



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TIBOLONA SOBRE EL
DAÑO INDUCIDO POR LA OVARIECTOMIA EN EL
HIPOCAMPO DE LA RATA ADULTA”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN FARMACOLOGÍA**

PRESENTA:

BIÓL. TERESA NERI GÓMEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

DRA. JUDITH ESPINOSA RAYA

MEXICO, D.F.

2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 29 del mes de abril del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E. S. M. para examinar la tesis titulada:

“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TIBOLONA SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA OVARIECTOMIA EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA ADULTA”

Presentada por la alumna:

Neri

Apellido paterno

Gómez

Apellido materno

Teresa

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	7	9	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Farmacología

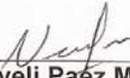
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

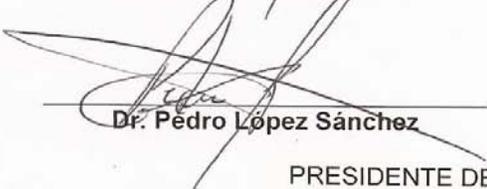
Directores de tesis


Dra. Judith Espinosa Raya


Dr. Christian Humberto Guerra Araiza


Dra. Nayeli Paez Martínez


Dr. Ofir Picazo Picazo


Dr. Pedro López Sánchez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F., el día 29 del mes abril del año 2011, la que suscribe **Teresa Neri Gómez** alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Farmacología con número de registro **B091795**, adscrita a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Judith Espinosa Raya** y del **Dr. Christian Humberto Guerra Araiza** y cede los derechos del trabajo intitulado **“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TIBOLONA SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR LA OVARIECTOMIA EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA ADULTA”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección tnerigomez@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Teresa Neri Gómez
registro **B091795**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA CONDUCTUAL DE LA SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL Y EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA DEL CENTRO MÉDICO S XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

I HAVE LEARNED SO MUCH

DANIEL LADINSKY

**I
Have
Learned
So much from God
That I can no longer
Call
Myself**

**A Christian, a Hindu, a Muslim
A Buddhist, a Jew.**

**The Truth has shared so much of itself
With me**

**That I can no longer call myself
A man, a woman, an angel
Or even pure
Soul.**

**Love has
Befriended Hafiz so completely
It has turned to ash
And freed
Me**

**Of every concept and image
My mind has ever known.**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

*A MI FAMILIA, MI MAMÁ Y MI HERMANO POR SU AMOR, APOYO
Y POR SOPORTARME TANTO*

A MIS TUTORES:

*DR. CHRISTIAN GUERRA Y DRA. JUDITH ESPINOSA POR SU
PACIENCIA, CONSEJOS Y BRINDARME SU AMISTAD.*

*A MI COMITÉ TUTORAL POR BRINDARME SIEMPRE NUEVOS
CONOCIEMIENTOS.*

*A MIS AMIGOS QUE SIEMPRE HAN ESTADO CONMIGO:
MARBEL, ARTURO. GRACIAS*

*A MIMIS (MU) POR SOPORTARME DURANTE ESTOS 2 AÑOS DE
LA MAESTRIA, BRINDARME SU AMISTAD Y COMPARTIR
MUCHOS MOMENTOS.*

*A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO: RODOLOFO, CLAUS,
BERE, TOMAS, NICHE, DELIA. GRACIAS POR HACER AMENO EL
TRABAJO.*

INDICE GENERAL

	Pagina
I Resumen	13
II Antecedentes	
2.1 Hormonas esteroides	
2.1.1 Estructura y función de las hormonas esteroides	15
2.1.2. Receptores a hormonas esteroides	18
2.1.3 Efecto de las hormonas esteroides ene l Sistema Nervioso Central	21
2.2 Climaterio y Menopausia	23
2.2.1. Endocrinología del climaterio, menopausia y postmenopausia	24 26
2.2.2 Síntomas del Climaterio	
2.2.3 Terapia de Reemplazo Hormonal	26
2.3 Tibolona	28
2.3.1 Propiedades químicas	29
2.3.2 Mecanismo de Acción	31
2.3.3 Absorción, Biotransformación y Excreción	32
2.3.4 Efecto de la Tibolona en Sistema Nervioso Central	33
2.4 Memoria y Aprendizaje	34
2.4.1 Aprendizaje: Modelos Conductuales	35
2.4.2 Condicionamiento clásico pavloviano	36
2.4.3 Condicionamiento instrumental operante	37
2.4.4 Transferencia pavloviana instrumental	38
2.4.5 Tipos y características de los sistemas de memoria	39
2.4.6 Tipos de memoria en función de la duración de la experiencia	42
2.4.6.1 Memoria Sensorial o inmediata	42
2.4.6.2 Memoria a corto plazo o memoria de trabajo	43
2.4.6.3 Memoria a largo plazo	43
2.5 Hipocampo	44

2.5.1 Vías aferentes del hipocampo	46
2.5.2 Vías eferentes del hipocampo	46
2.6 Acetilcolina	47
2.6.1 Vías cerebrales colinérgicas	48
2.7 Serotonina	50
2.7.1 Vías cerebrales serotoninérgicas	51
III Planteamiento del problema y Justificación	53
IV Hipótesis	54
V Objetivos	54
VI Material y métodos	55
VII Análisis estadístico	61
VIII Resultados	62
Pruebas de memoria y aprendizaje	
Western Blot	
Inmunofluorescencia y Detección de la apoptosis	
IX Discusión	70
X Conclusiones	76
XI Bibliografía	77
XII Anexos	84

INDICE DE FIGURAS

No	TITULO	PAG
1	Síntesis de las principales hormonas esteroides.	16
2	Dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides.	19
3	Mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides.	20
4	Estructura química de la Tibolona.	28
5	Estructura química del noretinodrel y de la noretisterona.	29
6	Estructura química de los metabolitos de la Tibolona.	30
7	Tipos de memoria y estructuras cerebrales relacionadas.	44
8	Esquema de la estructura del hipocampo.	46
9	Estructura química de la acetilcolina.	47
10	Síntesis de la Acetilcolina.	48
11	Distribución de las vías colinérgicas en el cerebro	49
12	Estructura química de la serotonina	50
13	Síntesis de la serotonina	51
14	Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada en un modelo de automoldeamiento.	62
15	Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada en la prueba de laberinto elevado en forma de T.	63
16	Índice de riesgo del laberinto elevado en forma de T.	63
17	Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre la actividad espontánea de la rata	64

18	Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre el contenido de ChAT	65
19	Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre el contenido de TPH	66
20	Detección de la dobleinmunofluorescencia en el hipocampo con los diferentes tratamientos de Tibolona.	67
21	Detección de la apoptosis en el hipocampo con los diferentes tratamientos de Tibolona	69

INDICE DE TABLAS

No.	TÍTULO	PAG
1	Función de las hormonas esteroideas.	17
2	Cambios endocrinológicos durante la menopausia	25
3	Signos y síntomas del climaterio	27
4	Afinidad relativa para el RE y RP para Tibolona y sus metabolitos	30
5	Anticuerpos utilizados	60

ABREVIATURAS

3 α -OH Tibo	3 α -hidroxi-Tibolona
3 β -OH Tibo	3 β -hidroxi-Tibolona
5-HT	5-hidroxitriptamina
Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AF-1	Función de activación 1
Akt	Proteína cinasa B
BA	Brazos Abiertos
CA	Cuerno de Amón
ChAT	Colinacetiltransferasa
DA	Dopamina
DBD	Dominio de unión al DNA
E ₂	Estradiol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EC	Estímulo condicionado
EE	Error Estadar
EI	Estímulo incondicionado
EI	Estímulo originario
ERK1	Cinasa regulada por señales extracelulares 1
FSH	Hormona folículoestimulante
GABA _A	Ácido γ -aminobutírico subtipo A
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HRE	Elementos de respuesta hormonal
HSP	Proteínas de choque térmico
IR	Índice de Riesgo
LET	Laberinto Elevado en T
LH	Hormona luteinizante

MAPK	Protein cinasa activada por mitogeno
MPA	Medroxiprogesterona
NMB	Núcleo basal magnocelular
OVX	Ovariectomizadas
P ₄	Progesterona
PI3-K	Inositol trifosfato cinasa
R	Respuesta
RA	Receptores de andrógenos
RC	Respuesta condicionada
RE	Receptores a estrógenos
Rf	Reforzador
RI	Respuesta incondicionada
RP	Receptores a P ₄
SNC	Sistema Nervioso Central
TPH	Triptófano Hidroxilasa
TRE	Terapia de reemplazo estrogénica
TRH	Terapia de Reemplazo Hormonal

1. Resumen

Para prevenir los síntomas del climaterio se prescribe una terapia de reemplazo hormonal (TRH), la cual puede tener componentes estrogénicos y/o progestágenos. Sin embargo, la TRH aumenta la incidencia de cáncer de endometrio y mama. Una estrategia para disminuir ésta incidencia es el uso de tibolona. Sin embargo, se desconoce el papel de ésta sobre los procesos de memoria y aprendizaje. Con el fin de conocer dicho papel se evaluó el efecto a largo plazo de diferentes dosis de tibolona en dos modelos de memoria y aprendizaje (automoldeamiento y laberinto en T); así como el contenido de acetilcolintransferasa (ChAT) y de triptófano hidroxilasa (TPH) mediante la técnica de western blot en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas, que recibieron uno de los siguientes tratamientos: 0 mg/Kg, 0.01 mg/Kg, 0.1 mg/Kg, 1.0 mg/Kg, 10 mg/Kg, dosis diaria por vía oral durante 18 semanas. En el modelo de automoldeamiento y la prueba de actividad espontánea, no se observaron cambios significativos con ningún tratamiento. Mientras que en el LET aumentó la latencia con la dosis de 10 mg/kg. El contenido de ChAT disminuyó con las diferentes dosis de tibolona; mientras que para la TPH se observó un aumento con las dosis de 1 y 10 mg/Kg. En el caso de la detección de la apoptosis se observó una menor inmunoreactividad para anexina V en CA3 del hipocampo con las diferentes dosis de Tibolona. Estos datos sugieren que la tibolona, a dosis alta, mejora el aprendizaje de una tarea con componente emocional, efecto que no se relaciona con alguna alteración en la capacidad motriz de la rata. Además, sugieren una regulación de la expresión de ChAT y TPH y una disminución de la apoptosis en el hipocampo de la rata ovariectomizada.

Abstract

To prevent symptoms of menopause, hormone replace therapy (HRT) is prescribed. This may have estrogenic and/or progestin components. HRT increases the incidence of endometrial and breast cancer. A strategy to reduce this impact is the use of tibolone, which also has estrogen and progestin components. However, the role of tibolone in the process of learning and memory is unknown. The aim of this study was to evaluate the long term effect of different dosis of tibolone (0 mg/Kg, 0.01 mg/Kg, 0.1 mg/Kg 1.0 mg/Kg and 10 mg/Kg orally daily for 18 weeks) on the memory and learning of ovariectomized rats. For this purpose, two behavioral animal models (autoshaping and T maze) were employed, as well as a direct measurement of the content of acetyl choline transferase (ChAT) and tryptophan hydroxylase (TPH) by Western blot in the hippocampus. In the autoshaping model and in the spontaneous activity test, no significant changes were observed. In the T maze there was an increased latency with the doses of 1 and 10 mg/Kg. Whereas the ChAT content decreased with increasing doses of tibolone, the TPH content increased with the doses of 1 and 10 mg/Kg of tibolone. These data suggest that high doses of tibolone improve the results of an emotional learning task, an effect that depends on the modular effect in cholinergic and serotonin systems.

II ANTECEDENTES

2.1 Hormonas Esteroides

2.1.1 Estructura y función de las hormonas esteroides

Las hormonas esteroides son lípidos no saponificables hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos y cuya estructura consiste en un núcleo tetracíclico al cual se le denomina ciclo pentanoperhidrofenantreno debido a que presenta tres anillos de seis átomos de carbono (perhidrofenantreno) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclo pentano) (Knobil y Neil, 1988).

Las hormonas esteroides regulan múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidroelectrolítica, las respuestas al estrés y la función reproductiva; además de regular distintas conductas. Todas las hormonas esteroides, con excepción del ácido retinoico, se derivan del colesterol, a partir del cual se forma la pregnanolona el principal intermediario para la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroides. Los esteroides con 21 átomos de carbono se dividen en pregnanos, glucocorticoides y mineralocorticoides, mientras que los de 19 y 18 átomos se denominan androstanos y estranos respectivamente (Knobil y Neil, 1988; González-Arenas et al., 2001) (Fig. 1).

La corteza adrenal es la principal responsable de la producción de los glucocorticoides, que regulan el metabolismo de carbohidratos y las respuestas al estrés, y los mineralocorticoides, que regulan los niveles de sodio y potasio. La progesterona (P_4) y el estradiol (E_2) son producidos principalmente en el ovario, mientras que los andrógenos en su mayoría son sintetizados por los testículos. Estas hormonas regulan principalmente las funciones reproductivas de los mamíferos por lo que son conocidas como hormonas sexuales (González-Arenas et al., 2001) (Tabla 1).

Tabla 1. Función de las hormonas esteroides.

<i>Hormona</i>	<i>Lugar de síntesis</i>	<i>Función</i>
Progestinas (P ₄)	Ovario, Placenta y Sistema Nervioso Central	Preparación del endometrio para la implantación del óvulo fertilizado, mantenimiento del embarazo, desarrollo de la glándula mamaria, conducta sexual y excitabilidad neuronal.
Glucocorticoides (Cortisol)	Corteza adrenal	Regulación de las respuestas al estrés, modulación del metabolismo de glucosa y la gluconeogénesis
Mineralocorticoides (Aldosterona)	Corteza adrenal	Metabolismo hidroelectrolítico. Retención de sodio y excreción de potasio.
Andrógenos (Testosterona)	Testículos	Conducta sexual y fenotipo masculino, espermatogénesis
Estrógenos (E ₂)	Ovario, placenta	Diferenciación sexual del cerebro, conducta sexual femenina, maduración ósea

Las hormonas esteroides tienen una velocidad de recambio elevada y no se almacenan, una vez que son secretadas pasan al torrente sanguíneo donde pueden circular libres o unidas a proteínas plasmáticas, tales como albúmina (cuando el enlace es inespecífico y poco afín) o las globulinas (cuando el enlace es de gran especificidad y de gran afinidad) (Wilson y Foster, 1992). El hígado es el órgano involucrado en el metabolismo de las hormonas esteroides (Greenspan y Strewler, 1998).

Los efectos de las hormonas esteroides ocurren a corto, mediano y largo plazo debido a que éstas tienen diversos mecanismos de acción (Camacho-Arroyo et al., 1995). Las hormonas esteroides ejercen sus efectos a través de mecanismos genómicos y no genómicos. Los mecanismos genómicos involucra la unión de la hormona esteroide con su receptor intracelular específico para regular la transcripción de genes específicos. El mecanismo no genómico involucra la acción de las hormonas esteroides sobre las bicapas fosfolipídicas de la membrana celular, sistemas de segundos mensajeros, su interacción con receptores membranales específicos e interacción con receptores a neurotransmisores como el del ácido γ -aminobutírico subtipo A (GABA_A) (Prieto et al., 2003).

2.1.2 Receptores a hormonas esteroides

Los receptores a hormonas esteroides son proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción inducidos por ligando que regulan específicamente la expresión de genes blanco involucrados en el metabolismo, desarrollo y reproducción. Estos receptores pertenecen a una familia de proteínas entre las que también se encuentran los receptores a vitamina D₃, y las hormonas tiroideas y el ácido retinoico (9-cis y all-trans) (Burriss y McCabe, 2003).

Estos receptores contienen seis dominios: en el extremo N-terminal se encuentra el dominio A/B, la región de mayor variabilidad entre los diferentes receptores, tanto en secuencia como en longitud. El dominio A/B permite diferenciar entre isoformas del mismo receptor y tiene también la función de activación 1 (AF-1), que es una de las regiones con actividad transcripcional del receptor. En la región C se encuentra el dominio de unión al DNA (DBD), el cual es altamente conservado y está constituido por dos dedos de zinc. El dominio D presenta una secuencia variable conocida como bisagra y contiene una señal de localización nuclear. El dominio E está localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la

región D; es relativamente largo y funcionalmente diverso ya que participa en: la unión con el ligando, con proteínas de choque térmico, la dimerización y la interacción con los cofactores. Esta región contiene también una señal de localización nuclear y la función de activación 2 (AF-2) que juega un papel importante en la regulación de la transcripción (Tata, 2002; Prieto et al., 2003). En cuanto al dominio F, existen estudios que muestran que participa en la función transcripcional del receptor y en su unión con agonistas y antagonistas (Schwartz et al., 2002) (Figura 2).

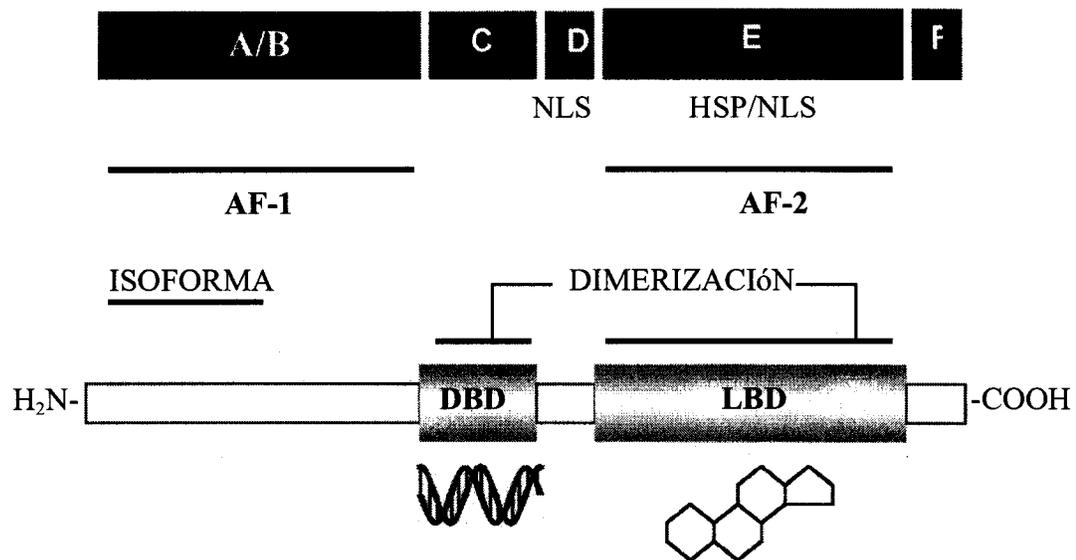


Fig. 2. Dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. A-E dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides. AF: función de activación, DBD: dominio de unión al DNA, LBD: dominio de unión al ligando (Tomado de: Prieto et al., 2003).

Las hormonas esteroides atraviesan las membranas celulares por difusión simple y en el núcleo se unen a sus respectivos receptores que se encuentran principalmente asociados con proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90 y HSP56).

