



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Efecto mnemónico del 17β -aminoestrógeno
pentolame y estradiol en un modelo de
menopausia en ratas SHR”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Daniel Islas Serrano

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Cristina Lemini Guzmán



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lista de abreviaturas

5-HT	Serotonina
ACV	Accidente cerebro vascular
AEs	17 β -aminoestrogenos
ANOVA	Análisis de varianza
A β	Beta amiloide
DAG	Diacilglicerol
E ₂	17 β -estradiol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EEC	Estrógenos equinos conjugados
ERE	Elementos de respuesta especifica de receptores de estrógenos
ERs	Receptores de estrógenos
ER α	Receptor de estrógeno alfa
ER β	Receptor de estrógeno beta
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HHG	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal
HSP	Proteína de choque térmico
HTA	Hipertensión arterial

IAch	Inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa
IP ₃	Trifosfato de Inositol
LH	Hormona Luteinizante
mg/kg	Miligramo por kilogramo
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
NMDA	Ácido N-metil D-Aspartato
Ovx	Ovariectomizada
PKC	Proteína cinasa C
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
SNC	Sistema Nervioso Central
TDHA	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
TRH	Terapia de reemplazo hormonal

Índice de Figuras y Graficas

Figura 1. Síntesis de estrógenos en ovario y cerebro.....	12
Figura 2. La estructura de los dos receptores de estrógenos.....	13
Figura 3. Modelos simplificados que representan la señalización rápida o no genómica del receptor de estrógeno y la vía genómica nuclear clásica.....	16
Figura 4. Estructura química del 17β-estradiol (E ₂) y los17β-aminoestrógenos (AEs).....	17
Figura 5. Tipos de memoria y estructuras cerebrales relacionadas.....	23
Figura 6. Laberinto de Barnes.....	33

Figura 7. Porcentaje de ratas SHR que alcanzan la meta bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (pentolame 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$), P2 (pentolame 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$), E₂ (17 β - estradiol 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y el grupo control (vehículo, 2mL/kg).....**38**

Figura 8. Tiempo que tardan en alcanzar la meta las ratas SHR bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (70 $\mu\text{g}/\text{kg}$), P2 (140 $\mu\text{g}/\text{kg}$), E₂ (17 β - estradiol 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y el grupo control (vehículo, 2mL/kg).....**39**

Figura 9. Distancia recorrida por las ratas SHR para alcanzar la meta bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (pentolame 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$), P2 (pentolame 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$), E₂ (17 β - estradiol 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y el grupo control (vehículo, 2mL/kg).....**40**

Figura 10. Velocidad a la que realizan el recorrido para alcanzar la meta las ratas SHR bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (pentolame 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$), P2 (pentolame 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$), E₂ (17 β - estradiol 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y el grupo control (vehículo, 2mL/kg).....**41**

Figura 11. Datos globales de: los promedios de: animales que llegan a la meta; latencia para encontrar la meta; distancia recorrida y velocidad durante las sesiones de ratas SHR bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (pentolame 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$), P2 (pentolame 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$), E₂ (17 β - estradiol 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y grupo C (vehículo, 2mL/kg); * $p < 0.001$ (Metodo de Dunn's).....**42**

INDICE

RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	
Capítulo 1. ESTRÓGENOS	11
1.1 Regulación hormonal: eje hipotálamo-hipófisis-gónada.....	11
1.2 Biosíntesis de estrógenos (periférica y a nivel cerebral).....	11
1.3 Receptores de estrógenos (efectos genómicos y nongenómicos).....	13
1.4 Efecto de los esteroides sexuales en el SNC.....	15
1.5 Antecedentes de los efectos de los 17β -aminoestrógenos en el SNC.....	17
1.6 Efectos de los estrógenos en la ansiedad y depresión.....	19
1.7 Efectos de los estrógenos sobre la memoria.....	20
1.8 Papel neuroprotector de estradiol (E_2).....	21
Capítulo 2. MEMORIA	22
2.1 Prevalencia de los trastornos de memoria.....	23
2.2 Neurobiología de la memoria.....	24
2.3 Trastornos de la memoria y tratamiento actual	25
2.4 Menopausia.....	27
2.5 Menopausia y memoria.....	28
2.6 Terapia de reemplazo hormonal actual beneficio-riesgo.....	29
Capítulo 3. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA MENOPAUSIA	30
3.1 Ovariectomía como modelo de hipoestrogenismo en la rata	31
3.2 Modelos animales para estudios de déficit de atención y memoria (la rata SHR).....	32
3.3 Modelo de Laberinto de Barnes.....	33

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
IV. HIPÓTESIS.....	34
V. OBJETIVOS.....	34
VI. MATERIAL Y METODOS.....	35
• Fármacos empleados.....	35
• Animales.....	35
• Ovariectomía.....	35
• Diseño Experimental.....	36
• Análisis estadístico.....	37
VII. RESULTADOS.....	37
VIII. DISCUSIÓN.....	43
IX. CONCLUSIONES.....	48
X. BIBLIOGRAFIA.....	49

RESUMEN

La menopausia en la vida de las mujeres, es un evento natural o inducido, que corresponde al cese permanente de la menstruación y marca la transición entre la etapa reproductiva y la no reproductiva. Los síntomas resultantes de la deficiencia ovárica durante la menopausia afectan la calidad de vida de las mujeres, lo que desencadena una serie de cambios fisiológicos y se ha asociado con cambios en la cognición y la memoria. Diversos reportes científicos han demostrado que la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos produce efectos neuroprotectores; sin embargo, estudios clínicos poblacionales han reportado que existe un aumento del riesgo de efectos trombotogénicos y de cáncer de mama en las usuarias. Esto ha señalado la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas alternas con mayor especificidad y seguridad. Se ha descrito que en ratas, los 17β -aminoestrógenos (AEs) son capaces de producir efectos ansiolíticos y antidepressivos, procesos que están regulados a nivel de SNC. Estudios experimentales recientes informaron de los efectos benéficos sobre la memoria del AE prolame, sin embargo, pentolame que es un análogo estructural del prolame aún no se ha evaluado para determinar sus posibles efectos mnemónicos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad del AE pentolame comparando sus efectos con la hormona 17β -estradiol (E_2) para determinar sus posibles efectos mnemónicos en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) ovariectomizadas (Ovx), utilizando el método de Barnes en un esquema crónico. Nuestros resultados demostraron que la administración crónica de pentolame produce efectos neuroprotectores en las ratas SHR Ovx en relación a un grupo control que recibió el vehículo. En contraste, los animales tratados con E_2 presentaron deterioro cognitivo en comparación al grupo control lo que indicó que E_2 y pentolame se comportan de manera opuesta en este modelo experimental. Estos resultados sugieren diferencias en los mecanismos de acción de estos esteroides en la memoria de las ratas SHR y nos abren una nueva vía para

profundizar en los estudios de los posibles efectos tanto de E₂ como del 17β-aminoestrógeno pentolame sobre la memoria en condiciones de hipertensión.

Palabras clave: pentolame, memoria, menopausia, THR, 17β-aminoestrogenos

INTRODUCCION

Los trastornos mentales tienen un gran impacto en la vida de los individuos, su núcleo familiar, entorno y la sociedad (OMS, 2001; Lara *et al.*, 2007). Estos trastornos se presentan en individuos de todas las edades, su prevalencia incrementa con la edad y en una proporción de 2:1 en mujeres con relación a los hombres (Belló *et al.*, 2005). Las mujeres durante su etapa fértil presentan menos padecimientos de esta índole, considerándose que están protegidas ante enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas como depresión, ansiedad y demencia. Estos efectos benéficos disminuyen después de la menopausia, lo que se considera que está altamente influenciado por la disfunción ovárica habiéndose atribuido una participación significativa de los esteroides sexuales, y particularmente a los estrógenos en dicha neuroprotección (Soares *et al.*, 2001).

Reportes científicos indican que el uso de estrógenos como terapia de reemplazo hormonal (THR) en mujeres peri-menopáusicas revierte los síntomas de ansiedad, depresión, y produce efectos benéficos sobre la demencia (Rasgon *et al.*, 2002); sin embargo, algunos efectos adversos asociados con la TRH de uso actual, son de mayor incidencia efectos trombogénicos y la inducción de ciertos tipos de cáncer (uterino y mamario), lo que limita su uso terapéutico (Farquhar *et al.*, 2009). Por estas razones, las Guías actuales de THR recomiendan la individualización de esta terapia teniendo en cuenta los factores de riesgo y la prescripción de la dosis mínima efectiva, durante el tiempo más breve posible (Santen *et al.*, 2010). Actualmente la mayor expectativa de vida de las mujeres sin una THR señala la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas más seguras y eficaces con este enfoque terapéutico. Se ha descrito que en roedores, los 17 β -aminoestrógenos (AEs) producen efectos anticoagulantes prolongados dosis-dependientes (Lemini *et al.*, 2005) que contrastan con los efectos procoagulantes producidos por los estrógenos sintéticos de uso actual y del 17 β -estradiol (E₂) (Rubio *et al.*, 1990; Lemini *et al.*, 1993).

Los AEs poseen actividad estrogénica sobre los órganos reproductores de manera semejante a la de la hormona natural E₂, no obstante que su potencia es

considerablemente menor. Asimismo, su potencial proliferativo en células de cáncer mamario es mucho menor que el que induce E₂ en éstas células (Lemini *et al.*, 2017).

Considerando en primer término, que han sido ampliamente demostrados los efectos del E₂ a nivel del SNC en ratas ovariectomizadas (Ovx) quien ha mostrado capacidad para producir acciones antidepresivas, ansiolíticas y mnemónicas en diferentes modelos experimentales (Estrada *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2008). En segundo término, el hallazgo de que los AEs son capaces de producir efectos facilitadores de la conducta sexual (lordosis) que está regulada también a nivel de SNC (Lemini y Canchola 2009), y trabajos recientes en los que se han descrito las propiedades ansiolíticas y antidepresivas de los AEs prolame y pentolame que presentan potencia equivalente o superior a la que manifiesta el E₂, ha sugerido que el perfil farmacológico de estos AEs podría constituir una nueva alternativa no trombogénica y de menor riesgo de cáncer uterino y mamario dirigido a la THR convencional para mujeres peri-menopáusicas y menopáusicas (Lemini *et al.*, 2013). Particularmente Los AEs podrían ser de gran utilidad para aquellas mujeres con predisposición a sufrir eventos tromboembólicos y con historial de los tipos de cáncer antes mencionados. Cabe señalar, que recientemente se han reportado los efectos mnemónicos del AE prolame, sin embargo, del AE pentolame que es un análogo estructural del prolame aún no se han explorado sus efectos mnemónicos.

II. MARCO TEÓRICO

Capítulo 1. ESTRÓGENOS

1.1 Regulación hormonal. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada

La reproducción y la fertilidad son reguladas a través de hormonas del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG). El control hipotalámico de la reproducción se coordina mediante la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). LA GnRH es secretada en pulsos lo que estimula la secreción de las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH). Estas hormonas actúan en las gónadas para estimular la producción de gametos y promover la liberación gonadal de los esteroides sexuales: testosterona, E₂ y progesterona. Estos esteroides gonadales además de controlar la función reproductiva en los tejidos periféricos, también pueden retroalimentar y modular los componentes del HHG en diferentes niveles. (Acevedo-Rodríguez *et al.*, 2018). En particular, los estrógenos son hormonas esenciales que regulan el crecimiento, desarrollo y fisiología del sistema reproductivo humano (Swedenborg *et al.*, 2009). El E₂ es la principal hormona estrogénica, que interacciona con los sistemas cardiovascular, óseo, adiposo y neuro-endócrino modulando una gran variedad de funciones en estos tejidos (Risbridger *et al.*, 2010).

1.2 Biosíntesis (periférica y a nivel cerebral)

La biosíntesis de los estrógenos se lleva a cabo en las células de la granulosa del ovario, durante la fase folicular; la pregnenolona proveniente del colesterol a través de 17 α -hidroxipregnenolona, deshidroepiandrosterona, androstenodiona, testosterona y mediante un proceso de aromatización del anillo A del esteroide con pérdida de C19, se transforma en el estrógeno E₂, en el ovario, una pequeña parte de éste se convierte en estrona; sin embargo en hígado, piel, tejido graso, músculo, endometrio e hipotálamo, la conversión a estrona es muy abundante. El principal metabolito y de mayor abundancia de E₂ es el estriol. (Amado y Flórez, 1997).

Por ser altamente liposolubles los estrógenos son transportados al cerebro a través de la barrera hematoencefálica (Hwang *et al.*, 2015). Los estrógenos pueden ser sintetizados en diversos sitios cerebrales, lo que manifiesta una particular importancia de los estrógenos en la función cerebral. Varios estudios han demostrado que el cerebro es capaz de sintetizar estrógenos *de novo* a partir del colesterol (Do Rego *et al.*, 2009).

De hecho, se ha informado que todas las enzimas requeridas para la síntesis, el metabolismo de los estrógenos y metabolitos intermedios críticos existen en diversas regiones del cerebro humano, en particular, la aromatasa, enzima clave para el último paso en el proceso de síntesis de los estrógenos provenientes de andrógenos; se encuentra expresada ampliamente en regiones específicas en el cerebro de los humanos, roedores y primates (Li y Singh, 2013).

