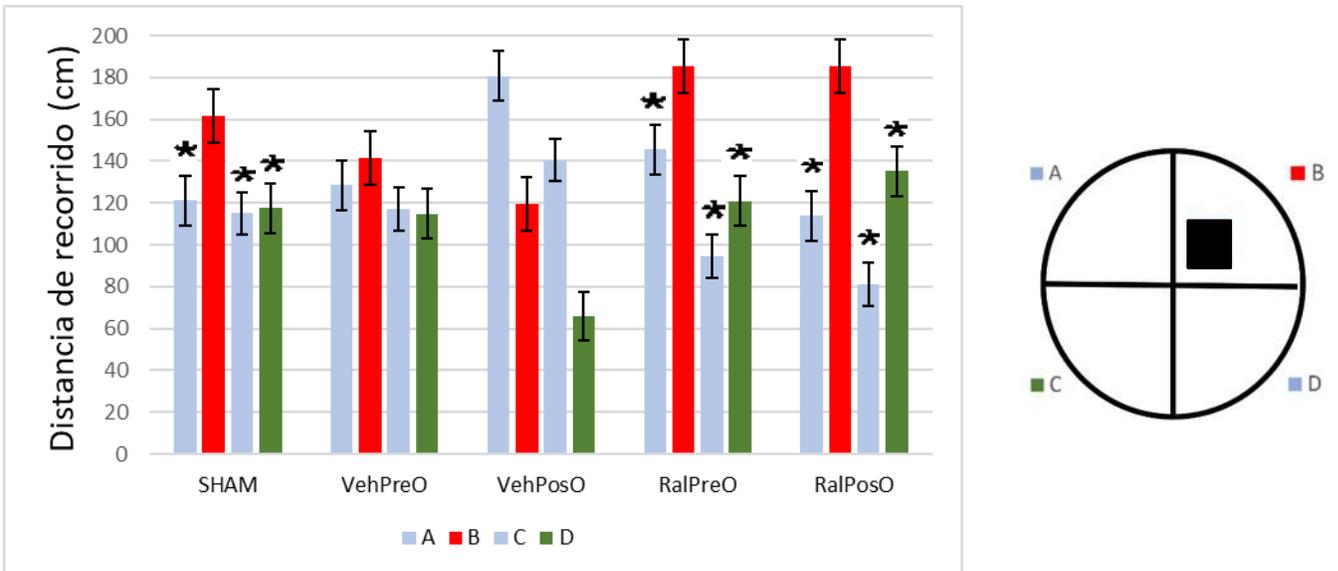


Figura 6. Longitud (cm) de la trayectoria de nado (Media \pm EE) en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia en los diferentes grupos experimentales. Las longitudes de la trayectoria de nado en el cuadrante B (donde se encontraba originalmente la plataforma) fueron mayores que en los cuadrantes A, C y D en los grupos Sham, RalPreO y RalPosO, pero no en los grupos VehPreO y VehPosO. * $p < 0.05$ vs. el cuadrante B.

7.2 Evaluación de la citoarquitectura.

La figura 7 muestra imágenes representativas de la citoarquitectura de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo, en las diferentes condiciones experimentales. Pueden observarse las características en el grupo Sham; y las diferencias de la citoarquitectura neuronal en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica en ausencia de tratamiento y bajo tratamiento con raloxifeno.

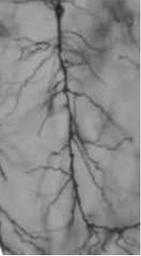
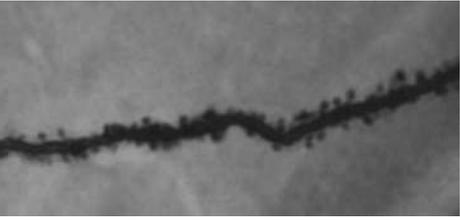
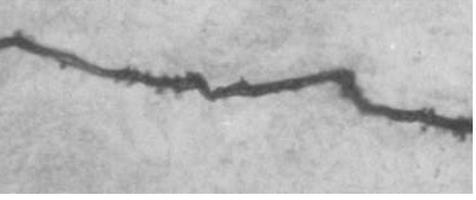
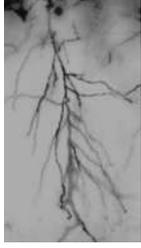
Grupo Experimental	Neurona	Segmento de la dendrita oblicua
Sham		
VehPreO		
VehPosO		
RalPreO		
RalPosO		

Figura 7. Fotomicrografías que muestran imágenes representativas de las neuronas piramidales del segmento CA1 y del segmento de 50 μm de una dendrita oblicua de 2° orden, de los diferentes grupos experimentales.

7.2.1 Longitud de la dendrita apical

Los valores (media \pm desviación estándar) de la longitud de la dendrita apical, de neuronas piramidales en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en los diferentes grupos experimentales, se muestran en la figura 8. Puede observarse que la longitud de la dendrita apical en los grupos RalPreO y RalPosO fue similar a la del Sham. En cambio, la longitud de la dendrita apical fue significativamente menor ($p=0.002$, $p=0.002$) en los grupos VehPreO y VehPosO con respecto al grupo Sham. Por su parte, la longitud de la dendrita apical en el grupo RalPreO fue mayor que en VehPreO ($p=0.001$) y VehPosO ($p=0.001$), así como la del RalPosO también en comparación con VehPreO ($p=0.001$) y VehPosO ($p=0.007$), con valores similares al Sham. No se observaron diferencias significativas entre los grupos VehPreO y VehPosO, ni entre los grupos RalPreO y RalPosO.

