



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

***Efectos de prolame (un 17 β -aminoestrógeno) sobre
memoria espacial y ansiedad***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA

ITZEL NISSEN CAMACHO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. EN C. LIMEI ZHANG JI



CIUDAD UNIVERSITARIA,
MÉXICO D. F., FEBRERO DE 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Sinodales para el examen de la defensa de Tesis:

PRESIDENTE: Profesor: Julio Moran
VOCAL: Profesor: Limei Zhang
SECRETARIO: Profesor: Robin Hudson
1er. SUPLENTE: Profesor: Raul Aguilar
2° SUPLENTE: Profesor: Clorinda Arias

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

Laboratorio de Comunicación Intercelular

Asesor del tema: Dra. Limei Zhang

Sustentante: Itzel Nissen Camacho

AGRADECIMIENTOS

Va este reconocimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de esta investigación.

A mis padres Thor y Betty con profunda gratitud y amor por el esfuerzo que han realizado durante todos estos años.

A mis hermanos Karstin y Bruno, a mis tíos Alicia, Victor, Eduardo y Ale y a mi Abuelita Rosita, por su comprensión, apoyo y afecto incondicionales.

A todos mis amigos por su paciencia y solidaridad, sobre todo, en aquellos momentos especiales.

A mis profesores del Instituto de Investigaciones Biomédicas Básicas, quienes representan dignamente a la institución que considero mi hogar, la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de la DGAPA-UNAM, me otorgó una beca de tesis de licenciatura a través del proyecto de investigación IN218111.

Quiero destacar mi reconocimiento al Dr. en C. Juan Manuel Fernández (IQ-UNAM), la Dra. en C. Aurora de la Peña (FM-UNAM), la Dra. en C. Claudine Irlles (FM-UNAM), y la Est. Alicia Nava Kopp (LIBB-UNAM) por haber contribuido a los resultados presentados en la presente tesis. También quiero agradecer a Dr. en C. Arturo Vega, al Cand. Dr. en C. Felipe Estrada Zaleta, Med. Esp. Felipe Estrada León, al Med. Cir. Vito Hernández por sus apoyos durante el desarrollo de la presente tesis.

Con un gran cariño, gratitud y admiración a la Doctora Limei Zhang, quien ha servido como ejemplo e inspiración.

A todos, que con su presencia hicieron posible, llegar a buen puerto.

Productos científicos derivados de esta tesis:

Carteles:

39 Reunión Anual de la Sociedad de Neurociencias (Chicago, 2009)

1. Ansigénesis y daño en la memoria espacial inducidos por ovariectomía, se revierten con la administración de un 17beta-amino estrógeno (prolame): Un estudio conductual en ratas hembras jóvenes.

I Reunión Anual del Día del Biomédico (Ciudad de México, 2010)

2. Un 17beta-amino estrógeno (prolame) revierte la pérdida de espinas dendríticas en neuronas piramidales del hipocampo en ratas jóvenes ovariectomizadas.

40 Reunión Anual de la Sociedad de Neurociencias (San Diego, 2010)

3. Un 17beta-amino estrógeno (prolame) revierte la pérdida de espinas dendríticas en neuronas piramidales del hipocampo en ratas jóvenes ovariectomizadas

Índice

1 RESUMEN	7
2 MARCO TEÓRICO	8
2.1 ESTRÓGENOS	8
2.1.1 <i>Síntesis y secreción</i>	8
2.1.2 <i>Funciones fisiológicas generales</i>	9
2.1.3 <i>Receptores de estrógenos</i>	9
2.1.4 <i>Funciones neurofisiológicas</i>	11
2.2 MENOPAUSIA	13
2.3 TERAPIA DE REMPLAZO HORMONAL	14
2.4 <i>PROLAME</i>	17
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4 OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
5 HIPÓTESIS	20
6 JUSTIFICACIÓN	20
7 MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 SÍNTESIS DE PROLAME	21
7.2 ANIMALES	21
7.3 <i>TRATAMIENTO DE PROLAME Y ESTRADIOL</i>	22
7.4 LABERINTO ELEVADO DE CRUZ (EPM POR SUS SIGLAS EN INGLÉS).....	23
7.5 LABERINTO DE AGUA DE MORRIS (MWM POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)	24
7.6 INMUNOTINCIÓN DE NÑOS Y TINCIÓN DE GOLGI	25

7.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
8	RESULTADOS.....	27
8.1	LABERINTO ELEVADO EN CRUZ.....	27
8.2	PRUEBA DEL LABERINTO DE MORRIS	28
8.3	INMUNOREACTIVIDAD DE LA NNOS	30
8.4	DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS	32
9	DISCUSIÓN	35
10	CONCLUSIONES.....	38
11	BIBLIOGRAFÍA	39
12	APENDICE I: ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
12.1	LABERINTO ELEVADO EN CRUZ.....	43
12.2	PRUEBA DEL LABERINTO DE MORRIS	43
12.3	INMUNOREACTIVIDAD DE LA NNOS	47
12.4	DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS: CA1	49
12.5	DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS: CA3	51
12.6	DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS: GD.....	54

1 Resumen

La terapia con remplazo de estrógenos ha sido utilizada ampliamente para tratar los síntomas causados por la menopausia natural o quirúrgica. Dentro del espectro de síntomas asociados a la pérdida de la función ovárica se encuentran los que afectan al sistema nervioso, tales como la ansiedad y déficits en el proceso de aprendizaje y en la memoria. Sin embargo, el remplazo de estrógenos conlleva posibles efectos secundarios, tales como el aumento en el riesgo de un evento tromboembólico y la proliferación celular no-deseada. Estas situaciones y otros efectos indeseable asociados, han fomentado la búsqueda de estrategias terapéuticas alternas que produzcan los beneficios deseados y reduzcan el riesgo de efectos secundarios.

El prolame es un aminoestrógeno sintetizado por primera vez por el grupo del Dr. J. M. Fernández en el Instituto de Química de la UNAM. Otros grupos de investigación han demostrado que este compuesto tiene efectos estrogénicos y proliferativos débiles, en el útero. Sin embargo, tiene una función anti-coagulante y anti-plaquetaria alta, contrastando el efecto negativo del estradiol en este aspecto. En este estudio, que es el contenido principal de mi proyecto de tesis de la licenciatura, investigué, con la co-participación de otros colegas de mi laboratorio, los efectos de prolame en ratas jóvenes ovariectomizadas sobre conductas de ansiedad utilizando el laberinto elevado en cruz, y sobre el aprendizaje espacial utilizando el laberinto acuático de Morris. Posteriormente medí los cambios en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo como índice de plasticidad.

Los resultados muestran que prolame revierte el aumento de ansiedad y los impedimentos en el aprendizaje posteriores a la ovariectomía, en una manera similar a la del estradiol. El hipocampo de los sujetos tratados con prolame muestra un aumento en la inmunoreactividad de la nNOS y su distribución hacia los compartimentos dendríticos. La recuperación de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales también fue observada tras el suministro de prolame.

Los resultados encontrados en este estudio sobre los efectos de prolame en el sistema nervioso central, sumados a los datos previamente reportados de menos proliferación celular en el útero y mayor efecto anticoagulante, sugieren que prolame puede ser una mejor alternativa, que el estradiol para mejorar los síntomas neurológicos de la menopausia con menores riesgos.

2 Marco Teórico

2.1 Estrógenos

2.1.1 Síntesis y secreción

Los estrógenos son compuestos esteroideos sintetizados a partir del colesterol y de la acetil coenzima A. La progesterona y la testosterona son precursores de los estrógenos. Inclusive cantidades mínimas de testosterona son sintetizadas por los ovarios.

Los estrógenos se producen principalmente en los ovarios para luego ser secretados a la sangre. Se han logrado aislar seis diferentes tipos de estrógenos obtenidos del plasma humano femenino, sin embargo solo tres de éstos se encuentran presentes de manera significativa y son: el β -estradiol, las estronas y el estriol (Fig. 1). El β -estradiol y las estronas

se encuentran presentes en la sangre, y el estriol es un producto oxidativo de las anteriores. La potencia estrogénica del β -estradiol es 12 veces mayor que el de las estronas y 80 veces mayor que la del estriol.

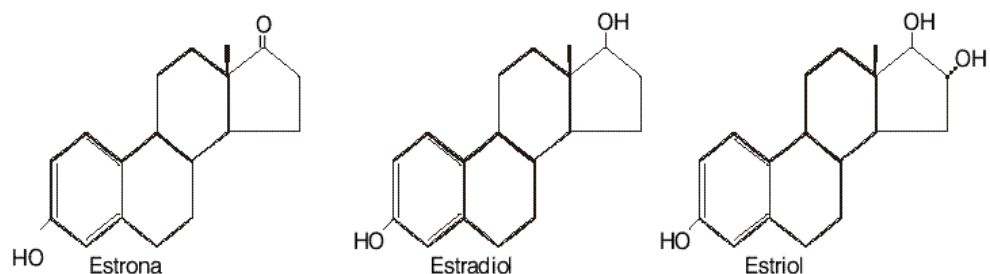


Figura 1. Tipos principales de estrógenos.

2.1.2 Funciones fisiológicas generales

Los estrógenos promueven el desarrollo y mantenimiento de los caracteres secundarios femeninos que comprenden la distribución del tejido adiposo en las mamas, abdomen, monte pubis, y las caderas así como el tono de voz y el patrón de crecimiento del pelo en la cabeza y el cuerpo. Incrementan el anabolismo proteico, incluyendo la formación de los huesos densos. Disminuyen los niveles sanguíneos de colesterol, lo que disminuye el riesgo de padecer enfermedad arterial coronaria.

2.1.3 Receptores de estrógenos

Los receptores de estrógenos (ERs) se identificaron alrededor del año 1960 y fue más tarde que se descubrió que actuaban mediante su unión al DNA, promoviendo la

asociación del complejo de pre-iniciación de los factores generales de transcripción en los promotores blanco (Tsai and O'Malley, 1994).

Existen varios tipos de ERs. Uno de estos es el ER α , caracterizado como un receptor intracelular que funciona como factor de transcripción regulado por ligando, por lo que se localiza principalmente en el núcleo de la célula. Una vez unido a estrógenos, los dímeros de ER α regulan la expresión génica por su acción sobre fragmentos de DNA denominados elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (O'Malley and Tsai, 1992). Estos cambios genéticos en la transcripción, se conocen como: mecanismos clásicos de acción de los estrógenos. Posteriormente se encontró otro receptor al que se le llamo ER β , que funciona de manera similar a ER α (Kuiper et al., 1996).

En estudios posteriores se observó que existen respuestas más rápidas en comparación con los mecanismos clásicos, a las que se les denominó efectos no clásicos de los estrógenos. Uno de los primeros efectos no clásicos reportados, fue el aumento de cAMP en el tejido uterino. Se ha mostrado que las concentraciones de cAMP aumentan 15 s después de la aplicación de estrógenos (Szego and Davis, 1967). En neuronas, se ha visto que en segundos, la hormona alteraba la actividad eléctrica de las neuronas preópticas septales (Kelly et al., 1976), siendo esto mediado por receptores acoplados a proteínas G o a canales iónicos.

Otro nombre utilizado para diferenciar mecanismos clásicos y no-clásicos es genómico y no genómico, sin embargo no se considera un buen nombre ya que hay efectos no-clásicos que también pueden causar modificaciones genéticas por medio del factor de transcripción CREB. También se intentó clasificar por el tiempo en el que se veían las respuestas, pensando que los lentos serían genómicos, sin embargo se ha visto que mecanismos clásicos/ genómicos tienen efectos en cuestión de minutos (Micevych and Mermelstein, 2008).

2.1.4 Funciones neurofisiológicas

La neuroendocrinología es un campo en el cual los mecanismos químicos detallados se han ligado a conductas biológicas cruciales. El primer conjunto de mecanismos estudiados fueron las conductas sexuales simples como la lordosis en ratas hembra. Esto se observa como consecuencia de la unión de estrógenos a neuronas del hipotálamo ventromedial (Agmo and Pfaff, 1999). También se vio que son necesarias neuronas de la zona lateral del área preóptica para la conducta de cortejo. Igualmente, existe una relación de los efectos de los estrógenos en la conducta materna (Numan and Sheehan, 1997).

Las relaciones entre el estradiol y las funciones no reproductivas del cerebro se han demostrado ya, por los estudios conductuales sobre dimorfismo sexual y pruebas de memoria y por la presencia de ERs a lo largo del cerebro. Por ejemplo, el aumento abrupto de estradiol está asociado a una deficiencia en el aprendizaje de aquellas tareas que requieran el funcionamiento del hipocampo. Sin embargo, la administración exógena de estradiol a largo plazo minimiza los déficits en dichas tareas. Se ha observado en estudios anatómicos que las fluctuaciones de estrógenos o los tratamientos con estrógenos están asociados a cambios en la plasticidad del hipocampo (Walf et al., 2009).

ER α y ER β se expresan a lo largo del eje rostro caudal del cerebro y la médula espinal y se ha demostrado que existe un traslape en sus patrones de expresión. Por ejemplo ambos receptores se encuentran expresados en el hipocampo (Weiser et al., 2008). Además, se sabe que los estrógenos en el hipocampo activan a la proteína serina/treonina cinasa Akt vía ER α , llevando a una cascada de señalización que regula el crecimiento de las espinas

dendríticas de las neuronas piramidales en el proceso de aprendizaje (Phan et al., 2011; Znamensky et al., 2003)

El hipocampo está involucrado en el aprendizaje y la memoria: episódica, declarativa, contextual y espacial. Uno de los procesos regulados por las hormonas ováricas es la formación y ruptura cíclica de sinapsis excitadoras en el hipocampo (Woolley et al., 1990). Algunas de estas sinapsis se dan sobre las espinas dendríticas, que son formaciones especializadas de las dendritas, donde se acumulan receptores y otros complejos proteicos que modulan la transmisión sináptica. Se ha demostrado que los estrógenos aumentan la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de una región del hipocampo denominada CA1 (Woolley and McEwen, 1992), al igual que la densidad de receptores de glutamato de tipo NMDA (por sus cifras en inglés, N-Methyl-D-aspartic acid). La activación del receptor NMDA por medio de glutamato es un factor esencial en el desarrollo de nuevas sinapsis excitatorias (Woolley et al., 1997). Uno de los mecanismos que se disparan por la activación de receptores NMDA es la síntesis de óxido nítrico (NO). Se ha mostrado que el NO está involucrado en la señalización neuronal y en procesos relacionados con plasticidad celular, como la potenciación a largo plazo (LTP) (Hawkins et al., 1998) (Zorumski and Izumi, 1998), que es considerada uno de los mecanismos celulares principales para los procesos de aprendizaje y memoria (Bon and Garthwaite, 2003). De hecho, se ha demostrado que el NO facilita la transmisión sináptica en el hipocampo, contribuyendo a la LTP (O'Dell et al., 1991) (Schuman and Madison, 1991). Además, trabajos previos han expuesto que los estrógenos inducen la expresión de la NOS en el hipocampo de la rata ovariectomizada (d'Anglemont de Tassigny et al., 2009). Se sabe que este proceso se lleva a cabo debido a que los receptores de estrógenos facilitan la unión de la nNOS al complejo intracelular del receptor NMDA (Fig. 2) (Para una revisión, ver (Panzica et al., 2006)).

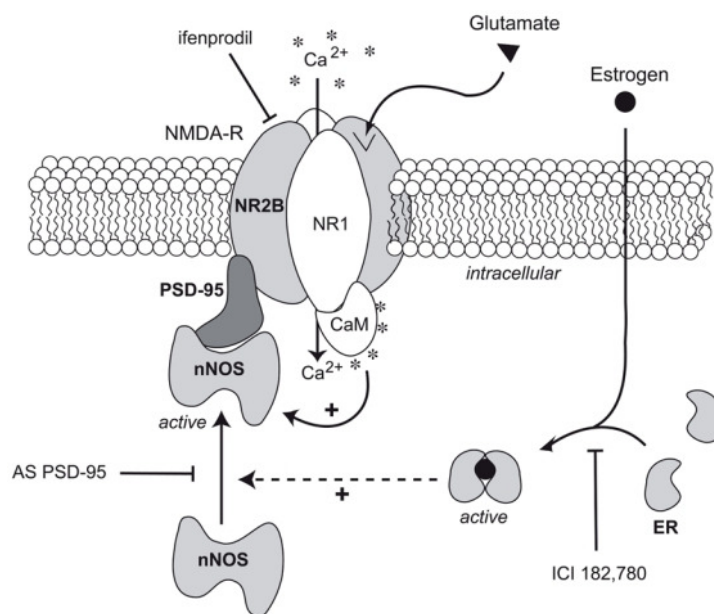


Fig. 2 Representación esquemática de los posibles cambios en interacciones proteicas, mediados por estradiol (d'Anglemont de Tassigny et al., 2009).

2.2 Menopausia

La menopausia es un evento biológico en el que la mujer deja de ovular y de menstruar. En México según el censo de población y vivienda realizado por el Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática (INEGI), en el 2005 había 103'263,388 habitantes, de los cuales 53'013,433 eran mujeres (51.3%); del total de mujeres el 11.4% (6'064,934) eran mayores de 55 años, las cuales en su gran mayoría tuvieron ya su última menstruación; con una esperanza de vida de 28 años, por lo que viven una tercera parte de sus vidas sin función ovárica (Mendoza, D.A., 2007). Algunos cambios físicos en las mujeres menopáusicas incluyen adelgazamiento del revestimiento vaginal, afecciones urinarias y osteoporosis, al igual que dolor en las articulaciones, insomnio, mareos, estreñimiento, irritabilidad, ansiedad y depresión. Se ha observado que la osteoporosis y los problemas cardiacos están asociados al bajo nivel de estrógeno en la población femenina después de la menopausia. En la actualidad se pueden prescribir estrógenos sintéticos a las mujeres que lo

necesiten (Papalia, 1997). La deficiencia de estrógenos debido a la menopausia natural o quirúrgica se puede asociar con modificaciones emocionales y cognitivas (Walf et al., 2009).

2.3 Terapia de remplazo hormonal

Antes del Siglo XX, la menopausia era considerada como una crisis fisiológica que, bajo ciertas circunstancias, podía generar algún padecimiento (Bell, 1990). Ya desde finales del Siglo XIX el Manual Merck listaba algunos tratamientos para la “climatérica”, uno de ellos derivado de gónadas animales. Otros productos fueron surgiendo, hasta que a finales de la década de 1930 se introdujo el Premarin derivado de la orina de yeguas preñadas. En 1966 Robert Wilson publicó un libro que se hizo muy popular titulado: *Femenina Eternamente*, en donde sostenía que la menopausia era una enfermedad debida a la deficiencia de estrógenos y que debía ser tratada con remplazo hormonal para prevenir lo que él denominó “la decadencia de la vida”. Pero no pasó mucho tiempo para que la evidencia científica delimitara los beneficios de un abordaje terapéutico universal con esta estrategia y se tuviera que restaurar el estudio de las consecuencias de los medicamentos disponibles. En el cuadro 1 se marcan algunas fechas y eventos que delinean el devenir de la terapia de reemplazo hormonal desde los finales del Siglo XIX (Stefanick, 2005).

Diferentes esteroides sintéticos tienen actividad estrogénica, uno de los cuales, el etinil estradiol, ha mostrado ser particularmente valioso desde el punto de vista terapéutico porque, a diferencia de los estrógenos naturales, tienen la misma eficiencia administrados de manera oral como en inyección. La terapia de remplazo hormonal (TRH) ha probado ser eficiente en prevenir y revertir algunas de estas condiciones incluyendo las deficiencias en aprendizaje y memoria espacial (Talboom et al., 2008), debido a la pérdida de la densidad de espinas dendríticas (Woolley and McEwen, 1992), al igual que las conductas similares a ansiedad (Rachman et al., 1998; Walf and Frye, 2006). Asimismo, el estradiol puede

influenciar los mecanismos de memoria, cognición, equilibrio corporal, habilidades motoras finas y control del estado de ánimo.

Cuadro 1. Hitos seleccionados en la terapia hormonal para la menopausia.

Año	Suceso
1889	Brown-Sequard se auto administra extracto testicular de perro para detener el envejecimiento
1890s	Se utiliza el Ovarin, derivado de ovario de vacas, para el tratamiento de la menopausia
1928	Searle [®] introduce un parche de estrógenos para aliviar los síntomas de la menopausia
1930s (inicio)	Se utilizan productos orales derivados de orina de mujer embarazada para el tratamiento de los síntomas
1930s (tardío)	Se utilizan productos orales derivados de la orina de yeguas embarazadas para el tratamiento de los síntomas
1937	Se patenta el Etil estradiol
1938	Dodds publica la fórmula del DES
1941	La FDA aprueba la comercialización del DES para el tratamiento de los síntomas de la menopausia; Albright sugiere que el DES puede estimular la formación de hueso
1942	La FDA aprueba el Premarin [†] 1.25 mg para el tratamiento de la menopausia
1943	Pelletes de testosterona implantados bajo la piel mejoran el placer coital
1960s	Se introducen los anticonceptivos orales para regular la menstruación y prevenir embarazos
1972	FDA: los estrógenos “pudieran ser efectivos” en casos seleccionados de osteoporosis
1970s	El Proyecto de Drogas Coronarias aleatoriza sujetos masculinos con enfermedad coronaria cardiaca: EEC (5.0 y 2.5 mg/día) deteniendo los brazos debido a un exceso de coagulación y enfermedad cardiovascular; se reportan riesgos de embolismo y parálisis en mujeres jóvenes que toman anticonceptivos orales (de alta dosis)
1975	Se reporta un incremento en el riesgo de cáncer endometrial en quienes utilizan estrógenos: la FDA ordena cambios en las advertencias que declaren un riesgo alto
1978	Mandato de la FDA: desde abril, todos los productos con estrógenos deben contener advertencias de que los estrógenos han demostrado efectividad solo en bochornos y sequedad vaginal y que acarrearán riesgos de cáncer y coagulación de la sangre
1985	Se publican reportes controversiales en cuanto al riesgo vascular en quienes utilizan estrógenos: el Estudio del Corazón de Framingham reporta un incremento en parálisis, coagulación y riesgo coronario; el Estudio de la Salud de las Enfermeras reporta reducción en el riesgo de enfermedad coronaria cardiaca
1986	La FDA considera que los estrógenos son “efectivos” para el tratamiento de la osteoporosis

1990	La FDA no aprueba el uso de estrógenos para la prevención de enfermedad cardíaca
1994	Lineamientos de la FDA para la Osteoporosis: su prevención, requiere de estudios controlados con placebo durante 2 años con DMO independientemente de la DMO basal; los tratamientos requieren reducción de fracturas en mujeres con osteoporosis basal
1995	El estudio PEPI sugiere reducción del riesgo de enfermedad coronaria cardíaca para los EEC con o sin uno de tres brazos con progestágenos; se introduce la primera pastilla combinando estrógenos + progestágenos (Prempro [‡])
1998	El estudio HERS en mujeres con enfermedad coronaria cardíaca (con útero intacto) no reporta beneficios de EEC + MPA después de 4.1 años de seguimiento; con exceso de riesgo durante el primer año
2002	El estudio WHI E + P reporta que los riesgos de EEC + MPA sobrepasan los beneficios después de 5.2 años
2003	Advertencia severa de la FDA en productos con estrógenos: los estrógenos y los progestágenos no deben ser utilizados como prevención de enfermedad cardiovascular; se recomiendan las dosis más bajas efectivas durante el periodo más corto. La FDA evalúa, pero no aprueba la indicación para el tratamiento de la osteoporosis para la combinación de estrógenos + progestágenos
2004	El estudio WHI E-solos reporta que no hay beneficio global con EEC tan solo después de 6.8 años
DMO = densidad mineral ósea; EEC = estrógenos equinos conjugados; DES = dietilestilbestrol; DESI = Estudio de Implementación de Eficacia de Medicamentos (por sus siglas en inglés: Drug Efficacy Study Implementation); FDA = Agencia Norteamericana para el control de alimentos y medicamentos (por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration); HERS = Estudio del corazón y reemplazo de estrógenos/progestágenos (por sus siglas en inglés: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study); MPA = acetato de medroxiprogesterona; PEPI = Intervenciones postmenopáusicas con estrógenos/progestágenos (por sus siglas en inglés: Postmenopausal Estrogen-Progestin Interventions); WHI = Iniciativa de salud femenina (por sus siglas en inglés: Women's Health Initiative).	
[Ⓞ] Searle, Chicago, IL.	
[†] Premarin (tabletas de estrógenos equinos conjugados; Wyeth Pharmaceuticals, Philadelphia, PA).	
[‡] Prempro (EEC = MPA; Wyeth Pharmaceuticals).	

La TRH también tiene un efecto contra la neurodegeneración y la lesión cerebral, en algunos modelos experimentales. Dicha sustancia protege a las neuronas de la apoptosis la cual es inducida por una variedad de estímulos como hipoxia, estrés oxidativo, exitotoxicidad, deprivación de la glucosa, exposición al péptido β -amiloide y otros agentes neurotóxicos. Por otro lado, el estradiol aumenta la densidad de espinas dendríticas y controla la capacidad de las neuronas para formar nuevas conexiones sinápticas a través de estas espinas. El aumento en el flujo de calcio es indispensable para el aumento de espinas dendríticas observadas en las neuronas del hipocampo, estructura relacionada con la memoria. Ver (Maggi et al., 2004) para una revisión.

Por otro lado en el endotelio vascular, los estrógenos y los progestágenos influyen en la agregación del colágeno, la síntesis de la elastina y en la liberación de compuestos vasoactivos así como de factores que controlan la fibrinólisis. Además, aumentan la distensión y la capacitancia de las venas disminuyendo el flujo sanguíneo que puede llevar a un estado estático de las venas y a trombosis (Daly et al., 1996; Rosendaal et al., 2002). Se sabe que el etinilestradiol promueve la coagulación y fibrinólisis afectando las funciones hepáticas y vasculares. Una dosis diaria de 10 mg de etinilestradiol aumenta significativamente los factores de coagulación VII, II-VII-X, VIII y von Willebrand, entre otros (Mammen, 2000). Finalmente se le relaciona con el aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama lo que ha causado que se deje de recomendar su uso en pacientes que tienen riesgos de padecer estas patologías (Rozenberg et al., 2011) (Palmeri et al., 1987) y ha sido una motivación para encontrar nuevas estrategias terapéuticas surgiendo así el prolame.

2.4 Prolame

El monoaminoestrógeno prolame (N-(3-hidroxi-1, 3, 5(10) estratien-17b-il)-3-hidroxi-propilamina) pertenece al grupo de los 17b-aminoestrógenos, análogos de los estrógenos que poseen una modificación del núcleo esteroide en la posición C17, en la cual se sustituye un hidroxilo por un grupo amino (Figura 3). Desde que este compuesto se sintetizó en 1985 por el Dr. Juan Manuel Fernández, del Instituto de Química de la UNAM, se ha demostrado que tiene efectos estrogénicos disminuidos (Jaimez et al., 2000) y efectos anti-coagulantes y anti-plaquetarios prolongados (De la Pena et al., 1993; Lemini et al., 1993).

Estos efectos del prolame se han relacionado con el incremento en la producción del NO por las plaquetas y las células endoteliales, mayor al observado con 17 β estradiol (E2) (Gonzalez et al., 2010). Está reportado que el prolame activa la expresión de genes reporteros CAT dependientes de receptores de estrógenos. La inducción de la transcripción por medio de este aminoestrógeno está mediada preferentemente por el ER α , comparado a lo observado con el ER β (Jaimez et al., 2000). Sin embargo, los efectos de prolame en el sistema nervioso central no han sido evaluados adecuadamente, excepto por un artículo reciente de Lemini y Canchola en el que se observó un aumento en la conducta sexual de ratas jóvenes ovariectomizadas por medio de la activación de ER (Lemini and Canchola, 2009).

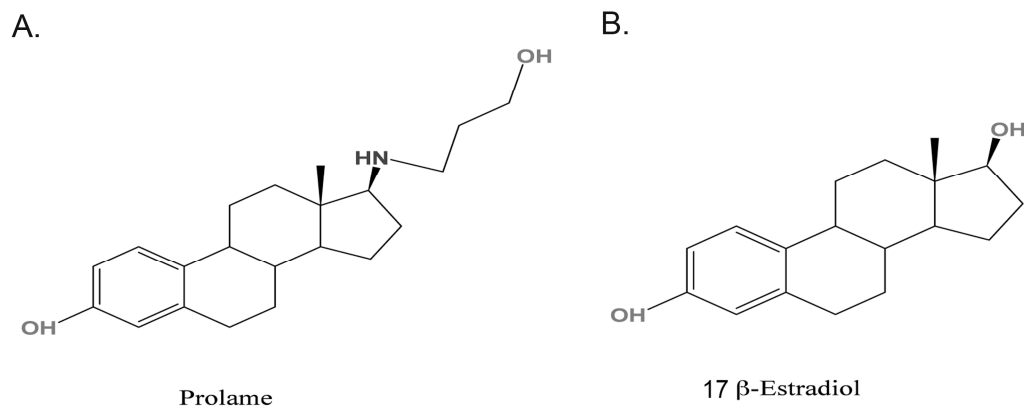


Figura 3. **Comparación de fórmulas estructurales.** (A) N-(3-hydroxy-1, 3, 5(10) estratrien - 17 β -yl)-3-hydroxypropylamine, prolame y (B) 17 β -estradiol.

3 Planteamiento del problema

La menopausia es el cese del ciclo menstrual y con ello, de la secreción de las hormonas producidas en el ovario. Esto tiene múltiples efectos a nivel periférico, pero también afecta al sistema nervioso central causando cambios emocionales, como el aumento en la incidencia de depresión y la ansiedad patológica, así como la disminución marcada del funcionamiento de procesos cognitivos, tales como la memoria y el aprendizaje.

Para disminuir estos síntomas, actualmente se utilizan terapias de remplazo hormonal que consisten principalmente en la administración de estrógenos. