



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA**

Proyecto de Tesis:

Efecto del Prolame sobre la memoria de reconocimiento y la morfología neuronal del hipocampo de ratones envejecidos.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN FARMACIA

PRESENTA:

Ana Lilia Altamirano Resendiz

DIRECTOR:

Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca

Puebla, Pue. Enero de 2022

ÍNDICE

1.0	Introducción	4
1.1	El envejecimiento	4
1.2	Envejecimiento cerebral	5
1.3	Hipocampo	7
1.4	El Hipocampo y su relación con el aprendizaje y memoria	8
1.5	Estrés oxidativo en el cerebro envejecido	9
1.6	Terapia de estrógenos contra el envejecimiento	12
1.7	Uso del prolame como terapia hormonal sustitutiva	13
2	Justificación	14
3	Hipótesis	15
4	Objetivos	15
5	Metodología	16
5.1	Administración de la droga en animales	16
5.2	Actividad locomotora espontánea en un ambiente nuevo	17
5.3	Tarea de reconocimiento de objetos nuevos (NORT)	17
5.4	Evaluación morfológica por el método de tinción de Golgi-Cox	18
5.5	Observación microscópica y análisis de Sholl	18
5.6	Análisis estadístico	19
6	Resultados	20
6.1	Actividad motora en un entorno novedoso	20
6.2	Tarea de reconocimientos de objetos nuevos	20
6.3	Análisis de la morfología dendrítica por tinción de Golgi- COX	21
6.4	Morfología dendrítica en CA1	22
6.5	Morfología dendrítica en CA3	23
6.6	Morfología dendrítica sobre DG	24
6.7	Morfología dendrítica del núcleo accumbens	25
7	Discusión	25
8	Conclusión	29
9	Referencias	29

RESUMEN

El envejecimiento cerebral muestra cambios bioquímicos y morfológicos en las dendritas de las neuronas piramidales del sistema límbico asociados a la pérdida de la memoria. Prolame (N- (3-hidroxi-1,3,5 (10) -estratrien-17 β -il) -3-hidroxi-propil amina), es un amino estrógeno no feminizante con actividad antitrombótica, que previene el deterioro neuronal, el estrés oxidativo y la neuroinflamación. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de prolame en procesos motores y cognitivos, así como su influencia en la morfología dendrítica de las neuronas de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dorsal (DH), las células granulares del giro dentado (DG), y neuronas espinosas medias del núcleo accumbens (NAcc), de ratones de edad avanzada. La morfología dendrítica se evaluó con el procedimiento de tinción de Golgi-Cox seguido por el análisis de Sholl. El Prolame (400 μ M a 50 nM) se inyectó diariamente por vía subcutánea durante 60 días en ratones de 18 meses de edad. Inmediatamente después del tratamiento, se evaluaron la actividad locomotora en un nuevo entorno y la memoria de reconocimiento utilizando la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NORT). Los ratones tratados con el prolame mostraron un aumento significativo en el cociente de exploración a largo plazo, pero la actividad locomotora no se modificó en comparación con los animales de control. Los ratones tratados con el prolame mostraron un aumento significativo en la densidad de las espinas dendríticas y la longitud dendrítica en las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 de la DH, así como la DG, mientras que las dendritas de las neuronas en la NAcc permanecieron sin modificar. En conclusión, la administración de el prolame promueve procesos de plasticidad del hipocampo, mejorando la memoria de reconocimiento a largo plazo. El prolame podría convertirse en una alternativa farmacológica para prevenir o retrasar el proceso de envejecimiento cerebral, y por lo tanto la aparición de enfermedades neurodegenerativas que afectan la memoria.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 El envejecimiento

El ciclo de vida es característico de cada especie, incluye el paso por distintas fases de crecimiento, desarrollo, maduración y senescencia o envejecimiento. La madurez o edad adulta se considera una etapa principal en la vida, en ella se presenta una estabilidad y funcionalidad óptima en todos los sistemas del organismo. La vejez se ha definido como la última etapa de la vida, ésta se ha determinado como fase que sigue a la madurez hasta llegar a la muerte (Portera y Schüller, 1993). El término envejecer hace referencia a un proceso, en el cual, se presenta un deterioro continuo e irreversible en todo el organismo, que determina una pérdida progresiva de la capacidad de adaptación, así como la disminución de la vitalidad asociado a un incremento en la probabilidad de morir. La pérdida de la vitalidad que se presenta durante el envejecimiento se refleja en un descenso de la capacidad funcional, de modo que un organismo es menos eficaz para realizar sus actividades habituales (Tobaruela, 2006; Bernis, 2004). Durante el envejecimiento la mayor parte de los órganos sufre un deterioro en su capacidad funcional, que se manifiesta de manera distinta en los aparatos y sistemas de cada individuo, de acuerdo a este deterioro, hay enfermedades que son mucho más frecuentes en el adulto mayor. Se ha descrito una mayor incidencia de padecimientos crónicos en los ancianos, como hipertensión arterial, artrosis, osteoporosis, cardiopatías, diabetes, alteraciones cognitivas, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson; además, incrementa la incidencia de padecimientos infecciosos y enfermedades autoinmunes (Alfaro y Ruiz, 2010).

El envejecimiento es un proceso que depende de una gran variedad de factores, propios y externos del individuo, incluidas la programación genética, estilo de vida y entorno de la persona (Bernis, 2004). Se han propuesto muchas teorías que intentan explicar los fenómenos ocurridos en el envejecimiento, sin embargo, los mecanismos precisos que ocurren en esta etapa no son muy claros. Una gran parte de las teorías sobre el envejecimiento se fundamentan principalmente en la importancia de los factores genéticos (Jazwinski, 2000), en alteraciones en las subestructuras celulares como la mitocondria o inclusive por

la interacción de las células con factores externos que someten al organismo a un constante estrés deteriorando lentamente su función.

Diversas teorías consideran que el envejecimiento es la consecuencia de un programa genético que inicia junto con el desarrollo en la etapa prenatal, continua en el adulto y termina en la vejez (Peinado y cols., 2000). Se han descubierto una serie de genes denominados gerontogenes que tienen una estrecha relación con la esperanza de vida de una especie (Johnson, 1997; Gregorio, 2000); además, se ha propuesto la existencia de un reloj biológico, que regula el número de divisiones que puede tener la célula antes de su muerte (Hayflick, 1980). El número de divisiones mitóticas en cada célula depende de la longitud de los telómeros, algunos genes como el de la telomerasa son activos durante la mayor parte del ciclo celular, pero se reprimen al llegar a la vejez (Harley, 1991).

Además de los mecanismos propios de la célula involucrados en su muerte o supervivencia se ha determinado que el envejecimiento puede ser la consecuencia del estrés generado por múltiples agentes ambientales (Rattan y Clark, 2005) , existen también evidencias de que los propios productos tóxicos generados en el metabolismo celular pueden lesionar algunas estructuras y afectar la función y supervivencia de la célula ya que se ha observado que en el envejecimiento hay un incremento en la producción de metabolitos tóxicos, sumado al hecho de que los procesos de detoxificación del organismo disminuyen (Gavrilov y Gavrilova, 2001).

1.2. Envejecimiento cerebral

Si bien todo el organismo se ve afectado por el proceso de envejecimiento, es sabido que el cerebro es uno de los principales órganos afectados al envejecer. Muchos de los problemas o enfermedades relacionadas con la edad son debidas a alteraciones propias del sistema nervioso central (SNC). En los años 50 se aceptó que, aún en ausencia de enfermedades neurodegenerativas, el número de neuronas se veía disminuido en el envejecimiento. A partir de estudios

realizados en los años 80 se demostró que el número de neuronas permanece estable, sin embargo, la disminución en el tamaño del cerebro en la vejez se atribuye a un cambio en la estructura normal de la neurona (Tobaruela, 2006).

Uno de los cambios más apreciables en los individuos viejos, es una disminución en el tamaño cerebral. Se calcula que el cerebro pierde de 2 a 3 g de peso al año, por lo que se estima que a los 80 años de edad se ha perdido un 10% del peso máximo alcanzado en la edad adulta. El volumen cerebral disminuye en un 2% cada década a partir de los 50 años (Tobaruela, 2006), esta pérdida de tamaño en el envejecimiento está directamente relacionado con una disminución de las funciones cerebrales. Además de las modificaciones en el peso y volumen cerebral, en el envejecimiento se ha observado también una atrofia en las circunvoluciones, agrandamiento de los ventrículos y ensanchamiento de los surcos cerebrales (Anderton, 1997). Las meninges tienen mayor fibrosis y hay acumulaciones de calcio y zonas de osificación.

Existen reportes que han asociado la pérdida de volumen que se observa en el cerebro con una disminución neuronal; sin embargo, en la actualidad se sabe que el envejecimiento no implica necesariamente una pérdida de neuronas, más bien se producen en las neuronas ciertos cambios estructurales como la retracción de su soma, disminución de la longitud dendrítica y disminución de la densidad de espinas (Peinado y cols., 2000) lo que conlleva a una disminución en el volumen cerebral. Además, no solamente las neuronas sufren alteraciones estructurales debido al proceso de envejecimiento sino también otras células del tejido nervioso como los astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células sostén (Peinado y cols., 1998); se ha mostrado también, un incremento en la hipertrofia de astrocitos asociado al envejecimiento (Unger, 1998; Sandell, 2002).

Se ha observado una disminución importante en la arborización y densidad de espinas relacionada con la edad, en regiones como la corteza prefrontal (Duan y cols., 2003; Dickstein y cols. 2007, Nakamura y cols., 1985); además, resultados obtenidos del análisis de la densidad de espinas muestra una significativa pérdida en la densidad de espinas, que disminuye aproximadamente entre un 28 a 37% en neuronas de animales viejos en comparación con animales jóvenes (Page y cols., 2002).