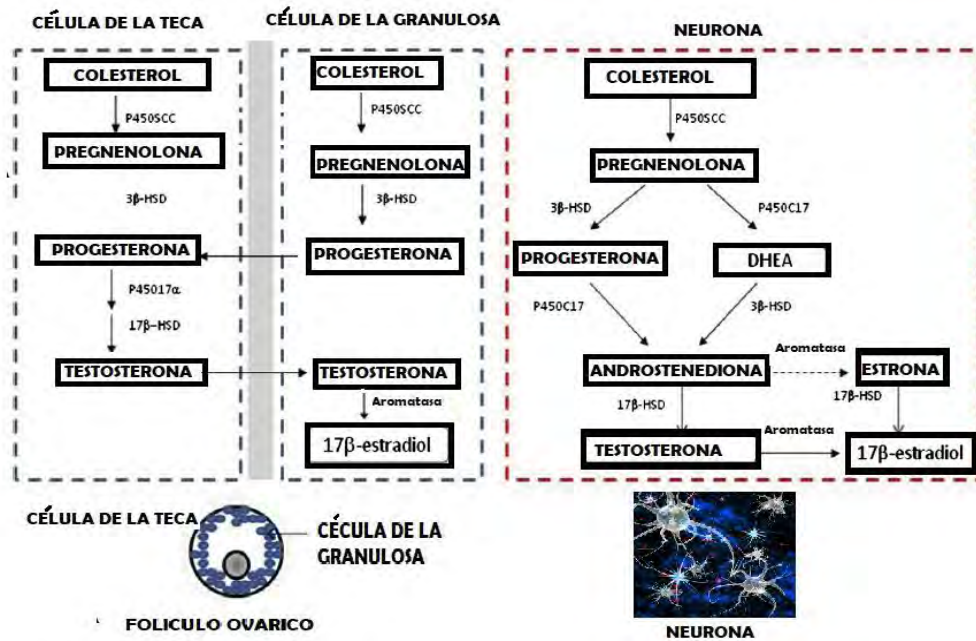


Figura 1. Síntesis de estrógenos en el ovario y el cerebro. (A) Síntesis de estrógenos en células específicas del ovario. La producción de estrógenos comienza con la síntesis de pregnenolona a partir del colesterol, catalizada por la enzima de escisión de la cadena lateral del citocromo P450 (P450scc). La pregnenolona se convierte luego en progesterona por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) en las células de la teca y de la granulosa. La progesterona se convierte en andrógenos vía citocromo P450 17α-hidroxilasa (P45017α) y 17βhidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD) en células tecales durante la fase folicular. La conversión de E₂ está catalizada por aromatasa (P450Arom) en células de la granulosa. (B) Las neuronas expresan todas las enzimas requeridas para la biosíntesis de estrógenos en cerebro (Modificado de Li y Singh, 2014).

1.3 Receptores de estrógenos (efectos genómicos y no genómicos)

Los receptores de estrógenos (ERs por sus siglas en inglés) más estudiados son los receptores ER α y el ER β . Estos receptores participan en el mecanismo de acción genómico o también conocido como mecanismo clásico. Estos subtipos de receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, son factores de transcripción inducibles por ligando (que en este caso es el E₂) y regulan genes blanco específicos ya sea incrementando o inhibiendo su transcripción. Sus efectos se observan en horas o días después de ser administrado el estrógeno (Marino *et al.*, 2006). En la Figura 2 se muestra la estructura de los dos receptores de estrógeno

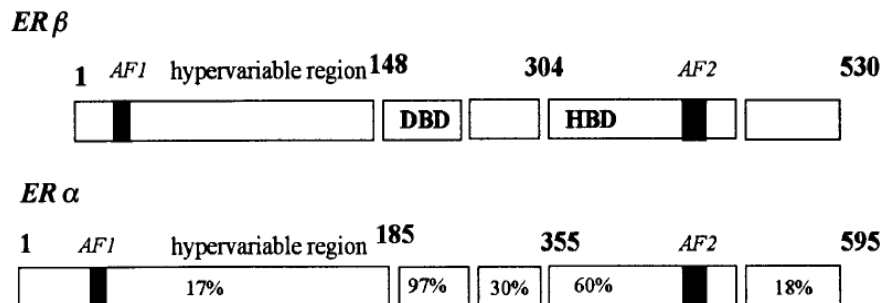


Figura 2. La estructura de los dos receptores de estrógeno. La estructura de ER β y ER α ilustra los distintos dominios funcionales. DBD es el dominio de unión al ADN y HBD es el dominio de unión a la hormona. Los porcentajes dentro de los cuadros representan la identidad de aminoácidos entre ER β y ER α . Los números al final de cada receptor indican la longitud total de la proteína. Las secuencias del núcleo de la función de activación 2 (AF2) son cercanas, pero no existe una región de homología significativa entre las regiones que contienen la función de activación 1 (AF1). (Modificada de Thornton, 2002)

El ER α se encuentra expresado principalmente en el útero, próstata, mama, ovario, hueso, epidídimo, hígado, tejido adiposo y varias regiones del cerebro. El ER β se expresa en la próstata, colon, ovario, médula ósea, endotelio vascular, glándulas salivales y ciertas regiones del cerebro. Ambos subtipos se expresan en los testículos, en las células de Leydig y espermatozoides (Heldring *et al.*, 2007).

Los ERs, además son ligandos de los estrógenos endógenos, pero también interactúan con compuestos estrogénicos sintéticos como el 17 β -etinilestradiol que se usa como anticonceptivo y con diferentes sustancias exógenas que tienen actividad estrogénica y asimismo con los conocidos como estrógenos ambientales,

entre los que se encuentran sustancias naturales como fitoestrógenos, pesticidas, bisfenoles y alquilfenoles (Diamanti *et al.*, 2009).

Adicionalmente se han descrito diferentes isoformas de los receptores citosólicos de estrógenos. Para el subtipo ER α existe el receptor de longitud completa o integral que se denomina ER α 66 así como las isoformas ER α 36 (Zhao *et al.*, 2005) y ER α 46 (Flouriot, 2000). Para el subtipo β hay 5 isoformas: ER β 1- ER β 5 (Slentz *et al.*, 200). Estas isoformas difieren en su estructura, localización, funcionalidad y están bajo estudio actualmente.

Se ha descrito que la isoforma ER α 36 participa de manera importante en la proliferación de células de cáncer de mama activando la vía MAPK (Zhang *et al.*, 2011). Varios autores han postulado la localización ER α 36 en la membrana celular acoplado a una proteína G. La interacción entre E₂ y ER α 36 a este nivel induce la síntesis de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ promueve el flujo de Ca⁺² desde el retículo endoplasmático liso y el DAG promueve la activación de proteína cinasa C (PKC). Debido a que PKC activa a ERK1/2, estas cinasas fosforilan rápidamente a las proteínas promoviendo la proliferación (Chaudhri *et al.*, 2014).

El mecanismo de acción genómico de los estrógenos se inicia considerando que el ER se encuentra en el citoplasma como monómero en un estado inactivo, ya que se encuentra anclado formando un complejo con proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70 y Hsp56). Cuando el E₂ (ligando endógeno) se une al ER se producen cambios conformacionales en el receptor que provocan que ER se disocie de las Hsps. Posteriormente el ER se dimeriza y transloca al núcleo, donde se une a secuencias específicas de DNA conocidas como elementos de respuesta específicas de receptores de estrógenos (ERE) dentro de las regiones promotoras de genes blanco que regulan la transcripción génica; el RNA sintetizado será finalmente traducido a proteínas, que producen cambios en una función celular específica (Acconcia y Marino, 2011).

Además del mecanismo clásico genómico de los estrógenos, se han documentado efectos rápidos en respuesta a estrógenos en diferentes tejidos (Thornton, 2002). La señalización rápida de los estrógenos está mediada por un receptor membranal acoplado a proteína G, que se conoce como GPER1. Estos receptores de membrana inician la señalización de Ca^{+2} , fosfolipasa C y adenil ciclasa con activación posterior de una serie de quinasas (B-RAF, IP3K, Src, ERK, AKT, PKA, PKC), que a su vez pueden influir rápidamente en la fisiología neuronal, llevando a cabo fosforilaciones o transcripción de factores tales como CREB o el mismo ER α para inducir la transcripción génica. Estas vías de señalización de E₂ interactúan con vías moleculares asociadas con la señalización del factor de crecimiento, muchas de ellas involucradas en el aprendizaje y la memoria (Bean *et al.*, 2014).

1.4 Efecto de esteroides sexuales en el SNC

Las hormonas sexuales ejercen sus efectos sobre numerosos blancos en el organismo, particularmente sobre el SNC, actúan a través de mecanismos organizacionales y activacionales. El efecto organizacional sobre el SNC tiene lugar en el periodo del desarrollo temprano (prenatal y neonatal). Durante este periodo las hormonas determinan cambios permanentes en las conexiones, para la sensibilidad cerebral, la programación fetal del HHA. El efecto activacional de los esteroides sexuales sobre el SNC en la vida postnatal lo ejerce sobre los sistemas neurales organizados anteriormente, manteniendo la manifestación de ciertas conductas, incluso las no sexuales. A su vez, los estrógenos tienen influencia facilitadora de la memoria (Jaffe *et al.*, 1994).

Además de su papel clave en la reproducción, los estrógenos tienen efectos en varios órganos, como se ha evidenciado por la identificación de los ER en múltiples tejidos. Numerosos estudios experimentales han demostrado que los estrógenos tienen efectos significativos sobre el SNC, y una cuestión clave es hasta qué punto el descenso en los niveles sanguíneos de estrógenos que se produce con la edad, sobre todo alrededor y después de la menopausia, tiene un impacto en la función cognitiva y la salud psicológica de las mujeres.

En la figura 3, se ilustran los mecanismos de acción genómicos y no-genómicos

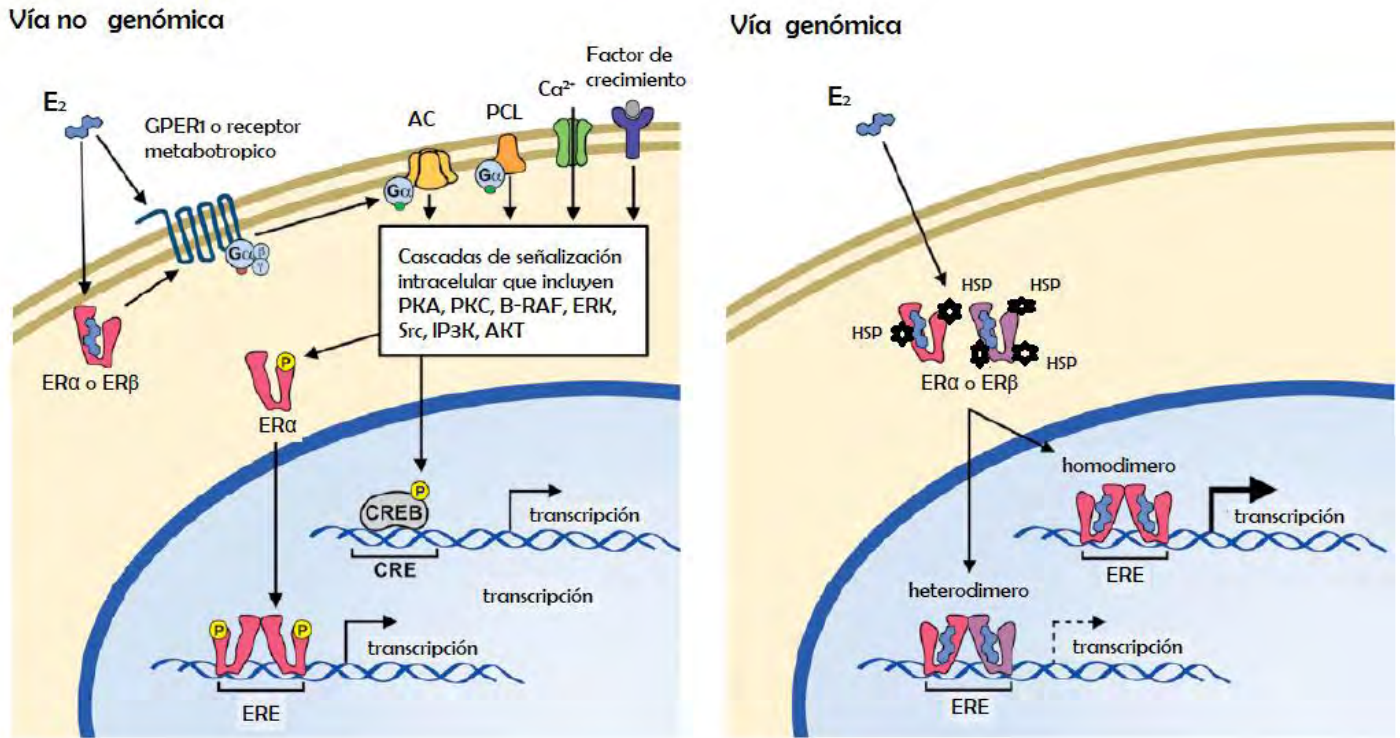


Figura 3. Modelos simplificados que representan la señalización rápida o no-genómica del receptor de estrógeno (izquierda) y la vía genómica nuclear clásica (derecha). En la vía de señalización rápida el receptor metabotrópico de estrógeno GPER1 (receptor asociado a la membrana acoplado a una proteína G) es activado por E_2 induciendo cascadas de señalización intracelular rápidas que influyen en la fisiología neuronal o conducen a la fosforilación del receptor de estrógenos alfa (ER α) o proteínas CREB. En la vía clásica, E_2 se une a ER α o ER β . El receptor es activado formando un dímero activado (homodímero o heterodímero), que puede unirse a un elemento de respuesta de estrógeno (ERE) en el ADN, y proteínas co-reguladoras para modificar la transcripción de los genes diana. Obsérvese que los homodímeros ER α exhiben una transcripción incrementada en relación con los heterodímeros receptores de estrógenos o los homodímeros ER β debido a que ER β actúa como un regulador negativo de la transcripción mediada por ER α (Modificada de Bean et al., 2014).

Los efectos directos de los cambios estrogénicos durante la menopausia se manifiestan en el cerebro, incluyendo la función cognitiva y el estado de ánimo, además de vías secundarias del SNC tales como los factores cardiovasculares que influyen sobre la función cognitiva. Es conocida la acción de los estrógenos en el mantenimiento de los niveles de neurotransmisores, lo que tiene un efecto positivo en el funcionamiento neuronal y la formación de sinapsis (Navarro *et al.*, 2017).

Los estrógenos juegan un papel crítico en la cognición, el comportamiento y la actividad cerebral al modular la expresión de enzimas, receptores y proteínas estructurales implicadas en la plasticidad sináptica. Los estrógenos sintéticos se han propuesto como una herramienta terapéutica alternativa en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas ya que promueven la expresión de neurotrofinas que desencadenan el crecimiento y la supervivencia de las neuronas (Navarro *et al.*, 2017).