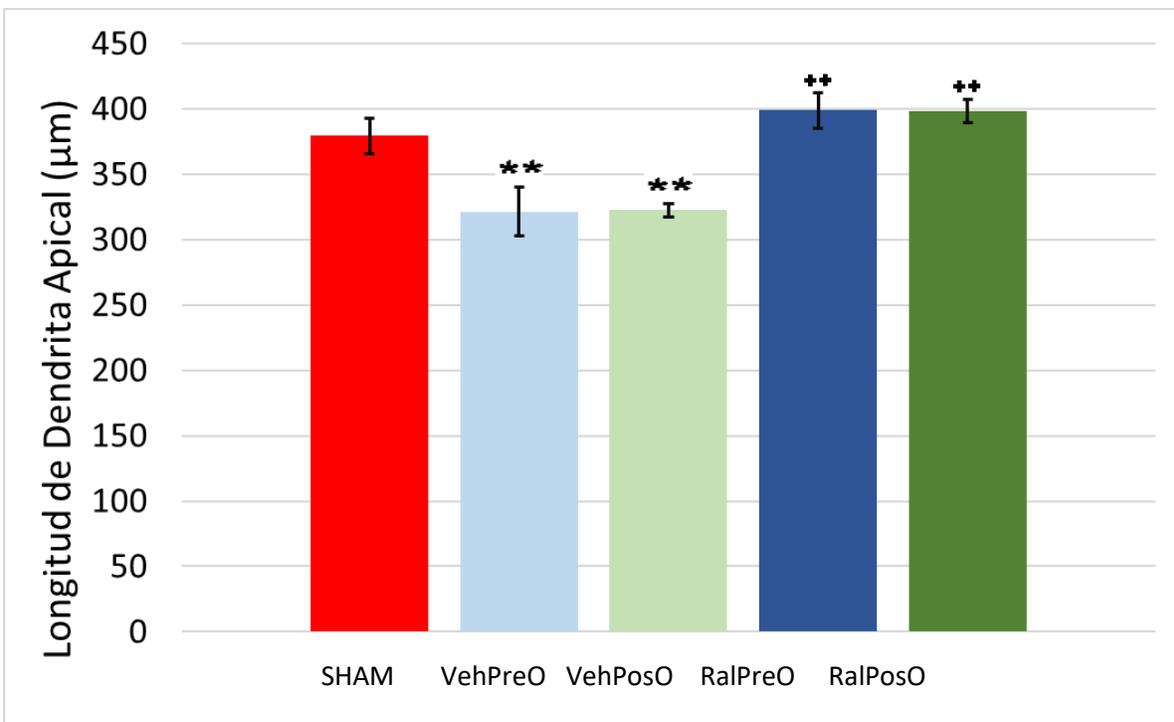


Figura 8. Longitud de la dendrita apical de las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo de los diferentes grupos experimentales (Media \pm DE). Puede observarse la reducción significativa de la longitud de la dendrita apical en los grupos VehPreO y VehPosO, en comparación con la del grupo Sham; y la longitud de la dendrita apical en los grupos RalPreO y RalPosO, similar a la del Sham y mayor a la de los grupos VehPreO y VehPosO. ** $p < 0.01$ vs. Sham; ++ $p < 0.01$ vs VehPreO y VehPosO.

7.2.2 Número de bifurcaciones

Los valores (Media \pm Desviación estándar) del número de bifurcaciones dendríticas en las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo, en los diferentes grupos experimentales, se muestran en la figura 9. Puede observarse que el número de bifurcaciones fue similar, sin diferencias significativas en los grupos Sham, RalPreO y RalPosO. En cambio, el número de bifurcaciones dendríticas se redujo significativamente en los grupos VehPreO y VehPosO con respecto al grupo Sham ($p=0.003$, $p=0.001$). Las dendritas en los grupos RalPreO ($p=0.0001$, $p=0.007$) y RalPosO ($p=0.001$, $p=0.001$) presentaron mayor número de bifurcaciones que las de los grupos VehPreO y VehPosO. El número de bifurcaciones dendríticas fue significativamente mayor en el grupo VehPreO, en comparación con el grupo VehPosO ($p=0.001$).

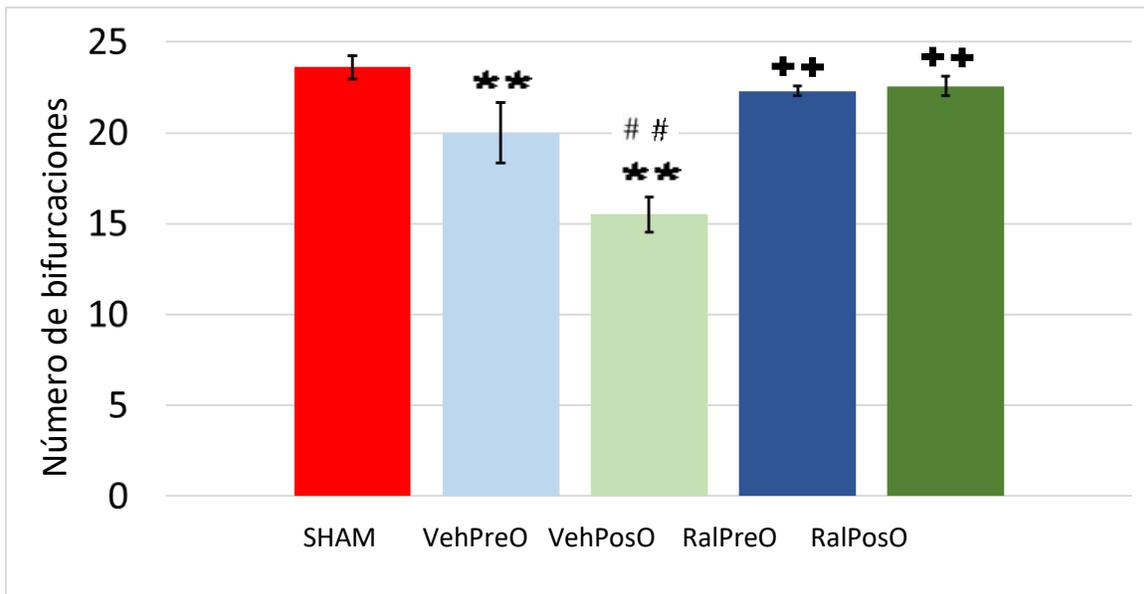


Figura 9. Número de bifurcaciones (Media \pm DE) en la dendrita apical de las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo de los diferentes grupos experimentales. Puede observarse la reducción significativa del número de bifurcaciones dendríticas en los grupos VehPreO y VehPosO, en comparación con las del grupo Sham y el mayor número de bifurcaciones en los grupos RalPreO y RalPosO en comparación con los grupos VehPreO y VehPosO. El número de bifurcaciones dendríticas del grupo VehPreO fue significativamente mayor en comparación con el grupo VehPosO. ** $p < 0.01$ vs. Sham; ++ $p < 0.01$ vs. VehPreO y VehPosO; ## $p < 0.01$ VehPosO vs. VehPreO.

7.2.3 Densidad y proporción de espinas dendríticas.

La tabla 1 y la figura 10 muestran la densidad (número total) de espinas dendríticas, y el número y proporciones de los diferentes tipos de espinas dendríticas observados en una extensión de 50 μm , en la parte medial de la primera dendrita oblicua proveniente de la dendrita apical, de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en los diferentes grupos experimentales,

Puede observarse una reducción significativa del número total de espinas dendríticas en los grupos VehPreO ($p < 0.001$) y VehPosO ($p < 0.01$), en comparación con el número de espinas en el grupo Sham, siendo el número total de espinas del grupo VehPosO significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con el grupo VehPreO. El número total de espinas dendríticas de los grupos RalPreO y RalPosO no fue diferente del observado en el grupo Sham; en cambio, fue significativamente mayor ($p = 0.01$) que el observado en los grupos VehPreO y VehPosO.

En cuanto a las proporciones de los diferentes tipos de espinas dendríticas, la proporción de espinas anchas aumentó significativamente en el grupo VehPreO ($p < 0.05$) con respecto al Sham, y en el grupo VehPosO ($p < 0.01$) con respecto al grupo Sham; y fue significativamente mayor que la observada en el grupo RalPosO ($p < 0.05$). Los valores de la proporción de las espinas en hongo mostraron una clara tendencia a la reducción en los grupos bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y tratamiento con vehículo, sin alcanzar diferencias significativas con respecto a los grupos Sham y a los grupos tratados con raloxifeno.

Tabla 1. Densidad (número total, media \pm EE) de espinas dendríticas en una extensión de 50 μm , y número y proporciones (%) de los diferentes tipos de espinas dendríticas en esa extensión, en las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo, en los diferentes grupos experimentales.