En el envejecimiento no solo se presentan cambios degenerativos en las neuronas, alteraciones en la función sináptica y la neurotransmisión, también en el intersticio de los cerebros de los ancianos, se encuentran lesiones, acumulación de pigmentos lipídicos, degeneración neurofibrilar, placas neuríticas y amiloideas (Anderton, 1997). El cerebro envejecido toma una coloración amarillenta, debido a la presencia de pigmentos relacionados con la edad. La lipofuscina es un pigmento derivado de la lipoperoxidación (Kato y cols., 1998) que se acumula con el paso del tiempo. Es posible también encontrar en los cerebros viejos, acumulación de proteínas dañadas, principalmente por el incremento de especies reactivas de oxígeno (Floyd, 2002).

1.3 Hipocampo

El hipocampo forma parte de la región hipocámpal, la cual está constituida por una serie de cortezas adyacentes que incluyen el giro dentado, el hipocampo, complejo subicular y corteza entorrinal. Para su estudio, el hipocampo se divide en una parte dorsal o septal y una parte ventral o temporal. La estructura del hipocampo ha sido estudiada extensamente en roedores desde 1911 por Ramón y Cajal, y por su discípulo Lorente de Nó, este último observó una serie de diferencias sutiles en la organización dendrítica de las células piramidales, lo que ayudó a describir claramente la estructura del hipocampo (Witter y Amaral, 2004). El hipocampo está constituido principalmente por células piramidales. Las células piramidales forman parte de un árbol dendrítico basal, el cual se extiende dentro del stratum oriens y un árbol dendrítico apical, que se extiende hasta la fisura hipocámpal. De acuerdo a su organización dendrítica el hipocampo se divide en tres regiones: CA1, CA2 y CA3 (Figura A), en la zona más distal se

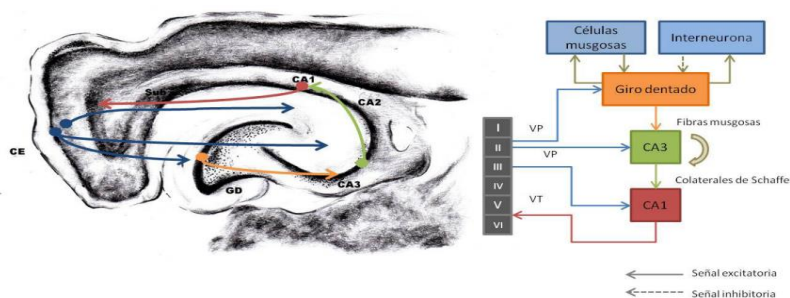


Figura A. Esquema de los circuitos en el hipocampo adulto. La tradicional vía excitatoria trisináptica (Corteza entorrinal (CE)-giro dentado (GD)-CA3-CA1-CE).

encuentra la región CA1, mientras que en la zona proximal está conformado por la región CA2 y CA3.

Con respecto a la neurotransmisión hipocampal, está ampliamente documentado que el principal neurotransmisor es el glutamato. Las células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 son principalmente glutamatérgicas, además de las células granulares del giro dentado. Sin embargo, existen otros neurotransmisores que también ejercen su influencia en el funcionamiento hipocampal, como en el caso de la acetilcolina proveniente del septum a través de la fimbria fórnix, el ácido gamma amino butírico liberado por los axones provenientes del septum y por las interneuronas gabaérgicas residentes en el hipocampo, la noradrenalina proveniente del locus coeruleus, la dopamina proveniente de las proyecciones neuronales del área ventral tegmental y la serotonina desde los núcleos de Rafé (Rueda- Orozco y cols., 2006).

1.4 El Hipocampo y su relación con el aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria son dos procesos cognitivos trascendentales para la adaptación y la supervivencia de los organismos. Ambas conductas son procesadas en el sistema nervioso central y su regulación requiere de la participación de diversas estructuras cerebrales. De manera interesante, el hipocampo es una de las dos regiones del cerebro adulto dónde se producen nuevas neuronas (Olivares, 2015). La generación de nuevas neuronas en el cerebro de los mamíferos, incluyendo el cerebro humano, es un fenómeno descrito desde hace ya varios años. Dicho fenómeno se conoce como neurogénesis y ocurre únicamente en dos regiones del cerebro adulto; la pared de los ventrículos laterales y el giro dentado del hipocampo. La presencia de neurogénesis se ha asociado a múltiples factores entre los que destaca el aprendizaje y su respectiva consolidación denominada memoria. Un número considerable de trabajos realizados en roedores han mostrado que cuando se aprende una tarea, el número de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo se incrementa de forma abundante, lo cual sugiere que el aprendizaje es un factor que estimula la proliferación de nuevas neuronas, muchas de las

cuales no sobreviven y pocas se integran al circuito cerebral para ser funcionales (Roedinger & McDermont, 2013). Adaptativamente, el aprendizaje y la memoria son procesos cognitivos vitales para los organismos que forman parte del reino animal. El ambiente es un entorno cambiante, por lo que animales que viven en ambientes que cambian continuamente necesitan de una plasticidad conductual. La plasticidad es una propiedad de los sistemas biológicos que les permite adaptarse a los cambios del medio para sobrevivir, la cual depende de los cambios fisiológicos que ocurran al interior. Desde hace tiempo se sabe que el aprendizaje y la memoria son eventos que favorecen la plasticidad, y entre más plástico es el sistema nervioso mayor es la capacidad de aprendizaje de los organismos. El aprendizaje puede considerarse como una modificación estructural y funcional del sistema nervioso que da como resultado un cambio en la conducta relativamente permanente. La información aprendida es retenida o almacenada en los circuitos neuronales que forman el cerebro y constituye lo que denominamos memoria. La memoria es la consecuencia usual del aprendizaje difícilmente nos referimos a alguno de estos términos de manera independiente (Roediger & McDermont, 2013).

1.5 Estrés oxidativo en el cerebro envejecido

Se ha establecido claramente durante el envejecimiento normal, el cerebro sufre modificaciones funcionales y morfológicas que afectan su árbol dendrítico y sinapsis, neurotransmisión, circulación y metabolismo, hay una afección de los sistemas tanto motores como sensoriales, ciclos de sueño, memoria, aprendizaje, así como un incremento en la acumulación de moléculas relacionadas con la edad. Sin embargo, las causas precisas que llevan a estos cambios no han sido descritas con claridad.

A pesar de la existencia de múltiples teorías que intentan explicar los fenómenos ocurridos en el proceso de envejecimiento, una de las más aceptadas es la teoría del estrés oxidativo, la cual postula que las mutaciones y los daños acumulados en diversas estructuras y moléculas celulares, como membranas, proteínas y ADN, se relacionan con el aumento de la exposición a radicales libres (Rodríguez y Céspedes, 1999).

Los radicales libres son moléculas que presentan un electrón desapareado, lo cual les confiere alta reactividad. Los radicales más tóxicos producidos por la célula son el ion superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Estas especies reactivas pueden interaccionar con células y tejidos, oxidando directamente a moléculas como lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos. Además, pueden inducir la activación de enzimas proteolíticas como las caspasas y endonucleasas (Halliwell, 2006).

Normalmente la generación de especies reactivas se lleva a cabo en la mitocondria como consecuencia del metabolismo oxidativo de las células; tanto la célula como la mitocondria son capaces de neutralizar estas sustancias, pero, cuando la célula envejece, la mitocondria produce una mayor cantidad de radicales libres y el equilibrio existente entre las especies reactivas y los mecanismos de protección celular; como enzimas antioxidantes, se pierde, los daños son más marcados y la reparación celular se hace difícil. A este fenómeno en el cual, el equilibrio existente entre las especies oxidantes y los sistemas antioxidantes se pierde, se le conoce como estrés oxidativo (Halliwell, 2007).

Se ha determinado que en las personas adultas el nivel de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) se encuentra disminuido (Rodriguez y Cespedes 1997). En modelos experimentales de jerbos viejos se ha demostrado la disminución de las enzimas antioxidantes, además de la disminución de estos sistemas de reparación se observó un incremento en el número de moléculas dañadas por oxidación, sin embargo, al administrarles antioxidantes exógenos disminuyó el daño oxidativo (Carney y Floyd, 1994) acompañado de una recuperación en su destreza.

El proceso de oxidación ocurre normalmente en todas las células del organismo, sin embargo, existen órganos que son más susceptibles a los daños generados por estos mecanismos de oxidación. El cerebro es uno de los órganos más afectados con este proceso, sus características intrínsecas le confieren una mayor vulnerabilidad (Floyd y Hensley, 2002). Se ha reportado que el estrés oxidativo se encuentra incrementado en el cerebro durante el envejecimiento (Floyd y Hensley, 2002), este órgano tiene características que le confieren una mayor susceptibilidad. El cerebro posee una gran cantidad de ácidos grasos

fácilmente oxidables, requiere altas cantidades de oxígeno por unidad de peso, además es pobre en defensas antioxidantes. El nivel y velocidad de oxidación que presenta el cerebro es mayor comparado con otros órganos, estudios en los que se evaluó la tasa de lipoperoxidación demostraron que en el cerebro el proceso de oxidación de lípidos es más rápido que en otros tejidos como el hígado, riñón, o músculo (Zaleska y Floyd, 1985). El cerebro, además, es un órgano con un alto consumo de oxígeno, estudios realizados en mitocondria aislada han mostrado que aproximadamente del 2 al 5% del oxígeno consumido se transforma en especies reactivas de oxígeno (ERO), principalmente H₂O₂ (Papa y Skulachev, 1997).