La unión con el ligando provoca un cambio estructural en el receptor que le permite la disociación de las HSPs y que activa al receptor exponiendo la región que le permite dimerizarse, resultando en una estructura con alta afinidad por secuencias específicas en el DNA llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE, por sus siglas en inglés); éstas son

secuencias palindrómicas separadas por tres nucleótidos en donde dos receptores se unen simétricamente a cada mitad de la secuencia como un homodímero cooperativo. Una vez unido al HRE, el complejo ligando-receptor facilita el ensamblaje y la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por hormonas esteroides, favoreciendo así la transcripción de genes blanco. Recientemente se ha observado que estos receptores interactúan con cofactores que: 1) pueden aumentar o disminuir la transcripción y 2) unir al receptor con los factores generales de transcripción y la RNA polimerasa II (Prieto et al., 2003; Burris y McCabe, 2001) (Fig. 3)

MECANISMO DE ACCION CLÁSICO DE LA PROGESTERONA

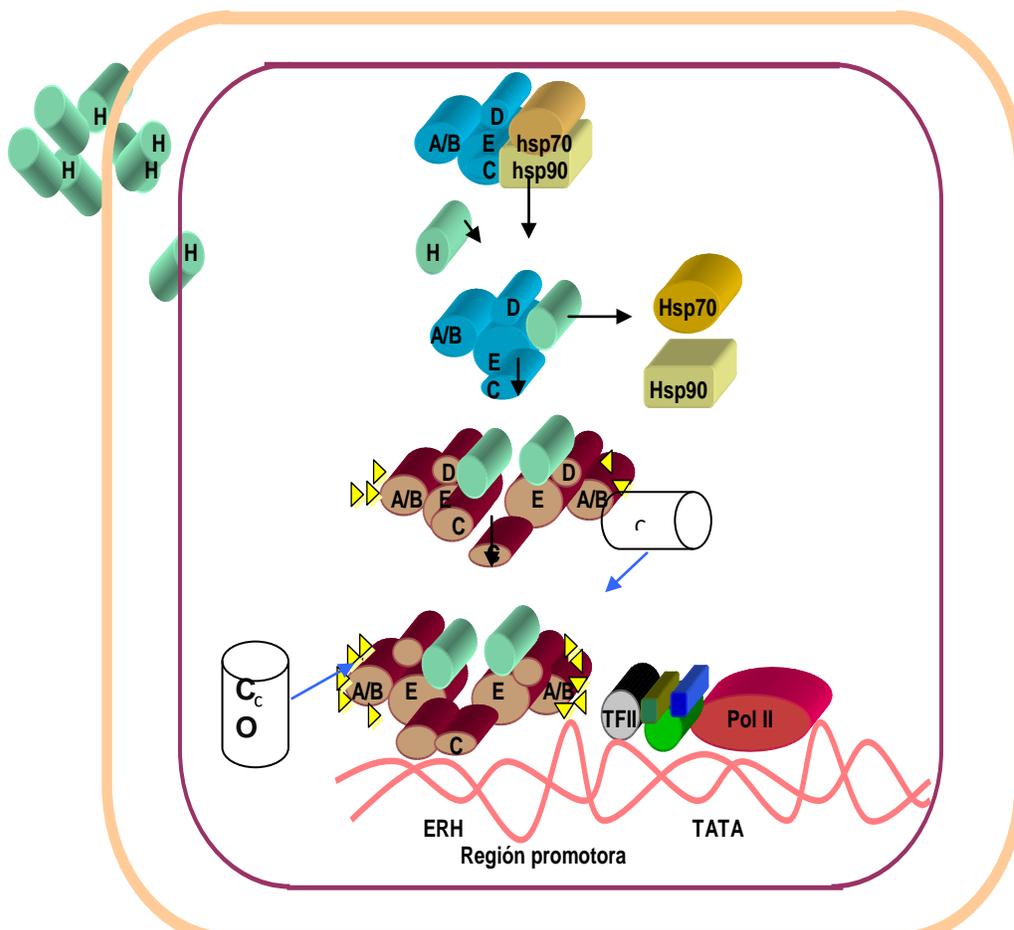


Fig 3. Mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides. El receptor a hormonas esteroides (A/B, C, D, E) se encuentra en un estado de inactivación, unido a proteínas de choque térmico (Hsp). La hormona (H) atraviesa la membrana plasmática y la envoltura nuclear e interactúa con su receptor, se liberan las Hsp, el receptor se dimeriza, se une a elementos de respuesta hormonal (ERH) y recluta a cofactores y a la maquinaria basal de transcripción.

Además de los efectos genómicos, las hormonas esteroideas son capaces de inducir la activación de diversas rutas de señalización celular que puede ocurrir en segundos o minutos después de la administración de las mismas (Díaz, 2001; Heldring, et al., 2007). Estos mecanismos *no genómicos* pueden iniciarse en la membrana o en el citoplasma e incluyen activación de cinasas y fosfatasa que incrementan el flujo de iones a través de la membrana plasmática. Los receptores de membrana producen efectos no genómicos inmediatos desencadenando diferentes cascadas de señalización, de tal forma que las modificaciones en la transcripción moduladas por los receptores nucleares, puede ser regulada positiva o negativamente por los segundos mensajeros dependientes de la activación de receptores membranales (Díaz, 2001). Los más conocidos de estos mecanismos son: la activación de la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y la vía de la proteína cinasa B (Akt, por sus siglas en inglés)/Inositol trifosfato cinasa (PI3-K, por sus siglas en inglés). La primera conduce a un incremento en la fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares 1 (ERK1, por sus siglas en inglés) importante para regular la supervivencia celular (Díaz, 2001). La segunda vía implica la fosforilación de Akt por medio de PI3-K, cuya activación es crucial para el efecto protector del estradiol contra excitotoxicidad por glutamato, así como protección de muerte celular inducida por acumulación de β -amiloides en células de hipocampo (Dhandapani y Brann, 2002).

2.1.3 Efecto de las hormonas esteroideas sobre el Sistema Nervioso Central

El E_2 y la P_4 están involucradas en la regulación de la morfología y la función neuronal en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se ha observado que durante el ciclo estral, el número de espinas dendríticas presenta una disminución del 30% en el día del estro respecto al día del proestro en la región CA1 del hipocampo de la rata, cuando las concentraciones de E_2 y P_4 son mayores durante el ciclo (Gould y Woolley, 1990). Estas modificaciones específicas en la morfología neuronal, involucran cambios en las proteínas de citoesqueleto que se conoce tienen una participación importante en la formación de axones y dendritas como son las proteínas Tau y MAP2. Estudios *in vitro* utilizando cultivos primarios de neuronas de hipocampo han mostrado que el E_2 aumenta el número de ramificaciones dendríticas

(Audersik et al., 2003) así como se ha observado un aumento en la expresión de MAP2 (Shah et al., 2003). En cultivos primarios obtenidos de neuronas de la amígdala de la rata, se ha observado que el E₂ aumenta la inmunopositividad a MAP2 (Lorenzo et al., 1992).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la neuroprotección inducida por estrógenos. Los más conocidos de estos mecanismos son la activación de la vía de señalización MAPK y la vía de Akt, /PI3-K.

El E₂ y el receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I) cooperan en el SNC para regular el desarrollo y la plasticidad neuronal, eventos neuroendocrinos y respuestas a daños en tejidos neuronales. Se ha observado que en el hipocampo de ratas hembras la expresión y función de los receptores a estrógenos y del receptor de IGF-I en el cerebro, es por medio de regulación cruzada (Cardona-Gomez et al., 2004).

Los hallazgos en investigación básica que proveen la relación más fuerte de un efecto benéfico de los estrógenos sobre las capacidades cognitivas en mujeres, incluyen su habilidad para incrementar las espinas dendríticas en el hipocampo, su habilidad para incrementar la concentración de colin-acetil-transferasa (ChAT) y sus numerosos efectos neurotróficos (Sherwin, 2006), así como su capacidad para proteger contra un amplio rango de daños tóxicos incluyendo la producción de radicales libres (McEwen, 1999; Díaz, 2001; Dubal, 2001), excitotoxicidad y toxicidad generada por β -amiloide (Díaz, 2001; Villarroja-Pastor, 2001; Wise et al, 2001) e isquemia.

Diferentes ensayos clínicos han sido desarrollados (Díaz, 2001; Sherwin, 2006; Vearcombe, 2009). El más conocido es la iniciativa de salud de la mujer de los institutos nacionales de salud (WHINIH, por sus siglas en inglés), la cual evalúa el papel de la terapia de reemplazo hormonal (TRH) a largo plazo (con seguimiento a seis años) sobre los síntomas y la progresión de la Enfermedad de Alzheimer (EA) en mujeres de 50-79 años; sus resultados permitieron concluir que los estrógenos son neurotróficos y neuroprotectores contra daños tóxicos asociados con EA en neuronas del cerebro basal anterior, hipocampo y corteza (Díaz, 2001).

Por otra parte se sabe que la P_4 y sus metabolitos regulan el desarrollo sináptico, plasticidad y función del cerebelo (Smith et al., 1987; Smith, 1989, 1991; Sakamoto et al., 2001, 2002; Tsutsui et al., 2004) del hipotálamo (Perez et al., 1993; Garcia-Segura et al., 1994) y del hipocampo (Woolley y McEwen, 1993), así como otras zonas cerebrales. Además, están involucrados en la diferenciación de neuronas y células gliales y en la formación de mielina (Baulieu y Scumacher, 2000; Tsutsui et al., 2004; Schumacher et al., 2004; Ghoumari et al., 2005). La P_4 y sus metabolitos también tiene efectos analgésicos (Patte-Mensah, et al., 2005) y anestésicos (Selye, 1941) e influencia en el sueño y en el hambre (Engel y Grant, 2001).

En explantes corticales de cerebro de ratón, la P_4 aumenta la fosforilación de Akt y de ERK (Singh, 2001). En cultivos de neuronas del hipocampo, la P_4 promueve una activación rápida y transitoria de ERK e induce su translocación al núcleo de la célula con lo cual atenúa la exotoxicidad producida por el glutamato (Nilsen y Brinton, 2003). La activación de PI3K y la señalización de MAPK son necesarias para la manifestación de efectos neuroprotectores de la P_4 *in vitro* (Nilsen y Brinton, 2003; Kaur et al., 2007).

2.2 Climaterio y Menopausia

El climaterio o perimenopausia comienza varios años antes de que se produzca la menopausia, incluye el período inmediatamente anterior a la menopausia (cuando comienzan las manifestaciones endocrinológicas, biológicas y clínicas), y como mínimo se prolonga hasta el primer año siguiente a la menopausia (Genazzani et al., 1996).

La Organización Mundial de la Salud define a la menopausia como “el cese permanente de la menstruación”, se debe a la pérdida de la función folicular ovárica y el diagnóstico se hace en forma retrospectiva después de un período de amenorrea de 12 meses (Trevoux, et al., 1986).

El momento de presentación de la menopausia está determinado genéticamente y ocurre a una edad promedio de 51 años. Por lo que, tomando en cuenta la esperanza de vida de la

población, significaría que este periodo puede constituir más del 33% del promedio de vida de la mujer debido al incremento de la longevidad (Trevoux et al., 1986). Durante este periodo las mujeres son vulnerables a trastornos por deficiencia de estrógenos (Hurd et al., 2004), los cuales tienden a ser crónicos más que agudos. Por este motivo, la TRH es una de las preocupaciones primarias de muchos servicios de atención médica.

2.2.1 Endocrinología del climaterio, la menopausia y la postmenopausia

Durante la transición de la etapa reproductiva a la no reproductiva, la mujer experimenta una serie de eventos, los cuales se inician varios años antes de que ocurra la menopausia. Alrededor de los 35 años, antes de cualquier alteración del ciclo menstrual y de las variaciones detectables en las concentraciones de E_2 , comienza a elevarse la hormona folículoestimulante (FSH) en la fase folicular temprana (Oldenhave et al, 1994). Generalmente después de los 40 años la fase folicular del ciclo se acorta, los niveles de E_2 , inhibina y de folículoestatina disminuyen y los de la FSH comienzan a elevarse. Posteriormente los niveles de la hormona luteinizante (LH) también aumentan aunque en menor proporción que la anterior (Al Azzawi, 1992; Khaw, 1992; Rozenberg et al., 1988). Los folículos disminuyen y es más frecuente la ovulación prematura y la fase lútea insuficiente con disminución de la producción de P_4 , lo que produce un exceso de estrógenos en relación a la hormona anterior (Rozenberg, et al.; 1988). Cerca de la menopausia, los ciclos menstruales a menudo presentan anovulación intermitente, los niveles de las gonadotrofinas son erráticos y es frecuente el hiperestrogenismo relativo con disminución de la P_4 . Clínicamente esto se manifiesta con sangrados vaginales irregulares, pueden existir períodos de amenorrea con valores de FSH y LH elevados, similares a los hallados en la menopausia, pero cuando se produce la ovulación, los niveles hormonales pueden volver a límites normales (Rozenberg et al., 1982; Dawood, 1993; Upton, 1982; Metcalf et al., 1982).

Finalmente, los folículos ováricos dejan de responder a las FSH y LH; el E_2 desciende a menos de 20 pg/mL, la P_4 es indetectable y clínicamente hay cese de la menstruación.

Algunos autores consideran que estos cambios corresponden a tres fases caracterizadas por una serie de cambios hormonales (Sowers et al.; 1995) (Tabla 2).

Tabla 2 Cambios endocrinológicos durante la menopausia (Tomado de: Canto de Cetina et al; 1996)

EVENTO	FASE I	FASE II	FASE III
FSH	Ligera elevación	Continúa elevándose	Elevada
LH	Niveles normales	Normal o lig. elevada	Elevada pero < q.FSH
Estrógenos	Disminuyen, pero en relación a la progesterona están elevados.	Exceso pero en relación a la progesterona	< 20 pg/ml
Progesterona	Comienza a disminuir	Continúa disminuyendo	Indetectable
Ciclos Menstruales	Normales o irregulares	Irregulares, sangrados frecuentes	Amenorrea
Ovulación	Normal o prematura	Errática, anovulación frecuente	Ninguna

Después de la menopausia los valores de LH y FSH permanecen elevados, aunque siempre con predominio de la segunda, cuya concentración puede ser hasta 10 a 15 veces mayor que la reportada en una fase folicular normal, en tanto que la LH se eleva en menor grado y más tardíamente ya que generalmente alcanza su pico 2 a 3 años después del cese de la menstruación (Vegakis, 1989; Chakravarti, 1976). Ambas permanecen elevadas por un tiempo variable que puede ser hasta de 20 años (Oldenhave et al., 1994). Después de la menopausia cambia el origen y la naturaleza del estrógeno circulante, ya que durante la vida reproductiva predomina el E₂ y en la postmenopausia la estrona. El primero es producido por el ovario y la segunda proviene en su mayoría de la conversión periférica de los precursores androgénicos en el tejido adiposo, músculo e hígado (Al Azzawi, 1992; Nordin et al., 1981; Speroff et al., 1989).

El ovario postmenopáusico no es un órgano inactivo ya que continúa produciendo tanto estrógeno como androstendiona, aunque en cantidades mínimas. Estudios clínicos sugieren que del 20 al 50 % de las mujeres postmenopáusicas tienen niveles de estrógenos indicativos de actividad folicular durante los primeros 6 a 12 meses después del cese de la

menstruación (Al Azzawi, 1992; Khaw, 1992) y se estima que el 10% de las mujeres pueden continuar presentando frotis estrogénico hasta 10 años después de la menopausia (Grattarola et al., 1969). La androstendiona disminuye y los niveles circulantes de esta hormona se reducen casi a la mitad. Por el contrario, la testosterona plasmática varía poco. De hecho, el ovario postmenopáusico, en la mayoría de las mujeres, secreta más testosterona, ya que con la desaparición de los folículos y del estrógeno, las gonadotrofinas elevadas estimulan el estroma ovárico para aumentar la secreción de testosterona (Oldenhave, 1994; Speroff, 1989).

2.2.2 Síntomas del Climaterio

El climaterio se asocia con signos y síntomas típicos relacionados con la deficiencia de estrógenos (Jazsman et al., 1969; Semens, 1982), tales como amenorrea, bochornos, períodos de sudoración y sequedad vaginal. Pueden presentarse otras condiciones como alteraciones psicológicas, emocionales y psicosomáticas, no asociadas al hipoestrogenismo (Greene, 1984).

Se ha sugerido que existe una variación cultural en la presencia de estos síntomas, ya que se han reportado en el 75 a 80% de las mujeres occidentales, en tanto que en otras culturas la frecuencia es mucho menor. No se sabe si esta variación se debe a diferencias en la fisiología o en la percepción que tienen las mujeres de sus síntomas (tabla 3).

2.2.3 Terapia de Reemplazo Hormonal

Algunos investigadores han considerado la deficiencia de estrógenos como un estado fisiológico más que patológico, probablemente porque la insuficiencia ovárica es un problema que se encuentra establecido de manera genética. Sin embargo, al aumentar la esperanza de vida de las mujeres, el impacto negativo de la deficiencia prolongada de estrógenos se vuelve más importante. Además de tener amplia aplicación en la terapéutica de síntomas asociados con este proceso tales como osteoporosis, síntomas vasomotores y prevención de la enfermedad cardiovascular, algunos estudios retrospectivos han sugerido

que los estrógenos ejercen efectos benéficos en la esfera cognitiva y en el retraso del inicio de la EA (Loose y Stancel, 2003).

Tabla 3. Signos y síntomas del climaterio

TÍPICOS:
Amenorrea
Bochornos
Crisis de sudoración
Alteraciones del tracto genitourinario:
Vulva: atrofia y prurito
Vagina: atrofia, dispareunia, vaginitis, sequedad
Uretra y vejiga: disuria, infecciones frecuentes, uretritis.
GENERALES:
Alteraciones psicológicas
Alteraciones emocionales
Alteraciones psicósomáticas

En la actualidad se recomienda la TRH tanto con un estrógeno como con un progestágeno para la mayoría de las mujeres posmenopáusicas (Loose y Stancel, 2003). Se han utilizado varios regímenes de reposición de hormonas el más utilizado actualmente es el denominado cíclico, con la administración de un estrógeno durante 25 días, la inclusión de medroxiprogesterona (MPA) durante los últimos 10 -13 días del tratamiento con estrógenos y 5-6 días sin hormonoterapia, durante los cuales normalmente sobreviene hemorragia por supresión. La inclusión del progestágeno que se administra sólo durante un segmento de cada ciclo terapéutico disminuye eficazmente la hiperplasia endometrial y la incidencia de carcinoma endometrial (Loose y Stancel, 2003; Singh, 2005). Cabe señalar que la MPA antagoniza los efectos de los estrógenos sobre el endometrio mientras que la P₄ no lo hace (Singh, 2005).

Otra consideración farmacológica es la vía de administración de los hormonales. La administración oral expone al hígado a concentraciones altas de estrógenos por medio de la circulación porta y causan conversión más rápida del estradiol o estrógenos conjugados equinos. Además, los estrógenos por vía oral pueden incrementar la globulina transportadora de esteroides sexuales. Esos dos efectos se aminoran con el estradiol por vía transdérmica (Loose y Stancel, 2003).

En general, se consideran más los beneficios que los riesgos por lo que se ha continuado la búsqueda por crear regímenes que proporcionen las acciones benéficas de los estrógenos sin sus efectos colaterales que pueden limitar el apego a la prescripción por parte de algunas pacientes (Loose y Stancel, 2003).

2.3 Tibolona

La Tibolona (Fig. 4) es un fármaco usado como tratamiento completo de primera elección para el alivio de los síntomas climatericos y la prevención de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas.