	Número total	Hongo	Delgadas	Anchas	Bifurcadas
SHAM	36.3 \pm 1.1 (100)	13.6 \pm 0.5 (37.5)	11.4 \pm 0.3 (31.4)	6.3 \pm 0.3 (17.3)	5 \pm 0.2 (13.8)
VehPreO	24.7 \pm 2.3 (100)**	5.3 \pm 1.5 (22.0)	6.9 \pm 1.0 (28.1)	10.1 \pm 0.4 (41.6) *	2.3 \pm 0.1 (9.5)
VehPosO	18.9 \pm 0.7 (100)**#	3.2 \pm 0.2 (16.7)	4.1 \pm 0.09 (21.5)	10.8 \pm 0.1 (57.0) **	0.9 \pm 0.02 (4.8)
RalPreO	38.9 \pm 1.3 (100)**	12.1 \pm 0.5 (23.9)	12.8 \pm 0.2 (32.9)	9.3 \pm 0.3 (31.2)	4.7 \pm 0.4 (12)
RalPosO	33.4 \pm 0.1 (100)**	11.1 \pm 0.1 (22.8)	9.8 \pm 0.09 (29.4)	7.6 \pm 0.2 (33.2) ⁺	4.9 \pm 0.2 (14.5)

** $p < 0.01$ vs. Sham; ** $p < 0.01$ vs. VehPreO y VehPosO; # $p < 0.05$ VehPosO vs. VehPreO.

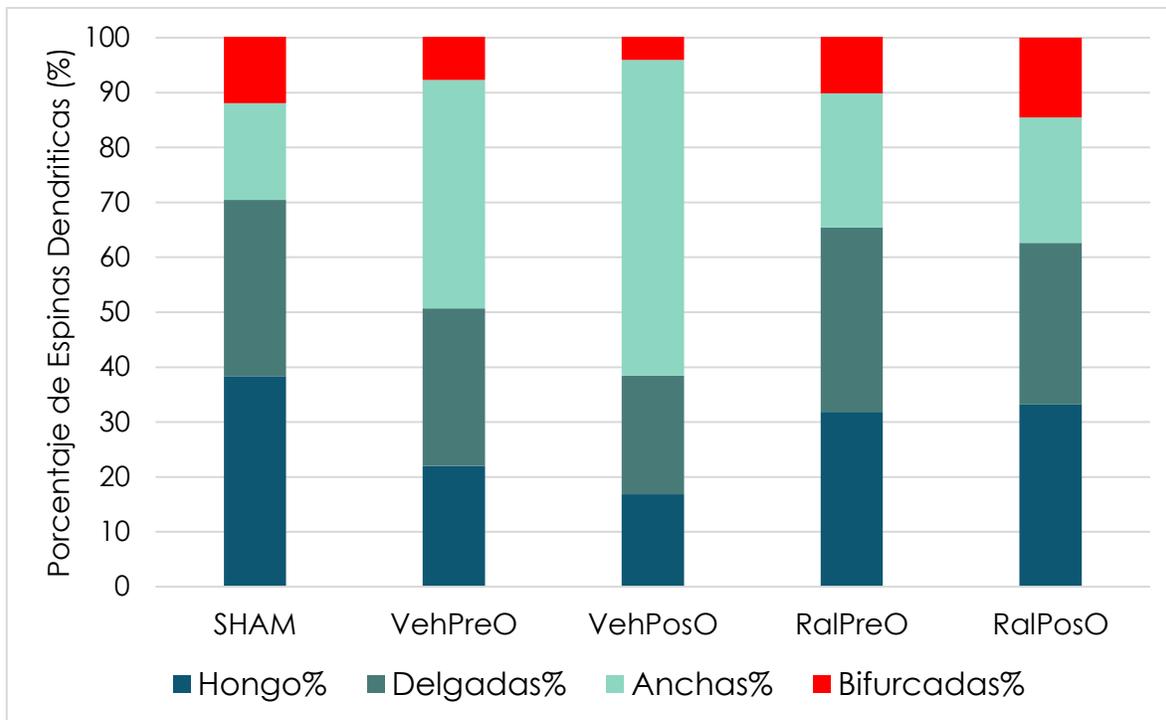


Figura 10. Porcentajes de los diferentes tipos de espinas dendríticas en una extensión de 50 μm , de un segmento oblicuo de la dendrita apical, de neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo, en los diferentes grupos experimentales.

8. Discusión

En el presente trabajo se han evaluado los efectos neuroprotectores del raloxifeno en un modelo de hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de estrógenos ováricos, en ratas viejas (18 meses de edad). Estas tres condiciones, pueden ser factores concurrentes como inductoras de alteraciones de funciones cognitivas dependientes de la integridad estructural y funcional de regiones cerebrales, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal, vulnerables a la reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral (Cechetti y cols., 2012a, 2012b; Iadecola, 2013; Tarumi y Zhang, 2018).

Los resultados obtenidos sobre la disminución de la eficiencia en el desempeño de la tarea de aprendizaje y memoria espacial, en el laberinto acuático de Morris, en los grupos experimentales VehPreO y VehPosO, sustentan la presencia de deterioro cognoscitivo como resultado de la hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de estrógenos ováricos.

En efecto, los valores del número de cruces por el sitio ocupado por la plataforma en los días previos, del tiempo de permanencia y de la longitud de las trayectorias de nado en el cuadrante donde se ubicaba la plataforma, considerados como criterios de eficiencia de la memoria espacial en la prueba de transferencia, fueron significativamente menores en los grupos con hipoperfusión cerebral crónica y tratamiento con vehículo, en comparación con los mismos parámetros en el grupo Sham. La menor eficiencia de los grupos con hipoperfusión cerebral crónica y tratamiento con vehículo en la prueba de transferencia fue observada tanto si se cumplieron (VehPreO, a partir del 5º día de prueba), como si no se cumplieron (VehPosO) los criterios de aprendizaje (reducción progresiva y permanente de la latencia de escape y de la longitud de las trayectorias de nado para encontrar la plataforma en días sucesivos) durante el período de 7 días de prueba.

Estos resultados sugieren que la reducción a largo plazo del flujo sanguíneo, en ausencia de estrógenos ováricos, altera el manejo de información y la función coordinada del hipocampo y la corteza prefrontal para las tareas de aprendizaje y memoria espacial (Otha y cols., 1997; Zhou y cols., 2012; Zhang y cols., 2014).

Por otra parte, los resultados de la prueba de transferencia en los grupos RalPreO y RalPosO, con parámetros de eficiencia similares a los del grupo Sham, sustentan los efectos neuroprotectores del raloxifeno en contra del deterioro cognoscitivo inducido por hipoperfusión cerebral crónica, en ausencia de estrógenos ováricos. En estos grupos, la búsqueda persistente de la plataforma, durante la prueba de transferencia, en el sitio y cuadrante donde se encontraba ubicada durante los 7 días de prueba previos, dio lugar a número de cruces, trayectorias de nado y tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo, significativamente mayores en comparación con los otros cuadrantes. Estos resultados sustentan la posibilidad de que aún en presencia de una reducción a largo plazo del flujo sanguíneo cerebral, las condiciones estructurales y/o funcionales de las regiones cerebrales involucradas en el aprendizaje y la memoria espacial, compatibles con una ejecución eficiente en la tarea de aprendizaje y memoria espacial que pone de manifiesto estas capacidades, fueron preservadas bajo tratamiento con raloxifeno, iniciado 15 días antes o de manera simultánea con la inducción de hipoperfusión cerebral crónica.

Se ha propuesto que los mecanismos fisiopatológicos de daño y muerte neuronal que estarían activados en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica en estructuras cerebrales involucradas en la integración de funciones cognitivas dan por resultado el deterioro de estas funciones (Azzubaidi y cols., 2012; Cechetti y cols., 2012a; Cechetti y cols., 2012b; Jia y cols., 2012, Du y cols., 2016);. De ahí que, la reducción de los fenómenos pro-inflamatorios, activación glial, secreción de TNF α e interleucinas, daño oxidativo, lesión del citoesqueleto, así como la modulación de la expresión de proteínas pro-y anti apoptóticas, Bax y Bcl-2, todo ello en oposición a los mecanismos de daño; lo mismo que la modulación de la síntesis y secreción de factores tróficos como BDNF, en favor de la reparación y plasticidad neuronal, que se han descrito bajo los efectos del raloxifeno (Konyalioglu y cols., 2007, Khan y cols., 2014; Du y cols., 2016; Khan, 2016; Segura-Uribe y cols., 2017;), podrían generar condiciones para la preservación de la estructura y del funcionamiento eficiente del sustrato neural involucrado en las funciones cognitivas.