Las especies reactivas formadas a partir del metabolismo celular están involucradas en el daño de biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Muchos productos formados a partir de las reacciones de oxidación, tienen actividad oxidante (Floyd y Hensley, 2002), pudiendo reaccionar, nuevamente, con otras moléculas biológicas, incrementando el daño generado en la célula. En el cerebro envejecido se han encontrado evidencias de incremento de oxidación de proteínas (Papa y Skulachev, 1997) principalmente en el lóbulo frontal y occipital de la corteza, así como incremento en algunos productos de lipoperoxidación como el malonildialdehído, el 4-hidroxihexenal e isoprostanos (Roberts II y cols., 1998; Roberts II y Morrow, 2000).

Además del daño generado por las reacciones de oxidación, el incremento de las ERO se ve implicado en el mecanismo que generan procesos inflamatorios (Floyd y Hensley, 2002) de bajo grado, probablemente inducida por estrés oxidativo y mediada por el factor de transcripción NF-kappa B. Los procesos neuroinflamatorios han sido asociados a un incremento en la transducción de señales que lleva a la inducción de genes como el de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), este gen es inducido tanto en la microglía como en astrocitos por citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 y peróxido de hidrogeno (Rozovsky y cols., 1998). Una vez que se induce iNOS se incrementa la producción de óxido nítrico (NO), el NO y sus productos de oxidación; como el peroxinitrito, son mucho más tóxicos para la neurona (Floyd, 1999).

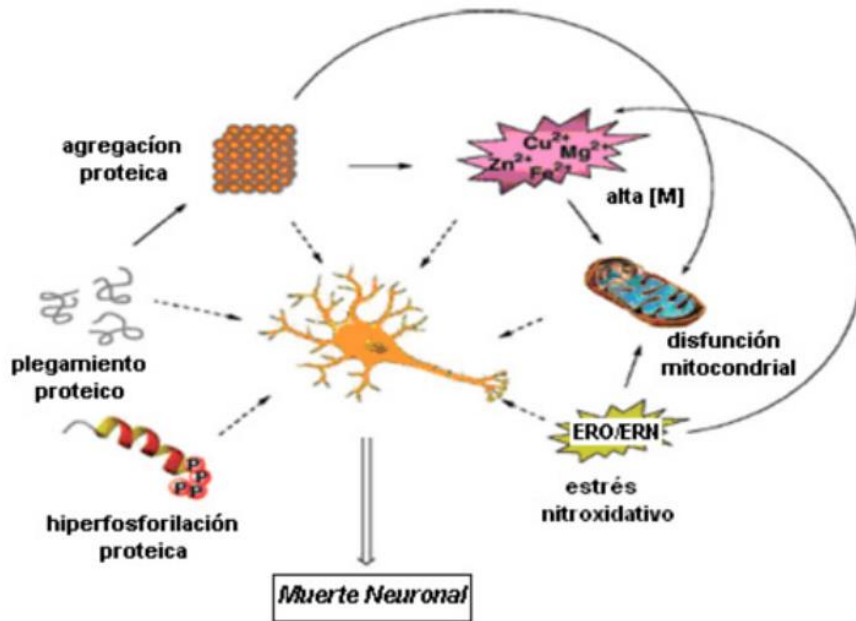


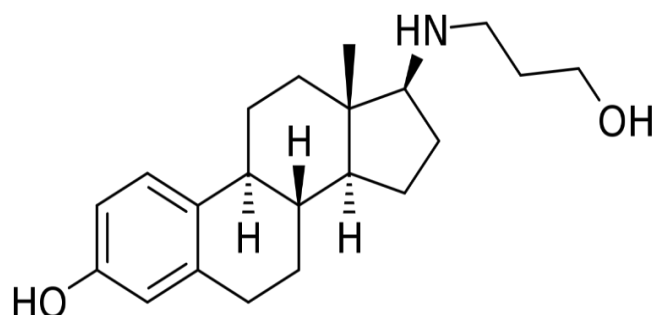
Figura B. Eventos multifactoriales que conducen a la muerte neuronal

1.6 Terapia de estrógenos contra el envejecimiento

Los estrógenos tienen un impacto en la cognición, el comportamiento y la actividad cerebral modulando la expresión de enzimas, receptores y proteínas estructurales implicadas en la plasticidad sináptica (Murphy y Segal, 1996; McEwen, 2002; Kramár et al., 2013). Se han propuesto estrógenos exógenos como una herramienta terapéutica alternativa en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Chakrabarti et al., 2014), ya que promueven la expresión de neurotrofinas que desencadenan el crecimiento y la supervivencia de las neuronas (Babayán y Kramár, 2013). Los estrógenos activan vías de señalización reguladas por el factor de transcripción CREB, que desempeñan un papel importante en la plasticidad neuronal (Boulware et al., 2005; Boulware y Mermelstein, 2009). Todos estos estrógenos considerados inducen efectos positivos en el aprendizaje, la memoria y el comportamiento motor, a través del receptor de estrógenos β y el receptor de estrógenos G-acoplado a la proteína 1 (GPER1), ambos implicados en la mejora cognitiva (Boulware et al., 2005; Ervin et al., 2013, Hawley et al., 2014). Además, hay evidencia que confirma que los

estrógenos también aumentan la densidad de las espinas dendríticas y la potenciación a largo plazo (LTP) en las neuronas del hipocampo, promoviendo una mayor sinapsis en la región CA3-CA1 y el giro dentado del hipocampo (Kramár et al, 2009; Smith y McMahon, 2005, Murakami et al, 2015).

1.7 Uso del Prolame como terapia hormonal sustitutiva



El prolame (N- (3-hidroxi-1,3,5 (10) -estratrien-17 β -il) -3-hidroxiopropilamina) es un aminoestrógeno no feminizante con actividad antitrombótica, ansiolítica y antidepresiva (Gonzalez et al., 2010; Lemini et al., 2005). También previene el deterioro de la memoria espacial al reducir la muerte neuronal, la inflamación y el estrés oxidativo en el hipocampo, bajo diferentes condiciones de neurodegeneración (Limon et al., 2012; Hernández-Reséndiz et al., 2015; Lemini et al., 2015).

El Prolame es un compuesto esteroideo con efectos estrogénicos, anticoagulantes y antiplaquetarios. El prolame inhibe el suero niveles de hormona luteinizante y restaura la reducción inducida por la castración en el peso uterino de ratas ovariectomizadas. Se activa principalmente el receptor estrogénico alfa, aunque la activación mínima se produce el receptor estrogénico beta.

El prolame no muestra propiedades antagónicas con ninguno de los subtipos de receptores de estrógeno. Se han hecho muchos intentos para dilucidar el mecanismo anticoagulante de prolame, pero hasta ahora los resultados no son concluyentes.

El prolame es un antioxidante, ya que poseen un anillo fenol, el cual puede actuar como un barredor de radicales libres y, a la vez, le permite donar un átomo H⁺. Esta propiedad le posibilita al prolame a intervenir en diferentes etapas de la oxidación lipídica. Estudios in vitro han evidenciado la capacidad antioxidativa del prolame, al disminuir la oxidación de H₂O₂ y el CuSO₄, e inclusive se ha mostrado una disminución de lesiones inducidas por radicales libres en cadenas de ADN. (Escalante, 2009)

2. JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento acelerado de la población es un problema mundial de salud actual (Allevato y Gaviria, 2008). Esta última etapa de la vida se caracteriza por una disminución generalizada en las capacidades funcionales y cognitivas del individuo, con un importante deterioro en el sistema nervioso central (Tobaruela, 2006). Si bien aún no se ha establecido con claridad las causas de este deterioro, una de las principales propuestas es el incremento de los procesos de oxidación presentes en el cerebro, aunado a un declive en la capacidad antioxidante del sistema (Gavrilov y Gavrilova, 2001).

Muchos de los cambios observados en esta etapa, atribuidos principalmente al incremento de los procesos de oxidación en el cerebro, son apreciados en la neurona individual, siendo evidente que durante el envejecimiento hay una disminución tanto en el tamaño del soma neuronal, como la longitud dendrítica, además de una pérdida de la arborización y densidad de espinas dendríticas, que repercute directamente en la funcionalidad del sistema (Page y cols., 2002). Algunos estudios han mostrado que, aunque el proceso de deterioro debido al envejecimiento afecta a todo el cerebro, este deterioro no se presenta de la misma manera en todas las regiones cerebrales, se sabe que algunos de los núcleos más afectados son la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado, particularmente el estriado dorsal (Mattson y Magnus, 2006).

Muchos estudios realizados tanto in-vivo como in-vitro, han demostrado que el prolame tiene actividad antioxidante y como agente neuroprotector (Baur y Sinclair 2006). Sin embargo, aunque ya se han evidenciado los efectos benéficos de este compuesto, actualmente no se sabe cuáles son los efectos que este

amino estrógeno puede tener en la morfología de las neuronas en un cerebro envejecido. Es de gran importancia, poder evaluar cuál es el efecto que tiene la administración de prolame en el proceso de deterioro neuronal; ya que, la pérdida de las funciones cerebrales se atribuye principalmente a las alteraciones morfológicas que sufre la neurona durante el envejecimiento.

Hasta el momento no existe evidencia que demuestre que la capacidad antioxidante del prolame, podrá disminuir los cambios en la morfología neuronal, debidos a un incremento en los procesos de oxidación en el cerebro; principalmente en áreas en las cuales el deterioro es más notable, como es el caso del hipocampo y núcleo accumbens. La evaluación del efecto de este amino estrógeno sobre los procesos de daño por oxidación, reflejados en las características morfológicas de la neurona, sería de gran ayuda para formular nuevas estrategias terapéuticas, que permitan a las personas, mantener la función cerebral, permitiendo con ello la calidad de vida en las personas de edad avanzada.