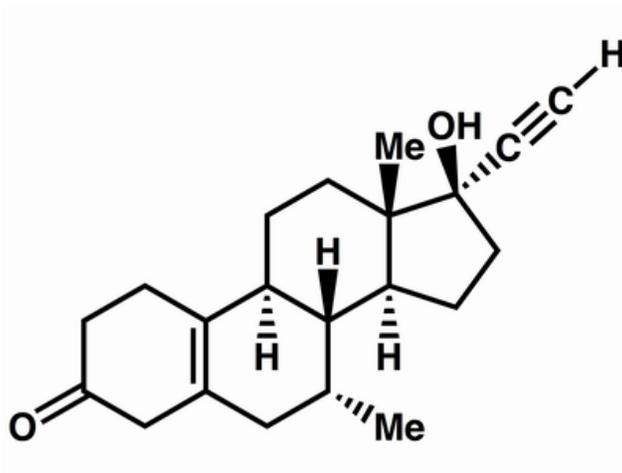


Fig 4. Estructura química de la Tibolona

Este fármaco fue sintetizado por primera vez a finales de los 1960s y sus propiedades probadas a principios de los 1970s. Varias pruebas biológicas, basadas en su estructura, revelaron que posee propiedades estrogénicas, progestagénicas y androgénicas. Sin embargo, su actividad estrogénica no era esperada por la falta de características estructurales esenciales, como un anillo aromático A y un grupo de compuesto fenólico C3 (Reed y Kloosterboer, 2004).

Este fármaco, principio activo del medicamento Livial®, tuvo su desarrollo clínico en los tardíos 1970s e inicialmente enfocado a la prevención de pérdida ósea. El primer estudio clínico en mujeres posmenopáusicas por Lindsay y cols. (1981) demostraron el efecto

positivo en los huesos pero, adicionalmente, parecía que, si bien la Tibolona alivia síntomas climatéricos, los efectos estrogénicos sobre el endometrio no se observaron. Estos hallazgos iniciaron nuevas investigaciones en el campo de los síntomas climatéricos y la prevención de la osteoporosis (Reed y Kloosterboer, 2004).

A la fecha, la Tibolona está registrada en 89 países para aliviar los síntomas del climaterio y en 45 para la prevención de la osteoporosis.

2.3.1 Propiedades químicas de la tibolona

La Tibolona [(7 α , 17 α)-17-hidroxi-7-metil-19-norpregn-5(10)-en-20-in-3-ona] es un esteroide estructuralmente relacionado con derivados de la 19-nortestosterona como el noretinodrel y la noretisterona (Fig. 5) que tiene una ligera afinidad a los receptores a estrógenos (RE), a los receptores de andrógenos (RA) y a los receptores a P₄ (RP), y por ello presenta triple actividad hormonal (Blom, M.J. et al., 2001).

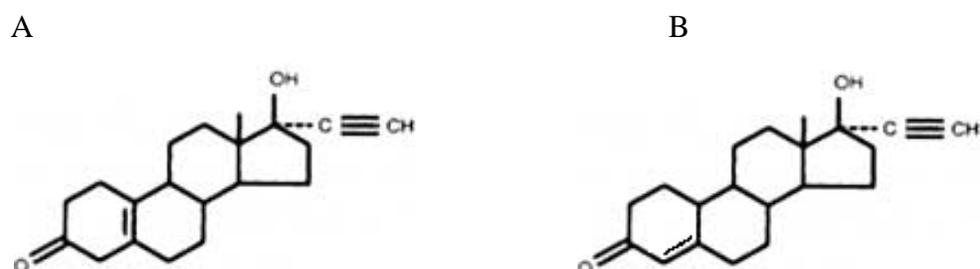


Fig.5. Estructura química del noretinodrel (A) y de la noretisterona (B)

Estructuralmente es diferente a los moduladores selectivos del receptor a estrógenos; (SERMs por sus siglas en inglés), con una configuración 3-ceto- Δ^5 -10 con dos sustituyentes, un grupo α metilo en la posición 13, así como un α 17 -etilo (Reed y Kloosterboer, 2004).

El metabolismo de la Tibolona se realiza rápidamente originándose a 3 -hidroxi-Tibolona (3 α -OH Tibo) y 3 β -hidroxi-Tibolona (3 β -OH Tibo) en las formas sulfatadas e inactivas; a partir de ellas o directamente de la Tibolona se produce un tercer compuesto que es el Δ^4

isómero (Blom et al., 2001). Los isómeros α y β tienen una gran afinidad por los RE mientras que el Δ^4 sólo tiene afinidad por el RA y el RP (Figura 6).

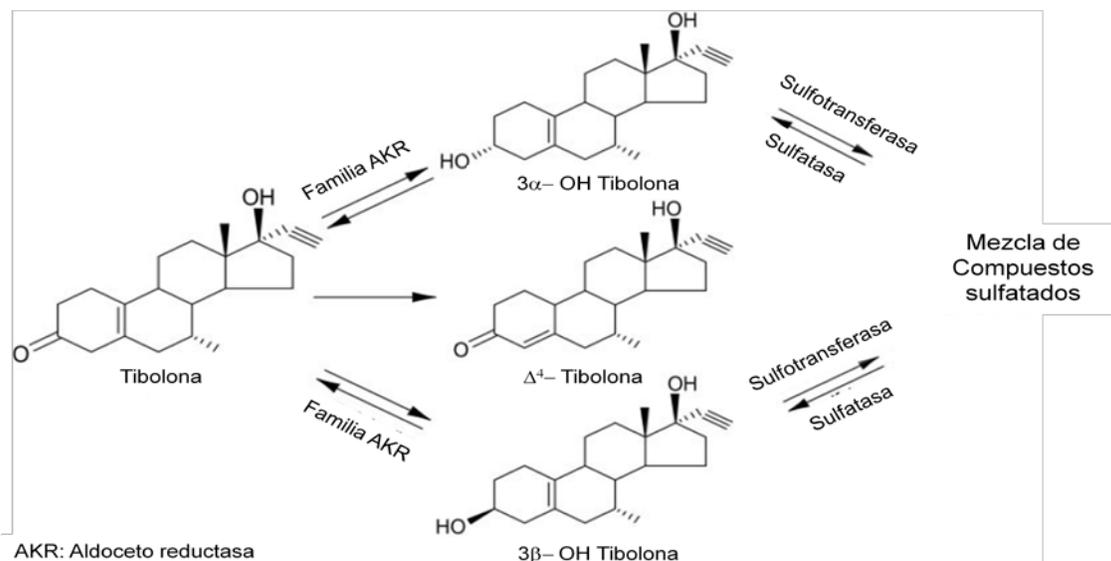


Fig. 6. Estructura química de los metabolitos de la Tibolona

La Tabla 4 nos muestra la afinidad relativa de la Tibolona y sus metabolitos con los RE y RP.

Tabla 4. Afinidad relativa para el RE y RP para Tibolona y sus metabolitos. Adaptado de Markiewicz y Gurpide, 1990

Esteroides	Afinidad relativa (%)	
	RE (E ₂ =100%)	RP (Org 2058=100%)
Tibolona	<1	1
Δ^4 Tibolona	<1	10
3 α - OH Tibolona	2	No unión
3 β -OH Tibolona	2	No unión

El efecto biológico de la Tibolona se determina directamente por la característica y capacidad química de cada tejido, así como con el contenido de RE, RP y RA. Es decir los

SERMs regulan la actividad de los RE, en cambio la acción de la Tibolona se modula específicamente en los tejidos (Blom et al., 2001).

2.3.2 Mecanismo de acción de la tibolona

La Tibolona tiene efectos estrogénicos, progestagénicos y androgénicos. Además, reduce a nivel central, los niveles de la FSH y la LH (Reed y Kloosterboer, 2004).

El efecto hormonal que produce este esteroide depende del tejido en el que actúe, es decir en unos tejidos actuará como un estrógeno y producirá efectos agonistas estrogénicos, y en otros actuará como un progestágeno o como un andrógeno y producirá los correspondientes efectos hormonales. Su perfil de acción resultará de la suma de sus distintos efectos hormonales en los diferentes órganos y tejidos en los que actúa. Es por esto por lo que se dice que la Tibolona es una molécula de acción tejido específica. De este modo, su acción es estrogénica en el hueso, la vagina y el cerebro; por otra parte el efecto es progestacional sobre el endometrio y androgénico sobre el hígado.

La Tibolona tiene un efecto similar a los estrógenos al disminuir los bochornos y otros trastornos climatéricos. Además, ejerce efectos similares a los estrógenos sobre la vagina y los huesos. Debido a sus efectos progestagénicos, no estimula el endometrio. Por lo tanto si se produce sangrado, éste por lo general se debe a un endometrio atrófico (Reed y Kloosterboer, 2004).

En el caso de la mama, se reportó que la Tibolona aumentó la expresión de los RP A y RP B sin afectar al RE α y al RE β en los senos de macacos. Estos resultados indican que los efectos de la Tibolona en el tejido mamario puede ser mediada a través de la regulación diferencial de las isoformas del RP-A y RP-B y por lo tanto distintas de las observadas con la TRH convencional (Ma et al., 2008).

Se tenía evidencia de que la Tibolona aumenta la densidad ósea (Bjarnason et al., 1996), pero se tenía duda si reducía el riesgo de fracturas atribuibles a osteoporosis. Gallagher

(2001) reportó que el uso de Tibolona en dosis de 2,5 mg produjo un aumento de la densidad ósea en columna lumbar de 2,6% respecto al basal y en cadera total aumentó más de 2% con Tibolona 2,5 mg, en tanto que con placebo se redujo 1,5. Lamentablemente no se mencionó la precisión de los resultados (IC 95%) y a pesar del seguimiento relativamente breve se perdió el 20,8% de la muestra. Por otro lado, en un estudio aleatorio de 4538 mujeres, que estaban entre las edades de 60 y 85 años, la Tibolona redujo el riesgo de fracturas y de cáncer de mama y cáncer de colon, pero aumentó el riesgo de accidente cerebrovascular en mujeres ancianas con osteoporosis (Cummings et al., 2008).

Por último, la Tibolona tiene efectos sobre algunos parámetros metabólicos y hematológicos, tales como una disminución plasmática del colesterol en lipoproteínas de la sangre. La implicación clínica del efecto de la Tibolona sobre el metabolismo de los lípidos y la hemostasia no está clara. Hasta la fecha no se han podido obtener conclusiones definitivas con respecto a los riesgos de enfermedad cardiovascular o tromboembolismo venoso así como los efectos a largo plazo (Garefalakis et al., 2008).

2.3.3 Absorción, biotransformación y excreción

Después de la administración oral, la Tibolona es rápidamente absorbida y distribuida. Debido a su rápido metabolismo en el intestino los niveles plasmáticos de Tibolona son muy bajos (Verheul et al., 2007).

Los datos farmacocinéticos indican cinéticas lineales. Los niveles plasmáticos máximos se alcanzan después de 1-4 horas, posteriormente se metaboliza en el hígado y no se produce acumulación. La Tibolona y el Δ^4 isómero sólo están presentes durante las primeras 6 horas tras la ingesta oral (Verheul et al., 2007).

En mujeres posmenopáusicas se reportó que el 98% de los metabolitos con actividad estrógenica se encuentran en forma disulfurada en suero y tejidos. De los metabolitos conjugados, el 3 α -hidroxi-Tibolona predomina en el suero, mientras que el Δ^4 Tibolona predomina en miometrio y la vagina. Los niveles de metabolitos disulfatados en el suero y

tejidos son de 3 a 5 veces más altos después de dosis múltiples que después de una dosis única (Verheul et al., 2007).

La excreción de Tibolona se produce principalmente en la forma de metabolitos polares. Una pequeña cantidad del compuesto administrado es excretada en la orina, pero la mayor parte es eliminada vía biliar y por las heces. En total la vida media de depuración es cercana a 48 horas. (Verheul et al., 2007).

2.3.4 Efectos de la Tibolona en Sistema Nervioso Central

Como se hizo referencia anteriormente, el primer estudio clínico en mujeres posmenopáusicas por Lindsay y cols (1981) demostró además del efecto positivo en los huesos, la propiedad de aliviar síntomas climatéricos (Reed y Kloosterboer, 2004). Los efectos sobre el hueso, las sudoraciones y los bochornos son similares a los observados para los tratamientos con estrógenos, por el contrario la Tibolona puede mejorar la libido de manera más eficaz que la terapia de reemplazo estrogénica (TRE) (Garefalakis y Hickey, 2008).

En otro estudio, animales ovariectomizados en la misma especie, los niveles cerebrales de los metabolitos de la Tibolona se midieron tras recibir Tibolona durante 36 días. En comparación con el suero, se encontraron altos niveles de los metabolitos estrogénicos así como del Δ^4 -Tibolona y menores niveles de metabolitos sulfatados en diversas regiones cerebrales. Los altos niveles de metabolitos estrogénicos en el hipotálamo podrían explicar la reducción de sofocos (Verheul y Kloosterboer, 2006).

En cuanto a la memoria, se reportó que ratas viejas ovariectomizadas (OVX) tratadas con una dosis de 1 mg/kg de Tibolona y evaluadas en la prueba del laberinto elevado, pasaron más tiempo en los brazos abiertos que los animales tratados con placebo. Por otro lado las ratas con OVX simulada y tratadas con una dosis de 0.5 mg/kg de Tibolona, así como las ratas jóvenes OVX tratadas con Tibolona tuvieron un peor desempeño comparados con los otros grupos en el laberinto de agua (De Aguilar et al., 2006).

Se ha reportado que el tratamiento crónico (dos años) con Tibolona a monos *Cynomologous* OVX produjo reducciones significativas tanto en la acetilcolintransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE) en el septo medial / banda diagonal de Broca, y este efecto fue dosis-dependiente (Gibbs et al., 2002). Eso nos indica que los efectos en los procesos cognoscitivos de la Tibolona, probablemente no sean debido a un efecto sobre la ChAT y AChE (Qiu et al., 2008).

En estudios hechos en humanos, se ha reportado que en mujeres premenopáusicas, la administración de Tibolona revierte el daño sobre la cognición que es causado por el acetato de leuprolide, y mejora el humor y la calidad de vida en pacientes que reciben este agonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para el tratamiento de leiomiomas uterinos (Palomba et al., 2008).

Por otra parte, se ha reportado en estudios donde se analizaron efectos cognitivos después de 10 años de tratamiento con diferentes TRH, que después de la exposición a una prueba de estrés leve, el grupo control se sentía más ansioso que el grupo tratado con Tibolona. El grupo que tomaba Tibolona tuvo mejor respuesta en las pruebas de memoria semántica (memoria para los hechos), evaluados en una tarea de la generación de categoría, pero que no difirieron en las pruebas de memoria episódica (memoria de eventos). En ese mismo estudio se reporto que el grupo de Tibolona tuvo peores resultados en una tarea de atención sostenida y una tarea de planificación, tareas que están asociadas con la función del lóbulo frontal (Fluck et al., 2002).

2.4 MEMORIA Y APRENDIZAJE

El aprendizaje y la memoria son procesos correlacionados capaces de sufrir modificaciones en función de los estímulos ambientales (Machado et al., 2008).

El *aprendizaje* se define como el proceso por el cual los organismos modifican su conducta para adaptarse a las condiciones ambientales del medio que los rodea, puede considerarse como una cambio en el sistema nervioso que resulta de la experiencia y que origina

cambios duraderos en la conducta de los organismos (Tulving, 2000; Correa, 2007). No se consigue separar el aprendizaje de la memoria, ni resulta posible realizar dicha distinción dentro del circuito neuronal. La medida de lo aprendido se relacionaría con la memoria, siendo ésta la expresión de la capacidad de retener y posteriormente recuperar informaciones adquiridas. Así, un recuerdo sería un patrón de actividad de un gran número de neuronas evocado por un estímulo. Se puede definir el concepto de *memoria* como “la retención a largo plazo de representaciones internas dependientes de la memoria”. Desde una descripción de la organización de la memoria, ésta representa el conjunto de estructuras y procesos cognitivos que permite fijar, guardar y recuperar diferentes tipos de información (Correa, 2007; Machado et al., 2008; Navarrete, 2008; Llorente-Vizcaíno et al., 2001).

Todo proceso mnemónico comienza con la *adquisición*, que consiste en la entrada de un suceso en el circuito neuronal ligado a la memoria. Tras la adquisición estos sucesos se almacenan por un tiempo, que puede oscilar entre algunos segundos a varios años. Este fenómeno se denomina *retención* (Machado, 2008).

2.4.1 APRENDIZAJE: Modelos condicionantes.

El aprendizaje no es un proceso único, sino que tiene dos formas principales: una forma *explícita* que se relaciona con los procesos cognitivos y una forma *implícita* relacionada con los procesos motores o el aprendizaje verbal, sin ser dependiente de los procesos cognitivos. La forma implícita puede ser *no asociativa* o *asociativa*. En la primera, la respuesta a un estímulo se produce en función del tiempo y se observa a través de comportamiento. Existen dos tipos de aprendizaje no asociativo: *habitación* y *sensibilización*. La habituación se entiende como la reducción de la eficiencia del estímulo que, por no ser significativo, conduce a ignorarlo. Se supone que tal fenómeno es el resultado de la disminución de la cantidad de glutamato liberado y la reducción de la capacidad de las vesículas. La sensibilización es la intensificación de la respuesta en función de un fuerte estímulo capaz de producir incluso la percepción de estímulos que, anteriormente al hecho, se consideraban débiles. Esta última puede durar minutos, días o incluso semanas y se considera modulada por un reforzamiento en la liberación de

neurotransmisor en las neuronas facilitadoras (algunas de las cuales son serotoninérgicas) (Machado et al., 2008).

El aprendizaje asociativo, se denomina como la forma en que los seres vivos adquieren conocimiento acerca de la causalidad de un evento, es decir, la relación entre estímulos y respuestas (Correa, 2007). Se caracteriza por asociaciones entre hechos (Machado, 2008). En términos simples, dentro de este contexto se encuentran tres variantes experimentales: *condicionamiento clásico*, *condicionamiento instrumental* (operante) y *transferencia pavloviana-instrumental* (Correa, 2007).

2.4.2 Condicionamiento clásico pavloviano.

En el condicionamiento clásico se produce la relación estímulo-respuesta, donde el primer estímulo evoca una respuesta que se puede medir de forma diferente a aquella que se produce como resultado de la aplicación del segundo estímulo. El primero es el estímulo incondicionado (EI), que no requiere entrenamiento o preparación anticipada a la respuesta; el segundo es la estimulación condicionado (EC) que necesita del entrenamiento específico sobre la acción motora pretendida (Machado, 2008). Este tipo de condicionamiento fue originalmente descrito por Pavlov: la presentación de un EI que produce una respuesta refleja, típica de la especie o respuesta incondicionada (RI), con un estímulo neutro que más tarde será el EC, hace que éste vaya adquiriendo propiedades condicionadas por asociación y así el EC produce, con el tiempo, el mismo tipo de respuesta refleja, ahora condicionada (RC), que el estímulo originario (EI). La RC es ahora una respuesta anticipada a la presentación del EI, dado que el organismo es capaz de determinar una relación predictiva entre el EC y el EI. Asimismo, cuando ya se ha establecido el condicionamiento, la presentación repetida del EC sin que éste haya seguido del EI tiene como consecuencia la desaparición gradual de la RC, fenómeno conocido como “*extinción*” (Correa, 2007)

Las bases neuroanatómicas propuestas para este tipo de aprendizaje son las estructuras que componen el haz prosencefálico medial, un conjunto de axones que, partiendo del mesencéfalo, proyectan a lo largo del eje rostro-caudal hasta el prosencéfalo basal rostral (Correa, 2007)

En el tipo de aprendizaje pavloviano con componente emocional se sabe que depende de la amígdala. Para que se produzca este tipo de condicionamiento, las vías que transmiten la información del EC tienen que converger en los núcleos basolaterales y núcleo central de dicha estructura, implicando también a los núcleos geniculados mediales e interlaminares del tálamo. El núcleo central, con sus proyecciones colinérgicas hacia la corteza, facilita el establecimiento de circuitos neurales sensibles al EC (Correa, 2007).