En este sentido, se ha mostrado que las estructuras neuronales involucradas en la codificación de la información aferente y en el procesamiento de la información en los circuitos neuronales del hipocampo, a través de procesos de comunicación celular sináptica excitatoria e inhibitoria, constituye un aspecto fundamental para el funcionamiento y su relación funcional de las estructuras neuronales, a través de conexiones eferentes, con otras regiones cerebrales involucradas en las funciones cognitivas (Tsien, 2006, Klausberger, 2009).

Para estos procesos, la extensión y abundancia de las arborizaciones dendríticas, así como la densidad y configuración de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales, forman parte fundamental en la conectividad de los circuitos neuronales del hipocampo. En particular, las espinas dendríticas son las estructuras post-sinápticas principales para la comunicación celular excitatoria en el sistema nervioso central y están involucradas de varias maneras en la recepción y procesamiento de estímulos aferentes, en el circuito trisináptico del hipocampo, en función del aprendizaje y la memoria espacial (Kasai y col., 2003; González-Burgos, 2009; González-Burgos, 2012).

A este respecto, cabe señalar que entre las consecuencias más importantes de las acciones estrogénicas, inducidas en condiciones fisiológicas por estrógenos endógenos, se han descrito a los procesos de plasticidad y conectividad sináptica en

estructuras cerebrales, tales como el hipocampo, el hipotálamo y la corteza cerebral (McEwen y cols., 1995; González-Burgos y cols., 2005; Liu y cols., 2008; Spencer y cols., 2008; González-Burgos, 2009; Méndez y cols., 2011; Morali & Cervantes, 2014; Zhu, 2017; Engler-Chiurazzi y cols., 2017). En particular, se ha mostrado que el número y proporciones relativas de los diferentes tipos de espinas dendríticas en las neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza prefrontal, 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 y cols., 2005; Hojo y cols., 2008; Prange-Kiel y cols., 2009; Chen y cols., 2009; Khan y cols., 2013; González-Burgos y cols., 2015).

De acuerdo con estas consideraciones, en el presente trabajo, la reducción de la longitud de la dendrita apical, del número de las arborizaciones dendríticas, de la densidad de espinas dendríticas, así como el cambio de las proporciones de diferentes tipos de espinas dendríticas de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de secreción de estrógenos ováricos, podrían estar asociadas a cambios en la conectividad de los circuitos neuronales del hipocampo que darían lugar a la menor eficiencia en el desempeño de la tarea de aprendizaje/memoria espacial, durante la prueba de transferencia, en los grupos VehPreO y VehPosO.

Asimismo, en estas condiciones, de acuerdo con las propuestas que se han planteado acerca del significado funcional de los distintos tipos de espinas dendríticas, la reducción significativa de las proporciones de las espinas delgadas y en hongo podría ser interpretada como una alteración del sustrato neuronal requerido en los procesos plásticos que darían lugar a la mejor transmisión sináptica, involucrada en el procesamiento de información, en función del aprendizaje y en la memoria. En cambio, el incremento de la proporción de las espinas anchas podría deberse a un mecanismo de compensación que amortiguaría los cambios en la excitabilidad neuronal resultante de la excesiva estimulación sináptica excitatoria, generada por la propia hipoperfusión cerebral crónica (Harris y cols., 1984, 1989; Kasai y cols., 2003; González-Burgos 2012; Bailey y cols., 2011; Bourne y Harris, 2007; González-Tapia y cols., 2015).

Por otra parte, cabe destacar que el tratamiento con raloxifeno, tanto si fue iniciado 15 días antes como si fue iniciado al mismo tiempo que la hipoperfusión cerebral

crónica, preservó la citoarquitectura de las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo, con las mismas características que en el grupo Sham. 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 la reducción o supresión de la secreción y acciones de los estrógenos ováricos y en condiciones de daño cerebral, en estructuras cerebrales involucradas en la integración de funciones cognitivas (Borrow y Handa, 2017; González-Flores y cols., 2015; Khan y cols., 2014; Kramár y cols., 2009; Sharma y Mehra, 2008; Zhou y cols., 2002).

En este sentido, se ha propuesto que el número y la diferente configuración de las espinas dendríticas dependientes de activación por las acciones estrogénicas, representan cambios en la conectividad y flujo de información (aférente y en los propios circuitos neuronales) requeridas para el adecuado desempeño de las funciones cognitivas (Frankfurt y Luine, 2015; Velázquez-Zamora y cols., 2014; Luine y Frankfurt, 2013; González-Burgos, 2012; Luine y Frankfurt, 2012; Bailey y cols, 2011; Bourne y Harris, 2007, González-Tapia y cols., 2015).

Por ello, en el presente trabajo, la preservación del número y proporciones relativas de las espinas delgadas y en hongo, similares a las del grupo Sham, es un efecto importante del raloxifeno, en función del mantenimiento de un sustrato neural compatible con un aprendizaje y memoria espacial eficientes, aún en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica y ausencia de secreción de estrógenos ováricos. A este respecto, cabe señalar que la participación de estos tipos de espinas dendríticas, especialmente eficientes para la transmisión sináptica involucrada en el procesamiento de información en procesos de aprendizaje y memoria, ha sido adecuadamente sustentada por diversos autores (Koch y col., 1992; Bourne and Harris, 2007; González-Burgos, 2009, 2012; Kasai et al., 2010a; Segal, 2010).

Un aspecto importante del diseño experimental en el presente trabajo fue la inducción de la hipoperfusión cerebral crónica en ratas en proceso de envejecimiento avanzado, en las que además se habían suprimido las acciones estrogénicas en cerebro, dependientes de la secreción de estrógenos ováricos. Se

sabe que en la rata la densidad de receptores estrogénicos en el hipocampo se reduce con el envejecimiento a partir de los 12 meses de edad, debido a alteraciones epigenéticas del ADN que codifica para ER α y ER β (Foster 2012; Bean y col., 2014; Ianov y col., 2017, Westberry y cols., 2011; Spencer y cols., 2008). Asimismo, la ausencia de la regulación a la alza de la expresión y síntesis de receptores estrogénicos dependiente de estradiol, contribuiría a la reducción de la densidad de receptores estrogénicos, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos (García-Segura y col., 2001).

Estas condiciones, envejecimiento y ausencia de acciones estrogénicas dependientes de la secreción de estrógenos ováricos, pueden dar lugar a la reducción de las acciones de los SERMs mediadas por receptores estrogénicos. Sin embargo, en el presente estudio, tanto el esquema de tratamiento iniciado 15 días antes de la hipoperfusión cerebral crónica, como el iniciado simultáneamente con la hipoperfusión cerebral indujeron claros efectos neuroprotectores, sin diferencias importantes entre ambos esquemas de tratamiento.

Conclusiones

La reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral, provoca deterioro del aprendizaje y memoria espacial en ratas viejas, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos.

En estas condiciones, el deterioro de las funciones cognitivas provocado por la reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral, está asociado a modificaciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, que pueden dar lugar a alteraciones de la conectividad del sustrato neural involucrado en la integración del aprendizaje y la memoria espacial.