1.5 Antecedentes de los efectos de los 17 β -aminoestrógenos en el SNC

Los 17 β -aminoestrógenos (AEs) son análogos sintéticos de E₂ que poseen un sustituyente de amino-alcohol con cadena variable en la posición C17 (figura 4)

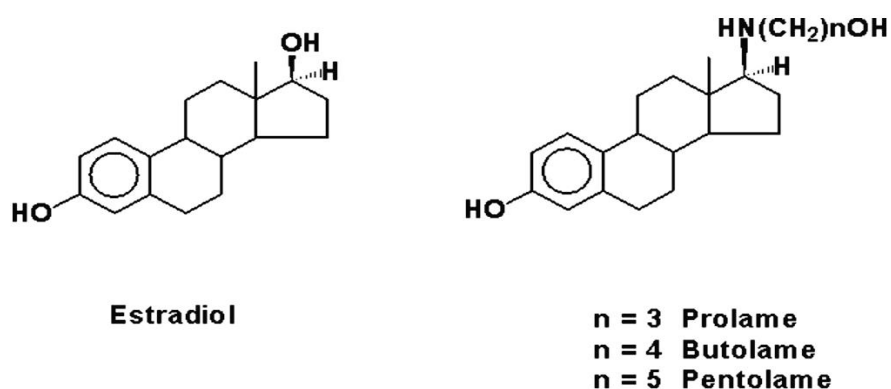


Figura 4: Estructura química del E₂ y los 17 β -AEs. Tomada de Lemini *et al.*, 2016.

La inserción de un grupo amino en lugar del hidroxilo en el C17 que se encuentra en la molécula de E₂ le confiere a este grupo de fármacos actividad anticoagulante, que contrasta con el efecto procoagulante que produce E₂ en roedores (Lemini *et al.*, 2013, 2016). Los AEs en roedores Ovx inducen efectos estrogénicos dosis-dependientes semejantes a los que produce la hormona E₂. Producen efectos uterotrópicos en ratas y ratones con cambios morfológicos e histológicos característicos de actividad estrogénica que son mediados por su interacción con los RE α y RE β de E₂.

La afinidad de los AEs es variable entre diferentes miembros de este grupo ya que el AE prolame posee afinidad para ambos subtipos de receptores mientras que los AEs butolame o pentolame tienen mayor afinidad por los RE α (Jaimez *et al.*, 2000). Sin embargo, su eficacia es menor y la potencia relativa de estos compuestos es mucho mas baja que la que manifiesta el E₂ y disminuye conforme se aumenta la cadena alquílica del sustituyente en la molécula. Así, la potencia relativa de los compuestos de la serie homóloga (figura 4) sigue el siguiente orden: E₂ > prolame > butolame > pentolame. Estos datos, y resultados de trabajos recientes sobre su baja capacidad para inducir la proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama positivo a estrógenos, señalan que el potencial estrogénico de estos compuestos es menor (de 100-500 veces menor) que la del E₂, lo que ha demostrado que tienen menos riesgo para producir efectos adversos en tejidos como el útero y mama (Lemini *et al.*, 2017).

Por otra parte, los AEs son capaces de ingresar al SNC ya que se cuenta con la evidencia de que pueden alterar las concentraciones de LH y poseen efectos sobre la conducta sexual femenina de la rata (Lemini y Canchola 2009). Uno de los AEs más estudiados ha sido el prolame; se ha demostrado que su administración aguda (por 3 días consecutivos) produce efectos antidepresivos en ratas Ovx (Lemini *et al.*, 2013) de manera semejante al E₂ aunque con una potencia de la mitad de la de la hormona ya que se requiere el doble de la dosis (20 μ g/rata) para producir el mismo efecto que el estrógeno natural. La conducta antidepresiva es completamente eliminada por el antagonista inespecífico de los

ERs, el tamoxifeno, lo que indicó que los ERs participan en su efecto antidepressivo de manera semejante al E₂ (Lemini *et al.*, 2013).

Por otro lado, el tratamiento crónico con el AE prolame (26 días; 60µg/kg) produce efectos ansiolíticos en ratas hembras adultas Ovx, en el modelo de ansiedad que se conoce como Laberinto Elevado en Cruz (Lemini *et al.*, 2016) también se ha evidenciado que el prolame produce efectos en la cognición, ya que mejora la navegación de ratas en la prueba del laberinto de Morris que evalúa la memoria espacial dependiente del hipocampo (Nissen *et al.*, 2012).

Prolame tiene un efecto muy cercano al de E₂ en pruebas de ansiedad, depresión y memoria en ratas jóvenes con hipoestrogenismo. Por otra parte, pentolame posee efectos ansiolíticos, sin embargo, no se han estudiado posibles efectos mnemónicos tanto de butolame y pentolame, sobre todo considerando que estos AEs son menos estrogénicos en órganos periféricos donde los estrógenos pueden tener efectos adversos de consideración.

Se ha propuesto que los AEs podrían ejercer efectos neuroprotectores en diferentes modelos de enfermedades del SNC, tales como Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y esclerosis múltiple, debido a su efecto protector contra el estrés oxidante y la toxicidad del β-amiloide (Aβ) (Nissen *et al.*, 2012). La selectividad que han mostrado en diversos ensayos indica que los AEs podrían tener utilidad en el tratamiento y prevención de enfermedades del SNC.

1.6 Efectos de los estrógenos en la ansiedad y depresión

En estudios recientes que investigan procesos afectivos en humanos se han observado tasas más altas de trastornos del estado de ánimo y la ansiedad en patologías relacionadas con anomalías en los niveles de la hormona gonadal E₂ (Rasgon *et al.*, 2002). En las mujeres, durante la transición a la menopausia, la disminución de la función ovárica conduce gradualmente a una disminución de los niveles de E₂. En este periodo se presentan con frecuencia síntomas físicos como sofocos y psicológicos como cambios en el estado de ánimo; manifestaciones

extremas de ansiedad y tristeza en mujeres con factores de riesgo que pueden llevar al diagnóstico de ansiedad y trastornos depresivos que afectan su calidad de vida. En la depresión se presenta anhedonia, sentimientos de culpa y tristeza, pensamientos de muerte, alteraciones alimenticias y del sueño. Estudios epidemiológicos han mostrado consistentemente una asociación entre la depresión y en las mujeres después de la ovariectomía o en la transición a la menopausia (Terauchi *et al.*, 2013).

Se ha documentado que los estrógenos de uso clínico pueden ser benéficos, ya que producen efectos antidepresivos y ansiolíticos en modelos animales de menopausia, sin embargo, no pueden ser utilizados por periodos largos por sus efectos adversos. En trabajos recientes se ha informado que los AEs prolamé, butolamé y pentolamé poseen acciones psicoactivas ya que inducen efectos ansiolíticos y efectos antidepresivos equivalentes a los de E₂ con potencia similar (Lemini *et al.*, 2015).

1.7 Efectos sobre la memoria

Los efectos de los estrógenos en el hipocampo están mediados por la interacción con los receptores intracelulares del receptor de estrógeno ER α o del subtipo ER β aunque los mecanismos no clásicos también podrían estar implicados en la neuroprotección. Por lo tanto, mucho más allá de su función reproductiva, los estrógenos son factores neuroprotectores importantes cuando la neurodegeneración, la isquemia, el envejecimiento o la neuroinflamación dañan el SNC (De Nicola *et al.*, 2010).

El prolamé (N- (3-hidroxi-1,3,5 (10) -estratrien-17 β -il) -3-hidroxi-propilamina) es un aminoestrógeno con bajo perfil feminizante, con actividad antitrombótica, ansiolítica y antidepresiva. También previene el deterioro de la memoria espacial al reducir la muerte celular neuronal, implicando que tiene un efecto neuroprotector contra el estrés oxidante y respuesta inflamatoria inducida por

toxicidad A β en el hipocampo de roedores, en diferentes condiciones de neurodegeneración (Díaz *et al.*, 2017).

Por otro lado, la administración de prolame promueve hiperplasia dendrítica en el hipocampo y mejora el reconocimiento de objetos (Díaz *et al.*, 2017). La inhibición del estrés oxidante y la inflamación, particularmente en el hipocampo de los roedores, se considera un efecto neuroprotector por lo que el tratamiento con prolame reduce significativamente los déficits de memoria en ratonas ovariectomizadas demostrando un efecto estrogénico mnemónico (Nissen *et al.*, 2012).

1.8 Papel neuroprotector de E₂

Se ha señalado el importante papel que desempeña E₂ para facilitar la plasticidad en la estructura y función cerebral. Existen evidencias tanto en estudios clínicos así como en modelos experimentales con animales de laboratorio de que la disminución y pérdida de E₂ contribuye al deterioro cognitivo (Walf *et al.*, 2011). En particular, el E₂ ejerce acciones en el hipocampo, estructura reconocida por su plasticidad estructural y funciones relacionadas como cognición, afecto, y neuroprotección ya que la actividad del hipocampo aumenta en presencia de E₂ (Rocca *et al.*, 2014).

Sin embargo, entre diversos estudios poblacionales, existe controversia acerca de los efectos de los estrógenos en mujeres menopaúsicas. Se ha señalado que los estrógenos administrados durante la menopausia pueden producir efectos benéficos, otros estudios señalan que no provocan ningún efecto y algunos otros señalan que pueden producir ocasionar efectos perjudiciales en la memoria de las usuarias. Se han observado varios factores involucrados en estas respuestas entre los que destacan; la edad a la que se inicie la TRH como tratamiento, la etapa de la menopausia (temprana o tardía) y el tipo de la menopausia de que se trate ya sea natural o la inducida (Rocca *et al.*, 2011; 2014).

Se ha descrito que el E₂ reduce la progresión del deterioro cognitivo si se inicia en la perimenopausia o en el inicio de la menopausia, cuando el tejido cerebral sano sigue siendo sensible a los estrógenos, y no así en etapas tardías de la menopausia cuando el tejido cerebral ha perdido su capacidad de respuesta a los estrógenos.

Aun cuando los mecanismos moleculares mediante los cuales el E₂ ejerce estas acciones, no se han esclarecido con claridad, la terapia basada en la administración de la hormona natural E₂ es considerada una vía terapéutica potencial para el tratamiento del Alzheimer. Sin embargo, es importante recordar que el uso de E₂ y otros estrógenos de uso actual como un tratamiento a largo plazo se ha asociado con el aumento en el riesgo de la aparición de problemas cardiovasculares, cánceres sensibles a E₂ y accidentes cerebrovasculares (Lan *et al.*, 2016).

Capítulo 2. MEMORIA

El sistema de cognición se integra a través de procesos de funcionalidad, aprendizaje y memoria, siendo esta última el proceso por el que la información adquirida se convierte en conocimiento que se almacena para ser utilizado posteriormente en el momento que sea necesario. La memoria se considera una función intelectual que tiene relación estructural y funcional con SNC y que se caracteriza por adquisición, almacenamiento, reposición de la información y las experiencias previas aprendidas, ingresadas por alguna vía sensorial (Solís y López, 2009).

La memoria se ha dividido en dos grandes bloques: memoria implícita llamada no declarativa y memoria explícita o declarativa.

La memoria implícita es la resultante de procesos de aprendizaje no consciente realizados a través de hábitos y habilidades, mediante estimulación o sensibilización previa, y en los que interviene la musculatura esquelética o bien respuestas emocionales y de aprendizaje no asociativo. La memoria explícita engloba la retención del conocimiento de determinados acontecimientos, lugares o

hechos, y en la que está involucrado directamente el lóbulo medio temporal del diencéfalo. En la memoria explícita se incluyen tres categorías diferentes: memoria inmediata, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Navarrete *et al.*, 2008).

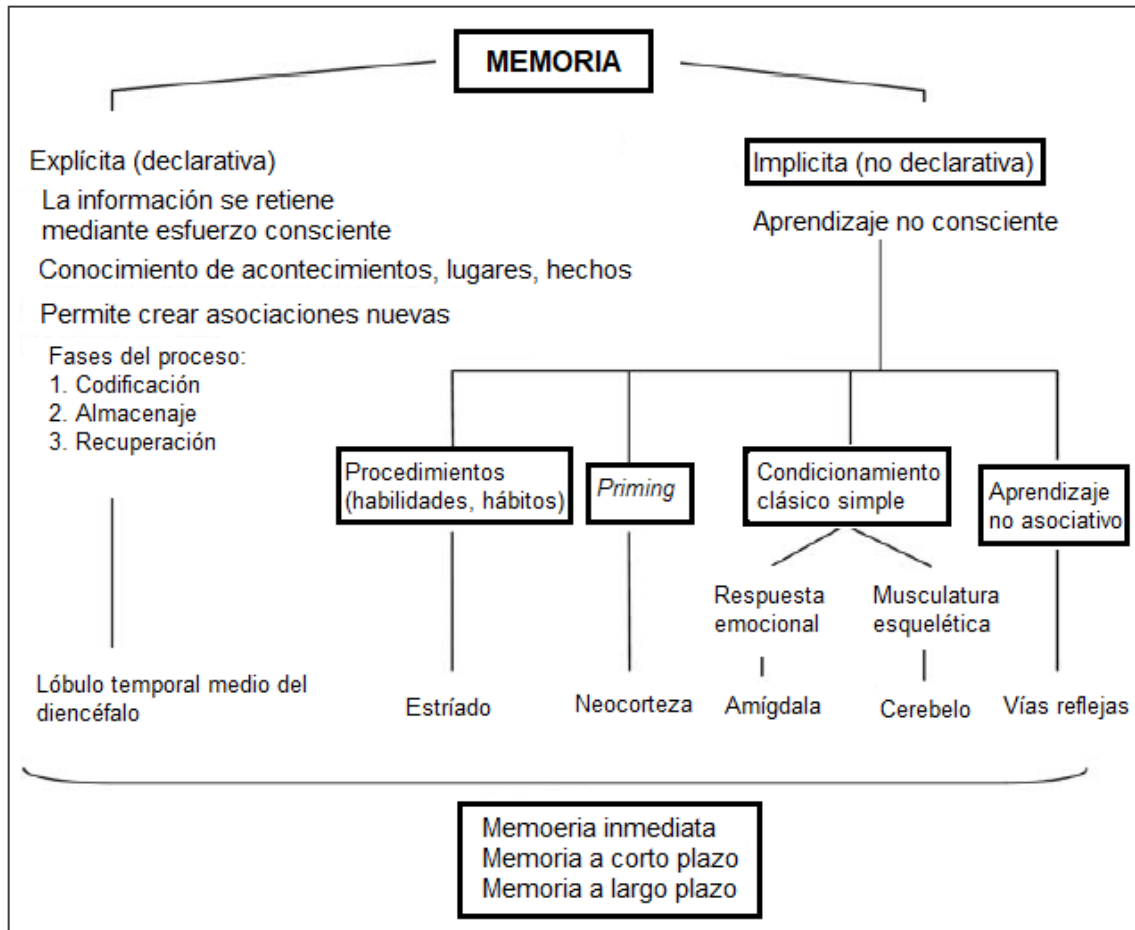


Figura 5. Tipos de memoria y estructuras cerebrales relacionadas. En función de cómo se recibe y almacena la información, cabe distinguir dos grandes tipos de memoria: la implícita, que no requiere un aprendizaje consciente, y la explícita, producto de un esfuerzo cognitivo consciente. (Imagen modificada de Navarrete *et al.*, 2008).