2.4.3 Condicionamiento instrumental u operante.

El condicionamiento instrumental u operante se describe por “la ley del efecto” (Correa, 2007), es la asociación de un comportamiento particular a un estímulo significativo, una relación estímulo-comportamiento orgánico donde el acto motor es consecuencia de una respuesta neurofisiológica a un suceso (Machado, 2008). La concepción de aprendizaje instrumental de Skinner también implica un reforzamiento pero en este caso, de las relaciones entre la respuesta y sus consecuencias. Skinner definió un reforzador (Rf) como una consecuencia (estímulo o actividad), que al seguir a la conducta instrumental, aumenta la probabilidad de que dicha conducta se repita en el futuro y, por tanto, el refuerzo aumentará la probabilidad de ocurrencia de cualquier respuesta instrumental que se dé justo antes de que aparezca el reforzador. Así pues, el condicionamiento instrumental es una forma de aprendizaje asociativo entre la realización de una conducta o respuesta (R) que, operando con el ambiente, sirve como el instrumento para la obtención de un Rf. Un Rf es un estímulo o actividad que incrementa la probabilidad de que se dé la R asociada a él, éste puede ser aversivo (Rf negativo) o apetitivo (Rf positivo). Se trata de un condicionamiento flexible (a diferencia del clásico pavloviano) en el cual el individuo actúa en función de las consecuencias de su conducta. La adquisición de una conducta instrumental dirigida a una meta (que es el Rf) implica dos formas de aprendizaje: el primero, aprender sobre la relación instrumental entre R-Rf y el segundo, aprender el valor del incentivo del propio Rf. (Correa, 2007).

Las diferencias más claras entre el condicionamiento clásico y el instrumental radican en que la RI, que más tarde se condiciona, en el clásico es una respuesta automática (refleja),

mientras que en el condicionamiento instrumental el organismo emite una respuesta voluntaria para conseguir un Rf (Correa, 2007).

El sustrato neural que se ha estudiado en relación con el proceso de refuerzo se ha centrado en las estructuras que comprenden el haz proscencefálico medial, un grupo de axones que partiendo del mesencéfalo, proyectan a lo largo del eje rostro- caudal hasta el prosencéfalo basal rostral. Estas neuronas dan lugar a los sistemas dopaminérgicos mesolímbicos (Área Tegmental Ventral-núcleo acumbens/amígdala/hipocampo, entre otros), mesocortical (Área Tegmental ventral-neocórtex prefrontal/corteza cingulada/hipocampo) y nigroestriatal (sustancia negra compacta-neoestriado). Se ha sugerido que la transmisión dopaminérgica en la corteza prefrontal-medial y en el núcleo acumbens es crucial para la adquisición de conductas instrumentales ya que la presentación de reforzadores primarios elevan los niveles de dopamina (DA) en ambas regiones (Correa, 2007).

2.4.4 Transferencia pavloviana instrumental.

Dado que una R automática puede conllevar a una consecuencia positiva o negativa para el sujeto, todos aquellos estímulos asociados pavlovianamente (EC) a la emisión de la R también quedarán asociados a la consecuencia de la emisión de ésta. Esta asociación llevará a que, en sucesivas ocasiones, el sujeto, ante la presencia de los EC, además de realizar la R refleja, llevará a cabo respuestas aproximatorias a éste en un intento por acercarse hacia la obtención del Rf y de las consecuencias emocionales que éste produce. Así, estos EC se convierten en incentivos que también son capaces de actuar como Rf secundarios promoviendo la R instrumental.

Las bases neuroanatómicas implican redes neurales corticosubcorticales que incluyen la corteza cingulada anterior, la parte central del núcleo acumbens, el núcleo central de la amígdala y el sistema mesolímbico de la dopamina (DA) (Correa, 2007).

Otros tipos de aprendizaje también implicados en este estudio son el aprendizaje motor y de destrezas y el aprendizaje de hábitos.

2.4.5 Tipos y características de los sistemas de memoria.

La memoria es un proceso que depende de diferentes sistemas cerebrales. La distinción principal habría que hacerla entre la capacidad de recuperar conscientemente hechos (*memoria declarativa o explícita*) y un conjunto heterogéneo de capacidades de aprendizaje no conscientes (*memoria no declarativa o implícita*) que sólo se expresan a través de la ejecución (Correa, 2007; Navarrete, 2008). La memoria declarativa es accesible a múltiples sistemas de respuesta, por lo tanto es más flexible mientras que la no declarativa es más encapsulada y tiene menos acceso a los sistemas no involucrados en el aprendizaje inicial (Squire, 1996).

A su vez, la memoria declarativa está compuesta por la memoria semántica y la memoria episódica (memoria de los eventos en tiempos y lugares específicos) (Roediger, 2001); Tulving (2000) ha descrito a la memoria semántica como aquel conocimiento organizado que un individuo posee acerca de palabras y otros símbolos verbales, sus significados y referencias, además de las reglas, fórmulas o algoritmos para la manipulación de conceptos y sus relaciones entre sí. La memoria semántica se refiere al conocimiento relativamente permanente del mundo o al conocimiento en general (Roediger, 2001).

La memoria episódica se define como la memoria de los acontecimientos y eventos la cual, como requisito indispensable, debe ser evocada junto con las circunstancias y el lugar de dicho acontecimiento. Incluye los mecanismos cognitivos y neurológicos implicados en el recordar dichos eventos por lo tanto, entre más significancia tenga la información, más fácil será el recordarla (Roedinger, 2001; Kapur, 2008). Muchos investigadores indican que este tipo de memoria se ve favorecidas notablemente cuando existe una fuerte motivación y un estado emocional adecuado (Almaguer, 2002).

La adquisición de la memoria explícita o declarativa es un proceso que requiere de tres fases (Navarrete, 2008):

Codificación: Captación de detalles sobre los estímulos y el entorno para su posterior consolidación (procesamiento de la información para almacenarla).

Almacenaje: Retención de la información a largo plazo de tiempo.

Recuperación: Utilizar la información retenida para crear una representación consciente del suceso o para ejecutar una respuesta motora aprendida.

Dado que la memoria declarativa puede adquirirse rápidamente, también se puede olvidar con la misma velocidad. Por esta razón, provoca cambios poco significativos en las conexiones sinápticas que se distribuyen por toda la corteza. En la región del lóbulo temporal se localizan las principales estructuras nerviosas implicadas en este tipo de memoria tales como el hipocampo y la corteza entorrinal. Existen regiones denominadas “moduladoras”, que actúan en la formación de la memoria declarativa. Entre otras estructuras se encuentra la amígdala, la sustancia negra, los núcleos del rafe y el núcleo basal magnocelular (NMB) (Machado, 2008). Las otras regiones reguladoras de los estados de ánimo, la ansiedad, la alerta y las emociones son responsables de la liberación de los neurotransmisores DA, noradrenalina (NA), serotonina y acetilcolina (ACh). Este proceso se lleva a cabo mediante el contacto de sus axones con el hipocampo, la amígdala y las cortezas entorrinal, cingulada y parietal (Machado, 2008). La memoria declarativa, a diferencia de la no declarativa, requiere vínculos asociativos entre varios tipos de información que son almacenados en múltiples regiones. Posee conexiones recíprocas (directas e indirectas) con el área visual y otras regiones sensoriales equivalentes (Squire, 1996).

La memoria no declarativa 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 el aprendizaje no asociativo (Navarrete, 2008).

La memoria no declarativa se denomina también memoria procedimental (Machado, 2008) y se revela cuando experiencias previas facilitan la ejecución en una tarea que no requiere del recuerdo consciente o intencionado de dichas experiencias, son nuestros recuerdos no conscientes en los cuales están basados nuestros hábitos perceptivos y motores (Correa, 2007). Se encarga de informaciones más subjetivas así como del aprendizaje de las habilidades motoras, los hábitos y comportamientos (Machado, 2008). La formación de este

tipo de memoria requiere cambios duraderos en las conexiones sinápticas y se adquiere mediante la práctica y repetición de los hechos que deben aprenderse, dando lugar a un aprendizaje de larga duración, que difícilmente falla y sufre modulación por variables emocionales. Las regiones responsables son, básicamente el núcleo caudado (inervado por la sustancia negra) y el cerebelo (Machado, 2008).

La memoria no declarativa involucra un amplio rango de experiencias y habilidades humanas: condicionamiento clásico, experiencia de aprendizaje motor, fenómeno de preparación sobre ciertas pruebas, resolución de fenómenos complejos (basado en la experiencia) y más. Todas ellas podrían representar subcategorías de dicha memoria (Roediger, 2001).

Se ha propuesto que la memoria no declarativa es más antigua en términos evolutivos y forma parte de todos los animales, por otro lado, la memoria declarativa es de más reciente aparición durante la evolución del cerebro y los sistemas neurocognitivos, el subtipo episódico quizá sea única en los humanos (Roediger, 2001; Machado, 2008).

Una forma de memoria implícita es la denominada “priming” o sistema de representación perceptivo que se expresa en la identificación realzada de los objetos como entidades físicas y perceptivas estructuradas, por lo que la exposición perceptiva a un objeto en una ocasión primaria facilita la percepción del mismo objeto en ocasiones posteriores. Fenomenológicamente, se describe como la “huella” inconsciente de ciertos estímulos que facilitan diferentes procesos mentales, incluida la memoria (Llorente-Vizcaíno, 2001).

Los efectos de facilitación o “priming” están conservados en todas las alteraciones de la memoria excepto en la Enfermedad de EA. Los resultados indican que la afectación del priming es específica en la EA, lo cual permite que algunos autores lo consideren como un marcador cognitivo de la EA (Llorente-Vizcaíno, 2001)

Las pruebas de memoria declarativa miden recolección de consciencia, mientras que las de memoria implícita reflejan la retención que ha sido descrita como automática, incidental o a nivel inconsciente. Algunas de las pruebas directamente relacionadas con el estudio de la memoria explícita incluyen: evocación libre, evocación seriada, evocación de pares

asociados, reconocimiento de objetos, pruebas de estimación de la frecuencia absoluta, entre otras (Roediger, 2001).

La afectación en las pruebas precedentes, permite definir el síndrome amnésico retrógrado de la EA en fases iniciales y leves. Algunos autores han atribuido tal síndrome a una falla en el proceso de fijación así como una alteración en los procesos de recuperación (Llorente-Vizcaíno, 2001).

Recientes observaciones han señalado la degradación en la organización de la memoria semántica como uno de los signos prominentes a medida que progresa la enfermedad; así en las fases iniciales y leves no es tan grave como la memoria episódica aunque está presente pero se infravalora por la afectación de esta última (Llorente-Vizcaíno, 2001).

2.4.6 Tipos de memoria en función de la duración de la experiencia.

La memoria puede ser ordenada generalmente por su persistencia, iniciando con la *memoria sensorial efímera* y posteriormente a la *memoria a corto plazo* o memoria de trabajo (almacenando la información en la mente y trabajando con ésta) y *memoria a largo plazo*. Debido a que no existen límites marcados, un tipo de memoria puede mezclarse con otro (Roediger, 2001).

2.4.6.1 Memoria sensorial o inmediata

Las sensaciones de los órganos de los sentidos no son codificadas inmediatamente en el cerebro, sino se almacenan en el sistema nervioso como información hasta ser procesadas por centros corticales superiores. Esta persistencia sensorial refleja una memoria efímera del mundo exterior. Aunque la memoria sensorial parece existir para todos los sentidos, la más estudiada es para la visión y la audición.

La memoria sensorial para la visión se refiere como memoria icónica y para la audición es llamada ecoica. Ambas presentan dos formas de persistencia, una más corta que la otra. La

forma más corta dura solo cientos de milisegundos, pero la más larga puede durar entre 2-10 segundos (Roedinger, 2001).

2.4.6.2 Memoria a corto plazo o memoria de trabajo.

Información almacenada inicialmente de forma lábil y transitoria (<4hr) (Almaguer, 2002). El término memoria de trabajo es usado para describir un sistema de memoria temporal donde la información es mantenida y manipulada por un periodo breve de tiempo (Roedinger, 2001). La información puede ser transferida a depósitos a largo plazo mediante un proceso de consolidación, dependiendo de qué tan extensamente ésta fue procesada mientras existe retenida en el sistema a corto plazo (Almaguer, 2002). Debido a que solo una pequeña cantidad de información puede mantenerse en el depósito a corto plazo en un momento dado, nueva información entrante reemplaza la información vieja en el depósito (Roedinger, 2001). Se ha propuesto que la memoria a corto plazo está integrada por tres componentes básicos: el centro ejecutivo, vía fonológica y el componente visoespacial (Baddeley y Hitch, 2000). Varios estudios han observado una afectación de la memoria de trabajo desde el inicio de la EA (Llorente-Vizcaíno, 2001).

2.4.6.3 Memoria a largo plazo

Todo lo que recordamos y no ocurrió en los minutos previos se considera memoria a largo plazo (Roedinger, 2001) por un periodo mayor de 4hr (Almaguer, 2002). Designa una serie de propiedades extensas y difusas de la capacidad de retención de un conocimiento por tiempo prolongado. Se encuentra organizada por significados más que por características perceptuales. Pueden ser hechas dos distinciones importantes: declarativa y no declarativa o implícita, ambas tratadas en la sección previa (Squire, 1996; Roedinger, 2001). En el siguiente esquema (Fig. 7) se muestra la subclasificación de la memoria a largo plazo antes descrita así como las estructuras de las cuales depende este tipo de memoria.

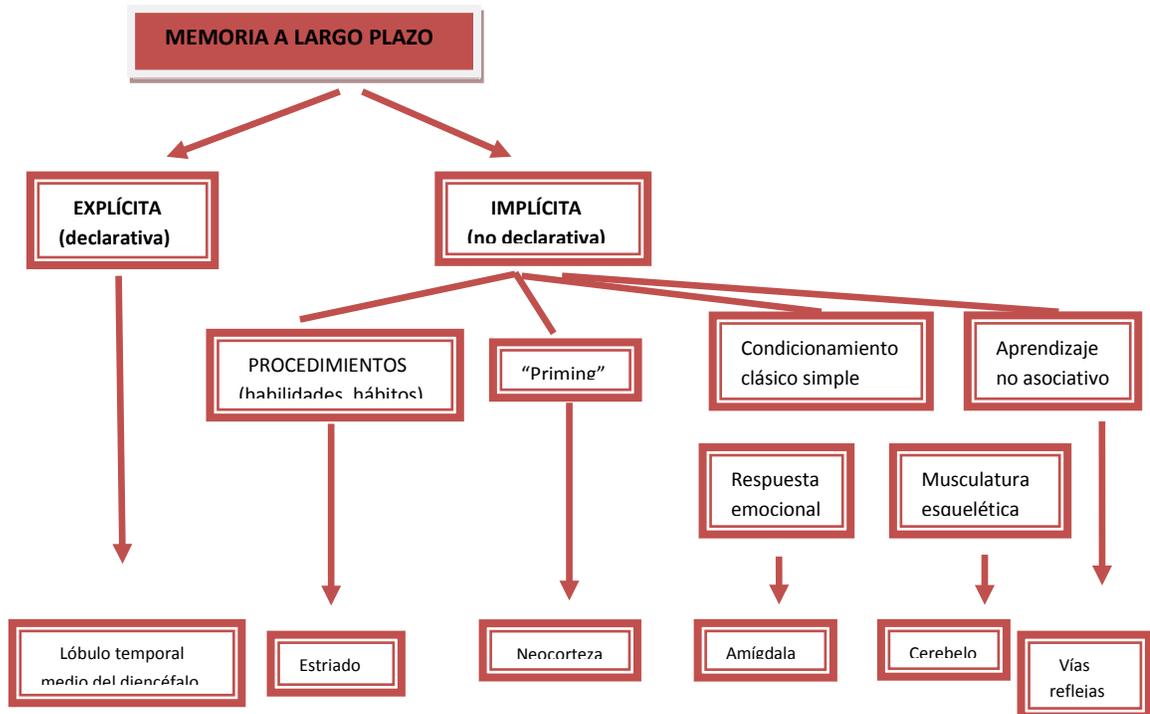


Fig. 7. Tipos de memoria y estructuras cerebrales relacionadas. En función de cómo se recibe y almacena la información, cabe distinguir dos grandes tipos de memoria: la implícita, que no requiere un aprendizaje consciente y la explícita, producto de un esfuerzo cognitivo consciente. Modificado de Navarrete, 2008.

2.5 Hipocampo

El hipocampo es una de las partes del cerebro que más se ha estudiado. El interés hacia él se debe tanto a su papel funcional (implicación en procesos de memoria y aprendizaje), como a las peculiaridades únicas de la organización del hipocampo y de su desarrollo, pues contiene varias subregiones con diferente organización y ritmo de desarrollo. Su ordenada organización estructural en capas y la elevada capacidad de reinervación, hacen del hipocampo el modelo experimental más empleado para el estudio del funcionamiento de los circuitos neuronales y la plasticidad y capacidad regenerativa del cerebro (Reznikov, 1991). Conviene distinguir entre los términos región hipocampal, formación hipocampal, e hipocampo. En el cerebro de mamíferos la región hipocampal es el componente central del sistema límbico. Este se compone de una porción cortical y una porción subcortical. La

porción cortical está constituida por la circunvolución límbica, la cual es parte de la corteza cerebral, tiene forma de anillo, está situada en la cara interna de cada hemisferio, separa la neocorteza del hipotálamo y del tronco encefálico, e incluye el giro parahipocampal, cingulado y subcalloso. La porción subcortical incluye la región hipocampal, la corteza olfatoria medial a la fisura rinal, la amígdala, el septum, los cuerpos mamilares, y el núcleo talámico anterior (Reznikov, 1991; Cardinali, 1992). La región hipocampal se subdivide en dos partes (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934; Blacjstad, 1956; Angevine, 1965, 1925; Isaacson, 1987): a) la formación hipocampal, consistente en el hipocampo propiamente: el Cuerno de Ammon, el giro dentado, y el subículum (incluyendo el prosubiculum), y b) la formación parahipocampal, consistente en el presubiculum, el parasubiculum (incluyendo el área retroplenial) y la corteza entorrinal. Sin embargo, el término hipocampo es empleado a menudo para designar la formación hipocampal (Isaacson, 1987).

El hipocampo representa una continuación de la corteza cerebral que se enrolla, mientras que el giro dentado representa su final libre. La formación hipocampal está curvada a lo largo de su eje longitudinal (septo-temporal), de manera que la parte dorsal posee una orientación casi horizontal, y la porción ventral desciende a la base cerebral (Blackstad et al, 1970; Hjorth-Simonsen, 1972; Kalhe, 1988), es decir, posee forma de “C”.