El tratamiento con raloxifeno iniciado 15 días antes o de manera simultánea a la hipoperfusión cerebral crónica previene las alteraciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del hipocampo y preserva la eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial en ratas viejas, en ausencia de secreción de estrógenos ováricos.

Los resultados del presente estudio sustentan la alternativa del uso de SERMs, como el raloxifeno, con un perfil farmacológico de NeuroSERMs (Zhao y col., 2005), como

inductores de acciones estrogénicas en el cerebro (evitando en gran medida la activación de receptores estrogénicos en órganos reproductores y otros tejidos periféricos), capaces de activar procesos genómicos, celulares y bioquímicos, requeridos para la supervivencia neuronal y el mantenimiento de la estructura y el funcionamiento del sustrato neuronal involucrado en las funciones cognoscitivas ante procesos fisiopatológicos de daño cerebral, con potencialidad de uso clínico .

9. Referencias bibliográficas

- Abdelhamid, R., Luo, J., VandeVrede, L., Kundu, I., Michalsen, B., Litosh, V.A., Schiefr, I.T., Gherezghiher, T., Yao, P., Qin, Z. y 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.
- Alsop, D. C., Dai, W., Grossman, M. y Detre, J. A. (2010). Arterial spin labeling blood flow MRI: Its Role in the early characterization of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 20(3), 871–880.
- Anagnostis P, Paschou SA, Gkekakos NN, Artzouchaltzi A M, Christou K, Stogiannou D, Andromachi Vryonidou A, Potoupnis M, Goulis DG. (2018) Efficacy of anti-osteoporotic medications in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Endocrine* 60:373–383
- Arevalo, M. A., Santos-Galindo, M., Bellini, M. J., Azcoitia, I. y Garcia-Segura, L. M. (2010). Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta*, 1800(10), 1106–1112.
- Arevalo, M. A., Santos-Galindo, M., Lagunas, N., Azcoitia, I. y Garcia-Segura, L. M. (2011). Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents. *J Mol Endocrinol*, 46(1), R1-R9.
- Armagan, G., Kanit, L., Terek, C.M., Sozmen, E.Y. y Yalcin, A. (2009). The levels of glutathione and nitrite–nitrate and the expression of Bcl-2 mRNA in ovariectomized rats treated by raloxifene against kainic acid. *Int J Neurosci*, 119(2), 227–239.

- Azcoitia, I., Santos-Galindo, M., Arevalo, M. A. y Garcia-Segura, L. M. (2010). Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Euro J Neurosci*, 32(12), 1995–2002.
- Azzubaidi, M.S., Saxena, A.K., Talib, N.A., Ahmed, Q.U. y 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. doi: 10.1590/S0100- 879X2010007500124
- Baez-Jurado, E., Rincón-Benavides, M.A., Hidalgo-Lanussa, O., Guio-Vega, G., Ashraf, G. M., Sahebkar, A., Echeverria, V., Garcia-Segura, L.M. y Barreto, G.E. (2019). Molecular mechanisms involved in the protective actions of Selective Estrogen Receptor Modulators in brain cells. *Front Neuroendocrinol*, 52(1), 44-64.
- 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
- Barreto, G., Santos-Galindo, M., Díaz-Chaves, Y., Pernia, O., Carrero, P., Azcoitia, I. y Garcia-Segura, L.M. (2009). Selective Estrogen Receptor Modulators Decrease Reactive Astroglia in the Injured Brain: Effects of Aging and Prolonged Depletion of Ovarian Hormones. *Endocrinology*, 150(11), 5010– 5015.
- Barrionuevo P, Kapoor E, Asi N, Alahdab F, Mohammed K, Benkhadra K, Almasri J, Farah W, Sarigianni M, Muthusamy K, Al Nofal A, Haydour Q, Wang Z, Murad M, (2019) Efficacy of Pharmacological Therapies for the Prevention of Fractures in Postmenopausal Women: A Network Meta-Analysis *J Clin Endocrinol Metab*, 104(5):1623–1630.
- Bean LA, Ianov L, Foster TC. Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist*. 2014. 20(5):534-45.
- Bennett, S. A., Tenniswood, M., Chen, J., Davidson, C. M., Keyes, M. T., Fortin, T. y Pappas, B. A. (1998). Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neurosci*, 9(1), 161–166.

- 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
- 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
- Bourque M, Morissette M, Fi Paolo T. (2014). Raloxifene activates G protein-coupled receptor 1/Akt signaling to protect dopamine neurons in i-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *Neurobiol Aging* 35: 2347-2356.
- Brann, D. W., Dhandapani, K., Wakade, C., Mahesh, V. B. y Khan, M. M. (2007). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*, 72(5), 381–405.
- Broughton, B. R. S., Reutens, D. C. y Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(5), e331-e339.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C. y Dauter, Z. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 389, 753–758.
- Carswell, H. V. O., Macrae, I. M., Gallagher, L., Harrop, E. y Horsburgh, K. J. (2004). Neuroprotection by a selective estrogen receptor β agonist in a mouse model of global ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(4), H1501–H1504.
- Carter, M. y Shieh, J.C. (2010) *Visualizing Nervous System Structure*. En: *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. M. Carter, J.C. Shieh, (Eds), 147-154. San Diego USA, Academic Press.
- Castaño-Guerrero, Y., González-Fraguela, M. E., Fernández-Verdecia, I., Horruiter-Gutiérrez, I. y Piedras-Carpio, S. (2013). Alteraciones del metabolismo oxidativo y de la memoria y el aprendizaje en un modelo de hipoperfusión cerebral en ratas. *Neurología*, 28(1), 1–8.
- Cechetti, F., Pagnussat, A.S., Worm, P.V., Elsner, V. R., Ben, J., Siveira-da-Costa, M., Mestriner, R., Weis, S.D. y Netto, C.A. (2012a). 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

- Cechetti, F., Valdeci, W. P., Lovatel, G., Moysés, F., Rodrigues, S. I., and Netto, C. A. (2012b). 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
- Cechetti, F., Worm, P. V., Lovatel, G., Moysés, F., Siqueira, I. R., & Netto, C. A. (2012). Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sciences*, 91(1-2), 29-36.
- Cechetti, F. y 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.
- Cerciat, M., Unkila, M., Garcia-Segura, L.M. y Arevalo, M.A. (2010). Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia*, 58(1), 93-102.
- Chao, L. L., Buckley, S. T., Kornak, J., Schuff, N., Madison, C., Yaffe, K. y Weiner, M. W. (2010). ASL perfusion MRI predicts cognitive decline and conversion from MCI to dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 24(1), 19-27.
- Chen, H., Yoshioka, H., Kim, G. S., Jung, J. E., Okami, N., Sakata, H. y Chan, P. H. (2011). Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*, 14(8), 1505-1517.
- Chen, J. Q., Cammarata, P. R., Baines, C. P. y Yager, J. D. (2009). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochem Biophys Mol Cell Res*, 1793(10), 1540-1570.
- 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

- Ciriza, I., Carrero, P., Azcoitia, I., Lundeen, S.G. y Garcia-Segura L.M. (2004). Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *J Neurobiol*, 61(2), 209–221.
- Comission on life Science. Guide for the care and use of laboratory animals. (2010). Washington DC USA National Academy Press
- Dai, X., Chen, L. y Sokabe, M. (2007). Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacology*, 52(4), 1124–1138.
- Davila, D., Connolly, N. M. C., Bonner, H., Weisová, P., Dussmann, H., Concannon, C. G. y Prehn, J. H. M. (2012). Two-step activation of FOXO3 by AMPK generates a coherent feed-forward loop determining excitotoxic cell fate. *Cell Death Differ*, 19(10), 1677–1688.
- Dhandapani, K. M. y Brann, D. W. (2007). Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol*, 42(1), 70–75.
- Dhandapani, K. M., Wade, F. M., Mahesh, V. B. y Brann, D. W. (2005). Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: Involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*, 146(6), 2749–2759.
- DonCarlos, L. L., Azoitia, I. y Garcia-Segura, L. M. (2009). Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology*, 34S1, S113–S122.
- Dowers, T.S., Qin, Z.H., Thatcher, G.R. y Bolton, J.L. (2006). Bioactivation of selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Chem Res Toxicol*; 19(9): 1125–1137.
- Downie, M.M. y Heath, R.W. (1983). *Basic statistical methods*. Harper & Row. New York.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, 62(6), 649–671.