3. HIPÓTESIS

La administración crónica del Prolame en ratones seniles aumenta la memoria de reconocimiento, previene las alteraciones morfológicas neuronales que se presentan en el hipocampo y el núcleo accumbens.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del prolame sobre la memoria de reconocimiento en relación con la morfología neuronal en las regiones hipocámpal y NAcc en ratones de edad avanzada.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la administración crónica del prolame sobre la actividad motora de ratones seniles.
- Evaluar el efecto de la administración crónica de prolame sobre la arborización y longitud dendrítica de neuronas piramidales de Hipocampo y neuronas espinosas medianas de Núcleo Accumbens de ratones seniles.
- Evaluar el efecto de la administración crónica de prolame sobre la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de neuronas piramidales de Hipocampo y neuronas espinosas medianas de Núcleo Accumbens de ratones seniles.

5. METODOLOGÍA

5.1 Administración del prolame en los animales

Veinte ratones machos CD1 (80-90 gr) de 18 meses de edad fueron obtenidos del Vivarium de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se alojaron en un ambiente controlado por temperatura y humedad en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con acceso libre a alimentos y agua.

Los animales se dividieron en dos grupos ($n = 10$ / grupo): vehículo (control) y grupo prolame. Todos los procedimientos descritos en el presente estudio fueron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Consejo Mexicano para el Cuidado de Animales NOM-062-ZOO-1999 Y las Directrices para el Uso de Animales en la Investigación en Neurociencia de la Sociedad de Neurociencias. Se hicieron esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y para asegurar que el dolor y malestar en los animales fue mínimo. Se administró Prolame ($400\mu\text{M}$ a 50nM x 60 días) o volúmenes equivalentes de vehículo (aceite de sésamo, $400\ \mu\text{l}$ x 60 días) subcutáneamente (SC) por la mañana (entre 8:00 am y 10:00 am). La dosis de los tratamientos que utilizamos fue escogida o calculada sobre la base de reportes anteriores (Limon et al., 2012; Gonzalez et al., 2010; Lemini et al., 2005).

5.2 Actividad locomotora espontánea en un ambiente novedoso

Al final de la administración de prolame, la actividad locomotora espontánea se evaluó en un nuevo entorno para los ratones prolame y de control. Los ensayos se realizaron como se ha descrito anteriormente (Flores et al., 1996, Lazcano et al., 2015). La actividad locomotora fue monitoreada en 10 jaulas individuales (20 x 40 x 30 cm), cada una de las cuales estaba equipada con un detector de ocho haces de luz conectado a un contador de computadoras (Technology Digital, México). Los ratones no aclimatizados se colocaron en las cajas de actividad, y se registraron los cruces de haz de luz durante 60 min. Todos los animales fueron examinados entre las 8:00 y las 10:00 am

5.3 Tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NORT)

La memoria fue evaluada por NORT, que se basa en la tendencia de los animales a dedicar más tiempo a explorar un objeto novedoso que un objeto familiar (Antunes y Biala, 2012). Los animales se colocaron en un aparato de campo abierto con dimensiones rectangulares (60 cm de ancho x 60 cm de longitud x 50 cm de altura). En la primera etapa de la prueba, se permitió a los animales explorar individualmente la arena durante 5 min. Veinticuatro horas después (segunda etapa), los animales se colocaron en el aparato de campo abierto con dos objetos equivalentes (Familiares) durante 5 min para medir el tiempo que tomaban para examinar cada objeto. Para evaluar la memoria de reconocimiento a corto plazo (STRM), dos horas después de la exposición de los dos objetos similares, uno de los objetos familiares fue intercambiado con un nuevo objeto en la misma ubicación de la arena. El animal se colocó nuevamente en la caja y se le dejó explorar durante 5 min. Se registraron los tiempos de exploración para los objetos familiares y novedosos durante la prueba STRM. Veinticuatro horas después, se evaluó la memoria de reconocimiento a largo plazo (LTRM) con una metodología ya descrita (Espinosa et al., 2013). Se obtuvo el cociente de exploración (EQ) = $(TN - TF) / (TN + TF)$ (Antunes y Biala, 2012), donde TF y TN representan el tiempo explorando los objetos familiares y novedosos, respectivamente. Para excluir la interferencia de olores, el aparato

de campo abierto y los objetos se limpiaron con etanol al 70% después de cada sesión.

5.4 Evaluación morfológica por la tinción de Golgi-Cox

Después de la prueba NORT, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (75 mg / kg de peso corporal, ip) intracardialmente con una solución salina al 0,9%. Se retiraron los cerebros y se cortaron en secciones coronales de 200 μm de espesor del hipocampo dorsal CA1 y CA3 (DH), giro dentado (GD) así como las regiones NAcc usando un vibratomo (Campden Instrument, MA752, Leicester, UK). Estas secciones se recogieron en placas limpias recubiertas de gelatina y se tiñeron, utilizando el método de Golgi-Cox modificado como se describió previamente (Flores et al., 2005).

La técnica de Golgi es un sencillo procedimiento histológico que revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones. Este método se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico, producto de la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata (reacción negra). La impregnación revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones. La imagen que se observa de una neurona coloreada con el método de Golgi equivale, en menor escala, a la que se obtiene de una neurona reconstruida a partir de cortes seriados en microscopía electrónica de transmisión (Orlando Torres-Fernández, 2006)

5.5 Observación microscópica y análisis Sholl

Se seleccionaron células piramidales de CA1 y CA3 (DH), células granulares (DG) y neuronas espinales medias (NAcc) para cada grupo de animales (Paxinos y Watson 1998). Las neuronas de las áreas izquierda y derecha del cerebro fueron dibujadas usando cámara lúcida a una ampliación de 250X (DMLS, Leica Microscope) por un observador entrenado "ciego" a las condiciones experimentales (Kolb et al., 1998). Se generó una reconstrucción secuencial

bidimensional de todo el árbol dendrítico para cada neurona y el trazado dendrítico se cuantificó mediante el análisis de Sholl (Sholl, 1953) de la siguiente manera: una retícula transparente con anillos concéntricos equidistantes (10 μm) se centró sobre el trazado del árbol dendrítico y el número de intersecciones anulares se utilizaron para estimar la longitud dendrítica total y la arborización dendrítica (Flores et al., 2005, Kolb et al., 1998, Martínez-Tellez et al., 2005, Tendilla-Beltran Et al., 2016). El número total de ramas dendríticas (ramificación indicada por bifurcado), otra estimación de la arborización dendrítica, se contó en cada orden alejada del cuerpo celular o eje dendrítico. Para calcular la densidad de la columna, se determinó una longitud de dendrita (por lo menos > 10- μm de longitud) a 1000X, se midió la longitud exacta del segmento dendrítico y se contó el número de espinas a lo largo de la longitud (para dar espinas /10- μm). Se analizaron la longitud dendrítica y la densidad de la columna vertebral para las células piramidales (n = 10 por cada animal, total de n = 1000 por grupo) para las dendritas basilares.

5.6 Análisis estadístico

Los valores medios de cada región del cerebro por animal se trataron como una sola medición para el análisis de los datos. Los datos de longitud dendrítica, número de columna vertebral y actividad locomotora se analizaron por ANOVA bidireccional, seguido de la prueba posthoc Newman-Keuls para comparaciones, con Prolame y cada región analizada como factores independientes (P <0,05 se consideró significativo). Los datos de longitud por orden de rama también se analizaron con ANOVA bidireccional, seguido de la prueba posthoc Newman-Keuls para comparaciones, con prolame y orden de rama como factores independientes (siendo significativos p <0,05).

6. RESULTADOS

6.1 *Actividad motora en un entorno novedoso*

La Figura 1 muestra el efecto de la administración crónica de prolame sobre la actividad motora en un entorno novedoso, en ratones de edad avanzada. Los animales tratados con Prolame y su grupo de control respectivo inicialmente mostraron un aumento en la locomoción en los primeros 10 minutos de la prueba, lo que refleja una conducta exploratoria activa en un entorno novedoso.

Posteriormente, la actividad locomotora se redujo gradualmente a un nivel estable hasta el final de la prueba. La comparación del comportamiento motor entre los grupos experimentales indicó que no hubo diferencia significativa (análisis bidireccional ANOVA [efecto de intervalos de tiempo $F_{1,78} = 39.5$, $P < 0.001$]) entre los intervalos de tiempo (0-20, 20, 20, 20, 20) -40 y 40-60 min). Los resultados también mostraron que el tratamiento con prolame no modifica la actividad motora en relación con el grupo de control. Alternativamente, el análisis estadístico de la actividad locomotora total en ratones tratados con prolame no fue significativamente diferente en comparación con los ratones de control ($P < 0,05$, Figura 1B).

6.2 *Tarea de reconocimiento de objetos novedosos*

Los resultados NORT se muestran en la Figura 1C. El análisis del tiempo de exploración indicó que los ratones envejecidos de control y los tratados con prolame no presentaron cambios significativos. Cuando la fase STRM se analizó no hubo cambios significativos entre los grupos. Sin embargo, en el análisis de LTRM, el grupo prolame presentó un aumento significativo en el cociente de exploración en comparación con los ratones control durante las pruebas LTM (ANOVA bidireccional, $p < 0,05$). Esto sugiere que la administración de prolame mejora la memoria de reconocimiento a largo plazo en ratones de edad avanzada.