2.1 Prevalencia de los trastornos de memoria

La memoria es una función mental compleja que puede verse afectada por numerosos factores, desde el simple cansancio cotidiano o envejecimiento normal, hasta la presencia de enfermedades agudas o crónicas (CEMIC, 2012). Los

trastornos mentales representan el 12% de la carga mundial de morbilidad, pero solo una minoría de los afectados recibe tratamiento (OMS, 2010).

La demencia afecta a nivel mundial a unos 50 millones de personas, de las cuales alrededor del 60% viven en países de ingresos bajos y medios. Cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos, se calcula que entre un 5 y un 8% de la población de 60 años o más, sufre demencia en un determinado momento. Se prevé que el número total de personas con demencia alcance los 82 millones en 2030 y 152 millones en 2050 (OMS, 2017).

Estudios recientes realizados en Europa por el grupo de Albert Hofman han señalado que la demencia presenta una incidencia del 10.7 por 1000 personas al año (13.1 por 1000 mujeres y 6.9 por 1000 hombres), con un incremento notable de forma paralela a la edad (0.9 a los 55-64 años, 25.2 a los 80-84 años, y 97.2 en mayores de 95 años) sobre una media de 10.5 por 1000 en la población global mayor de 55 años (Ministerio de Sanidad, 2011).

2.2 Neurobiología de la memoria

Distintos estudios señalan múltiples estructuras cerebrales relacionadas con la memoria como son: hipocampo, tálamo, amígdala del lóbulo temporal, cuerpos mamilares y cerebelo, entre otras. Asimismo, en la función cognitiva están involucrados procesos bioquímicos en donde participan diversos neurotransmisores como glutamato, aspartato, ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT), dopamina, noradrenalina y acetilcolina (Nowakowska *et al.*, 2001).

El aprendizaje y la memoria no están confinados a una zona específica del encéfalo, ni a un número especializado determinado de “células de la memoria” que almacenan experiencias de nuestras vidas y conductas aprendidas, independientemente del resto de las funciones encefálicas. En la actualidad

sabemos que la memoria declarativa depende de manera importante del hipocampo y de estructuras relacionadas, la memoria procedimental involucra al estriado y los vestigios de la memoria de trabajo se localizan en varias zonas encefálicas (Solís y López, 2009).

Desde el punto de vista funcional, el aprendizaje y la memoria resultan de la actividad fisiológica repetitiva de millones de neuronas, ensambladas en circuitos neuronales específicos, que lleva al reforzamiento de las conexiones sinápticas involucradas y a cambios de plasticidad sináptica. También, durante el aprendizaje y la memoria se activan segundos mensajeros y se modifican proteínas sinápticas existentes. Algunos de estos cambios temporales se convierten en permanentes (memoria a largo plazo), por alteración en la estructura de las sinapsis (Solís y López, 2009).

2.3 Trastornos de la memoria y su tratamiento actual

En los trastornos de la memoria se presentan alteraciones significativas de las funciones cognitivas; el síndrome clínico de demencia se caracteriza por un déficit adquirido en más de un dominio cognitivo que representa una pérdida respecto al nivel previo y que reduce de forma significativa la autonomía funcional. La demencia cursa frecuentemente con síntomas conductuales y emocionales o síntomas neuropsiquiátricos (De Cuesta *et al.*, 2009).

El criterio de clasificación más extendido de la demencia es el etiológico considerando tres grandes categorías: 1) demencias degenerativas primarias (enfermedad de Alzheimer, demencia degenerativa de lóbulo frontal, enfermedad de Pick, Parkinson, Corea); 2) demencias vasculares (HTA, diabetes, obesidad, arritmias); 3) demencias secundarias de etiología múltiple (combinadas o mixtas sida, encefalitis herpética, hiper/hipotiroidismo, esclerosis múltiple).

Otras formas de clasificación de las demencias están basadas en criterios de presencia de otros síntomas neurológicos como la edad de inicio o distribución topográfica y también han sido clasificadas utilizando criterios no clínicos como neuropatológicos, moleculares, y/o genéticos (Pascual, 2006).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia: se calcula que representa entre un 60% y un 70% de los casos. Otras formas frecuentes son la demencia vascular, la demencia por cuerpos de Lewy (agregados anormales de proteínas en el interior de las células nerviosas) y un grupo de enfermedades que pueden contribuir a la demencia frontotemporal (degeneración del lóbulo frontal).

Las manifestaciones clínicas de la demencia son heterogéneas debido a que existen múltiples etiologías, diferentes patrones lesionales y variabilidad en el curso evolutivo. Aproximadamente un 80% de los enfermos con demencia presenta síntomas conductuales psicológicos en algún momento de su evolución, que en algunos casos, dificulta el diagnóstico, pero por otra parte ayuda a diferenciar el tipo de demencia.

Las demencias de origen neurodegenerativo tienen en común un comienzo habitualmente insidioso y un curso evolutivo progresivo. En fases iniciales y en la mayoría de los casos como en la EA se caracteriza por una afectación de la memoria para hechos recientes, a la que se añaden posteriormente déficits en otras funciones cognitivas y un progresivo deterioro en las actividades avanzadas, instrumentales y finalmente básicas de la vida diaria, seguido de deterioro de funciones motoras, con aparición de trastorno de la marcha, temblor, mioclonías, incontinencia de esfínteres, disfagia y finalmente, inmovilización del paciente y fallecimiento por una complicación intercurrente como tromboembolismo o infecciones. (Alberca, 2009).

Existen intervenciones para apoyar y mejorar la vida de las personas con demencia atendiendo a sus cuidadores y familias. Los objetivos principales de los servicios de tratamiento relacionados con la demencia son a) optimizar la salud

física, la cognición, la actividad y el bienestar del enfermo; b) identificar y tratar enfermedades físicas concomitantes; c) detectar y tratar los síntomas conductuales y psicológicos problemáticos; d) proporcionar información y apoyo a largo plazo a los cuidadores (Solís y López, 2009).

El manejo farmacológico de los trastornos mentales en estos enfermos por lo general es eficaz en las etapas agudas y para prevenir recaídas, sin embargo, en los tratamientos a largo plazo y el control diario de los trastornos mentales su eficacia disminuye (OMS, 2017).

Actualmente se dispone de dos tipos de fármacos específicos para el tratamiento sintomático de la EA: a) los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (IACH) que inhiben la degradación de la acetilcolina a nivel del espacio sináptico como son donepezilo, rivastigmina y galantamina cuyos perfiles de seguridad y eficacia son similares para el tratamiento de los pacientes diagnosticados de EA de leve a moderada. b) el antagonista no competitivo de los receptores de N-metil D-Aspartato (NMDA) memantina, que actúa como neuromodulador del glutamato, impidiendo la neurotoxicidad que provoca el exceso crónico de glutamato y que promueve su actividad fisiológica en el receptor NMDA y ha mostrado cierta eficacia en el tratamiento de la EA moderada y grave, cuando es utilizado como monoterapia o en combinación con un IACH (Brunton *et al.*, 1996). Sin embargo, en numerosos casos no existen tratamientos específicos por lo que se requiere la búsqueda de nuevos fármacos y enfoques terapéuticos.

2.4 Menopausia

La menopausia es el periodo de vida en la mujer en donde ocurre un marcado descenso en las concentraciones circulantes de estrógenos, su diagnóstico se establece por la ausencia de menstruación por 12 meses o más (Basavilvazo *et al.*, 2013). De esta manera, la menopausia se define como el cese permanente de la menstruación como consecuencia de la pérdida de la función ovárica. El origen de este proceso está estrechamente relacionado con el envejecimiento ovárico y su repercusión sobre el eje HHG. El proceso se produce de forma progresiva a

partir de los 38 años de edad, en donde se distinguen dos fases sucesivas: la perimenopausia (40-50 años) y la menopausia definitiva que ocurre posteriormente (Takahashi y Johnson, 2015). La edad promedio de presentación de la menopausia en la población femenina mexicana se ha descrito a los 49 años con un rango entre 41-55 años (Vázquez *et al*, 2010).

Durante este periodo la severa disminución en los niveles de estrógenos produce un desequilibrio endocrino. La deficiencia estrogénica se asocia con varios síntomas somáticos como bochornos, atrofia urogenital, infecciones del tracto urinario, disfunción sexual y pérdida de elasticidad de la piel, pérdida de masa ósea y aumento de riesgo cardiovascular (Ojeda *et al.*, 2014). También ocurren cambios en el estado de ánimo produciendo irritabilidad, ansiedad, depresión, agotamiento mental y físico (Gjelsvik *et al.*, 2011). Todos estos síntomas tienen un importante impacto negativo sobre la calidad de vida de la mujer, y que considerando que el aumento de expectativa de la vida media poblacional, la mujer pasa por un periodo más largo bajo esta condición hipoestrogénica, en donde se produce un alto deterioro en su calidad de vida, por lo que es necesario desarrollar terapias más selectivas, eficaces y seguras dirigidas a un buen manejo de la THR.

2.5 Memoria y Menopausia

El brusco descenso de los niveles de hormonas gonadales después de la menopausia conduce a una variedad de cambios fisiológicos en la mujer y se ha asociado con los cambios cognitivos en la memoria, atención, percepción visual y fluidez verbal (Mitsiades *et al.*, 2008). La demencia representa un deterioro cognitivo importante, en la mayoría de las regiones del mundo el Alzheimer representa la demencia más común en la población (Henderson, 2014). Esta enfermedad presenta cuatro indicadores principales que la definen: 1) la formación de placas de A β . El A β es un péptido de 36 a 43 aminoácidos que proviene de la división secuencial de una proteína precursora amiloidea; 2) la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares; 3) gliosis reactiva y 4) pérdida de memoria

total, la acumulación. La deposición del péptido A β en las placas seniles y en la vasculatura cerebral se consideran un paso determinante en el mecanismo patogénico de la enfermedad de Alzheimer (Davey y Thomas, 2015).

El efecto neurotóxico de A β se ha explicado en función de: 1) aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno tales como peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, anión superóxido y radicales hidroxilo altamente reactivos; 2) la acumulación de calcio intracelular; 3) una alteración de la fluidez de la membrana; 4) el agotamiento de energía; 5) alteraciones de componentes del citoesqueleto (Limón *et al.*, 2012).

2.6 Terapia de reemplazo hormonal actual beneficio-riesgo

La terapia de reemplazo hormonal (THR) se define como la administración de hormonas a mujeres con deficiencia estrogénica, sintomáticas, durante la transición a la menopausia y la posmenopausia. Representa una de las prescripciones indicadas con mayor frecuencia en los países latinoamericanos para el tratamiento de la menopausia. Se considera que anualmente se realizan más de 100 millones de prescripciones a la población femenina que presenta deficiencia estrogénica (Ramírez y Gordillo, 2008). Esta terapia constituye la opción más efectiva para tratar los síntomas vasomotores y de deficiencia estrogénica urogenital. Otros síntomas relacionados con la menopausia, como dolores articulares y musculares, cambios de estado ánimo, disturbios del sueño, disfunción sexual y disminución del libido también pueden mejorar durante el tratamiento con la TRH.

La TRH puede ser administrada por vía oral, sistémica o tópica. Las formulaciones pueden contener estrógenos solos, o regímenes combinando un estrógeno y un progestágeno. Los distintos esquemas de TRH pueden incluir mezclas variables de forma cíclica o secuencial, donde primero se administra un estrógeno y posteriormente se añade un progestágeno durante 10-14 días cada cuatro semanas. Los estrógenos que se utilizan con mayor frecuencia en la THR son los estrógenos equinos conjugados (EEC), 17 β -estradiol micronizado o estrógenos

sintéticos como el etinilestradiol y los progestágenos, el acetato de medroxiprogesterona (MPA) y acetato de noretisterona (Vargas *et al.*, 2013).

Por otra parte, estudios poblacionales amplios han alertado sobre los riesgos de la utilización de hormonas estrogénicas en la posmenopausia. El mayor riesgo de la terapia estrogénica es la producción de cáncer de endometrio y mama, así como una mayor frecuencia de presentar tromboembolismo venoso (embolismo pulmonar o venoso profundo), accidente cerebrovascular (ACV) y eventos coronarios en las usuarias; estos riesgos son de gran consideración y limitan su uso terapéutico (De Villiers *et al.*, 2013).

Capítulo 3. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA MENOPAUSIA

Los modelos experimentales en animales de laboratorio (farmacología preclínica) han sido y siguen siendo esenciales en el desarrollo de medicamentos. Estos estudios están dirigidos a la demostración de un efecto farmacológico, llevar a cabo estudios farmacocinéticos, comprender los mecanismos a diferentes niveles (farmacodinámicos) y evaluar la seguridad de nuevos fármacos como terapias candidatas realizando estudios toxicológicos que puedan informar acerca de la posible utilidad y seguridad de los nuevos fármacos.

La similitud estructural y fisiológica entre el hombre y algunas especies de mamíferos utilizadas como modelos animales apoya su utilidad en modelos experimentales conductuales basada en la evaluación de una variedad de signos y comportamientos que nos proporcionan información acerca de un efecto farmacológico dado. Los modelos animales son útiles en la investigación médica debido a sus sistemas nerviosos más simplificados, donde los comportamientos pueden estar bajo entornos controlados que se interpretan o traducen en una actividad biológica dada y que puede simular una gran variedad de intervenciones (van Meer *et al.*, 2015).

3.1 Ovariectomía como modelo de hipoestrogenismo en la rata

Dado que en el ser humano los trastornos de memoria se presentan a mayor edad y la prevalencia de estos trastornos se duplica en las mujeres en relación a los hombres de la misma edad; se infiere que en la etapa de la menopausia la disminución de los esteroides sexuales son los responsables en gran parte de que ocurra esta disfuncionalidad. En roedores, principalmente rata y ratón, la ovariectomía es realizada para imitar las características de envejecimiento por hipoestrogenismo y ha sido de gran utilidad como un modelo de menopausia adquirida donde se ha estudiado la participación de los esteroides sexuales.