- Du, B., Ohmichi, M., Takahashi, K., Kawagoe, J., Ohshima, C., Igarashi, H., Mori-Abe, A., Saitoh, M., Ohta, T. y Ohishi, A. (2004). Both estrogen and raloxifene protect against b-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor α -transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade. *J Endocrinol*, 183(3), 605–615.
- 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
- Dubal, D.B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S.W., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Kindy, M.S. y Wise, P.M. (2001). Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(4), 1952–1957.
- Duncombe, J., Kitamura, A., Hase, Y., Ihara, M., Kalaria, R. N. y 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*, 131(19), 2451–2468.
- Elzer, J. G., Muhammad, S., Wintermantel, T. M., Regnier-Vigouroux, A., Ludwig, J., Schütz, G. y Schwaninger, M. (2010). Neuronal estrogen receptor- α mediates neuroprotection by 17 β -estradiol. *J Cereb. Blood Flow and Metab*, 30(5), 935–942.
- Enasem.org. (2015). MHAS. [online] disponible at: http://www.enasem.org/index_Esp.aspx [Consultado el 15 Oct. 2018].
- 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.
- Espeland, M. A., Rapp, S. R., Manson, J. E., Goveas, J. S., Shumaker, S. A., Hayden, K. M. y Resnick, S. M. (2016). Long-term Effects on Cognitive Trajectories of

Postmenopausal Hormone Therapy in Two Age Groups. *J Gerontol A Biol. Sci Med. Sci*, 00(00), 1-8.

Ettlinger, B., Black, D.M., Gözdereliler, E., Boon, N., Aamand, J., De Roy, K., Granitsiotis, M.S., Albrechtsen, H., Sørensen, R.(1999). Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *Jama* 282(7):637–45. [PubMed: 10517716]

Farkas, E., Luiten, P. G. M. y Bari, 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.

Foster, T.C., (2012). Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus*. 22(4):656-69.

Frankfurt, M., y 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.

Fuentes, N. y Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 116: 135–170.

Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M.M. y Mizukami, Y. (2006). G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(3), 904–910.

Garcia-Segura, L.M., Arévalo, M.A. y Azcoitia, I. (2010). Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signalling in the nervous system: new advances. *Prog Brain Res*. 181(C), 251–272.

Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I. y DonCarlos, L.L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*. 63:29–60.

Goekoop, R., Barkhof, F., Duschek, E.J., Netelenbos, C., Knol, D.L., Scheltens, P. y Rombouts, S.A. (2006). Raloxifene treatment enhances brain activation during recognition of familiar items: a pharmacological fMRI study in healthy elderly males. *Neuropsychopharmacology*, 31(7), 1508–1518.

- Goekoop, R., Duschek, E.J., Knol, D.L., Barkhof, F., Netelenbos, C., Scheltens, P. y Rombouts, S.A. (2005). Raloxifene exposure enhances brain activation during memory performance in healthy elderly males; its possible relevance to behavior. *Neuroimage*, 25(1), 63–75.
- 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
- González-Burgos, I., Alejandre-Gómez, M. y Cervantes, M. (2005). Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci Lett* 379: 52-54.
- González-Burgos, I., Rivera- Cervantes, M. C., Velázquez-Zamora, D. A., Feria-Velasco, A. y 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
- Gonzalez-Burgos, I., Tapia-Arizmendi, G. y Feria-Velasco, A. (1992). Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *Biotech. Histochem*, 67(5), 288–296.
- González-Burgos, I., Velázquez-Zamora, D. A., González-Tapia, D. y 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
- 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. In: González-Burgos I. (Ed.) *Synaptic Fundamentals of Memory Performance*. Nova Science Publishers. New York, 2015. pp 33-57.

- González-Tapia, D., Dulce A. Velázquez-Zamora, D.A. y González-Burgos, I. (2015) The molecular biology of dendritic spine plasticity in memory processing. In: I. González Burgos (Ed.). *Synaptic Fundamentals of Memory Performance*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp 59-79.
- Gorelick, P., Scuteri, A., y Black, S. (2011). Contributions to cognitive impairment and dementia a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 42(9), 2672–2713.
- Gould, E., Woolley, C.S., Frankfurt, M. y McEwen, B.S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*, 10(4), 1286–1291.
- Hammes, S. R., y Levin, E. R. (2007). Extranuclear steroid receptors: Nature and actions. *Endocrinol Rev*, 28(7), 726–741.
- Hara, Y., Waters, E. M., McEwen, B.S., y Morrison, J.H. (2015). Estrogen Effects on Cognitive and Synaptic Health Over the Lifecourse. *Physiol Rev*. Jul;95(3):785-807.
- Harris, K. M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 9(3), 343-348.
- Harris, K.M., Jensen, F.E. & Tsao, B.H. (1989) Ultrastructure, development, and plasticity of dendritic spine synapses in area CA1 of the rat hippocampus: extending our vision with serial electron microscopy and three-dimensional analyses, in: Chan-Palay, V., Kohler, Ch. (Eds.), *The hippocampus – new vistas*, Alan R. Liss, USA, pp. 33-52.
- Harris, K.M. & Kater, S.B. (1994) Dendritic spines: Cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.*, 17, 341-371.
- Hojó, 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
- Iadecola, C. (2013). The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron*, 80(4), 844–866.

- Ianov L, Kumar A, Foster TC. Epigenetic regulation of estrogen receptor α contributes to age-related differences in transcription across the hippocampal region CA1 and CA3. *Neurobiol Aging*. 2017. 49:79-85.
- Ikeda, T., Matsuki, N. y 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.
- Ismailoglu, O., Oral, B., Sutcu, R., Kara, Y., Tomruk, O. y Demir, N. (2013). Neuroprotective effects of raloxifene on experimental spinal cord injury in rats. *Am J Med Sci*, 345(1), 39–44.
- Jacobsen, D.E., Samson, M.M., Emmelot-Vonk, M.H. y Verhaar, H.J.. (2009). Raloxifene improves verbal memory in late postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Menopause*, 17(2), 309-314.
- Jarrard, L. E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. and Neural Biol*, 60(1), 9–26.
- Jelks, K.B., Wylie, R., Floyd, C.L., McAllister, A.K. y Wise, P. (2007). Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor- α . *J Neurosci*, 27(26), 6903– 6913.
- Jellinger, K. A. (2013). Pathology and pathogenesis of vascular cognitive impairment-a critical update. *Front Aging Neurosci*, 5(1), 1–19.
- Ji, E., Weickert, C. S., Lenroot, R., Kindler, J., Skilleter, A. J., Vercammen, A. y Weickert, T. W. (2016). Adjunctive selective estrogen receptor modulator increases neural activity in the hippocampus and inferior frontal gyrus during emotional face recognition in schizophrenia. *Transl Psychiatry*, 6, 1-9.
- Jia, H., Zhang, X. M., Zhang, B. A., Liu, Y. y Li, J. M. (2012). Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex and hippocampus in 2VO rats. *Neurol Sci*, 33(5), 1063–1070.
- Kalita, K., Szymczak, S. y Kaczmarek, L. (2005). Non-nuclear estrogen receptor β and α in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus*, 15(3), 404–412.