El hipocampo se ha subdividido en diversas regiones o áreas. Ramón y Cajal (1911) distinguió en los roedores dos regiones, una inferior, que comprende la zona de células piramidales grandes, y otra superior, que comprende el resto del hipocampo. Un análisis morfológico más detallado permitió a Lorente de Nó (1934) subdividir el hipocampo en cuatro campos: CA1, CA2, CA3 y CA4 (Fig. 8). El área CA1 corresponde a la mayor parte de la región superior, CA2 está situada cerca de la curva del arco del hipocampo, CA3 ocupa la mayor parte de la región inferior, y CA4 se encuentra dentro de la apertura del arco que forma el giro dentado, en la región del hilus.

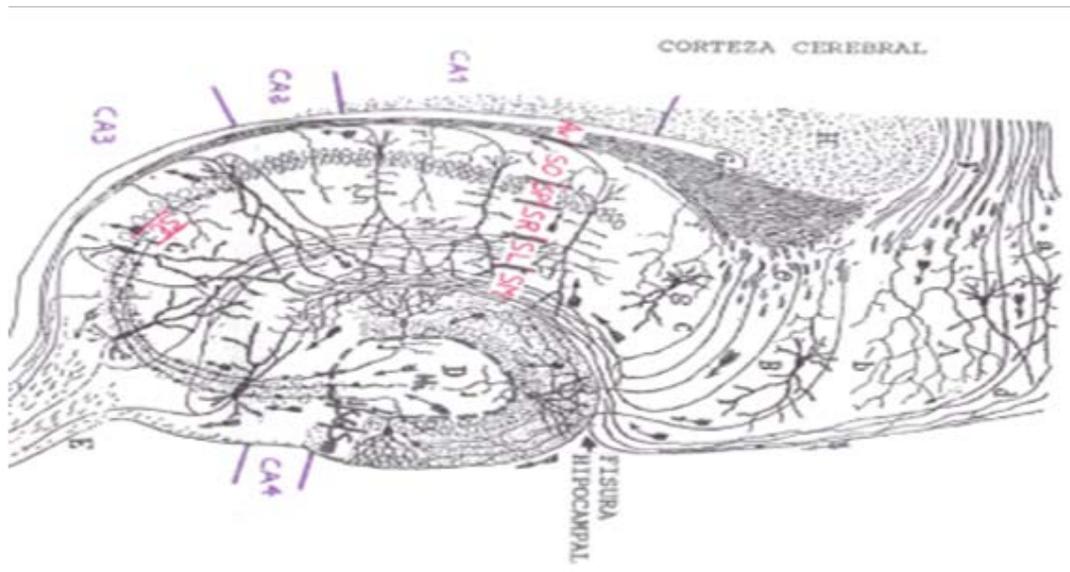


Fig 8. Esquema de la estructura del hipocampo. CA: Cuerno de Amón.

2.5.1 Vías aferentes del hipocampo

La información llega al hipocampo a través de diferentes vías que son las cortezas entorrinal, parahipocámpica posterior y prepiriforme, y del núcleo central de la amígdala, y van al subículo, el cuerno de Amón y el giro dentado. También hay información que llega de la corteza cingular y va al subículo, y de los núcleos del *septum*, el hipotálamo y la corteza entorrínica, por la comisura del trígono, al hipocampo contralateral. Además, del *septum* y los núcleos de la banda diagonal de Broca llegará información por el fórnix al cuerno de Amón, el giro dentado y el subículo (Ottersen y Storm-Mathisen, 1989). Otras aferencias al hipocampo provienen de la parte rostral del mesencéfalo, el núcleo interpeduncular y el *locus coeruleus*, así como del núcleo reticular superior central dorsal del rafé y dorsal tegmental (Shepherd, 1979).

2.5.2 Vías eferentes del hipocampo

El fórnix que, en su contingente retrocomisural, llevará 56% del total de las fibras, es una la vía eferente principal de la formación hipocámpica. Después de su conexión con el cuerpo

mamilar ipsilateral, y por medio del haz mamilotalámico de Vicq d'Azyr, descargará en los núcleos talámicos anteriores. El contingente fornical precomisural irá hacia áreas y núcleos septales, *nucleus accumbens*, núcleo olfatorio anterior y núcleos preópticos. El contingente supracomisural irá a la corteza ístmica y la corteza cingular, y las áreas y los núcleos septales. El subículo se proyectará a las cortezas frontal, entorrínica, perirrínica, temporal media, retrosplenial, cingular y prefrontal, así como a los núcleos amigdalinos (Andersen, et al., 2007)

2.6 Acetilcolina

La ACh (Fig. 9) fue el primer neurotransmisor en ser descubierto. Fue aislado en 1921 por un biólogo alemán llamado Otto Loewi, quien ganó posteriormente el premio Nobel por su trabajo. La ACh tiene muchas funciones: es la responsable de la estimulación de los músculos, incluyendo los músculos del sistema gastro-intestinal. También se encuentra en neuronas sensoriales y en el sistema nervioso autónomo, y participa en la programación del sueño REM (Perry et al., 1999).

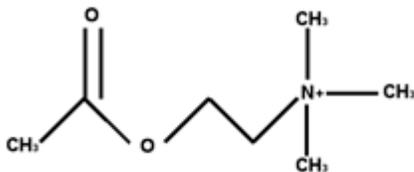


Fig. 9. Estructura química de la acetilcolina (ACh).

En el cerebro de los mamíferos, el efecto fisiológico más importante de la ACh es una reducción de la permeabilidad a K⁺, de tal forma que las neuronas sensibles a esta son más susceptibles a otras influencias excitatorias (Perry et al., 1999).

Todas las regiones de la corteza cerebral están inervadas por ACh, por lo que no es de extrañar que influya sobre la función cortical. Por ello, varios grupos neuronales están relacionados esencialmente con fenómenos de activación cortical, el paso de sueño a vigilia

y también con la memoria. Así, la actividad colinérgica es esencial para mantener el ritmo hipocampal (Díaz Hernández et al., 2000).

Por otra parte, las lesiones en el núcleo basal de Meynert en animales de experimentación provocan pérdida de memoria, que se revierte tras la administración de agonistas colinérgicos. Las vías corticales procedentes de este núcleo juegan un papel preponderante en los procesos de aprendizaje mediante cambios en la liberación cortical de ACh, que modulan la respuesta cortical a un determinado estímulo (Mesulamm, 1995).

Las vías colinérgicas del hipocampo parecen estar también involucradas en procesos de memoria y asociación. El conjunto, la innervación colinérgica de áreas corticales y límbicas, sugiere su participación en procesos de consolidación de la memoria y de componentes emocionales (Perry, et al., 1999).

La ACh se sintetiza a partir de la colina, cuyo origen generalmente es la dieta, y de la acetil-coenzima A, que proviene de la glucosa a través de varios pasos metabólicos que ocurren en las mitocondrias. La enzima responsable de esta reacción es la ChAT (Massoulie y Bon, 1982) (Fig 10).

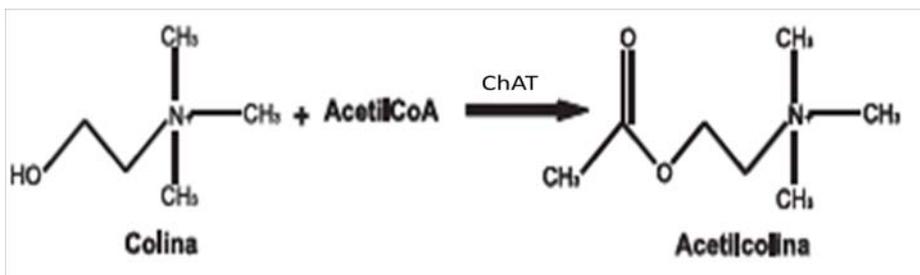


Fig. 10. Síntesis de la Acetilcolina. Colin Acetil Transferasa (ChAT)

2.6.1 Vías cerebrales colinérgicas

Muchas de las evidencias sobre la localización de las vías colinérgicas en el cerebro han sido obtenidas por estudios inmunohistoquímicos, por lo que se han utilizado anticuerpos específicos para la ChAT, así como la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas para la localización de estructuras colinérgicas, lo que ha hecho posible desarrollar un mapeo sobre

la distribución de las neuronas y fibras colinérgicas con un alto grado de precisión (Oda, 1999).

También gracias a los estudios de hibridación *in situ* con sondas para los RNAm de la enzima de síntesis, se ha logrado definir con mayor claridad los cuerpos neuronales, y de este modo se dispone hoy en día de un mapa colinérgico cerebral (Perry et al., 1999) (Fig. 11).

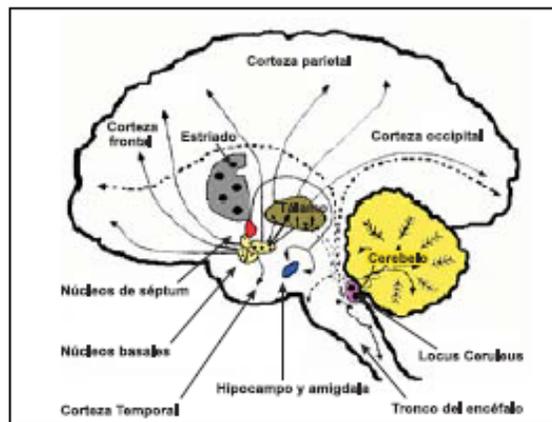


Fig 11. Distribución de las vías colinérgicas en el cerebro

La distribución y morfología de las neuronas colinérgicas es muy variada. Las que tienen axones cortos se pueden considerar como interneuronas, son muy abundantes en el estriado, donde establecen una estrecha relación funcional con las neuronas dopaminérgicas, cuyas terminales son muy abundantes en esta zona. Los núcleos de los pares craneales tienen también abundantes interneuronas colinérgicas, lo mismo que toda la médula espinal. Otras interneuronas colinérgicas se encuentran en la corteza cerebral de los roedores, pero no tienen su equivalente en primates (Mesulman, 1995).

Las vías cerebrales colinérgicas con axones largos tienen una localización más difusa que las aminérgicas, y no siempre sus cuerpos celulares se corresponden con núcleos definidos. La vía colinérgica que sale de la base del cerebro anterior, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el septum, la banda diagonal de Broca, pallidum ventral y, sobre todo, el núcleo basal de Meynert, se extiende hasta el bulbo olfativo, corteza, amígdala y/o

hipocampo, quedando toda la vía del sistema de recompensa cerebral bajo su influencia (Gotti et al., 1997)

Una disminución de la funcionalidad de esta vía parece ser el origen de disfunciones cerebrales, como el Alzheimer, la demencia asociada con aparición de cuerpos de Lewy, incluso alguna variante de Parkinson. Es de destacar que el núcleo basal de Meynert, que consta de unas 200,000 neuronas de cada lado del cerebro del individuo sano, suele perder hasta 90% de sus neuronas en enfermos de Alzheimer (Perry et al., 1999).

2.7 Serotonina

En el año 1930, Vally y Erspamer demostraron la existencia de una sustancia en las células enterocromafines de la mucosa digestiva a la que denominaron enteramina, que tenía la propiedad de estimular la contracción de la musculatura lisa del sistema gastrointestinal. Unos años más tarde, en 1948, Rapport y cols. aislaron del suero sanguíneo una sustancia vasoconstrictora a la que denominaron serotonina, que identificaron como 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Fig 12) y que era la misma molécula que la enteramina (Gronstad et al., 1985; Wade et al., 1994).

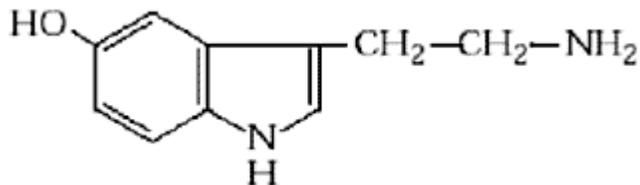


Fig 12. Estructura química de la serotonina

En la actualidad se sabe que la serotonina es una sustancia perteneciente a las aminas biógenas que actúa como neurotransmisor y como neuromodulador, y que juega un papel importante en el humor, ansiedad, sueño y que se distribuye por todo el organismo ejerciendo múltiples funciones. Está presente en la mayoría de las especies animales y vegetales, localizándose en el caso de los mamíferos, en un 95% en el sistema

enterocromafín del tracto gastrointestinal, y el resto en las plaquetas y neuronas triptaminérgicas del sistema nervioso central y del sistema nervioso entérico (Ahlman et al., 1981; Gershon, 2004).

La síntesis de la 5-HT se inicia a partir del triptófano (Figura 13), que es oxidado en posición 5 del anillo pirrólico, mediante la enzima triptófano-5-hidroxilasa (TPH) dando como producto el 5-hidroxitriptófano. Esta molécula, tras descarboxilación de la cadena lateral por la 5-OH-triptamina descarboxilasa da lugar finalmente a la 5-HT. La enzima triptófano-5-hidroxilasa ha mostrado ser el factor limitante de la síntesis de la serotonina (Camilleri et a., 1994).

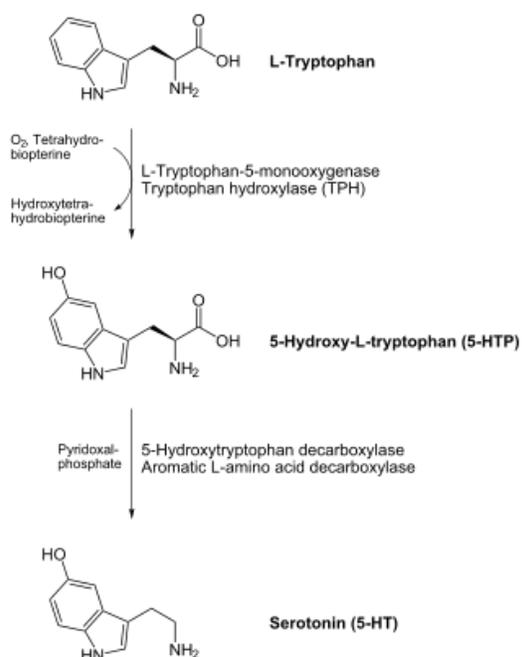


Fig 13. Síntesis de la serotonina

2.7.1 Vías cerebrales serotoninérgicas

Por medio de técnicas inmunohistoquímicas se han podido identificar núcleos serotoninérgicos en el interior del sistema nervioso. Se ha observado que las células serotoninérgicas se concentran en la parte media del tallo cerebral, agrupándose en nueve núcleos principales, conocidos como *complejo nuclear del rafé*. A partir de estos núcleos

nacen fibras que llegan a prácticamente todo el sistema nervioso (ganglios basales, hipotálamo, tálamo, hipocampo, sistema límbico, corteza cerebral, cerebelo y médula espinal). Los núcleos más anteriores (en animales) proyectan hacia las partes más rostrales (hacia adelante), mientras que las más posteriores envían sus fibras hacia las áreas del tallo cerebral y la médula. A través de estas proyecciones, la serotonina participa en el control de los estados de sueño y vigilia, el ánimo, las emociones, el control de la temperatura, la dieta, la conducta sexual, algunos tipos de depresión, conducta suicida, memoria y ciertos estados alucinatorios inducidos por drogas (Daubert y Condrón, 2010)

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Se sabe, que el E₂ es un factor que promueve la supervivencia y diferenciación de diferentes poblaciones neuronales en cultivo, como células hipotalámicas, células de la amígdala o células hipocámpales. Además, se ha demostrado que protege de la muerte neuronal inducida por multitud de agentes estresantes como los radicales libres, el péptido β-amiloide, y los aminoácidos excitadores glutamato, AMPA, kainato y NMDA.

La información derivada del estudio Women's Health Initiative en 2002, acerca del incremento en los riesgos de accidente vascular cerebral, enfermedad tromboembólica y de cáncer mamario en las usuarias de la combinación de estrógenos conjugados de origen equino y acetato de medroxiprogesterona, durante el climaterio y la posmenopausia a partir del quinto año de administración, ha generado cambios y controversias sobre los criterios e indicaciones para la prescripción del tratamiento hormonal de sustitución en estas etapas de la vida. Esta situación ha provocado un renovado interés acerca de las posibles ventajas del empleo de hormonas sintéticas como la Tibolona, la cual no tiene efectos estrogénicos en el endometrio, por lo que su uso es seguro.

Existen diversos estudios de los efectos de la Tibolona en el hueso, en el músculo cardíaco y en el endometrio. Sin embargo no hay estudios acerca del efecto de esta hormona sintética en el Sistema Nervioso Central. Por lo que en este trabajo se analizarán los efectos de la Tibolona a diferentes dosis en un modelo animal de menopausia para determinar si presenta efecto neuroprotector y evaluar su capacidad para contrarrestar el déficit cognitivo inducido por la ovariectomía a largo plazo.

IV HIPÓTESIS

Si la Tibolona tiene efectos neuroprotectores entonces la administración crónica disminuirá el déficit cognitivo que se presenta en las ratas con ausencia prolongada de hormonas esteroides.

V OBJETIVO

- Determinar la dosis efectiva de Tibolona en la que se observa neuroprotección en ratas con ausencia prolongada de hormonas esteroides.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de diferentes dosis de Tibolona sobre la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada y observada a largo plazo.
- Determinar el efecto de diferentes dosis de Tibolona sobre el contenido de ChAT y TPH en el hipocampo de la rata ovariectomizada a largo plazo.
- Determinar por medio de la técnica de TUNEL la muerte neuronal en el hipocampo de la rata ovariectomizada a largo plazo.

VI. Materiales y Métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 250g de peso, las cuales se ovariectomizaron bilateralmente bajo anestesia. Después de la cirugía se dejaron descansar por dos semanas para iniciar la administración de la Tibolona como se describe a continuación:

Grupo 1: Vehículo (agua)

Grupo 2: Tibolona 0.01 mg/kg

Grupo 3: Tibolona 0.1 mg/Kg

Grupo 4: Tibolona 1 mg/Kg

Grupo 5: Tibolona 10 mg/kg

La administración de la Tibolona y del vehículo fue por vía esofágica, por 18 semanas. Cada grupo tuvo una n=8. Cada grupo de tratamiento se utilizó para las dos pruebas de memoria y aprendizaje.

PRUEBAS DE MEMORIA Y APRENDIZAJE

PRUEBA DE AUTOAPRENDIZAJE

Una vez que se cumplió el tiempo post-ovariectomía se evaluó la capacidad cognitiva de las ratas en el modelo de aprendizaje de tipo automoldeamiento. El entrenamiento se realizó en una caja de Skinner. El procedimiento consiste en que el animal se “auto enseña” a presionar una palanca y para que ocurra esto se le dio una serie de ensayos que consistieron en una presentación de una palanca y el encendido de un foco que ilumina la palanca por un minuto (EC); al término de este periodo la luz se apaga y se entrega un trozo de comida (EI), inmediatamente después se da inicio a otro ensayo. Si la rata recibe puntualmente comida cuando presiona la palanca, su tasa subsiguiente de presión de la palanca durante el

EC (RC) aumenta por encima de la tasa espontánea. Después de un número de secuencias, el animal experimenta el EC y presenta la RC, tal como tocar o presionar la palanca. El incremento o decremento de RC se considera como una mejoría o deterioro del aprendizaje, respectivamente. Cada animal se colocó en la cámara experimental por un periodo de habituación de 20 min. Se dieron tres sesiones: 20 ensayos las dos primeras y 10 ensayos en la última sesión, con 24 h de diferencia entre cada una (Meneses, 2003).