El ciclo estral en la rata y el ratón se caracteriza por cuatro estadios: metaestro o diestro I, diestro II, proestro y estro. Este ciclo está bajo el control del eje hipotálamo-hipofisis-ovario (HHO). Los cambios en los tipos de células vaginales que se observan durante cada fase correlacionan con los cambios ováricos. (Nelson, 2000). En la fase de metaestro o diestro I se presenta una disminución en el número de células cornificadas y se observa la presencia de leucocitos iniciando el desarrollo de nuevos folículos (~ 24h). En la fase de diestro II se observa la presencia de unas pocas células epiteliales nucleadas, leucocitos y desaparecen las células cornificadas (~24h). El proestro se caracteriza por la abundancia de células epiteliales nucleadas y una reducción en el número de leucocitos (~12h) coincidiendo con el máximo desarrollo folicular, la ovulación y con el inicio de la conducta de apareamiento. Finalmente el estro (~36h) se caracteriza por la presencia de células cornificadas, ocurre después de la ovulación y corresponde con la formación del cuerpo lúteo. Una hembra presenta ciclos de cuatro a cinco días; si no recibe estímulos de apareamiento o éstos son insuficientes, los cuerpos lúteos sufren regresión poco después de formarse. Aproximadamente de los 9-12 meses de edad, la rata progresa de ciclos regulares a ciclos irregulares y finalmente se establece una fase conocida como diestro

continuo que se caracteriza por una disminución significativa en los niveles de estrógenos semejante a la que se produce en la menopausia. En esta fase de ciclos irregulares las ratas presentan infertilidad y disminución de la actividad sexual (Chakraborty y Gore, 2004).

3.2 Modelos animales para estudios de déficit de atención y memoria

La rata espontáneamente hipertensa (SHR) ha sido utilizada extensamente y en la actualidad constituye el modelo animal mejor validado para el estudio del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), que tiene como base una amplia gama de criterios conductuales, genéticos y neurobiológicos, que son la causa de los principales síntomas como son la falta de atención, hiperactividad e impulsividad, semejantes a los que ocurren en pacientes que sufren este trastorno. (Avila, 2004) Generalmente en los estudios la rata SHR se compara con su control (normotenso), la rata Wistar Kyoto proveniente de Harlan, Reino Unido (Sagvolden *et al.*, 2009).

Los modelos animales de trastornos cognitivos desempeñan un papel clave en la comprensión de las bases neuroquímicas de la función/disfunción cognitiva. Con su utilización podemos profundizar en las bases fisiopatológicas del deterioro que se produce por el simple hecho de envejecer o el que aparece asociado a diferentes situaciones patológicas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, las demencias vasculares, la angiopatía amiloide cerebral, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, la esquizofrenia y otras enfermedades neurodegenerativas. Además, los modelos animales nos permiten comprobar la eficacia de nuevos fármacos e identificar posibles dianas terapéuticas (Castellucci, 2008).

3.3 Modelo de Laberinto de Barnes

Esta prueba permite estudiar el aprendizaje, la memoria espacial, la memoria de trabajo y de referencia, la memoria a corto y largo plazo, así como otras tareas más complejas en ratas y ratones. Fue diseñado por Barnes en la Universidad de Arizona y consiste en un laberinto seco donde se utilizan luz y ruido como estímulos aversivos. Un foco de luz (de unos 150 W) y un generador de ruido (sobre 80 dB) constituyen los estímulos aversivos. Estos sirven como refuerzo que recibe el animal para escapar de estos estímulos.

El laberinto está constituido por un disco de plástico opaco elevado del suelo mediante un trípode. A lo largo del perímetro del disco se distribuyen 20 agujeros de 5 cm de diámetro y debajo de uno de ellos se coloca un cajón de escape de plástico opaco (Navarrete *et al.*, 2008).

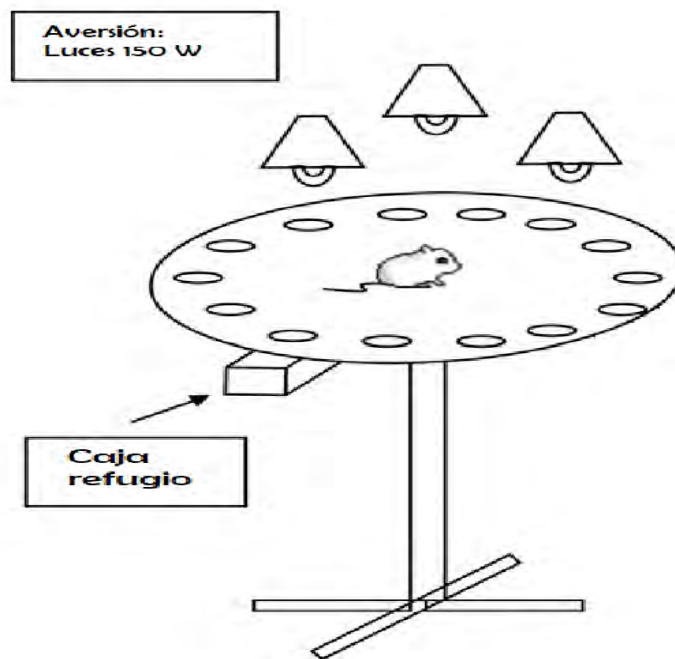


Figura 6 Laberinto de Barnes. El animal se sitúa primero en el centro del aparato en una cámara de inicio y a continuación se le deja que explore los diversos orificios ante la exposición a estímulos aversivos, como luces y sonidos. Se evalúa el tiempo que emplea en encontrar la salida que conduce al cajón refugio. (Modificada de Navarrete *et al.*, 2008).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pentolame es un AE que produce efectos antidepresivos en ratas hembra adultas Ovx (hipoestrogénicas). Estos efectos son semejantes y equivalentes en magnitud a los que produce E₂, lo que sugiere que podría ejercer efectos centrales benéficos como THR. La ventaja del pentolame en relación al E₂ es que tiene una menor potencia en sus efectos periféricos en útero y no posee efectos pro-trómbicos lo que indica que podría tener un menor potencial de efectos adversos en estos tejidos. Se han descrito efectos benéficos del AE prolame sobre la memoria en ratas ovariectomizadas que señalan que pentolame podría estar compartiendo esta propiedad con prolame sin embargo, actualmente se desconoce si el pentolame produce efectos benéficos mnemónicos.

IV. HIPÓTESIS

El tratamiento crónico con pentolame en ratas SHR hipoestrogénicas Ovx producirá un efecto protector sobre la memoria semejante o superior al que induce E₂.

V. OBJETIVOS

- Evaluar y comparar el efecto del tratamiento crónico de dosis equivalentes de pentolame y E₂ en ratas hembras SHR Ovx.
- Elaborar un curso temporal de la respuesta a la administración crónica de pentolame y E₂ sobre la memoria de ratas hembras SHR OVX debida utilizando el modelo de Barnes.

VI. MATERIAL Y METODOS

Fármacos Empleados

En este trabajo se utilizaron los siguientes reactivos: 17 β -estradiol (E₂; 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol) obtenido de Sigma Chemical (St. Louis, MO). Pentolame (17 β -(5-hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol) que fue sintetizado por nuestro grupo de trabajo mediante métodos previamente reportados (Lemini *et al*, 1993). Aceite de maíz (Mazola).

Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa SHR de 5 meses de edad, (193- 318 g) provenientes del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los animales se alojaron en condiciones estándar de bioterio, bajo ciclo luz/oscuridad invertido (12 x 12 horas, las luces se apagaron de 8:00h a 20:00 h). La Temperatura se mantuvo a 22-25 °C y los animales recibieron alimento (Purina chow) y agua *ad libitum* durante los experimentos. El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para Animales de Experimentación (NOM-062-Z00-1999).

Ovariectomia

Todas las ratas fueron sometidas a ovariectomia bilateral con el fin de eliminar la principal fuente de estrógenos (ovarios) y manejar condiciones de hipoestrogenismo. Para la cirugía, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (35 mg/kg, ip); se utilizó sutura quirúrgica absorbible (Atramat) para suturar el músculo y sutura de seda (triple cero, Atramat) para la piel. Las ratas ovariectomizadas (OVX) tuvieron un periodo de recuperación de 3 semanas después de la cirugía antes del inicio del tratamiento.

Diseño experimental

Las ratas SHR Ovx fueron marcadas individualmente para su identificación mediante un arete con un código colocado en una de sus orejas, las cuales se distribuyeron en cuadrados latinos en base al peso corporal en cuatro grupos (N = 7 animales/grupo). Los tratamientos fueron asignados a los cuatro diferentes grupos al azar, y se llevó a cabo la administración subcutánea de: grupo 1 o control (aceite de maíz 2 mL/kg); grupo 2 pentolame (70 µg/Kg) grupo 3 pentolame (140µg/Kg), grupo 4 17β-estradiol (40 µg/Kg). La administración se llevó a cabo entre 12:00–12:30 pm, en un periodo de 30 días.

El procedimiento comenzó con un entrenamiento durante 3 días consecutivos, y consistió en colocar durante 30 segundos a la rata en el centro del laberinto de Barnes en el interior de una "cámara de inicio" que consistió; en una caja forrada con papel aluminio. En seguida se retiró la cámara de inicio, conectando al mismo tiempo una fuente de luz (150 W) y ruido zumbido (80 dB), permitiendo la exploración del animal en el laberinto y conduciendo al animal de forma manual a la cámara de escape. El estrés producido por los estímulos (luz y sonido) induce al animal a buscar un espacio cerrado que sirva de refugio a los estímulos nocivos.

La sesión se daba por terminada cuando el animal encontraba la cámara de escape o cuando habían transcurrido cinco minutos desde la liberación del animal de la cámara de inicio. Cuando el animal encontraba la cámara de escape y se introducía en ella, los estímulos aversivos se eliminaban, y la rata se regresaba a su jaula. La cámara de escape se eligió de forma aleatoria y siempre estuvo situada debajo del mismo agujero. Al término de cada prueba el laberinto se limpió con una solución de etanol al 96% para continuar con la evaluación de la rata siguiente. Después de las sesiones de entrenamiento se realizaron 22 evaluaciones divididas en cuatro semanas, en donde los días domingo los animales no recibieron tratamiento ni se llevó a cabo la evaluación.

Los experimentos fueron videograbados y analizados con el programa OAVidReg y Matlab. Se determinaron los parámetros: 1) frecuencia de localización de la meta (porcentaje de animales que encuentra la meta), 2) latencia de localización de la meta, 3) distancia total recorrida por el animal para encontrar la meta en el laberinto, 4) la velocidad a la cual la rata realizó dicho recorrido.

Análisis estadístico

Los resultados de las diferentes evaluaciones se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La significancia de las diferencias entre los grupos tratados y el grupo control se estimaron utilizando las pruebas de Dunn o Dunnet. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando los valores de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Sigma Plot 11.

RESULTADOS

Los resultados del tratamiento crónico de los diferentes grupos de ratas SHR Ovx que fueron tratadas con 2 mL/kg de vehículo (grupo control), 70 µg/kg de pentolame (P1), 140 µg/kg pentolame (P2) y 40 µg/kg de E₂ y que se evaluó durante 22 sesiones se muestran en las figuras 7, 8, 9 y 10. Los diferentes cursos temporales se graficaron e ilustran: el porcentaje de animales que alcanzó la meta en la figura 7; los tiempos que los animales tardaron en alcanzar la meta en la figura 8; las distancias que recorrieron los animales para alcanzar la meta en la figura 9; y la velocidad que mantuvieron durante su recorrido para alcanzar la meta en la figura 10. En la figura 11 se muestran es análisis de los datos globales acumulativos de los promedios de los parámetros de cada grupo experimental considerando que estos resultados reflejan los efectos de los diferentes tratamientos.

El análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de ratas SHR que alcanzan la meta bajo los diferentes tratamientos mostró diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Las ratas tratadas con las dos diferentes dosis de pentolame P1 y P2 encontraron en más ocasiones la meta en relación a los grupos control y E₂.

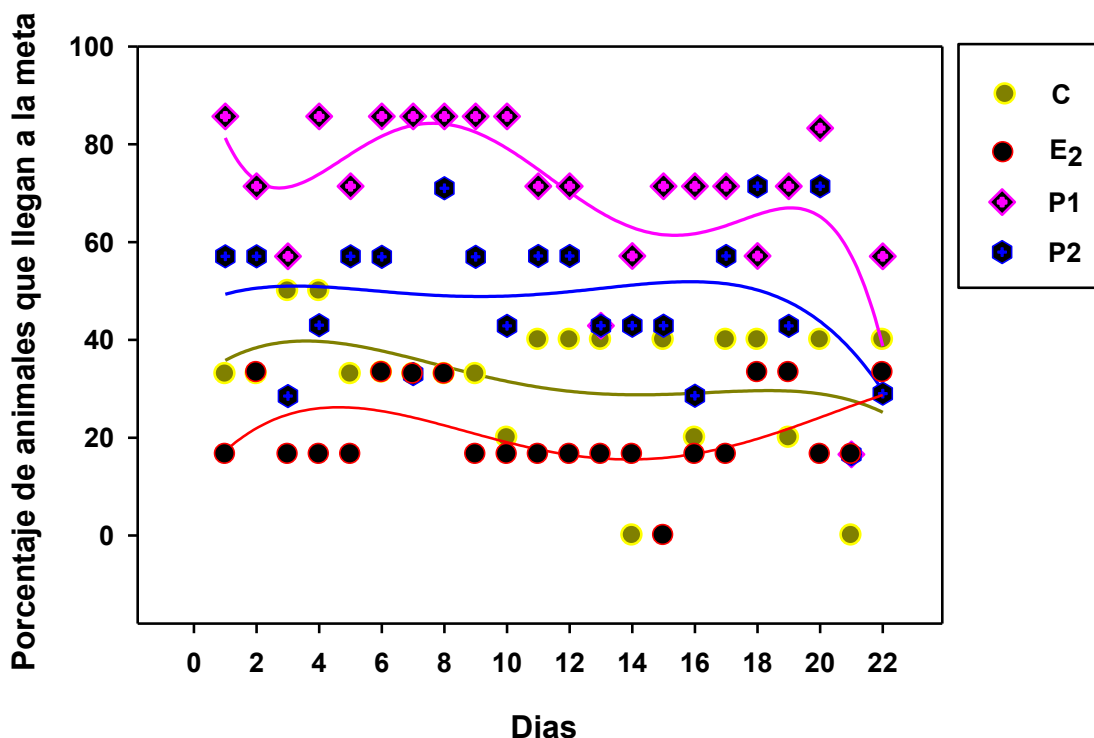


Figura 7. Porcentaje de ratas SHR que alcanzan la meta bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (pentolame 70 µg/kg), P2 (pentolame 140 µg/kg), E₂ (17 β-estradiol 40 µg/kg) y el grupo C (vehículo, 2mL/kg). Los valores representan el porcentaje de ratas SHR que encontraron la cámara de escape en las diferentes evaluaciones.