- 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
- Kesner, R. P. y Churchwell, J. C. (2011). Neurobiology of Learning and Memory An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem*, 96(3), 417-431.
- 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
- 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
- Khan, M. M., Wakade, C., De Sevilla, L. y Brann, D. W. (2015). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) enhance neurogenesis and spine density following focal cerebral ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 146(1), 38-47. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.05.001
- Klausberger T. GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *Eur. J. Neurosci*. 2009; 30: 947-957.
- Koch, Ch., Zador, A. & Brown, T.H. (1992) Dendritic spines: convergence of theory and experiment. *Science*, 256, 973-974.
- Kokiko, O. N., Murashov, A. K. y Hoane, M. R. (2006). Administration of raloxifene reduces sensorimotor and working memory deficits following traumatic brain injury. *Behav Brain Res*, 170(2), 233-240.
- Konyalioglu, S., Durmaz, G. y Yalcin, A. (2007). The potential antioxidant effect of raloxifene treatment: a study on heart, liver and brain cortex of ovariectomized female rats. *Cell Biochem Funct*, 25(3), 259-266. doi: 10.1002/cbf.1328
- 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.
- Lebesgue, D., Chevalleyre, V., Zukin, R.S. y Etgen, A.M. (2009). Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids*, 74(7), 555–561.
- Lebesgue, D., Traub, M., DeButte-Smith, M., Chen, C., Zukin, R.S., Kelly, M.J. y Etgen, A.M. (2010). Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PLoS One*, 5(1), 1-8.
- León, R., Pentón, G., Almaguer, W., Marín, J., Cruz, A., Lorigados, L. y Pavón, N. (2015). Experimental Model of Cerebral Hypoperfusion Produced Memory-learning Deficits, and Modifications in Gene Expression. *Acta Biol Colomb*, 20(1), 15–25.
- Levin, E. R. (2005). Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Mol Endocrinol*, 19(8), 1951–1959.
- Liu, M., Kelley, M. H., Herson, P. S., & Hurn, P. D. (2010). Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinol*, 35(2), 127–143.
- 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
- Manrique-Espinoza, B., Salinas-Rodríguez, A., Moreno-Tamayo, K. M., Acosta-castillo, I., Sosa-Ortiz, A.L., Gutierrez-Robledo, L.M. y Téllez-Rojo, M. M. (2013). Condiciones de salud y estado funcional de los adultos mayores en México. *Salud Pública de México*, 55(2), 323–331.
- Mansour, A., Niizuma, K., Rashad, S., Sumiyoshi, A., Ryoke, R., Endo, H. y Tominaga, T. (2018). A refined model of chronic cerebral hypoperfusion resulting in cognitive impairment and a low mortality rate in rats. *J Neurosurg*, 131(3), 892-902.
- Marin, R., Díaz, M., Alonso, R., Sanz, A., Arévalo, M.A. y Garcia-Segura, L.M. (2009). Role of estrogen receptor alpha in membrane-initiated signaling in neural cells: interaction with IGF-1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 114(1), 2–7.

- Matsuda, K., Sakamoto, H., Mori, H., Hosokawa, K., Kawamura, A., Itose, M., Nishi, M., Prossnitz, E.R. y Kawata, M. (2008). Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neurosci Lett*; 441(1), 94–99.
- McEwen, B. S., Akama, K. T., Spencer-Segal, J. L., Milner, T. A. y Waters, E. M. (2012). Estrogen effects on the brain: Actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav. Neurosci*, 126(1), 4–16.
- McEwen B.S., Gould E, Orchinik M, Weiland NG, Woolley CS. Estrogens and the structural and functional plasticity of neurons: implications for memory, ageing and neurodegenerative processes. In: Goode J (editor). *Ciba Foundation Symposium. The Non-reproductive Actions of Sex Steroids*. CIBA Foundation. London 1995; 191:52–73.
- Méndez P., García-Segura L.M. y Müller D. Estradiol pro-motes spine growth and synapse formation without affecting pre-established networks. *Hippocampus*. 2011. 21(12):1263–7. doi: 10.18502/ijrm.v16i12.3682
- Miller, N. R., Jover, T., Cohen, H. W., Zukin, R. S. y Etgen, A. M. (2005). Estrogen Can Act via Estrogen Receptor α and β to Protect Hippocampal Neurons against Global Ischemia-Induced Cell Death. *Endocrinology*, 146(7), 3070–3079.
- Milner, T. A., Ayoola, K., Drake, C. T., Herrick, S. P., Tabori, N. E., McEwen, B. S. y Alves, S. E. (2005). Ultrastructural localization of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 491(2), 81–95.
- Moralí G, Cervantes M. (2014). Neuroprotective effects of estrogens against cerebral ischemia. In: Gonzalez-Burgos I (editor). *Estrogens and Cognition. Psychobiological and Clinical Aspects*. ISBN 978-81-308-0550-4. 153-186.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11(1), 47–60.
- Moser, M., Rowland, D. C., & Moser, E. I. (2015). Place Cells, Grid Cells, and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(2), 1–15.

- 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. y 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.
- Murakami, G., Hojo, Y., Kato, A., Komatsuzaki, Y., Horie, S., Soma, M., Kim, J., y Kawato, S. (2018). Rapid nongenomic modulation by neurosteroids of dendritic spines in the hippocampus: Androgen, oestrogen and corticosteroid. *J Neuroendocrinol*, 30(2).
- Nilsen, J., Mor, G. y Naftolin, F.. (1998). Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells. *Menopause*, 5, 211–216.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ohta, H., Nishikawa, H., Kimura, H., Anayama, H., & Miyamoto, M. (1997). Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience*, 79(4), 1039–1050.
- Otori, T., Katsumata, T., Muramatsu, H., Kashiwagi, F., Katayama, Y. y Terashi, A. (2003). Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physi*, 30(4), 266–272.
- Pan, M. X., Tang, J. C., Liu, R., Feng, Y. G. y Wan, Q. (2018). Effects of estrogen receptor GPR30 agonist G1 on neuronal apoptosis and microglia polarization in traumatic brain injury rats. *Chinese J Trauma*, 21(4), 224–228.
- Pappas, B. A., de la Torre, J. C., Davidson, C. M., Keyes, M. T. y Fortin, T. (1996). Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late- emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res*, 708(1), 50–58.

- Pérez, S. E., Chen, E.Y. y Mufson, E. J. (2003). Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Dev Brain Res*, 145(1), 117–139.
- Pickar, J. H. y 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.
- 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.
- Prince, Martin; Wimo, Anders; Guerchet, Maëlen; Ali, Gema-Claire; Wu, Yu-Tzu; Prina, M. (2015). *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia*. Alzheimer's Disease International, 1–88.
- Pulsinelli, W. A. (1985). Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res*, 63, 29–37.
- Raz, L., Khan, M. M., Mahesh, V. B., Vadlamudi, R. K. y Brann, D. W. (2008). Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*, 16(2), 140–153.
- Riggs, B.L. y Hartmann, L.C. (2003). Selective estrogen-receptor modulators—mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med*, 348, 618–629.
- Roepke, T.A., Ronnekleiv, O.K. y Kelly, M.J. (2011). Physiological consequences of membrane-initiated estrogen signaling in the brain. *Front Biosci*, 16, 1560–1573.
- Rzemieniec, J., Litwa, E., Wnuk, A., Lason, W. y Kajta, M. (2018). Bazedoxifene and raloxifene protect neocortical neurons undergoing hypoxia via targeting ER α and PPAR- γ . *Mol Cell Endocrinol*, 461, 64–78.
- Rzemieniec, J., Litwa, E., Wnuk, A., Lason, W., Gołas, A., Krzeptowski, W. y Kajta, M. (2015). 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.