La caja de Skinner se encuentra conectada a un sistema de cómputo, el cual posee un software que permite, automáticamente suministrar una esfera de alimento cada vez que el animal presenta una RC. Asimismo, permite visualizar el número total de RC durante cada ensayo (Navarrete, 2008). Se registraron los resultados obtenidos en la tercera sesión, se promediaron y se expresaron como la media \pm Error Estándar (EE).

LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE T

Se utilizó un laberinto en forma de T (LET) elevado 50 cm del piso, con dos brazos opuestos abiertos (50x10 cm) y un brazo cerrado sin techo (50x10x40 cm) todos extendiéndose de una plataforma central (10x10 cm). Los brazos abiertos tienen una orilla de plástico para evitar la caída de las ratas. Cada sesión se grabó con una videocámara. Después de cada ensayo el aparato se limpió con solución de etanol al 10%.

Sesión de entrenamiento. Cada rata se colocó inicialmente al final del brazo cerrado del LET. Al animal se le permitió explorar el brazo cerrado por un máximo de 300 s (criterio de evitación). Si la rata dejó el brazo cerrado colocando sus cuatro extremidades en uno de los brazos abiertos, el ensayo se terminó y el animal se regresó a su caja por 30 s. Después de este tiempo, la rata se volvió a someter a tantos ensayos como fueron necesarios para alcanzar el criterio de evitación, en otras palabras debió permanecer en el brazo cerrado durante 300 s.

Además, cuando la rata exploró alguno de los brazos abiertos (BA) colocando 1, 2 ó 3 de sus extremidades fuera del brazo cerrado y regresó a su posición original, esto se registró

como un intento, mismo que sirvió para calcular el índice de riesgo (IR) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{IR} = \frac{\text{Frecuencia de intentos}}{\text{Entradas en el BA} + \text{frecuencia de intentos}}$$

Este parámetro permite eliminar la posibilidad de que el animal permanezca en el brazo cerrado por habituación o por una falta de motivación. Así, un valor de $\text{IR} = 0$ implica una incapacidad de asociación de la rata, mientras que un $\text{IR} = 1$ implica una respuesta máxima de aprendizaje en este modelo.

Sesión de prueba. Setenta y dos horas después de la sesión de entrenamiento las ratas fueron colocadas en el brazo cerrado y se registró la latencia para entrar a alguno de los brazos abiertos solo una vez (De-Mello y Carobrez, 2002).

PRUEBA DE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

Con el fin de descartar cualquier alteración motora que pudiera afectar el desempeño de los animales en las pruebas de memoria y aprendizaje, se monitoreó la actividad espontánea de las ratas. Para ello, cada animal se colocó durante 5 minutos dentro de una caja de acrílico de 10 x 20 x 40 cm la cual contiene sensores que permiten contabilizar automáticamente la actividad general del animal (Opto-Varimex; Ugo Basile Italia). Esta prueba detecta tanto la movilidad total que tenga el animal durante el tiempo de experimentación así como la actividad ambulatoria y vertical. Los resultados se presentaron como la media \pm EE del número de cuentas en 5 minutos de la actividad ambulatoria

OBTENCION DEL TEJIDO

Una vez realizadas las pruebas conductuales se tomo una n=4 para la realización de las técnicas de inmunofluorescencia y detección de la apoptosis y una n=4 para la realización del western blot, que se describirán a continuación.

INMUNOFLUORESCENCIA

Después de realizar las pruebas conductuales, las ratas se anestesiaron y se perfundieron con 200 mL de PBS seguidos por 250mL de paraformaldehído al 4% en solución de fosfatos 0.1M pH 7.4. Los cerebros se removieron, post-fijaron en paraformaldehído al 4% y posteriormente se crioprotegieron en una solución de sacarosa al 20% por 24 horas e inmediatamente después se colocaron en una solución de sacarosa al 30%. Posteriormente, se obtuvieron los cortes coronales del hipocampo, de 40 μ m cada uno, por medio de un criostato.

La doble inmunofluorescencia se realizó por el método de flotación, en donde los cortes coronales se pusieron en cajas de 24 pozos a los cuales se incubaron por una hora en agitación con una solución de PBS con Tritón al 0.3% para evitar uniones no específicas. Una vez realizado el bloqueo se incubo con los anticuerpos primarios para ChAT y TPH toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con PBS 3 veces por 5 minutos. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo en una dilución 1:1000-1:2000. Nuevamente se realizaron lavados con PBS 3 veces por 5 minutos. Finalmente, se montaron los cortes en laminillas cargadas y se les pondrá un medio de montaje especial para fluorescencia.

Se tomaron fotos en un microscopio de epifluorescencia para su análisis cualitativo.

WESTERN BLOT

Una vez realizadas las pruebas conductuales se tomo una n=4 para realizar la técnica de western blot, y se disecó el hipocampo.

Se homogenizaron los tejidos en buffer de lisis con un cóctel de inhibidores de proteinasas (Tris-HCl 10 mM, ditioneitol 1mM, glicerol al 30%, tritón al 1%, azida de sodio 15 mM, EDTA 1mM, leupeptina 4 µg/ml, aprotinina 22 µg/ml, PMSF 1mM, ortovanadato de sodio 1mM), en una relación de 1 ml de buffer/1 g de tejido a 4°C.

Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 15 min, a 4°C para obtener en el sobrenadante las proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

Las proteínas totales obtenidas de los tejidos (30 µg) se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% a 75 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparo con Buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto-etanol 5%) en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 min para depositarse en los geles antes mencionados.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 20 volts, durante 1 hora en una cámara semihúmeda. Las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% en TBS 1X. Las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos monoclonales anti ChAT (Millipore) o anti TPH (Sigma) en una dilución 1:1000. Las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 3 veces por 5 minutos.

Para detectar ChAT y TPH, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-cabra o anti-ratón (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24 µg/ml. Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad por quimioluminiscencia (ECL), (Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol y un potenciador son sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario y se genera una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada pozo, se lavaron las membranas con TBS-Tween para posteriormente incubarlas con un

anticuerpo primario anti- α Tubulina en una dilución 1:10, 000 (Sigma) o anti -GAPDH (Millipore) toda la noche a 4°C.

Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos. Se incubaron 1 hora con un anticuerpo secundario anti-mouse acoplado a peroxidasa en una concentración de 0.24 μ g/ml (Santa Cruz) y posteriormente se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico para cuantificar la expresión de ChAT, TPH, α .Tubulina y GAPDH de acuerdo a la intensidad de cada banda, utilizando el programa ChemiImager 4400.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Marca
ChAT	AB144P, Millipore
TPH	SAB4503028, Sigma
GAPDH	MAB374, Millipore
α -Tubulina	T9026, Sigma

DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS

Una vez realizadas las pruebas conductuales se tomó una n=4 para realizar la técnica de detección de la apoptosis.

Se utilizaron cortes del hipocampo medial para realizar la técnica de apoptosis por medio del kit APOAC de Sigma.

Los cortes se bloquearon por 45 minutos con PBS+BSA al 10% y Triton al 0.3% por una hora, se lavaron 3 veces con Buffer de Binding 1X y se dejaron con Anexina-V, 6-CFDA y Buffer de Binding por toda la noche.

Se realizaron 5 lavados con PBS+BSA al 10% y se contratiño con Hoesch en una dilución 1:100 por 5 minutos.

Se montaron los cortes en laminillas cargadas de la marca BIOCARE y se observaron en un microscopio de epifluorescencia, detectando una inmunotinción en color rojo de la anexina-V, en color verde 6-CFDA y en azul Hoesch. Se tomaron fotografías para su posterior análisis cualitativo

VII ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza y una prueba *post hoc* de Tukey. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para calcular los valores de probabilidad.

VIII RESULTADOS

PRUEBA DE AUTOAPRENDIZAJE

Una vez que se cumplió el tiempo de tratamiento, se evaluó la capacidad cognitiva de las ratas en el modelo de aprendizaje de tipo automoldeamiento. Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los diversos tratamientos administrados (Fig. 14).

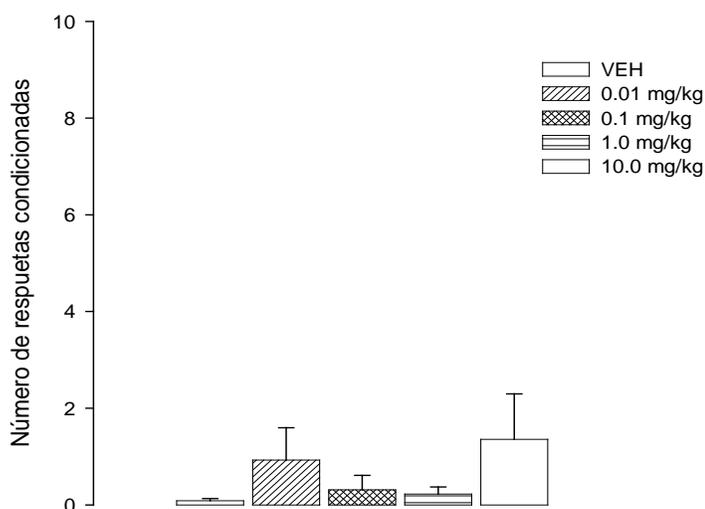


Fig. 14. Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada en un modelo de automoldeamiento. Cada columna representa la media \pm EE; n=8, Veh: vehículo.

LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE T (LET)

Los resultados de esta prueba se muestran en la figura 15, en donde al realizar el análisis estadístico se observó una diferencia significativa con la dosis de 1 mg/Kg con respecto al vehículo y la dosis de 10 mg/Kg con respecto a todos los grupos.

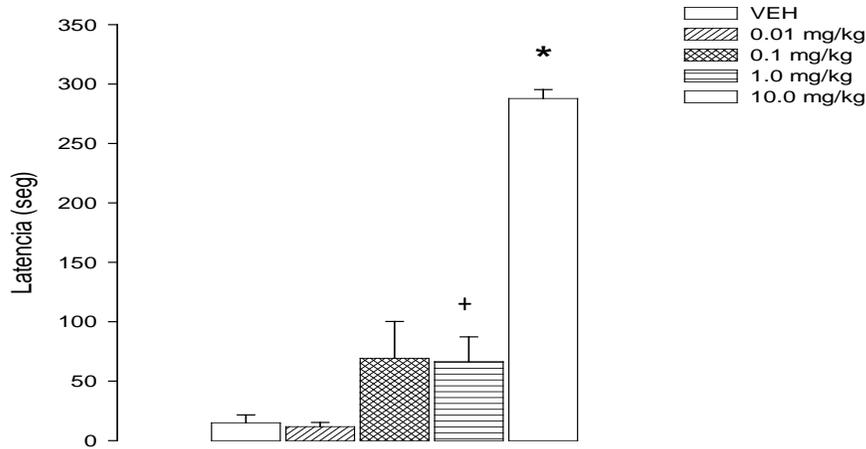


Fig. 15. Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada en la prueba de laberinto elevado en forma de T. En este modelo, una mayor latencia se interpreta como un aumento del aprendizaje. Cada columna representa la media \pm EE; n=8; *p<0.05 vs los demás tratamientos; + p<0.05 vs vehículo. Veh: vehículo.

El índice de riesgo se muestra en la figura 16. Se obtuvieron valores cercanos a 1 conforme aumentan las dosis de Tibolona.

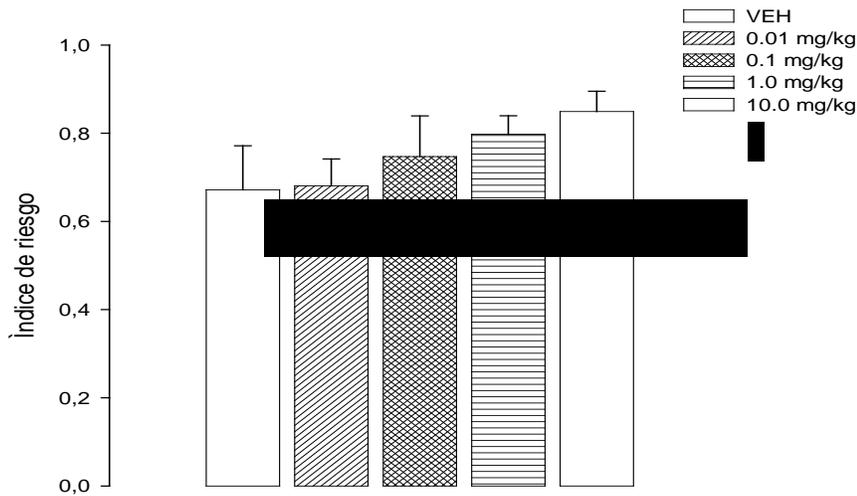


Fig. 16. Índice de riesgo del laberinto elevado en forma de T. En este modelo, un incremento en el índice de riesgo se asocia con una mejoría en el aprendizaje. Cada columna representa la media \pm EE; n=8, Veh: vehículo.

ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

Los resultados de la actividad espontánea de las ratas se presentan como la media \pm EE del número de cuentas en 5 minutos (fig. 17). El análisis estadístico de los datos indica que ninguna de las dosis de Tibolona administradas afectó las habilidades motoras de las ratas.

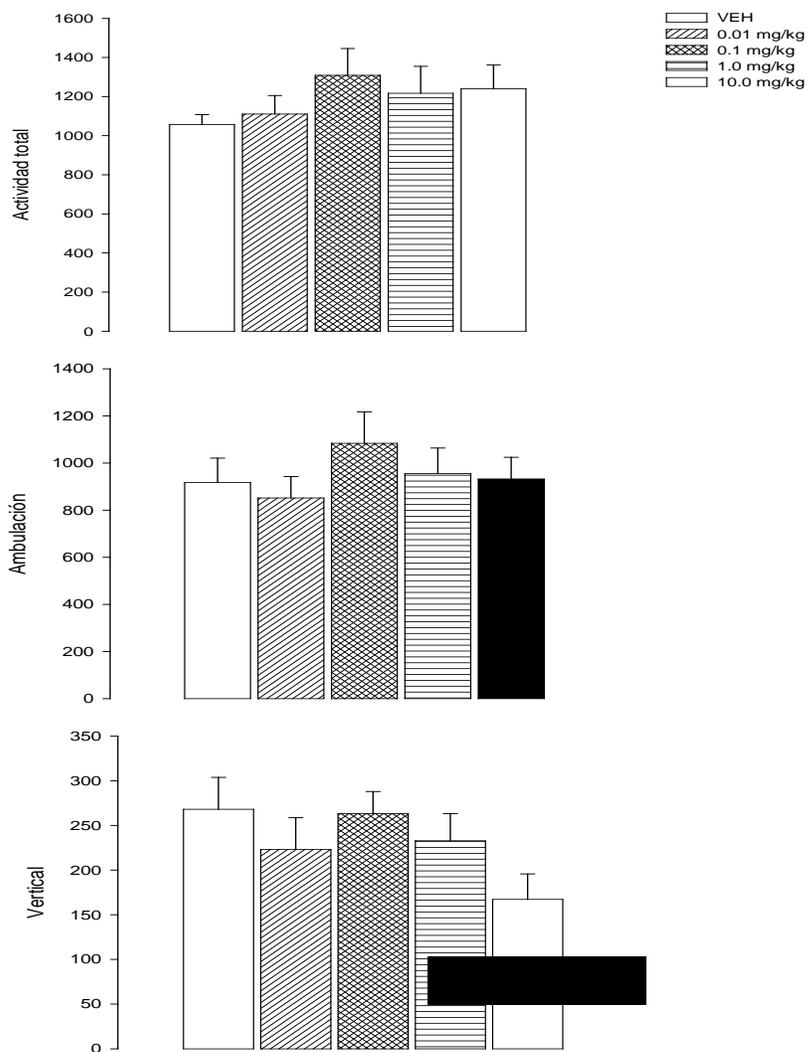


Fig. 17. Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre la actividad espontánea de la rata. Cada columna representa la media \pm EE; n=8, Veh: vehículo.

WESTERN BLOT

Para determinar el contenido de ChAT y TPH con las diferentes dosis de Tibolona en el hipocampo se realizó la técnica de Western blot. En la Fig. 18 se muestra la detección de ChAT en el hipocampo. Se muestra una banda de 75 KDa correspondiente a ChAT y como se observa hay una disminución significativa del contenido con las dosis de 0.1, 1.0 y 10 mg/Kg

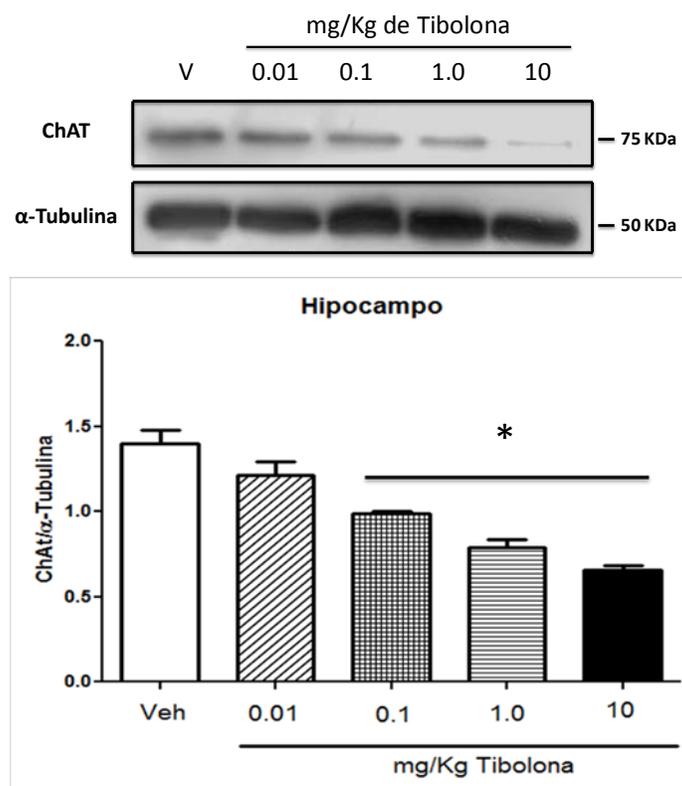


Fig 18. Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre el contenido de ChAT. Se realizaron 4 experimentos independientes en los hipocampos de la ratas tratadas con: Vehículo (V), 0.01 mg/Kg de Tibolona, 0.1 mg/Kg de Tibolona, 1.0 mg/Kg de Tibolona y 10 mg/Kg de Tibolona. El contenido de ChAT se cuantifico por medio de un análisis densitometrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos de tubulina. $P < 0.05$ vs Vehículo

En la figura 19 se muestra el contenido de TPH con los diferentes tratamientos de Tibolona, se observó un incremento significativo del contenido de TPH con las dosis de 1.0 y 10 mg/Kg de Tibolona.