Este fenómeno se observó durante todo el experimento, ya que los animales bajo tratamiento con pentolame encontraron la meta con mayor frecuencia. Sin embargo, cabe señalar que el grupo P1 al que se administró la dosis menor de pentolame (70 µg/kg) tuvo una diferencia de 117% ($p < 0.05$; prueba de Tukey) en relación el grupo control y el grupo P2 al que le fue administrada el doble de la dosis de pentolame (140 µg/kg) presentó una diferencia menor con respecto al grupo control (49%; $p < 0.05$; prueba de Tukey).

Por otra parte el grupo de ratas tratadas con E₂ mostraron una conducta opuesta a la que se observó con los dos grupos de ratas tratadas con pentolame (P1 y P2), ya que un 35% menos de animales ($p < 0.05$; prueba de Tukey) encontraron la meta en relación al grupo control.

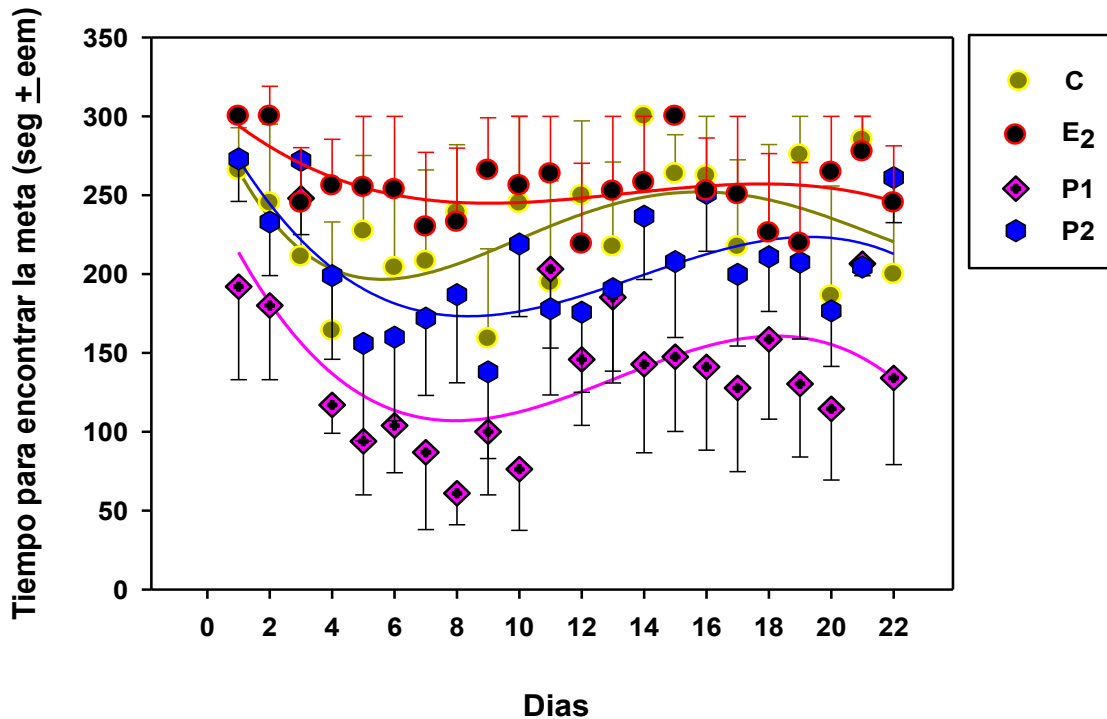


Figura 8. Tiempo que tardan en alcanzar la meta las ratas SHR bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (70 $\mu\text{g}/\text{kg}$), P2 (140 $\mu\text{g}/\text{kg}$), E₂ (17 β - estradiol 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y el grupo C (vehículo, 2mL/kg). Los valores representan el tiempo en segundos \pm eem.

El análisis de varianza (ANOVA) realizado con los datos obtenidos del tiempo que tardan en alcanzar la meta las ratas SHR bajo diferentes tratamientos con los esteroides mostró diferencias significativas entre los grupos. ($p < 0.05$).

La prueba Tukey reveló diferencias significativas entre los tiempos que tardaron los animales de los grupos P1 y P2, y los tiempos que manifestó el grupo control para alcanzar la meta. P1 y P2 llegaron a la meta en 140 ± 10 y 204 ± 8 segundos respectivamente en relación al grupo control que llegó en un tiempo promedio de 229 ± 8 segundos. El grupo de animales tratados con E₂ alcanzó la meta en un tiempo promedio de 255 ± 5 segundos, mostrando diferencias significativas en relación al grupo control ($p < 0.05$; prueba de Tukey). Los

animales tratados con P1 y P2 tardaron menos tiempo en encontrar la meta de manera significativa ($p < 0.05$; prueba de Tukey) este comportamiento se observó a lo largo de todo el experimento. Cabe señalar que los animales del grupo P1 presentaron una mayor habilidad para encontrar la meta de manera significativa (+39%; $p < 0.05$) que contrasta con los datos obtenidos del grupo de animales P2 (+11%; $p < 0.05$) cuya respuesta fue menor en comparación al grupo de P1, pero mayor en relación al grupo control.

En la figura 8 también se aprecia que el grupo de animales tratados con E₂ mostró una conducta opuesta a la que presentaron los grupos P1 y P2, ya que el tiempo en el que las ratas SHR de este grupo en encontrar la meta fue mayor desde el inicio de las 22 evaluaciones tardando 11% más de tiempo que el grupo control ($p < 0.05$).

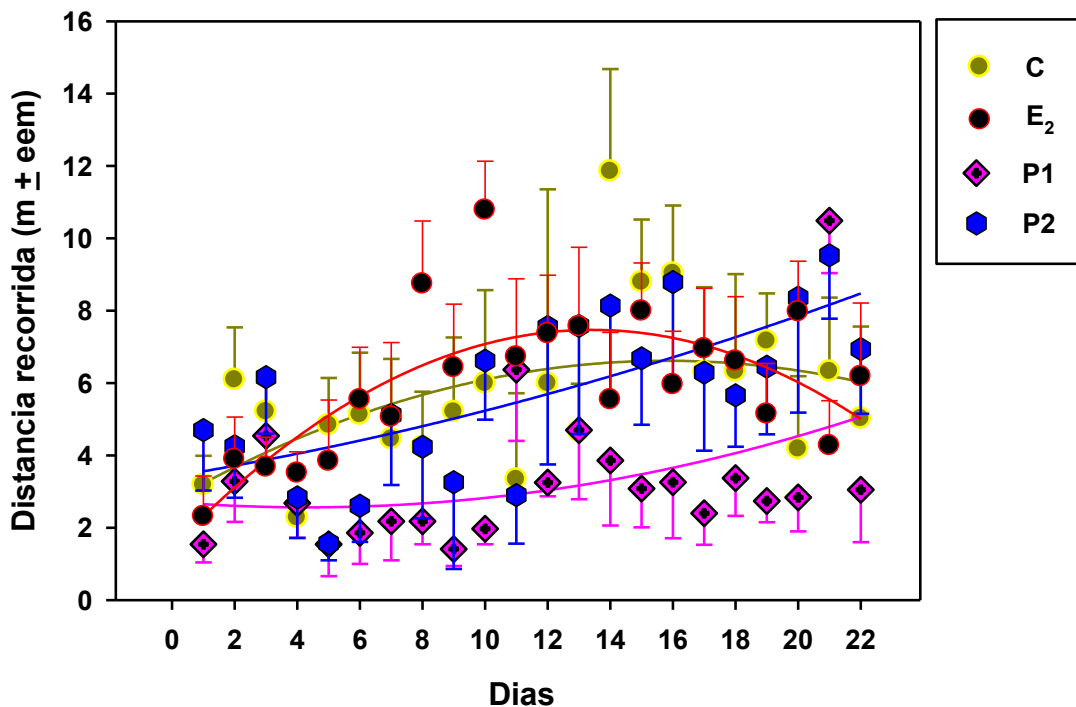


Figura 9 Distancia recorrida por las ratas SHR para alcanzar la meta bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (pentolame 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$), P2 (pentolame 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$), E₂ (17 β - estradiol 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y el grupo C (vehículo, 2mL/kg). Los valores representan la distancia en metros \pm eem.

El análisis de varianza (ANOVA) de los datos de la distancia recorrida por las ratas SHR para alcanzar la meta bajo diferentes tratamientos con los esteroides mostró diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$). Con ayuda de la prueba de Tukey se revelaron diferencias significativas entre las distancias recorridas por los animales tratados de cada grupo para alcanzar la meta. El grupo control recorrió una distancia promedio de 5.7 ± 0.45 metros, mientras que el P1 presentó una distancia promedio recorrida de 3.3 ± 0.42 metros, para el caso de P2 y E₂ la distancia promedio recorrida fue de 5.7 ± 0.47 y 6.0 ± 0.42 metros respectivamente. El grupo de animales P1 recorrió 42% menos distancia en comparación al grupo control. ($p < 0.05$). Del mismo modo el grupo de animales de P1 recorrió menor distancia que el grupo de animales de P2 y E₂, ya que los animales de estos grupos recorrieron una distancia mayor con respecto al grupo control. Es de suma importancia señalar que el grupo de animales de E₂ recorrió un 5% mayor distancia de manera significativa ($p < 0.05$; prueba de Tukey) con respecto al grupo control.

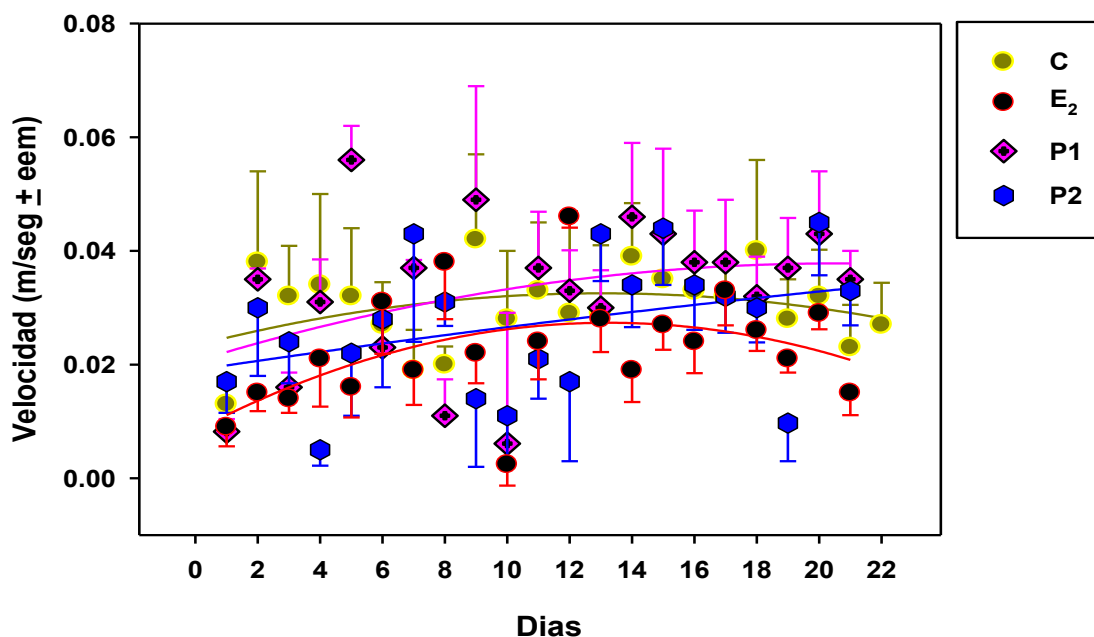


Figura 10. Velocidad a la que realizan el recorrido para alcanzar la meta las ratas SHR bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (pentolame 70 µg/kg), P2 (pentolame 140 µg/kg), E₂ (17 β- estradiol 40 µg/kg) y el grupo C (vehículo, 2mL/kg). Los valores representan la velocidad en m/seg ± eem.

El análisis de los datos de la velocidad a la que realizan el recorrido las ratas SHR para alcanzar la meta bajo diferentes tratamientos con los esteroides que se indican en la figura 10, señaló que el análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos mostró diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). El método Holm-Sidak reveló diferencias significativas entre las velocidades a las cuales los animales de los diferentes grupos realizaron su recorrido para alcanzar la meta. El grupo de animales tratados con P1 alcanzó la meta (m/s) a una mayor velocidad (0.03 ± 0.002) en relación al grupo control (0.03 ± 0.001) E₂ (0.023 ± 0.009) y P2 (0.027 ± 0.002). Cabe señalar que el grupo de P1 presentó una diferencia significativa del 8% en relación al grupo control ($p < 0.05$).

Los grupos de animales tratados con P2 y E₂ presentaron un comportamiento contrario al grupo de animales de P1 ya que realizaron su recorrido para alcanzar la meta a una velocidad menor (0.027 ± 0.002 y 0.023 ± 0.009 m/s respectivamente) en comparación al grupo control (0.03 ± 0.001 m/s) presentando diferencias significativas del (10%, $p < 0.05$) y (25%, $p < 0.05$) ambos en relación al grupo control, respectivamente.

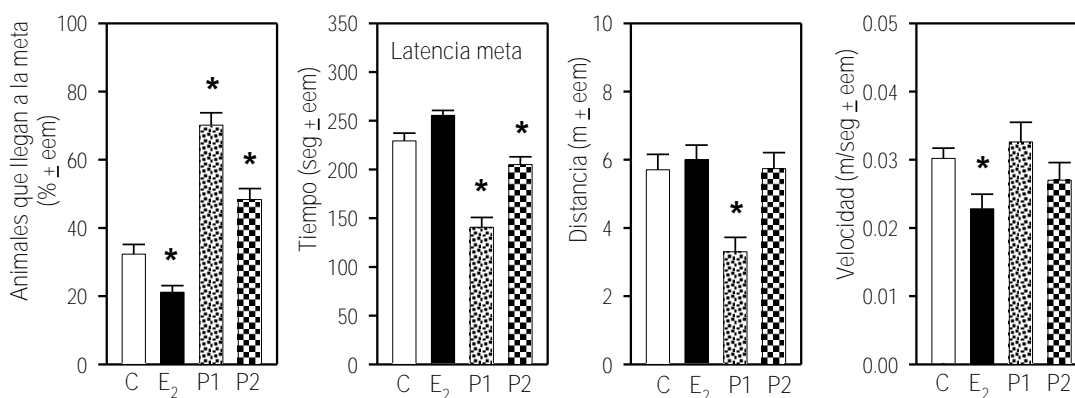


Figura 11. Datos globales de: los promedios de: animales que llegan a la meta; latencia para encontrar la meta; distancia recorrida y velocidad durante las sesiones de ratas SHR bajo diferentes tratamientos con los esteroides: P1 (pentolame 70 µg/kg), P2 (pentolame 140 µg/kg), E₂ (17 β- estradiol 40 µg/kg) y grupo C (vehículo, 2mL/kg); * $p < 0.001$ (Metodo de Dunn's).