- Sarti, C., Pantoni, L., Bartolini, L. y Inzitari, D. (2002). Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J Neurol Sci*, 203–204, 263–266.
- Schroeder, A., Hudson, M., Du, X., Wu, Y. W. C., Nakamura, J., Van den Buuse, M. y Hill, R. A. (2017). Estradiol and raloxifene modulate hippocampal gamma oscillations during a spatial memory task. *Psychoneuroendocrinology*, 78, 85–92.
- Segal, M. (2010) Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur. J. Neurosci.*, 31, 2178-2184.
- Segal, M., (2017) Dendritic spines: Morphological building blocks of memory. *Neurobiol Learn Mem.* Feb;138, 3-9. doi: 10.1016/j.nlm.2016.06.007. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27311757 Review.
- Segura-Uribe, J.J., Pinto-Almazán R., Coyoy-Salgado, A., Fuentes-Venado, C.E. y Guerra-Araiza C. (2017). Effects of Estrogen Receptor Modulators on Cytoskeletal Proteins in the Central Nervous System. *Neural Regen Res*, 12(8), 1231. doi: 10.4103/1673-5374.213536
- 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: 1016/j.brainres.2008.01.080
- Siegel S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw Hill. New York 1956.
- Smith, C.C. y McMahon, L.L. (2006). Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci*, 26, 8517–8522.
- Smith, C.L. y O'Malley, B.W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocrinol Rev*, 25, 45–71.
- Sopala M, Danysz W. (2001) Chronic cerebral hypoperfusion in the rat enhance age-related deficits in spatial memory. *J Neural Transm* 108: 1445-1456.

- Spencer J.L., Waters E.M., Romeo R.D., Wood G.E., Milner T.A., McEwen B.S. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol.* 2008. 29(2):219-237.
- Tang H, Zhang Q, Yang L, Dong Y, Khan M, Yang F, Brann D, Wang R (2014) GPR30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol.* 387 52-58.
- Tapia-Gonzalez, S., Carrero, P., Pernia, O., García-Segura, L.M. y Diz-Chavez, Y. (2008). Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *J Endocrinol*, 198, 219–230.
- Tarumi, T. y Zhang, R. (2018). Cerebral blood Flow in normal aging adults: Cardiovascular determinants, clinical implications, and aerobic fitness. *J Neurochem*, 144, 595-608.
- Terán-Dávila, J. y Teppa-Garrán, A.J. (2005). Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs): bioquímica, farmacología y aplicación clínica en ginecología *Ginecol Obstet Mex*, 73, 424-435.
- Tsien J.Z. Learning and memory. In: Siegel G.J., Alberts R.W., Brady S.T., Price, D.L. (Eds.). *Basic Neurochemistry.* (2006). Seventh edition. Elsevier, New York. pp 859-874.
- Vegeto, E., Belcredito, S., Ghisletti, S., Meda, C., Etteri, S. y Maggi, A. (2006). The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology*, 147(5), 2263–2272.
- Velázquez-Zamora, D.A., García-Segura, L.M. y Gonzalez-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, 512–517.
- Velázquez-Zamora, D. A., González-Tapia, D., Fera-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.

- Venkat, P., Chopp, M. y Chen, J. (2015). Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol*, 272, 97–108.
- Vesga-Jimenez D, Hidalgo-Lanussa O, Baez-Jurado E, Echeverria V, Ashraf G, Sahebkar A, Barreto G, (2018) Raloxifene attenuate oxidative stress and preserves mitochondrial function in astrocytic cells upon glucose deprivation. *Cell Physiol* 234(3) 2051- 2057.
- Weickert, T. W., Weinberg, D., Lenroot, R., Catts, S. V., Wells, R., Vercammen, A. y Weickert, C. S. (2015). Adjunctive raloxifene treatment improves attention and memory in men and women with schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 20(6), 685–694.
- Westberry JM, Trout AL, Wilson ME. Epigenetic regulation of estrogen receptor beta expression in the rat cortex during aging. *Neuroreport*. 2011. 22(9):428-32.
- Woolley, C. S. (2007). Acute Effects of Estrogen on Neuronal Physiology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 47(1), 657–680.
- World Health Organization. (2017). Global action plan on the public health response to dementia 2017 - 2025. WHO.
- World Health Organization (2018). ICD-11 - Mortality and Morbidity Statistics. [online] Disponible en: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>
- Yaffe, K., Krueger, K., Cummings, S.R., Blackwell, T., Henderson, V.W., Sarkar, S., Ensrud, K. y Grady, D. (2005). Effect of raloxifene on prevention of dementia and cognitive impairment in older women: the multiple outcomes of raloxifene evaluation (MORE) randomized trial. *Am J Psych*, 162, 683–690.
- Zhang, B., Subramanian, S., Dziennis, S., Jia, J., Uchida, M., Akiyoshi, K., Migliati, E., Lewis, A.D., Vandenberg, A.A., Offner, H. y Hurn, P.D. (2010). Estradiol and G1 reduce infarct size and improve immunosuppression after experimental stroke. *J Immunol*, 184, 4087–4094.
- Zhang, Z. H., Shi, G. X., Li, Q. Q., Wang, Y. J., Li, P., Zhao, J. X., ... Liu, C. Z. (2014). Comparison of cognitive performance between two rat models of vascular dementia. *International Journal of Neuroscience*, 124(11), 818–823.

- Zhao, L., O'Neill, K. y Diaz-Brinton, R. (2005). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: Current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res. Rev.*, 49(3), 472–493.
- Zhao, Y. y Gong, C. X. (2014). From Chronic Cerebral Hypoperfusion to Alzheimer-Like Brain Pathology and Neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol.*, 35(1), 101–110.
- Zhou, F., Dong, H., Liu, Y., Yan, L., Sun, C., Hao, P. y Liu, Y. (2018). Raloxifene, a promising estrogen replacement, limits TDP-25 cell death by enhancing autophagy and suppressing apoptosis. *Brain Res. Bull.*, 140, 281–290.
- 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
- Zhou, L., Lehan, N., Wehrenberg, U., Disteldorf, E., von Lossow, R., Mares, U. y Rune, G. M. (2007). Neuroprotection by estradiol: A role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABAA receptors. *Exp Neurol.*, 203(1), 72–81.
- Zhou, Z., Zhang, Y., Zhu, C., Sui, J., Wu, G., Meng, Z., Meng, Z., Huang, H., y Chen, K. (2012). Cognitive functions of carotid artery stenosis in the aged rat. *Neuroscience.*, 219, 137–144.
- Zhu, Y., Zhang, Q., Zhang, W., Li, N., Dai, Y., Tu, J. y Wang, R. (2017). Protective Effect of 17 β -Estradiol Upon Hippocampal Spine Density and Cognitive Function in an Animal Model of Vascular Dementia. *Sci Rep.* 7(1), 42660.