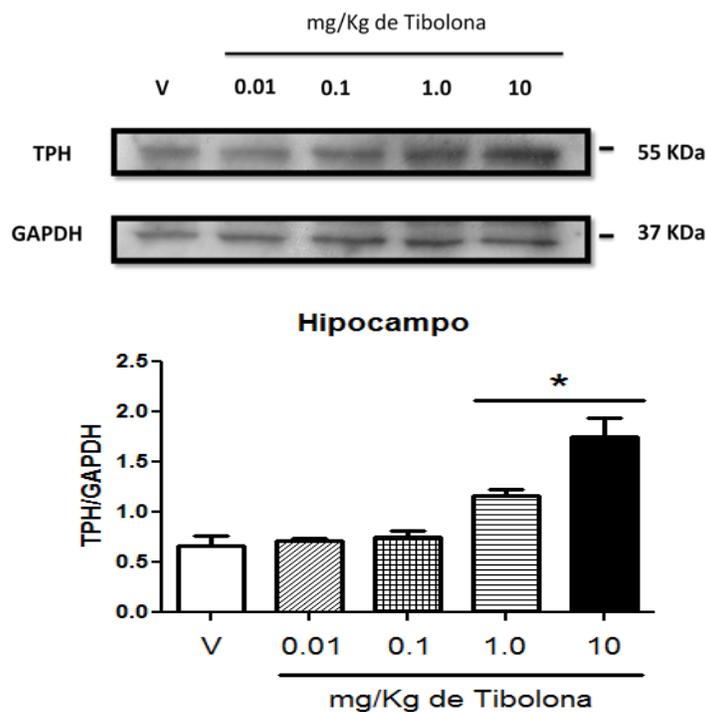


Fig 19. Efecto de las diferentes dosis de Tibolona sobre el contenido de TPH. Se realizaron 4 experimentos independientes del hipocampo de la rata tratada con: Vehículo (V), 0.01 mg/Kg de Tibolona, 0.1 mg/Kg de Tibolona, 1.0 mg/Kg de Tibolona y 10 mg/Kg de Tibolona. El contenido de TPH se cuantificó por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos de GAPDH. $P < 0.05$ vs Vehículo

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se realizó usando dos fluoróforos alexa fluor 486 y 686, el primero da una fluorescencia roja y el segundo una fluorescencia verde. La doble inmunofluorescencia se observa en la figura 20, en donde se muestra la región CA3 del hipocampo.

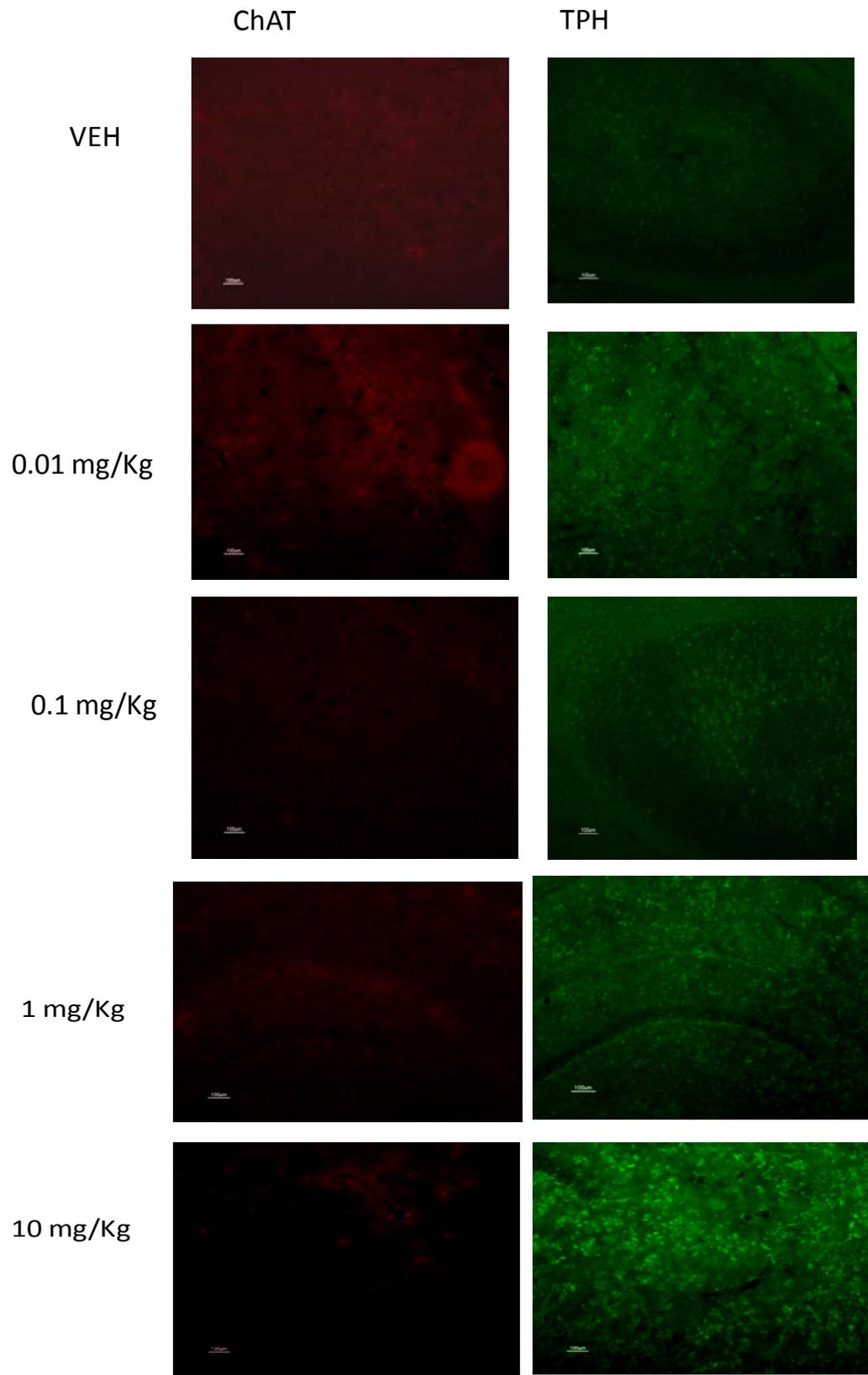


Fig 20. Detección de la dobleinmunofluorescencia en el hipocampo con los diferentes tratamientos de Tibolona. Se realizó la detección de ChAT (rojo) y TPH (verde) en el CA1 del hipocampo de la rata tratadas con diferentes dosis de Tibolona, Vehículo (V), 0.01 mg/Kg de Tibolona, 0.1 mg/Kg de Tibolona, 1.0 mg/Kg de Tibolona y 10 mg/Kg de Tibolona.

Detección de la apoptosis

La detección se realizó utilizando un marcador de la apoptosis, anexina-V, por medio de un kit comercial, el cual marca a esta proteína de color rojo en la membrana de la célula si esta entra en apoptosis, mientras que por otro lado el 6-CFDA marca a las células vivas en color verde. En la figura 15 se muestran la detección de anexina-V rojo y 6-CFDA en verde, en CA3 del hipocampo. En donde se observa una disminución con el marcaje rojo, indicando que hay menor cantidad de células inmuno-reactivas a anexina-V.

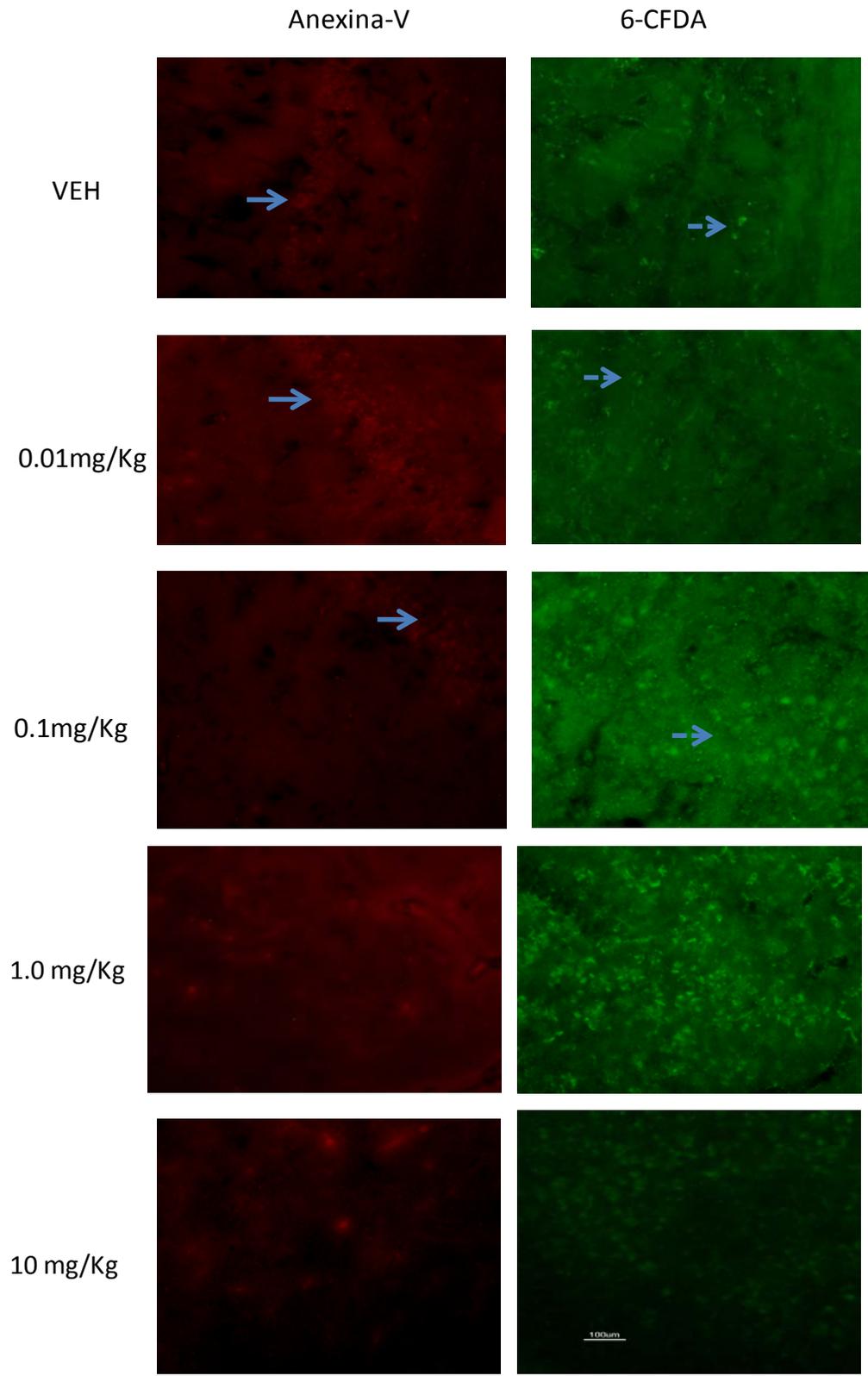


Fig 21. Detección de la apoptosis en el hipocampo con los diferentes tratamientos de Tibolona. Se realizó la detección de anexina-V y 6CFDA en el CA3 del hipocampo de la rata tratadas con diferentes dosis de Tibolona, Vehículo (V), 0.01 mg/Kg de Tibolona, 0.1 mg/Kg de Tibolona, 1.0 mg/Kg de Tibolona y 10 mg/Kg de Tibolona. La línea continua muestra el marcaje con anexina-V, la flecha punteada muestra el marcaje con 6-CFDA.

IX DISCUSIÓN

MEMORIA Y APRENDIZAJE

Los resultados obtenidos nos indican que el tratamiento a largo plazo con Tibolona a diferentes dosis tiene diferentes efectos con respecto a las pruebas de memoria y aprendizaje que se realizaron.

Se ha observado que cuando los estrógenos disminuyen, después de la menopausia y por la OVX en modelos animales, empieza un déficit de la memoria y la cognición. Se sabe que los estrógenos tienen la capacidad de mantener o aumentar la función cognitiva, memoria de trabajo y semántica (Genazzani et al., 2007).

El aprendizaje de tipo automoldeamiento requiere una red neuronal intacta en el hipocampo, septum y corteza, así como la participación de las vías de transducción colinérgica en la integración de las habilidades cognitivas autoaprendidas (Meneses, 2003). En la prueba de autoaprendizaje, el incremento o disminución en el número RC fue considerado como indicador del aumento o disminución del aprendizaje, respectivamente. Considerando esto y el análisis estadístico de los datos, no se observaron cambios significativos en el desempeño de los animales con ninguno de los diferentes tratamientos con Tibolona. Además, estos resultados no fueron enmascarados por alguna alteración en la actividad ambulatoria de los animales, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en la prueba de actividad locomotriz.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se encontró que en ratas OVX tratadas a corto plazo con E₂ (40 µg/Kg) aumentó el número de RC's, y en el grupo tratado con E₂ (40µg/Kg) más P₄ (4mg/Kg) no se observó cambios en las RCs (Farfán-García, 2010; Espinosa-Raya, et al 2011). En el mismo trabajo, pero con el tratamiento a largo plazo, se observó que tanto el tratamiento con E₂ como con P₄ aumentó el número de RC's (Farfán-García, 2010). Con lo anterior y debido a que los metabolitos hidroxilados de la Tibolona tienen efecto estrógeno en el SNC, esperábamos un aumento en las RCs. Sin embargo, no observamos tal efecto. Con lo anterior y tomando en cuenta nuestros resultados, podríamos

sugerir que se está generando el isomero delta 4 de la Tibolona, el cual se sabe que tiene efecto progestagénico y atenúa el efecto estrogénico de la misma (Verheul et al., 2006).

El condicionamiento al miedo es un modelo de memoria y aprendizaje de tipo “evitación pasiva” (De-Mello y Carobrez, 2002). Aunque hay diferencias en la naturaleza de las características neurofisiológicas subyacentes en los modelos de evitación activa o pasiva la evaluación general de aprendizaje y memoria es una constante. El LET fue descrito por primera vez por Graeff y cols. (1993) y deriva del laberinto elevado, un modelo animal de ansiedad. Exposiciones repetidas al LET induce en el animal el aprendizaje de una evitación inhibitoria (pasiva) a los brazos abiertos (por ejemplo, aumento de latencia para dejar el brazo cerrado en varios ensayos consecutivos), la cual está etológicamente basada en la aversión experimentada en estos animales cuando se exponen a lugares no protegidos (respuesta de evitación inhibitoria pasiva aprendida). La adquisición de la evitación inhibitoria en el LET está representada por una curva de aumento de aprendizaje hasta que el criterio de evitación es alcanzado. La presencia de la conducta de evaluación de riesgo hacia los brazos abiertos estando en los brazos cerrados en la sesión de entrenamiento, indica una creciente reunión de información para disminuir los conflictos o vacilaciones con respecto al ambiente. Esto sugiere que el tiempo gastado dentro del brazo cerrado no representa habituación o pérdida o falta de motivación para explorar, sino una respuesta de evitación inhibitoria aprendida.

A diferencia de la prueba de automoldeamiento, en el LET se observó un aumento significativo en la latencia en la sesión de prueba, con las dosis de 1 mg/Kg y de 10 mg/Kg respecto al grupo tratado con vehículo, esto nos indica que las ratas aprendieron la respuesta de evitación inhibitoria pasiva. Al realizar el cálculo del índice de riesgo se obtuvo que este fue aumentando conforme aumentó las dosis de Tibolona, acercándose a la unidad, lo que sugiere que el tiempo que estuvieron los animales en el brazo cerrado no representa una falta de motivación para explorar o por alguna alteración en su actividad locomotriz.

Esta prueba, al derivar del laberinto en elevado en forma de cruz, de manera indirecta valora los niveles de ansiedad en las ratas. Así, al evaluar el tiempo que los animales

pasaron en los brazos abiertos respecto al brazo cerrado y el índice de riesgo, pueden dar un acercamiento de los niveles de ansiedad de los animales. Los datos obtenidos sugieren un efecto ansiolítico de las dosis de 1 y 10 mg/kg. Se sabe que las hormonas ováricas como el estradiol tienen efectos ansiolíticos ya que se ha observado que en ratas en proestro disminuyen sus niveles de ansiedad, esto debido a los altos niveles de estradiol, mientras que ratas en diestro tiene altos niveles de ansiedad, debido a los bajos niveles de estradiol y al tratar a las ratas durante esta etapa del ciclo con estradiol se observa que los niveles de ansiedad disminuyen; en el caso de la Tibolona se ha observado que con una dosis de 1 mg/Kg hay una disminución de la ansiedad; sin embargo no se sabía si otras dosis tenían un efecto o no en esta conducta.

Es bien conocido que la amígdala, la neocorteza y el hipocampo son regiones meta del sistema cerebral basal anterior colinérgico, que se relaciona estrechamente con diversas funciones del aprendizaje y la memoria (Van der Zee y Luiten, 1999). La prueba de autoaprendizaje se sabe es hipocampo-dependiente (Meneses, 2003). Los resultados de las pruebas conductuales muestran que en una prueba de autoaprendizaje el tratamiento de Tibolona a las diferentes dosis no fue efectiva, una posible explicación podría ser una reducción en la actividad de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (CBA) que proyectan a la corteza frontal e hipocampo, principalmente en CA1, donde estas juegan un papel importante en la función cognitiva, debido a que dos núcleos del CBA que son el núcleo basal magnocelular y la banda diagonal de Broca responde de manera selectiva a la estimulación visual o auditiva, las cuales están asociadas al reforzamiento de la comida, el cual es importante en esta prueba (Wilson, 1990). Sin embargo no se sabe el mecanismo de acción de la Tibolona en cuanto a otros sistemas de neurotransmisión implicados en este tipo de prueba.

En contraste con lo anterior, el LET es una prueba en la que se aprende una respuesta de evitación inhibitoria pasiva y la estructura neuroanatómica que regula la entrada de la información es la amígdala. Se sabe que el sistema serotoninérgico, juega un papel importante en la adquisición y consolidación en este tipo de aprendizaje (Graef et al, 1998). Nuestros datos muestran que el tratamiento con Tibolona mejora el aprendizaje en una tarea de asociación con componente emocional. Esto sugiere que posiblemente la Tibolona este

ejerciendo su efecto sobre el sistema serotoninérgico, dato que coincide con lo observado en estudios clínicos en los cuales una dosis de 2.5mg al día disminuye los niveles de ansiedad en mujeres menopáusicas (Jacobsen et al., 2008).

WESTERN BLOT

Cuando los estrógenos declinan después de la menopausia, un amplio rango de neurotransmisores, incluyendo el sistema monoaminérgico y colinérgico, así como la cognición y otros procesos que dependen de ellos se ven afectados (McEwen,1999). Para determinar si el efecto del tratamiento hormonal sobre la cognición se encuentra relacionado con cambios en los sistemas colinérgicos o serotoninérgicos, se midieron los niveles de ChAT y TPH por Western blot.

Los datos mostraron que el contenido de ChAT disminuyó con las dosis de 0.1. 1.0 y 10mg/Kg de Tibolona. Por lo que, la regulación a la baja de la ChAT nos sugiere el porqué los animales no tuvieron un buen desempeño en la prueba de autoaprendizaje, ya que para realizar esta prueba es necesario tener un sistema colinérgico estable para que puedan realizar la tarea asociativa (Meneses, 2003). Se ha observado que en monos hembras ovariectomizadas y tratados con dosis de 0.2 y 1.0 mg/Kg de Tibolona, a largo plazo, disminuye la actividad de la ChAT en el hipocampo, lo cual concuerda con lo observado con la dosis de 1.0 mg/Kg (Gibbs et al., 2002).