En la figura 11 se muestran gráficamente los datos globales acumulativos de los promedios de los parámetros de cada grupo experimental. Es notable que los datos del porcentaje de animales que llegan a la meta solo los grupos tratados con P1 y P2 presentaron diferencias significativas positivas y el efecto que manifiesta E₂ es en sentido opuesto. Por otra parte el tiempo que los animales tardan en llegar a la meta (latencia a meta) P1 y P2 presentaron una menor latencia que contrasta con la latencia a meta de E₂ que fue muy cercana a la del grupo control y en sentido también opuesto a P1 y P2. La distancia que recorrieron para encontrar la meta los diferentes grupos de animales solo fue diferente significativamente en el grupo P1. Por último la velocidad a la que realizaron el recorrido los animales para alcanzar la meta solo se modificó en el grupo de animales tratados con E₂ siendo significativamente menor a la que mostro el grupo control.

VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que la administración crónica del 17 β -aminoestrógeno pentolame en ratas SHR produce un efecto benéfico sobre la memoria espacial de los animales tratados. El efecto mnemónico de pentolame contrasta con el que manifestaron las ratas tratadas con E₂ que fue más bajo que el que se observó con el control, las ratas bajo tratamiento con E₂ mostraron un deterioro funcional mayor al que exhibieron las ratas control Ovx.

Se ha descrito que las ratas SHR exhiben déficits en atención sostenida, retardo, acortamiento de aprendizaje y aumento de su actividad motriz. Este modelo de rata muestra hipofuncionalidad de sus sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos, encefalopatía pronunciada, caracterizada por pérdida neuronal hipocámpica, disminución del volumen de materia blanca en las regiones del cerebro anterior y cambios en la neurogénesis hipocámpal (Pietranera *et al.*, 2010). Estos cambios también se observan en los trastornos mentales, como el deterioro cognitivo, por lo que esta cepa se ha considerado un modelo importante

para el estudio de la demencia y síndrome de hiperactividad con déficit de atención (Pietranera *et al.*, 2010).

No obstante, hasta la fecha, muy pocos estudios han investigado los efectos de hormonas sexuales en el comportamiento en ratas SHR en la edad adulta. El trabajo de Bucci *et al.*, (2008) reporta el efecto del aprendizaje asociativo de ratas SHR gonadalmente intactas (tanto machos como hembras) y Wistar (cepa normo-activa). Las hormonas sexuales participan en la función activadora de la memoria mostrando diferencias de comportamiento entre estas cepas.

La gonadectomía en ratas adultas SHR y Wistar presentan diferencias: en ratas Wistar, la gonadectomía no muestra efectos sobre la respuesta condicionada en las hembras, pero disminuye la respuesta condicionada en los machos, lo que elimina de manera efectiva la diferencia sexual en el comportamiento de estos animales por la castración y sugiere que los andrógenos circulantes en ratas Wistar machos normalmente ayudan en la tarea del condicionamiento. Por el contrario, en ambos sexos en las ratas SHR, la gonadectomía aumenta la respuesta condicionada, señalando que los andrógenos y/o los estrógenos participan de manera importante en las asociaciones condicionadas en esta cepa. La hipertensión y el aumento de la edad en las ratas SHR dañan su aprendizaje asociativo y memoria; dicha asociación en los animales produce alteraciones cognitivas aditivas. Por lo que la ovariectomía (extirpación de la fuente principal de secreción de estrógenos) en la cepa SHR conduce a un modelo de hipoestrogenismo semejante al que ocurre durante la etapa no reproductiva (de mayor edad o envejecimiento). Se ha descrito que la deficiencia estrogénica causa una expresión reducida de ER α y disfunción endotelial que puede restaurarse mediante la administración de E₂ (Frick y Kim, 2018). También se ha descrito que la ovariectomía conduce a un deterioro cognitivo importante, en especial en el hipocampo, que es una región del cerebro rica en receptores de estrógenos y progesterona y por lo tanto muy sensible a estos esteroides. El hipocampo participa en la mediación de la formación de diferentes tipos de memoria, incluidas: la espacial, relacional, contextual y de reconocimiento de

objetos, por lo tanto su déficit está implicado en el deterioro cognitivo (Frick y Kim, 2018).

Por otra parte, el tratamiento con estrógenos como el E₂ en ratas normales presenta efectos benéficos sobre los sistemas de memoria dependientes del hipocampo que se ha considerado una estructura para el estudio del deterioro cognitivo ya que está reportado que tanto el hipocampo de los roedores y el del ser humano son sensibles a los estrógenos y progestágenos (Pollard *et al.*, 2018).

Los resultados del presente estudio mostraron que pentolame produce un efecto mnemónico significativo con las dos dosis administradas de 70 y 140µg/Kg después de la cuarta administración, y este efecto se sostiene a lo largo del tratamiento crónico de 30 días; la dosis más baja (70 µg/Kg) produjo un mayor efecto mnemónico que la dosis mayor de pentolame (P2, 140 µg/Kg). Esto se observa claramente en el mayor porcentaje de ratas que encuentra la meta a lo largo de todo el experimento con la dosis de 70 µg/Kg (71%) en relación a la dosis de pentolame de 140µg/Kg (48%) y de ambos grupos en relación al grupo control. Adicionalmente en estos grupos de pentolame se observaron diferencias significativas en el tiempo y la distancia recorrida para encontrar la meta con el mismo perfil en relación al grupo control y al tratado con E₂.

La administración de la dosis de 70µg/kg pentolame a las ratas produjo una reducción tanto en el tiempo como en la distancia recorrida para alcanzar la meta de manera significativa (figuras 8, 9 y 11). Estos resultados indican un aumento de la habilidad de las ratas en el reconocimiento de la meta. La velocidad a la que las ratas realizaron el recorrido aumentó en el caso de la administración de la dosis de 70µg/kg, en contraste a lo que se observó con los grupos tratados con pentolame a la dosis de 140µg/kg, el que recibió la dosis de 40µg/kg de E₂ donde la velocidad disminuyó en relación al grupo control.

Estos últimos datos confirman que la dosis baja de pentolame P1, produce un mayor efecto mnemónico, ya que mejoran el aprendizaje y la memoria de las

ratas, utilizando menos tiempo en llegar a la meta, recorriendo una menor distancia a una velocidad mayor.

El efecto producido por pentolame es similar en magnitud al efecto que ha sido descrito por Nissen *et al.*, (2012) para el AE prolame en la cognición. Prolame administrado en dosis de 60µg/kg por un periodo de 30 días mejora el desempeño de ratas Wistar en la prueba del laberinto de Morris y su efecto es semejante al que produce E₂ (Nissen *et al.*, 2012). La diferencia molecular entre los AEs prolame y pentolame es la distancia entre el grupo amino sustituyente en el C17 y el grupo alcohol terminal del sustituyente –NH(CH₂)_nOH que para prolame es 3 y para pentolame 5. Estos AEs siendo homólogos, guardan diferencias en su actividad estrogénica; prolame posee mayor estrogénicidad que pentolame, se une a los receptores ERα y ERβ con mayor afinidad que pentolame y este último tiene una mayor selectividad para el receptor ERα (Jaimez *et al.*, 2000).

El efecto de mayor eficacia en la memoria de las ratas SHR podría estar relacionado con la mayor selectividad de pentolame sobre ERα ya que también ERα tiene mayor distribución en regiones cerebrales implicadas en la memoria como son: la región telencefálica, el hipotálamo, regiones CA-1 y CA-3 del hipocampo y también su acción sobre la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); y ERβ presenta una distribución diferente y solo en ciertas regiones como la hipófisis anterior, el área preóptica del hipotálamo y la amígdala cerebral (Heldring *et al.*, 2007). La mayor afinidad y selectividad de pentolame por ERα podría explicar su efecto de mayor eficacia en relación al que se observa con la administración de E₂ en la memoria.

Numerosos reportes en la literatura de las dos últimas décadas consideran a las hormonas sexuales y particularmente E₂ y progesterona como reguladores clave de la consolidación de la memoria en roedores hembra. Por otra parte, evidencias clínicas señalan que E₂ puede mejorar las funciones cognitivas en la mujer menopáusica. Sin embargo existen datos controvertidos, ya que algunos autores señalan que no producen ningún efecto sobre esta función y otros han encontrado que E₂ produce efectos nocivos sobre la cognición (Rocca *et al.*, 2014). Se ha

planteado que estas diferencias dependen de la edad de inicio del tratamiento con la THR, el tipo de menopausia (natural o inducida) y la etapa de la menopausia (temprana o tardía). Estudios basados en observaciones han probado estas hipótesis demostrando que los efectos neuroprotectores o dañinos del E₂ en la THR dependen en efecto, de la edad de la mujer al momento del inicio del tratamiento y la etapa de la menopausia (Rocca *et al*, 2011).

Se ha recomendado que las mujeres que se someten a una ovariectomía bilateral antes de la aparición de la menopausia o las mujeres que experimentan la menopausia natural temprana o prematura deban ser consideradas para someterse a la THR hasta la edad promedio de la menopausia (alrededor de los 50 años), esto ha sido corroborado en estudios experimentales de animales de laboratorio particularmente ratas y ratones en los cuales se han establecido diferencias significativas entre animales de diferentes edades (jóvenes o viejos) y animales Ovx en respuesta a la administración de estrógenos particularmente E₂ y progesterona. (Rocca *et al*, 2011).

Los mecanismos por los cuales E₂ presenta estas respuestas en la cognición aún no se comprenden con total claridad. Los efectos pleiotróficos de E₂ pueden ocurrir a través de acciones genómicas por interacción con los receptores nucleares de estrógeno ER α y ER β . Sin embargo, también participan interacciones de E₂ a nivel membranal que contribuyen a los efectos observados en el SNC (Walf *et al.*, 2011).

Nuestro resultados del nulo efecto con E₂ en ratas SHR señala que factores asociados a la hipertensión (como por ejemplo riesgo sanguíneo en el cerebro deficiente) en estas ratas podrían jugar un papel importante en su deterioro cognitivo y que en estos casos no es posible revertirlo con una THR con E₂.

También podría pensarse que posiblemente pentolame esté utilizando mecanismos diferentes a los que utiliza E₂ para ejercer su efecto neuroprotector sobre la memoria.

De igual manera nuestros resultados señalan que pentolame podría tener acciones neuroprotectoras en la memoria en la hipertensión que merecen ser estudiadas a mayor profundidad ya que este fármaco produce efectos benéficos sobre la memoria de las ratas SHR.

IX. CONCLUSIONES

- El tratamiento crónico con pentolame en ratas SHR produjo mejora en la memoria de éstos animales.
- Pentolame administrado de manera crónica en las dosis de 70 µg/Kg y 140 µg/Kg produce efectos benéficos sobre la memoria de las ratas SHR.
- Pentolame a una dosis de 70 µg/kg presentó un efecto mnemónico mayor en las ratas SHR que la dosis de 140 µg/Kg.
- En contraste, el E₂ administrado en dosis de 40 µg/Kg produjo deterioro cognitivo de las ratas SHR en relación al grupo control.
- Nuestros resultados señalan que E₂ y pentolame no comparten los mismos mecanismos de acción en el SNC en el modelo de ratas SHR.

X. BIBLIOGRAFIA

- Acconcia, F., & Marino, M. (2011). The effects of 17 β -estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane. *Front Physiol*; (2): 1–8.
- Acevedo-Rodriguez, A., Kauffman, A. S., Cherrington, B. D., Borges, C. S., Roepke, T. A., & Laconi, M. (2018). Emerging insights into Hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis regulation and interaction with stress signaling. *J Neuroendocrinol*, e12590.
- Alberca R. Enfermedad de Alzheimer. En: Molinuevo JL, Peña-Casanova J, editores. *Guía oficial para la práctica clínica en demencias: conceptos, criterios y recomendaciones (2009)*. Barcelona: Prous Science, SAU. Thomson Reuters. *Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología*.(8);61-85
- Amado, J., & Flórez, J. (1997). Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. *Farmacología Humana, 3ra Edición*, 867–890.
- Avila, ME. (2004). Datos y reflexiones acerca del uso del metilfenidato (ritalín) para el tratamiento del trastorno por déficit de atención e hiperactividad. *Rev. Fac. Med. UNAM.*; 47(1): 31-34.
- Basavilvazo, M., Torres, P., García, A., Hernandez, M., Negrín, M., Valencia, G., Vital, V. (2013). Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento de la Perimenopausia y postmenopausia. *Instituto Mexicano Del Seguro Social*, (2) 1–99.
- Bean, L. A., Janov, L., & Foster, T. C. (2014). Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist*, 20(5): 534–545.
- Belló, M., Puentes-Rosas, E Medina-Mora, M.E y Lozano, R. (2005). Prevalencia y diagnóstico de depresión en población adulta en México, (47): S4-S11.
- Böttner, M., Thelen, P., & Jarry, H. (2014). Estrogen receptor beta: Tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *J Steroid Biochem Mol Biol*, (139): 245–251.

- Brunton Laurence L., Lazo John S., Parker Keith L. "Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica". McGraw Hill. 9° edición. 1996, 459-465
- Castellucci, V. F. (2008). Chapter 16 Animal models and behaviour: Their importance for the study of memory. *Prog Brain Res*, (169): 269-275
- CEMIC, I. U. (2012). Guía práctica para el manejo de los trastornos de la memoria y las demencias, 1–30.
- Chakraborty, T.R y Gore, A.C (2004). Aging-related changes in ovarian hormones, their receptor and neuroendocrine function. *Exp Biol Med*, (229): 977-987.
- Chaudhri, R. A., Schwartz, N., Elbaradie, K., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2014). Role of ER α 36 in membrane-associated signaling by estrogen. *Steroids*, (81): 74–80.
- Davey, D. A., & Thomas, D. (2015). Alzheimer'S Disease, Dementia, Mild Cognitive Impairment and the Menopause: A 'Window of Opportunity'. *Women´s Health* (9): 279–290.
- De Cuesta P, J., Virués-Ortega, J., Vega, S., Seijo-Martínez, M., Saz, P., Rodríguez, F., del Barrio, J. L. (2009). Prevalence of dementia and major dementia subtypes in Spanish populations: A reanalysis of dementia prevalence surveys, 1990-2008. *BMC Neurology*, (9): 55.
- De Nicola, A. F., Pietranera, L., Brocca, M. E., De Nicola, A. F., Pietranera, L., Bellini, M. J., & Goya, R. (2010). Protective effect of estrogens on the brain of rats with essential and endocrine hypertension. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 4(2): 549–557.
- De Villiers, T. J., Pines, A., Panay, N., Gambacciani, M., Archer, D. F., Baber, R. J., Sturdee, D. W. (2013). Updated 2013 International Menopause Society recommendations on menopausal hormone therapy and preventive strategies for midlife health. *Climacteric*, 16(3): 316–337.
- Diamanti-kandarakis, E., Bourguignon, J., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Gore, A. C. (2009). EDCs, (30): 293–342.
- Díaz, A., Treviño, S., Vázquez-roque, R., Venegas, B., & Guevara, J. (2017). Research Article Synapse.). The aminoestrogen prolame increases rec -

- ognition memory and hippocampal neuronal spine density in aged mice. *Synapse* (New York, NY), (71), e21987.
- Do Rego, J.L., Seong, J.Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., Tonon M.C., Pelletier, G., Vaudry, H., 2009. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol*, (30): 259–301.
- Estrada-Camarena, E, Fernández-Guasti, A, López-Rubalcava, C (2003). Different estrogenic compounds produce an antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacol*, (28): 830-838.
- Flouriot, G. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER- α) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- α activation function 1. *The EMBO Journal*, 19(17): 4688–4700.
- Frick, K. M., & Kim, J. (2018). Hormones and Behavior Mechanisms underlying the rapid effects of estradiol and progesterone on hippocampal memory consolidation in female rodents. *Eur. J. Neurosci*, (19): 3026–3032..
- Gerd, F. (2016). Primary and secondary prevention interventions for cognitive decline and dementia - An overview. *JADP*, 06(05): 289-295
- Gjelsvik, B., Rosvold, E. O., Straand, J., Dalen, I., & Hunskaar, S. (2011). Symptom prevalence during menopause and factors associated with symptoms and menopausal age. Results from the Norwegian Hordaland Women's Cohort study. *Maturitas*, 70(4): 383–390.
- Gutiérrez, L, M. "Plan de Acción Alzheimer y Otras Demencias, México 2014", Instituto Nacional de Geriatria, 2014.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Treuter, E., Stro, A. (2007). Estrogen Receptors : How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev*, (87): 905–931.
- Henderson, V. W. (2014). Alzheimer's disease: review of hormone therapy trials and implications for treatment and prevention after menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol*, (0): 99–106.
- Hwang, D. S., Kim, N., Choi, J. G., Kim, H. G., Kim, H., & Oh, M. S. (2017). Dangguijakyak-san ameliorates memory deficits in ovariectomized mice by

- upregulating hippocampal estrogen synthesis. *BMC Complement Altern Med*, 17(1): 1–8.
- Jaffe, A. B., Toran-Allerand, C. D., Greengard, P., & Gandy, S. E. (1994). Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid β precursor protein. *J Biol Chem*, 269(18): 13065–13068.
- Jaimez, R., Cooney, A., Jackson, K., Lemus, A. E., Lemini, C., Cárdenas, M., Larrea, F. (2000). In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17 β -aminoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 73 (1–2): 59–66.
- Lan, Y. L., Zou, S., Zhang, C., Li, J., Xu, Y., & Li, S. (2016). Update on the effect of estradiol in postmenopause women with Alzheimer's disease: a systematic review. *Acta Neurologica Belgica*, 116(3): 249–257.
- Lara-Muñoz MC, Medina-Mora ME; Borges G, Zambrano J (2007). Social cost of mental disorders: disability and work day lost. Results of the Mexican survey psychiatric epidemiology. *Salud Mental* (30): 7-11.
- Lemini, C., Canchola, E. (2009). Effects of 17 β -aminoestrogens on the sexual behavior of female rats. *Physiol Behav*, 96(4–5): 662–666.
- Lemini, C., Cruz-López, B., & Martínez-Mota, L. (2013). Participation of estrogen receptors in the antidepressant-like effect of prolame on the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav*, 103(3): 659–665.
- Lemini, C., Estela Avila, M., Medina, M., Sánchez, C., Figueroa, A., García-Mondragón, M. J. Jiménez-Orozco, A. (2017). Proliferative Properties of 17 β -aminoestrogens in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 120(3): 235–242.
- Lemini, C., Franco, Y., Avila, M. E., & Jaimez, R. (2005). Contrasting effects of estradiol and 17 β -aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. *Eur J Pharmacol*, 510(3): 229–233.
- Lemini, C., García-albor, E., Cruz-lópez, B., Matamoros-trejo, G., & Martínez-mota, L. (2016). Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Differential effect of the 17 β -aminoestrogens prolame, butolame and

- pentolame in anxiety and depression models in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, (64): 102–108
- Lemini, C., Jaimez, R., Figueroa, A., Martinez-Mota, L., Aavila, M. E., & Medina, M. (2015). Ovariectomy differential influence on some hemostatic markers of mice and rats. *Exp Anim*, 64(1): 81–89.
- Lemini, C., Rubio-Póo, C., Silva, G., Garcia-Mondragon, J., Zavala, E., Mendoza-Patiño, N., Mandoki, J. J. (1993). Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17 β -aminoestrogens, butolame [17 β -(4-hydroxy-1-butylamino)-1, 3,5(10)-estratrien-3-ol] and pentolame [17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1, 3,5(10)-estratrien-3-ol]. *Steroids*, 58(10): 457–461.
- Li, R., Singh, M. (2014). Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*, 35(3): 385–403.
- Limón, D., Díaz, A., Hernandez, M., Fernandez-G, J. M., Torres-Martínez, A. C., Pérez-Severiano, F., Guevara, J. (2012). Neuroprotective effect of the aminoestrogen prolame against impairment of learning and memory skills in rats injected with amyloid- β -25-35 into the hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 685(1–3): 74–80
- Manuel Vargas-Hernández, V., Acosta-Altamirano, G., Adán Moreno-Eutimio, M., Manuel Vargas-Aguilar, V., Flores-Barrios, K., & María Tovar-Rodríguez, J. (2013). Terapia hormonal de reemplazo durante la menopausia. Del riesgo al beneficio. *Rev Hosp Jua Mex*, 80(4): 251–261.
- Marino, M., Ascenzi, P., & Acconcia, F. (2006). S-palmitoylation modulates estrogen receptor α localization and functions. *Steroids*, 71(4): 298–303.
- Marjoribanks, J., Farquhar, C., Roberts, H., & Lethaby, A. (2012). Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochr Dat System*, 7(2): 4143.
- Martínez-Mota L, Cruz Martínez JJ, Márquez-Baltazar MS, Fernández-Guasti A (2008). Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 88: 332-340.
- MINISTERIO DE SANIDAD, P. S. E. I. (2011). Guía de Práctica Clínica sobre la Atención Integral a las Personas con Enfermedad de Alzheimer y otras

- Demencias. *Guías De Práctica Clínica En El Sistema Nacional de Salud*, 90–100.
- Mitsiades, N., Correa, D., Gross, C. P., Hurria, A., & Slovin, S. F. (2008). Cognitive Effects of Hormonal Therapy in Older Adults. *Semi Oncol*, 35(6): 569–581.
- Navarrete, F., Pérez-Ortiz, J. M., Femenía, T., García-Gutiérrez, M. S., García-Payá, M. E., Leiva-Santana, C., & Manzanares, J. (2008). Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Revista de Neurología*, 47(3): 137–145.
- Navarro-Pardo, E., Holland, C. A., & Cano, A. (2018). Sex hormones and healthy psychological aging in women. *Front Aging Neurosci*, (9): 1–10.
- Nelson R.J. “An Introduction of Behavioral Endocrinology”. Sinaver Associates, 2° edición, 2000, 359-368
- Nissen, I., Estrada, F. S., Nava-Kopp, A. T., Irlles, C., de-la-Peña-Díaz, A., Fernández-G, J. M., Zhang, L. (2012). Progesterone ameliorates anxiety and spatial learning and memory impairment induced by ovariectomy in rats. *Physiol Behav*, 106(2): 278–284.
- Nowakowska, E., Chodera, a, Kus, K., Nowak, P., & Szkilnik, R. (2001). Reversal of stress-induced memory changes by moclobemide: the role of neurotransmitters. *P J Pharmacol*, 53(3): 227–233.
- Ojeda, E., Blümel, J. E., Vallejo, M. S., & Lavín, P. (2014). Climacteric symptoms in Quechua and Mestizo women from the Andean region of Cusco, Peru: Effects of altitude and ethnicity. *Maturitas*, 77(4): 356–360.
- OMS (2001). Informe sobre la Salud en el Mundo. Salud Mental: nuevos conocimientos, nuevas esperanzas. Ginebra, Suiza, 29-30.
- OMS. (2010). “Tratamiento farmacológico de los trastornos mentales en la atención primaria de salud, 1-17. Recuperado de http://www.who.int/mental_health/management/psychotropic/es/ , consultado ultima vez: 5/06/2018 a las 13:45h
- OMS. 2017. Demencia, Recuperado de <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/dementia>, consultado ultima vez: 5/06/2018 a las 13:35h

- Pascual Millán LF. Tipos básicos y clasificación etiopatogénica de las demencias. En: Alberca R, López-Pousa S, editores. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 43-50.
- Pietranera, L., Lima, A., Roig, P., & De Nicola, A. F. (2010). Involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in oestradiol neuroprotection of the hippocampus of hypertensive rats. *J Neuroendocrinol*, 22(10): 1082–1092.
- Pollard, K. J., Wartman, H. D., & Daniel, J. M. (2018). Previous estradiol treatment in ovariectomized mice provides lasting enhancement of memory and brain estrogen receptor activity. *Horm Behav*, 102(May): 76–84.
- Ramírez, G. S., & Gordillo, G. del C. Á. (2008). La terapia hormonal de reemplazo en la pre y pos menopausia: tendencias y controversias. *Poblacion y Salud En Mesoamerica*, 6(1): 1–21.
- Rasgon, N.L., Altshuler, L.L., Fairbanks, L.A., Dunkin, J.J., Davtvan, C., Elman, S., Rapkin, A.J., 2002. Estrogen replacement therapy in the treatment of major depressive disorder in perimenopausal women. *J. Clin. Psychiatry* 63: 45–48.
- Risbridger, G. P., Davis, I. D., Birrell, S. N., & Tilley, W. D. (2010). Breast and prostate cancer: More similar than different. *Nat Rev Cancer*, 10(3): 205–212.
- Rocca, W. A., Grossardt, B. R., & Shuster, L. T. (2011). Oophorectomy, menopause, estrogen treatment, and cognitive aging: Clinical evidence for a window of opportunity. *Brain Research*, 1379: 188–198.
- Rocca, W. A., Grossardt, B. R., & Shuster, L. T. (2014). Oophorectomy, estrogen, and dementia: A 2014 update. *Mol Cell Endocrinol*, 389(1–2): 7–12.
- Sagvolden, T., Johansen, E. B., Wøien, G., Walaas, S. I., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L. H., ... Faraone, S. V. (2009). The spontaneously hypertensive rat model of ADHD - The importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacol*, 57(7–8): 619–626.
- Santen, R. J., Allred, D. C., Ardoin, S. P., Archer, D. F., Boyd, N., Braunstein, G. D., Utian, W. H. (2010). Postmenopausal Hormone Therapy: An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metabolism*, 95: S1–S66

- Slentz-Kesler, K., Moore, J. T., Lombard, M., Zhang, J., Hollingsworth, R., & Weiner, M. P. (2000). Identification of the human Mnk2 gene (MKNK2) through protein interaction with estrogen receptor β . *Genomics*, 69(1): 63–71.
- Soares, C. N., Almeida, O. P., Joffe, H., Cohen, L. S. S., de Novaes Soares, C., Almedia, O., Cohen, L. S. S. (2001). Efficacy of estradiol for the treatment of depressive disorders in perimenopausal women: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Archives of General Psychiatry*, 58(6): 529–534.
- Solís, H., & López, H. (2009). Neuroanatomía funcional de la memoria. *Neurocién (Mex)*, 14(3): 176–187
- Swedenborg, E., Power, K. A., Cai, W., Pongratz, I., & Rüegg, J. (2009). Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cell Mol Life Sciences*, 66(24): 3873–3894.
- Takahashi, T. A., & Johnson, K. M. (2015). Menopause. *Med Clin North Am*, 99(3): 521–534.
- Terauchi, M., Hiramitsu, S., Akiyoshi, M., Owa, Y., Kato, K., Obayashi, S., Kubota, T. (2013). Associations among depression, anxiety and somatic symptoms in peri-and postmenopausal women. *Journal of Obstet Gynaecol Re*, 39(5): 1007–1013.
- Thornton, M. J. (2002). The biological actions of estrogens on skin. The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol*, 11(9): 487–502.
- Van Meer, P. J. K., Graham, M. L., & Schuurman, H. J. (2015). The safety, efficacy and regulatory triangle in drug development: Impact for animal models and the use of animals. *E J Pharmacol*, (759): 3–13.
- Vargas-Hernández, M. V., Acosta-Altamirano, G., Adán Moreno-Eutimio, M., Manuel Vargas-Aguilar, V., Flores-Barrios, K., & María Tovar-Rodríguez, J. (2013). Terapia hormonal de reemplazo durante la menopausia. Del riesgo al beneficio. *Rev Hosp Jua Mex*, 80(4): 251–261
- Vázquez, J. E. Motta, J. M. (2010). Estudio del climaterio y la menopausia. *Comego*, 235–256.

- Walf, A. A., Paris, J. J., Rhodes, M. E., Simpkins, J. W., & Frye, C. A. (2011). Divergent mechanisms for trophic actions of estrogens in the brain and peripheral tissues. *Brain Research*, 1379: 119–136.
- Zhang, X. T., Kang, L. G., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z., & Wang, Z. Y. (2011). A positive feedback loop of ER- α 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene*, 30(7): 770–780.
- Zhao, Y. W., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B. W., Chang, Y., & Deuel, T. F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochem Biophys Res Comm*, 336(4): 1023–1027.