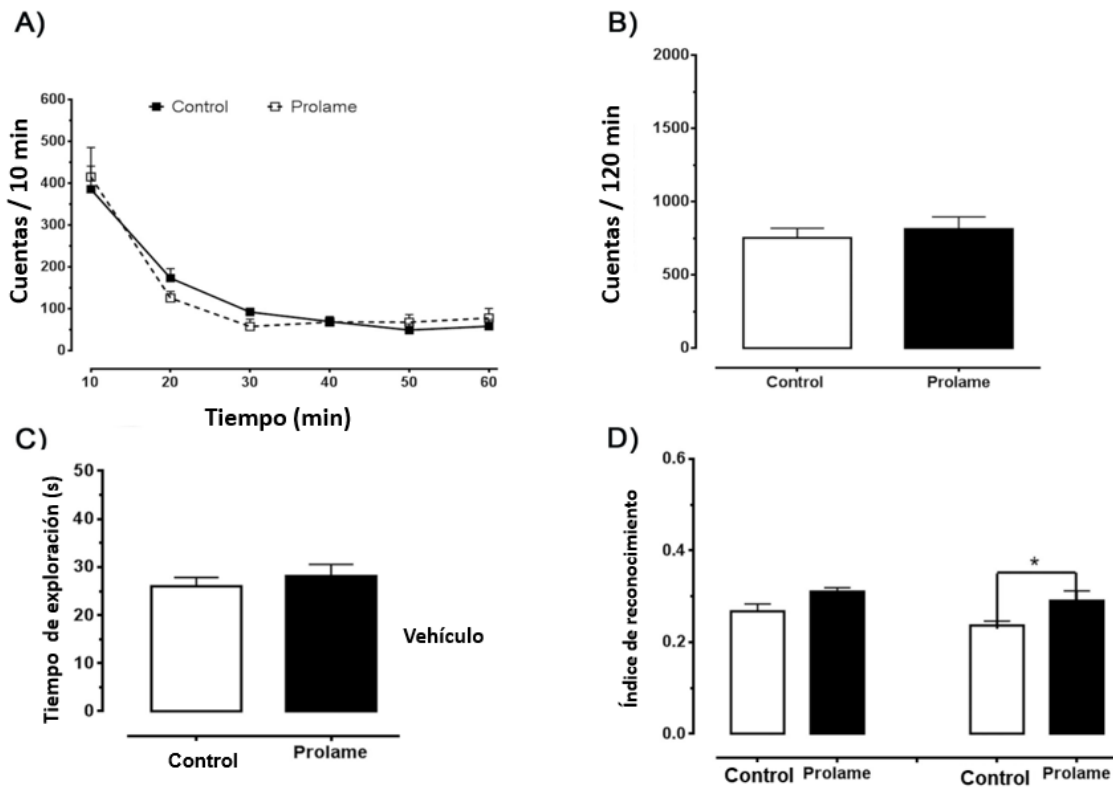


Figura 1. – El prolame no modifica la actividad locomotora inducida a un nuevo entorno (A, B) y mejora la memoria de largo plazo (MLP) en la tarea de memoria de reconocimiento de objetos novedosos en ratones de edad avanzada (C).

6.3 Análisis de la morfología dendrítica por tinción de Golgi-Cox

El procedimiento de impregnación de Golgi-Cox llenó claramente los ejes dendríticos de las neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3 del DH, células granulares de las DG y neuronas espinosas medias del NAcc, como se muestra en las Figs. 2A - 5A. El efecto del prolame sobre la morfología dendrítica de DH, DG y NAcc en ratones envejecidos se ilustra en las Figs. 2B - 5B. Se midió la ramificación dendrítica, la longitud dendrítica total (TDL) y la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas en estas mismas regiones cerebrales usando tinción de Golgi-Cox, como se informó anteriormente (Flores et al., 2005, Lazcano et al., 2015, Tendilla Beltran et al., 2016). Para cada animal, se seleccionaron 10 neuronas por región, con un total de 1000 neuronas seleccionadas.

6.4 Morfología dendrítica en CA1

La figura 2 C muestra el efecto del prolame en la morfología dendrítica CA1 (DH). El análisis de ANOVA bidireccional de la densidad de espinas dendríticas correspondiente a las neuronas piramidales de esta región del hipocampo mostró un aumento significativo en los animales tratados crónicamente con prolame ($F_{1, 42} = 3,27$ $p < 0,0001$) en comparación con el grupo de control. El análisis TDL de CA1-DH reveló que la administración de prolame aumentó la longitud dendrítica (ANOVA bidireccional, ($F_{1, 42} = 3,52$, $p = 0,0931$) (Fig. 2D).

El análisis del orden de ramificación de CA1 (ANOVA bidireccional, ($F_{1, 82} = 12,78$, $p < 0,0015$), reveló que la longitud del tercer y cuarto orden de ramificación se incrementó significativamente en el grupo prolame en comparación con el grupo de control ($P < 0.05$) (Fig. 2E).

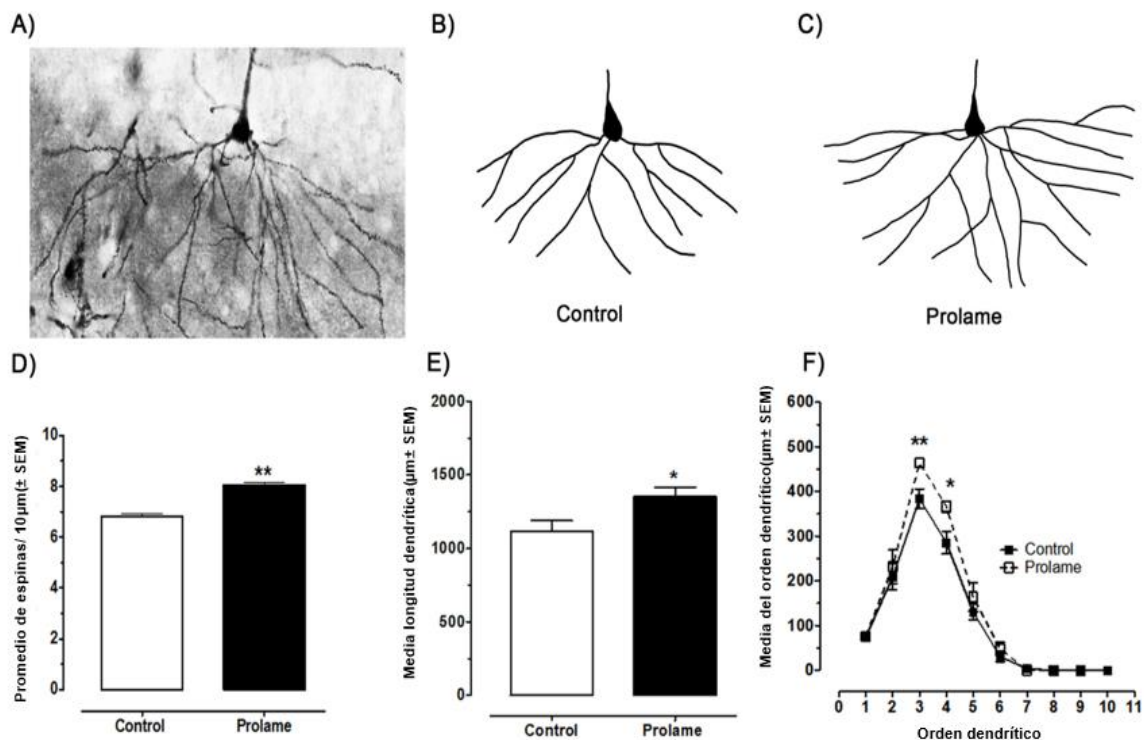


Figura 2. Efecto del Prolame de la morfología dendrítica de las neuronas piramidales de CA1 del DH de ratones de edad avanzada. A: Coloración Golgi-Cox representativa. B: Esquemas esquemáticos representativos del árbol dendrítico. C: Densidad de la columna dendrítica. D: Muestra la densidad de la columna dendrítica. E: Longitud dendrítica total. F: Longitud de la rama dendrítica del subcampo CA1 del HD de ratones envejecidos tratados con vehículo y el prolame. * $P < 0,05$; ** $P < 0.01$.

6.5 Morfología dendrítica en CA3

El análisis estadístico del número de espinas dendríticas en las neuronas piramidales CA3 del DH evidenció un aumento significativo en el grupo prolame en relación con los ratones de control (Fig. 3C) ($F_{1, 43} = 2.523$; $p = 0.6622$). El análisis de TDL de CA3 reveló que prolame modificó positivamente la longitud dendrítica (ANOVA bidireccional, ($F_{1, 43} = 4,37$, $p = 0,0835$) (Fig. 3D). El análisis de orden de ramificación CA3 reveló que la longitud del orden de la tercera y cuarta rama aumentó significativamente en animales tratados crónicamente con el prolame en comparación con el grupo de control (Fig. 3E).

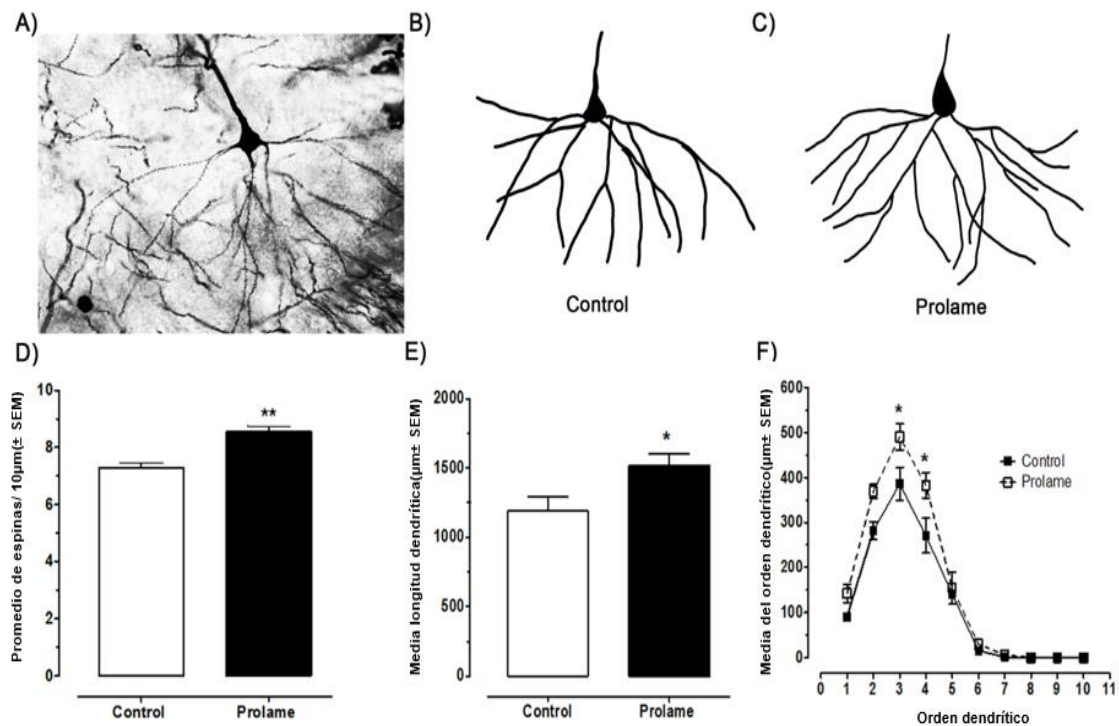


Figura 3. Efecto Prolame de la morfología dendrítica de las neuronas piramidales en CA3 del DH de ratones de edad avanzada. A: Coloración Golgi-Cox representativa. B: Dibujos esquemáticos representativos del árbol dendrítico. C: Densidad de la columna dendrítica. D: Muestra la densidad de la columna dendrítica. E: Longitud dendrítica total. F: Longitud de la rama dendrítica del subcampo CA3 del HD a partir de ratones envejecidos tratados con vehículo y Prolame. * $P < 0,05$; ** $P < 0.01$.