Por otra parte, este efecto en la disminución del contenido de ChAT también se ha observado en monos hembras ovariectomizadas y tratadas con estrógenos conjugados de equinos y/o acetato de medroxiprogesterona (Gibbs, et al., 2002). Además, se ha observado que el efecto positivo del E₂, sobre diferentes parámetros bioquímicos y conductuales, no se mantienen en respuesta al tratamiento a largo plazo (Gibbs, 2010) y que este hallazgo puede deberse a niveles reducidos de RE (Blaustein, 2003; Brown, 1996). Con lo que podemos sugerir que el efecto observado sobre el contenido de ChAT se debe a un efecto estrogénico la Tibolona.

Para TPH se observa un incremento en su contenido con las dosis de 1.0 y 10 mg/Kg de Tibolona. Datos previos indican que esto se puede deber al efecto estrogénico de la Tibolona ya que se ha observado que la administración crónica de estradiol (10µg/Kg), aumenta la expresión de la TPH en el hipocampo y corteza frontal, así como una disminución de los niveles de ansiedad (Pandaranandaka et al., 2006, 2009). Como se menciona en la introducción, la TPH es la enzima más importante para la síntesis de serotonina, la cual es un neurotransmisor que juega un papel importante en la ansiedad y depresión así como también participa en la modulación de la memoria y aprendizaje. Se ha observado que en mujeres durante la fase premenstrual disminuyen los niveles de serotonina plasmáticos y se ha correlacionado con cambios de humores negativos como ansiedad (Sigmon, 1996).

En cuanto al LET y la TPH se ha observado que ratas OVX y tratadas con E₂ tienen un mejor desempeño en esta prueba, aprendiendo la tarea de evitación pasiva inhibitoria y con disminución de la ansiedad. Nuestros resultados sugieren que la Tibolona puede ejercer un efecto estrogénico sobre la regulación de la TPH y la síntesis de serotonina en el hipocampo, lo cual se puede ver reflejado en un mejor desempeño en la prueba de LET en las dosis de 1 y 10 mg/kg de Tibolona.

INMUNOFLUORESCENCIA Y DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS

En el caso de la Inmunofluorescencia se analizó de manera cualitativa el área CA1 del hipocampo, esta área es importante ya que es influenciada principalmente por las vías colinérgicas. Se observó una disminución en la inmunoreactividad de ChAT y un aumento en la inmunoreactividad de TPH conforme aumentaban las dosis de Tibolona, lo cual concuerda con lo observado previamente en el western blot.

Los resultados de la prueba de detección de apoptosis, nos sugieren que la OVX a largo plazo desencadena procesos apoptóticos en el hipocampo de la rata hembra. Esto lo observamos al encontrar un gran número de células inmunoreactivas para la anexina V en las ratas tratadas con vehículo. Por el contrario, al realizar el análisis de la detección de la

apoptosis, observamos que la administración de Tibolona disminuyó el número de células inmunoreactivas para la anexina-V. Lo anterior sugiere que al dar tratamiento con Tibolona, sobre todo a dosis altas, disminuyó el proceso apoptótico en el hipocampo, principalmente en la región CA3. Por datos de la literatura, se sabe que esta región es regulada por hormonas esteroides ya que se reportado que el tratamiento con E₂ regula diferentes vías apoptóticas y anti-apoptóticas; por ejemplo, se sabe que E₂ aumenta la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2, mientras que cuando hay un daño por la ausencia prolongada de estradiol hay un aumento de células apoptóticas así como un aumento en el contenido de Bax (Sales et al., 2010). Nuestros resultados sugieren que la administración de Tibolona ejerce un efecto neuroprotector similar al del E₂ sobre los cambios por su ausencia prolongada, así como también que una de las vías probables de este efecto sea a través de la activación de vías antiapoptóticas y la inactivación de vías apoptóticas, aunque esto último requiere posteriores análisis.

Todos estos datos indican que la Tibolona tiene efecto en procesos de aprendizaje de tipo emotivo, como lo es la prueba del LET, no así en un proceso de aprendizaje de tipo automoldeamiento. A su vez, es capaz de modular las enzimas involucradas en estos procesos, regulando hacia arriba la expresión de TPH con las dosis de 1 y 10 mg/Kg y la de ChAT a la baja de manera dosis dependiente. Lo anterior nos sugiere que la Tibolona al estar modulando los neurotransmisores está modificando la capacidad cognitiva de las ratas. Sin embargo falta determinar qué pasa con los receptores de estos neurotransmisores en el hipocampo y también determinar el contenido de estas enzimas en otras regiones involucradas en las pruebas como lo son el CBA, la corteza y la amígdala.

Observamos que la Tibolona es capaz de prevenir la neurodegeneración ya que conforme aumentan las dosis de Tibolona se observa menos inmunoreactividad de anexina V y un mayor marcaje con 6CFDA, lo cual indica que hay más células vivas, sin embargo falta determinar cómo se da esta regulación de la neuroprotección

X. CONCLUSIONES

- El tratamiento a largo plazo con diferentes dosis de Tibolona mejoro la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada en un modelo de evitación pasiva inhibitoria, pero no en un modelo de aprendizaje de tipo automoldeamiento.
- Las diferentes dosis de Tibolona no afectan la actividad espontánea de la rata ovariectomizada.
- El contenido de ChAT disminuye de manera dosis dependiente.
- Aumenta el contenido de TPH con las dosis de 1 y 10 mg/Kg
- Disminuye la muerte celular por apoptosis con las dosis de 0.1,1.0 y 10 mg/Kg de Tibolona en el hipocampo de la rata.

XI BIBLIOGRAFÍA

1. Al Azzawi F. 1992. Endocrinological aspects of the menopause. *Br Med Bull*; 48:262-275.
2. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe. 2007. *The hippocampus book*. Oxford University Press. 832pp
3. Audesirk T, Cabell L, Kern M, Audesirk G. 2003. beta-estradiol influences differentiation of hippocampal neurons in vitro through an estrogen receptor-mediated process. *Neuroscience*; 121:927-34.
4. Berning B, Kuijk CV, Kuiper JW, Bennink HJ, Kicovic PM, Fauser BC. 1996. Effects of two doses of Tibolone on trabecular and cortical bone loss in early postmenopausal women: a two-year randomized, placebo-controlled study. *Bone*.19:395-9.
5. Bjarnason NH, Bjarnason K, Haarbo J, Rosenquist C, Christiansen C. 1996. Tibolone: prevention of bone loss in the late postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*; 81:2419-22.
6. Blaustein, J.D., Olster, D.H., Tetel, M.J., 1993. Heterogeneous regulation of steroid hormone receptors in the brain, *Integr. Comp. Biol.* 33, 219–228.
7. Blom MJ, Groot-Wassink M, Ederveen AGH, Kloosterboer HJ, Lambert JGD, Goos HJT. 2001. The metabolism of Org OD14 and its derivatives in rat and human target tissues for hormone replacement therapy. In: Blom MJ, editor. *Thesis. Steroids and steroid analogues for hormone replacement therapy; metabolism in target tissues.*; Chapter 5, p. 63–80.
8. Brown, T.J., Scherz, B., Hochberg, R.B., MacLusky, N.J., 1996. Regulation of estrogen receptor concentrations in the rat brain: Effects of sustained androgen and estrogen exposure, *Neuroendocrinology* 63, 53–60.
9. Burris T, E McCabe (eds). 2001. *Nuclear receptors and genetic disease*. Academic Press. USA. 419 pp.

10. Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., Pérez-Palacios, G. y Cerbón MA. 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Inv Clín.* 47: 329-340.
11. Chakravarti S, Collins WP, Forecast JD, Newton JR, Oram DH, Studd J W. 1976. Hormonal profiles after the menopause. *Br Med J*; ii:784-787.
12. Correa M. (2007). Functional neuroanatomy of implicit learning: associative, motor and habit. *Review Neurology*; 44(4): 234-242.
13. Cummings SR, Ettinger B, Delmas PD, Kenemans P, Stathopoulos V, Verweij P, Mol-Arts M, Kloosterboer HJ L, Mosca L, Christiansen C, Bilezikian J, Kerzberg EM, Johnson S, Zanchetta J, Grobbee DE, Seifert W, Eastell R; 2008.LIFT Trial Investigators. The effects of tibolone in older postmenopausal women. *N Engl J Med.*; 359:697-08
14. Dawood MY, Tidey GF. Menopause current problems in obstetrics. 1993.*Gynecol Fertil*; 16:169-208.
15. De Aguilar RB, Dickel OE, Cunha RW, Monserrat JM, Barros DM, Martinez PE. 2006. Estradiol valerate and Tibolone: effects on memory. *Pharmacol Biochem Behav.*; 85:689-96.
16. Dhandapani Krishnan M. y Brann Darrel W. 2002. Protective effects of estrogen and and Selective Estrogen Receptor Modulators in the brain. *Biol of reprod.* 67, 1379-1385
17. Diaz BR. 2001. Disease: Recent Insights and Remaining Challenges Memory Function and Neuroprotection Against Alzheimer's Cellular and Molecular Mechanisms of Estrogen Regul. *Learning and Memory.* 8: 121-133.
18. Díaz Hernández M, Gualix J, Gómez Villafuertes R, Castro R, Pintor J, Miras Portugal MT. 2000. Receptores nicotínicos neurales: interacción con receptores purinérgicos. *Anal Real Acad Farm*; 66: 1-21.
19. Gallagher JC, Baylink DJ, Freeman R, and McClung M. 2001. Prevention of bone loss with Tibolone in postmenopausal women: Results of two-randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-findings studies. *J Clin Endocrinol Metab*; 86:4717-26.

20. Garefalakis M y Hickey M. 2008. Role of androgens, progestins and tibolone in the treatment of menopausal symptoms: a review of the clinical evidence Clin Interv Aging.; 3:1-8
21. Genazzani AR, Petraglia F, Purdy RH, eds. 1996. The Brain: Source and Target for Sex Steroid Hormones. London, United Kingdom; The Parthenon Publishing Group.
22. Gibbs RB, Nelson D., Anthony MS and Clarkson TB. 2002. Effects of long term hormone replacement and of tibolone on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the brains of ovariectomized, CYNOMOLOGOUS MONKEYS. Neuroscience. 113: 907-914
23. Gibbs, R. B., 2010. Estrogen therapy and cognition: a review of the cholinergic hypothesis. Endocr Rev. 31, 224-253.
24. González-Arenas AA, Reyna-Neyra A, Gómez MJ, Méndez I, Larrieta-Carrasco ME Haces ML, Jiménez B, Camacho-Arroyo I.2001. Los mensajeros químicos del sistema neuroendócrino. *Educación Química*. 3: 158-162.
25. Gotti C, Fornasari D, Clementi F. 1997. Human neuronal nicotinic receptors. Prog Neurobio; 53: 199-237
26. Gould E, Woolley CS, McEwen BS. 1990. Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: a Golgi study in the adult rat. Neuroendocrinology. 51(5):530-5
27. Grattarola R, Secreto G, Recchione C. 1969. Correlation between urinary testosterone or estrogen excretion levels and interstitial cell-stimulating hormone concentrations in normal post-menopausal women. Am J Obstet Gynecol;121:380-381
28. Greene JG. 1984. .The social and psychological origins of theclimateric syndrome. Aldershot: Gower,
29. Greenspan, F.S. y Strewler, G.J. 1998. Endocrinología básica y clínica. Manual Moderno, México, 967 pp.
30. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol Rev. 87(3):905-31

31. Jacobsen DE, Samson MM, T van der Schouw Y, Groebbee DE, Verhaar HJJ. 2008. Efficacy of tibolone and raloxifene for the maintenance of skeletal muscle strength, bone mineral density, balance, body composition, cognitive function, mood/depression, anxiety and quality of life/well-being in late postmenopausal women ≥ 70 years: Study design of a randomized, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, single-center trial. *Trials* 9:32
32. Jazsmann L, Van Lith N D, Zaat JLA. 1969. The perimenopausal symptoms: The statistical analysis of a survey. *Med Gynaecol Sociol*; 4:268-277.
33. Khaw KT. 1992. Epidemiology of the menopause. *Br Med Bull*; 48:249-261.
34. Knobil E and Neil J (eds). 1988. *The physiology of reproduction*. Raven Press, Ltd. , New York. 3250pp.
35. Ma L, Hofling M, Masironi B, von Schoultz B, Cline JM, Sahlin L. 2008. Effects of tibolone and conventional HRT on the expression of estrogen and progesterone receptors in the breast. *Maturitas* : 345-9
36. Massoulie J, Bon S. 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci*; 5: 57-106.
37. McEwen Bruce S., Alves Stephen E. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews* 20(3): 279–307.
38. Metcalf MG, Donald RA, Livesey JH. 1982. Pituitary-ovarian function before, during and after the menopause: a longitudinal study. *Clin Endocrinol*; 17:489-494.
39. Navarrete F., Pérez Ortíz JM., Femenía T., García Gutiérrez MS., García Payá ME., Leiva Santana C., Manzanares J. 2008. Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Review neurology*; 47:137-145.
40. Nordin BEC, Crilly RG, Marshall DH, Barkworth SA. 1981. Oestrogens, the menopause and the adrenopause. *J Endocrinol*; 89:131-143.
41. Oda Y. 1999. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Phatol. Int.* 49(11):921-37
42. Oldenhave A, Netelembos C. 1994. Pathogenesis of climacteric complaints: ready for the change? *Lancet*. 343:649-653

43. Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, 1989. *The Hippocampus*. New York. pp:97-119.
44. Palomba S, Orio F Jr, Falbo A, Oppedisano R, Tolino A, Zullo F. 2008. Tibolone reverses the cognitive effects caused by leuprolide acetate administration, improving mood and quality of life in patients with symptomatic uterine leiomyomas. *Fertil Steril.*; 90:165-73
45. Perry E, Walker M, Grace J, Perry R. 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *TINS*; 22-6, 273-80.
46. Prieto A, O, Villamar-Cruz, M Saqui-Salces, T Neri-Gómez, A Almaraz-Nieves, V. I. Hernández-Molina, H Valdez Rodríguez e I Camacho-Arroyo. 2003. Cómo actúan las hormonas. *Educación Química* 14:196-201.
47. Qiu J, Bosch MA, Rønnekleiv OK, Kloosterboer HJ, Kelly MJ. 2008. Tibolone rapidly attenuates the GABAB response in hypothalamic neurones. *J Neuroendocrinol.* 20:1310-8.
48. Reed MJ, Kloosterboer HJ. 2004. Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR) *Maturitas.* 30:S4-6.
49. Rozenberg S, Bosson D, Peretz A, Caufriez A, Robyn C. 1988. Serum levels of gonadotrophins and steroid hormones in the post-menopause and later life. *Maturitas*; 10:215-224.
50. Sales S, Ureshino RP, Pereira RTS, Schmidt M, Pires de Oliveira M, Yamanouye N, Godinho O, Soubhi S, Segreti C, Abdalla F. 2010. Effects of 17 β -estradiol replacement on the apoptotic effects caused by ovariectomy in the rat hippocampus. *Life Sci.* 86: 832-838
51. Semmens JP, Wagner G. 1982. Estrogen deprivation and vaginal function in postmenopausal women. *JAMA*; 248:445-448
52. Shepherd, G. 1979. *The synaptic organization of the brain* (Second edition). Oxford University Press.
53. Sigmon ST, Fink CM, Rohan KJ, Hotow LA. 1996. Anxiety sensitivity and menstrual cycle reactivity: psychophysiological and self-report differences. *J Anxiety Disorders*; 10:393-410.

54. Sowers MR, La Pietra MT. 1995. Menopause: its epidemiology and potential association with chronic diseases. *Epidemiologic Reviews*; 17:287-301
55. Speroff L, Glass RH, Kase NG. 1989. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 4a ed. New York: Williams and Wilkins, 121-163.
56. Tata JR. 2002. Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 3(9):702-10.
57. Trévoux R, DeBrux J, Castanier M. 1986. Endometrium and plasma hormone profile in the peri-menopause and post-menopause. *Maturitas*. 8:309-26.
58. Upton GV. 1982. The perimenopause: physiologic correlates and clinical management. *J Reprod Med*; 27:1-27, editorial comment 27-28.
59. Vagenakis AG. 1989. Endocrine aspects of menopause. *Clin Rheumatol*; 8(suppl 2):48-51.
60. Van der Zee, E.A., Luiten, P.G.M. 1999. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*. 58: 409-471.
61. Verheul HA y Kloosterboer HJ. 2006. Metabolism of exogenous sex steroids and effect on brain functions with a focus on tibolone. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; 102:195-204
62. Verheul HA, Blok LJ, Burger CW, Hanifi-Moghaddam P, Kloosterboer HJ. 2007. Levels of tibolone and estradiol and their nonsulfated and sulfated metabolites in serum, myometrium, and vagina of postmenopausal women following treatment for 21 days with tibolone, estradiol, or estradiol plus medroxyprogesterone acetate. *Reprod Sci.*; 14:160-8.

❖ **BUFFER DE TBS 1X, pH 7.5**

Tris-Base	50mM
NaCl	150mM

Se pone en agitación con agua destilada y se ajusta el pH con HCl. Se afora a 1L.

❖ **BUFFER DE CORRIDA 1X**

Tris-Base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	10%

Se pone en agitación con agua destilada y se afora a 1L.

❖ **TBS TWEEN (TTBS)**

TBS 1X	1000 mL
TWEEN 20	0.1%

❖ **BUFFER DE CARGA 5X (LB5X)**

SDS	20%
Glicerol	10%
Dithiothreitol(DTT)	7.7%
Tris	0.5M pH 8.5
Azul Bromofenol	0.1%

Poner en agitación y aforar con agua destilada a 200 mL.

SOLUCIÓN ROJO PONCEAU

Ácido Acético	5%
Rojo Ponceau	0.1%

❖ **PERSULFATO DE AMONIO**

Persulfato de	0.1%
---------------	------

BUFFER TRANSFERENCIA 1X

Tris Base	24 mM
Glicina	19.2 mM
SDS	0.37%

Se pone en agitación con agua destilada y se afora a 1L.

SOLUCION DE BLOQUEO

Leche descremada en polvo al 5% en TTBS 1X

BUFFER LISIS PROTEÍNAS (PIK)

NaCl	150mM
Tris HCl	20mM
EDTA	5mM
Glicerol	10%

NP 40 1%

Se ajusta el pH a 7.4

Se afora a 200 mL con agua desionizada.

Se agrega una pastilla de inhibidores complete de roche por cada 10ml

amonio(APS)

❖ GEL DE POLIACRILAMIDA

El gel tiene dos partes: Stacking (concentrante) y Resolving (separador)

RESOLVING (100mL) dependiendo el tamaño de las proteínas

Tamaño de la proteína (Kda)	14	15-70	20-100	50-250	>250
% Gel	14%	12%	10%	8%	7%
Glicerol 50%	20mL	20mL	20mL	20mL	20mL
H ₂ O	8.33mL	15mL	21.68mL	28.33mL	31.66mL
Tris 1,5M pH 8,8	25mL	25mL	25mL	25mL	25mL
Bisacrilamida 30%	46.66mL	40mL	33.32mL	26.66mL	23.33mL
SDS 10%	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

STACKING (100 mL)

H ₂ O	61mL
Tris 0,5M pH 6,8	25mL
Bisacrilamida 30%	13mL
SDS 10%	1mL

RESOLVING (para dos geles)

Resolving	15 mL
APS	150 µl
TEMED	15 µl

STACKING (para dos geles)

Resolving	7 mL
APS	90 µl
TEMED	9 µl