6.6 Morfología dendrítica en el DG

El efecto del prolame sobre la morfología dendrítica de las células granulares (DG) en ratones viejos se muestra en la figura 4. El análisis de ANOVA bidireccional de la densidad dendrítica de las células de gránulares reveló que la administración de prolame causó un aumento significativo comparado con el control (Fig. 4C) ($F_{1, 41} = 10,10$; $p = 0,0017$). El análisis TDL de las células granulares no mostró cambios después de la administración del prolame en relación con la longitud dendrítica y el orden de ramificaciones en relación con el grupo de control (Fig. 4D-E).

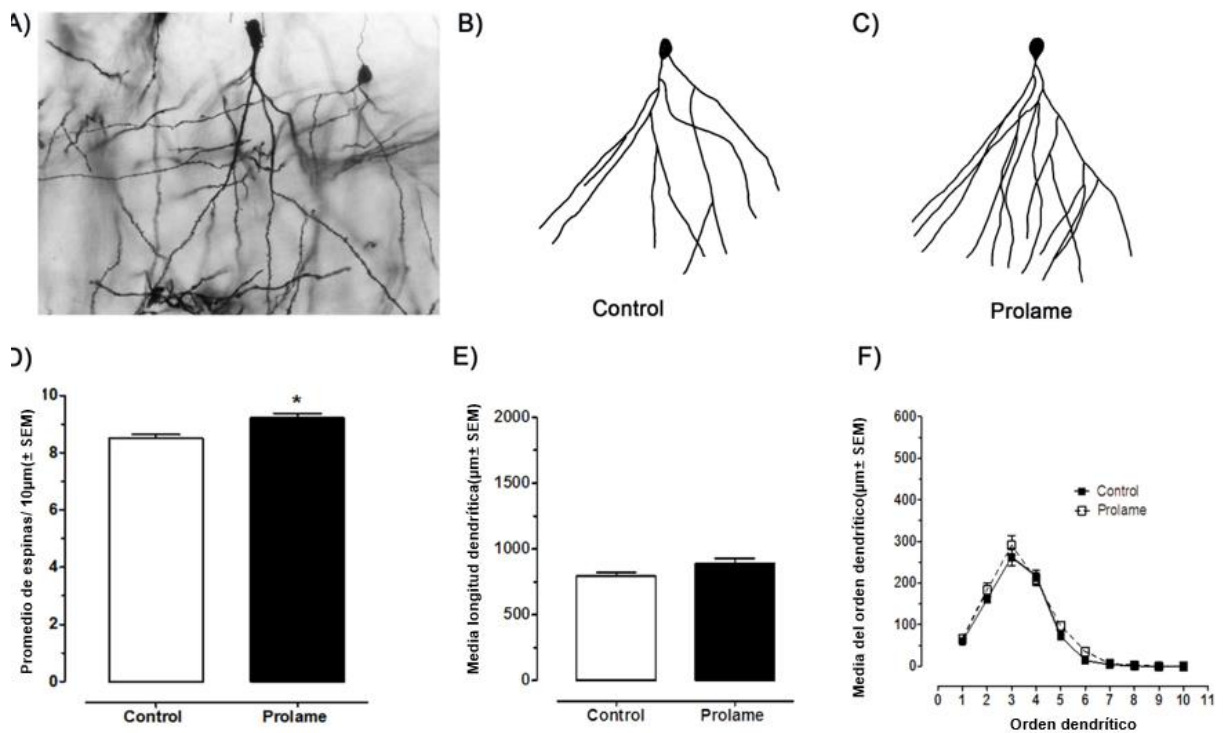


Figura 4. Efecto de la administración de prolame en la morfología dendrítica de células granulares de giro dentado (DG) de ratones de edad avanzada. A: Coloración Golgi-Cox representativa. B: Dibujos esquemáticos representativos del árbol dendrítico. C: Densidad de la columna dendrítica. D: Longitud dendrítica total. E: Longitud de la rama dendrítica de células granulares de Dentate Gyrus (DG) de ratones envejecidos tratados con vehículo y Prolame a las 8 semanas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

6.7 Morfología dendrítica del Núcleo accumbens

No se observaron cambios significativos en la densidad de las espinas dendríticas, la longitud dendrítica y el orden de ramificación dendrítico en las neuronas espinosas medianas del NAcc en ninguno de los grupos de animales (Fig. 5C-E).

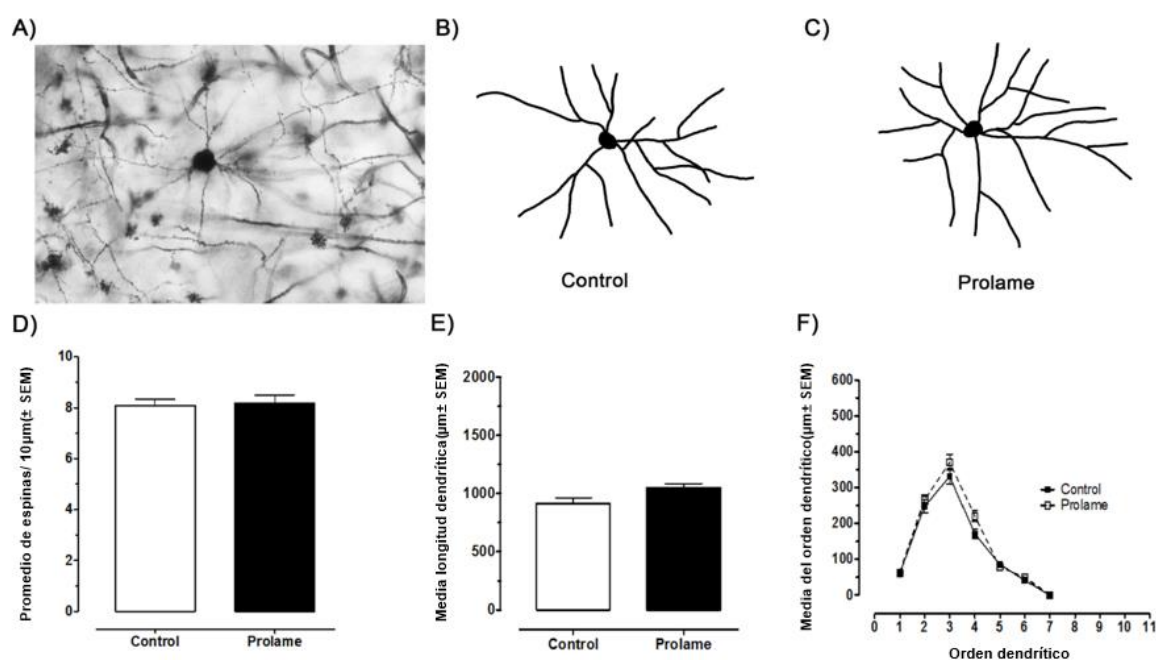


Figura 5. El prolame no cambia en la morfología dendrítica de las neuronas espinosas medias de NAcc de ratones de edad avanzada. A: Coloración Golgi-Cox representativa. B: Dibujos esquemáticos representativos del árbol dendrítico. C: Densidad de la columna dendrítica. D: Longitud dendrítica total. E: Longitud del dendríticas de las neuronas espinosas medias de NAcc de ratones de edad avanzada tratados con vehículo y el prolame por 8 semanas. *P < 0.05; ** P < 0.01.

7. DISCUSIÓN

El envejecimiento humano se propone como un estado de deterioro funcional y progresivo en el que las funciones fisiológicas se deterioran a través del tiempo (Flatt, 2012). Esto provoca cambios bioquímicos, celulares y estructurales que promueven la aparición de enfermedades crónicas degenerativas. Durante el envejecimiento, uno de los órganos afectados principalmente es el cerebro, porque hay una reducción en la neurogénesis y la densidad de las espinas dendríticas (Burke y Barnes, 2006). En consecuencia, la neurotransmisión y la

neuroplasticidad se deterioran significativamente (Segovia et al., 2001), lo que explica la aparición de demencia o fallas en las habilidades motoras que comprometen la calidad de vida de los seres humanos. Por lo tanto, es de suma importancia el desarrollo de estrategias que ayuden a prevenir o retrasar las consecuencias del envejecimiento y, por lo tanto, reducir la incidencia de enfermedades neurodegenerativas que afectan a la población de adultos mayores en el mundo.

Los estrógenos están implicados en el mantenimiento de la función cerebral (Rossetti et al, 2016. Galea et al, 2016). Estas hormonas interactúan con diferentes receptores, incluyendo el estrógeno alfa y beta, que están presentes en el cerebro (Mikosha et al., 2015; Almey et al., 2016). Los estrógenos pueden activar diferentes vías de señalización para modular los procesos de neuroplasticidad, y, además, inhibir el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria y la apoptosis (muerte neuronal). El efecto neuroprotector inducido por los estrógenos modula diferentes procesos fisiológicos y de comportamiento en mamíferos (Galea et al., 2016, Gatson et al., 2012). Sin embargo, se ha informado, en condiciones de envejecimiento, que una disminución significativa en los niveles de estrógeno afecta drásticamente la función cerebral en la plasticidad neuronal en las regiones límbicas y consecuentemente el desarrollo del comportamiento cognitivo y motor; además de aumentar el riesgo de enfermedades demenciales tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) (McGilvray, 2016; Shults et al, 2015).

Recientemente informamos que Prolame (N- (3-hidroxi-1,3,5 (10) -estratrien-17 β -yl) -3-hidroxiopropilamina), un aminoestrógeno con efectos estrogénicos y antitrombóticos (Gonzalez et al., 2010, Lemini et al., 2005), tiene un efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria inducida por la toxicidad amiloide- β en el hipocampo de roedores (Limon et al., 2012), además, evitó el deterioro de la memoria espacial. Prolame es un compuesto no feminizante cuando se evalúa en ratas macho (Jaimez et al., 2001). En este trabajo Prolame se empleó como un tratamiento alternativo en ratones de edad avanzada. Los resultados mostraron que la administración de prolame durante 8 semanas mejoró la memoria de reconocimiento y promovió la hiperplasia dendrítica en el hipocampo y regiones DG, CA1 y CA3, respectivamente.

Una característica del envejecimiento es la disminución de las funciones cognitivas y motoras, lo que probablemente se debe a la disminución de la función-estructura de las neuronas del hipocampo y NAcc, respectivamente (Hovens et al., 2015). Estas regiones cerebrales son vulnerables a la muerte neuronal inducida por inflamación o por radicales libres, así como la disminución de factores neurotróficos tales como BDNF (Walsh et al., 2016). Nuestros resultados indican que el tratamiento de prolame durante 8 semanas no modificó el comportamiento motor, pero sí mejoró la tarea de desarrollo del reconocimiento de objetos (NORT). Varios informes indican que los estrógenos aumentan la neurotransmisión excitatoria a lo largo del hipocampo y activan la señalización del BDNF (Balasubramanian et al., 2014), permitiendo la modulación de la potenciación a largo plazo y la mejora de la memoria. Como los estrógenos no alteran los niveles de dopamina en el cerebro (Wu et al., 2015, Spencer-Segal et al., 2012), los animales tratados con prolame no mostraron cambios en la actividad motora. Estudios con prolame indican que este aminoestrógeno previene déficits en la memoria espacial, sin causar alteración en el comportamiento motor en roedores empleados para el estudio de la ansiedad (Limon et al., 2012; Lemini et al., 2016). La inhibición del estrés oxidativo y la inflamación, particularmente en el hipocampo de los roedores se considera como un efecto neuroprotector. El tratamiento Prolame reduce significativamente los déficits de memoria en ratones y ratas ovariectomizados, lo que demuestra un efecto estrogénico (Lemini et al., 2005, Nissen et al., 2012). Nuestros resultados sugieren que la administración de prolame durante 8 semanas previene el deterioro de la memoria de reconocimiento en ratones de edad avanzada.

Para demostrar el efecto neuroprotector del prolame en la morfología neuronal utilizamos el método de impregnación de Golgi-Cox y el análisis de Sholl (Gibb y Kolb, 1998, Flores et al., 2016) para evaluar la morfología dendrítica, el número de espinas, la longitud dendrítica y arborización de neuronas piramidales correspondientes a DH-CA1 y DH-CA3, así como células granulares de DG y neuronas espinosas medias de NAcc. Los resultados indicaron que el tratamiento prolame causó cambios en la morfología dendrítica de ratones envejecidos, especialmente en las neuronas piramidales de los subcampos DH

de CA1 y CA3, así como en células granulares de DG. Ambas regiones cerebrales son de interés cognitivo y en modelos de envejecimiento muestran una reducción en la densidad dendrítica de las espinas dendríticas y la longitud dendrítica, (Alcantara-Gonzalez et al., 2012; Hernandez-Hernandez et al., 2016), porque son altamente susceptibles al estrés oxidativo, Respuesta inflamatoria y apoptosis, que causan la muerte neuronal (Mattson y Magnus, 2006). La administración crónica de prolame produjo un efecto protector, disminuyendo la pérdida de arborización, longitud dendrítica y retracción neuronal en las regiones CA1 y CA3 de del hipocampo de los ratones de edad avanzada.

Los estrógenos aumentan las espinas dendríticas del hipocampo y la densidad sináptica (Tuscher et al., 2016, Hojo et al., 2015, Vierk et al., 2015). Existe una fuerte correlación entre los estrógenos, espinogénesis y mejoras en la cognición (Lacreuse et al., 2015). Por lo tanto, los cambios crónicos en las concentraciones circulantes de estradiol alteran la densidad de las espinas dendríticas de las células piramidales en el hipocampo (Woolley et al., 1990 y Luine y Frankfurt, 2013).

En los roedores de edad avanzada (Luine, 2014, von Bohlen y Halbach et al., 2006), que mostraron una disminución en los niveles de estrógeno, hay una reducción en la densidad de espinas dendríticas en comparación con los animales jóvenes. Las hembras mayores que muestran deterioro de la memoria, así como una reducción de las concentraciones séricas de estrógeno, tienen una marcada disminución en la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales CA1 y CA3 (Luine et al., 2011). Además, la administración de estradiol mejora las etapas de adquisición, como se demuestra en la prueba de laberinto de agua, y se correlaciona con aumentos en el número de espinas dendríticas. (Markham et al., 2013). No hubo cambios en la morfología dendrítica en las neuronas espinosas medias de NAcc responsables de modular el comportamiento motor probablemente debido a que la densidad de receptores de estrógenos en esta región cerebral es menor en comparación con el hipocampo.

8. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con prolame mejora los procesos de neuroplasticidad en el hipocampo durante el envejecimiento promoviendo un aumento de la densidad de espinas dendríticas, así como la longitud dendrítica de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dorsal y las células granulares de la DG, lo que mejora la memoria de reconocimiento. Por lo tanto, el prolame es un potente aminoestrógeno con un efecto específico sobre la plasticidad neuronal cerebral de ratones de edad avanzada que mejora el comportamiento funcional y la memoria de reconocimiento.

9. REFERENCIAS

- Alabarse PV, Hackenhaar FS, Medeiros TM, Mendes MF, Viacava PR, Schüller AK, Salomon TB, Ehrenbrink G, Benfato MS. 2011. Oxidative stress in the brain of reproductive male rats during aging. *Exp Gerontol.* 46(4):241-248
- Almey A, Milner TA, Brake WG. 2016. Estrogen receptor α and G-protein coupled estrogen receptor 1 are localized to GABAergic neurons in the dorsal striatum. *Neurosci Lett.* 622:118-23.
- Antunes M, Biala G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 13(2):93-110.
- Babayan AH, Kramár EA. 2013. Rapid effects of oestrogen on synaptic plasticity: interactions with actin and its signalling proteins. *J Neuroendocrinol.* 25(11):1163-72.
- Balasubramanian P, Subramanian M, Nunez JL, Mohankumar SM, Mohankumar PS. 2014. Chronic estradiol treatment decreases brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression and monoamine levels in the amygdala--implications for behavioral disorders. *Behav Brain Res.* 261:127-133.
- Bayer J, Rune G, Schultz H, Tobia MJ, Mebes I, Katzler O, Sommer T. 2015. The effect of estrogen synthesis inhibition on hippocampal memory. *Psychoneuroendocrinology.* 56:213-225.

- Bizon JL, Lee HJ, Gallagher M. 2004. Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell*. 3(4):227-234.
- Boulware MI, Mermelstein PG. 2005. The influence of estradiol on nervous system function. *Drug News Perspect*. 18(10):631-637.
- Boulware MI, Mermelstein PG. 2009. Membrane estrogen receptors activate metabotropic glutamate receptors to influence nervous system physiology. *Steroids*. 74(7):608-613.
- Boulware MI, Weick JP, Becklund BR, Kuo SP, Groth RD, Mermelstein PG. 2005. Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein. *J Neurosci*. 25(20):5066-5078.
- Burke SN, Barnes CA. 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*. 7(1):30-40.
- Chakrabarti M, Haque A, Banik NL, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Ray SK. 2014. Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration. *Brain Res Bull*. 109:22-31.
- Ervin KS1, Phan A, Gabor CS, Choleris E. 2013. Rapid oestrogenic regulation of social and nonsocial learning. *J Neuroendocrinol*. 25(11):1116-1132.
- Espinosa J, Rocha A, Nunes F, Costa MS, Schein V, Kazlauckas V, Kalinine E, Souza DO, Cunha RA, Porciúncula LO. 2013. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J Alzheimers Dis*. 34(2):509-518.
- Flatt T. 2012. A new definition of aging?. *Front Genet*. 3:148
- Flores G, Alquicer G, Silva-Gómez AB, Zaldivar G, Stewart J, Quirion R, Srivastava LK. 2005. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*. 133(2):463-470.
- Flores G, Barbeau D, Quirion R, Srivastava LK. 1996. Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neurosci*. 16(6):2020-2026.

- Flores G, Flores-Gómez GD, de Jesús Gomez-Villalobos M. 2016. Neuronal changes after chronic high blood pressure in animal models and its implication for vascular dementia. *Synapse*. 70(5):198-205.
- Galea LA, Frick KM, Hampson E, Sohrabji F, Choleris E. 2016. Why estrogens matter for behavior and brain health. *Neurosci Biobehav Rev*. pii: S0149-7634(16)30023-9.
- Gatson JW, Liu MM, Abdelfattah K, Wigginton JG, Smith S, Wolf S, Simpkins JW, Minei JP. 2012. Estrone is neuroprotective in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 29(12):2209-2019.
- Gibb R, Kolb B. 1998. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J. Neurosci. Methods*. 79: 1–4.
- González G, Alvarado-Vasquez N, Fernández-G JM, Cruz-Robles D, Del Valle L, Pinzón E, Torres I, Rodríguez E, Zapata E, Gómez-Vidales V, Montaña LF, de la Peña A. 2010. The antithrombotic effect of the aminoestrogen prolame (N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -YL)-3-hydroxypropylamine) is linked to an increase in nitric oxide production by platelets and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 208(1):62-68.
- Hawley WR, Grissom EM, Moody NM, Dohanich GP, Vasudevan N. 2014. Activation of G-protein-coupled receptor 30 is sufficient to enhance spatial recognition memory in ovariectomized rats. *Behav Brain Res*. 262:68-73.
- Hernández-Hernández ME, Serrano-García C, Antonio Vázquez-Roque R, Díaz A, Monroy E, Rodríguez-Moreno A, Florán B, Flores G. 2016. Chronic administration of resveratrol prevents morphological changes in prefrontal cortex and hippocampus of aged rats. *Synapse*. 70(5):206-17
- Hernández-Reséndiz S, Palma-Flores C, De Los Santos S, Román-Anguiano NG, Flores M, de la Peña A, Flores PL, Fernández-G JM, Coral-Vázquez RM, Zazueta C. 2015. Reduction of no-reflow and reperfusion injury with the synthetic 17 β -aminoestrogen compound Prolame is associated with PI3K/Akt/eNOS signaling cascade. *Basic Res Cardiol*. 110(2):1.
- Hojo Y, Munetomo A, Mukai H, Ikeda M, Sato R, Hatanaka Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Kimoto T, Kawato S. 2015. Estradiol rapidly modulates

- spinogenesis in hippocampal dentate gyrus: Involvement of kinase networks. *Horm Behav.* 74:149-156.
- Hovens IB, van Leeuwen BL, Nyakas C, Heineman E, van der Zee EA, Schoemaker RG. 2015. Prior infection exacerbates postoperative cognitive dysfunction in aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 309(2):R148-159.
 - Imtiaz B, Tolppanen AM, Kivipelto M, Soininen H. 2014. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochem Pharmacol.* 88(4):661-70
 - Jaimez R, Rubio-Póo C, Lemini C. 2001. Effects on blood clotting time of 17 beta-estradiol and 17 beta-aminoestrogens in rats and mice. *Proc West Pharmacol Soc.* 44:163-166.
 - Kolb B, Forgie M, Gibb R, Gorny G, Rowntree S. 1998. Age, experience and the changing brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 22: 143–159.
 - Kramár EA, Babayan AH, Gall CM, Lynch G. 2013. Estrogen promotes learning-related plasticity by modifying the synaptic cytoskeleton. *Neuroscience.* 239:3-16.
 - Kramár EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, Lynch G. 2009. Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci.* 29(41):12982-93.
 - Lacreuse A, Mong JA, Hara Y. 2015. Neurocognitive effects of estrogens across the adult lifespan in nonhuman primates: State of knowledge and new perspectives. *Horm Behav.* 74:157-166.
 - Lazcano Z, Solis O, Díaz A, Brambila E, Aguilar-Alonso P, Guevara J, Flores G. 2015. Dendritic morphology changes in neurons from the ventral hippocampus, amygdala and nucleus accumbens in rats with neonatal lesions into the prefrontal cortex. *Synapse.* 69(6):314-325.
 - Lemini C, Estela Avila M, Medina M, Sánchez C, Figueroa A, García-Mondragón MJ, Vargas-Vázquez A, Jiménez-Orozco A. 2016. Proliferative Properties of 17 β -aminoestrogens in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* In press.

- Lemini C, Franco Y, Avila ME, Jaimez R. 2005. Estrogenic effects of 17 beta-aminoestrogens assessed in uteri of rats and mice. *Eur J Pharmacol.* 510(3):235-239.
- Limón D, Díaz A, Hernandez M, Fernandez-G JM, Torres-Martínez AC, Pérez-Severiano F, Rendón-Huerta EP, Montañó LF, 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.
- Luine V, Frankfurt M. 2013. Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. *Neuroscience.* 239:34-45.
- Luine V. 2015. Recognition memory tasks in neuroendocrine research. *Behav Brain Res.* 285:158-164.
- Luine VN, Wallace ME, Frankfurt M. 2011. Age-related deficits in spatial memory and hippocampal spines in virgin, female Fischer 344 rats. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2011:316386.
- Markham JA, Mullins SE, Koenig JI. 2013. Periadolescent maturation of the prefrontal cortex is sex-specific and is disrupted by prenatal stress. *J Comp Neurol.* 521(8):1828-1843.
- Martínez-Tellez R, Gómez-Villalobos Mde J, Flores G. 2005. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Res.* 1048(1-2):108-115.
- Mattson MP, Magnus T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci.* 7(4):278-294.
- McEwen B. 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res.* 57:357-384.
- McGilvray A. 2016. Ageing: Restoration project. *Nature.* 531(7592):S4-5.
- Mikosha AS, Kovzun EI, Tronko ND. 2015. Biochemical effects of estrogens in non-reproductive organs. *Ukr Biochem J.* 87(5):10-23.
- Murakami G, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Chambon P, Nakajima K, Oishi Y, Kimoto T, Kawato S. 2015. Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus. *Brain Res.* 1621:133-146.

- Murphy DD, Segal M. 1996. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci.* 16(13):4059-4068.
- Nissen I, Estrada FS, Nava-Kopp AT, Irlles C, de-la-Peña-Diaz A, Fernandez-G JM, Govezensky T, Zhang L. 2012. Prolame ameliorates anxiety and spatial learning and memory impairment induced by ovariectomy in rats. *Physiol Behav.* 106(2):278-284.
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The Rat Brain Atlas.* Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Pratap UP, Patil A, Sharma HR, Hima L, Chockalingam R, Hariharan MM, Shitoot S, Priyanka HP, ThyagaRajan S. 2016. Estrogen-induced neuroprotective and anti-inflammatory effects are dependent on the brain areas of middle-aged female rats. *Brain Res Bull.* 124:238-253
- Rossetti MF, Cambiasso MJ, Holschbach MA, Cabrera R. 2016. Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *J Neuroendocrinol.* 28(7).
- Segovia G, Porrás A, Del Arco A, Mora F. 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev.* 122(1):1-29.
- Sholl A, Uttley AM. 1953. Pattern discrimination and the visual cortex. *Nature.* 171: 387–388.
- Olivares Hernández, Juan David; 2015. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje
- Shults CL, Pinceti E, Rao YS, Pak TR. 2015. Aging and Loss of Circulating 17 β -Estradiol Alters the Alternative Splicing of ER β in the Female Rat Brain. *Endocrinology.* 156(11):4187-99.
- Smith CC1, McMahon LL. 2005. Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci.* 25(34):7780-7791.
- Spencer-Segal JL, Tsuda MC, Mattei L, Waters EM, Romeo RD, Milner TA, McEwen BS, Ogawa S. 2012. Estradiol acts via estrogen receptors

- alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. *Neuroscience*. 202:131-146.
- Tendilla-Beltrán H, Arroyo-García LE, Diaz A, Camacho-Abrego I, de la Cruz F, Rodríguez-Moreno A, Flores G. 2016. The effects of amphetamine exposure on juvenile rats on the neuronal morphology of the limbic system at prepubertal, pubertal and postpubertal ages. *J Chem Neuroanat*. 7:68-77.
 - Tuscher JJ, Luine V, Frankfurt M, Frick KM. 2016. Estradiol-Mediated Spine Changes in the Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex of Ovariectomized Female Mice Depend on ERK and mTOR Activation in the Dorsal Hippocampus. *J Neurosci*. 36(5):1483-9.
 - Vierk R, Bayer J, Freitag S, Muhia M, Kutsche K, Wolbers T, Kneussel M, Sommer T, Rune GM. Structure-function-behavior relationship in estrogen-induced synaptic plasticity. *Horm Behav*. 74:139-148.
 - Von Bohlen und Halbach O, Zacher C, Gass P, Unsicker K. 2006. Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *J Neurosci Res*. 83(4):525-531.
 - Roediger HL, McDermott KB. Two types of event memory. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: 20856-857.
 - Orlando Torres-Fernández Laboratorio de Microscopía, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia, *Biomédica* 2006;26:498-508
 - Walsh JJ, Scribbans TD, Bentley RF, Kellawan JM, Gurd B, Tschakovsky ME. 2016. Neurotrophic growth factor responses to lower body resistance training in older adults. *Appl Physiol Nutr Metab*. 41(3):315-23.
 - Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS. 1990. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*. 10(12):4035-4039.
 - Yamaguchi-Shima N, Yuri K. 2007. Age-related changes in the expression of ER-beta mRNA in the female rat brain. *Brain Res*. 1155:34-41.
 - Yu W, Tu D, Hong F, Wang J, Liu X, Cai Y, Xu R, Zhao G, Wang F, Pan H, Wu S, Feng T, Wang B. 2015. Analysis of the Association between Catechol-O-Methyltransferase Val158Met and Male Sexual Orientation. *J Sex Med*. 12(9):1920-1926.

- Oxidative Profile of the Menopausal Woman: Estrogens' Rol in the Prevention and Treatment of Diseases; Carlos Escalante-Gómez, Silvia Quesada. 2009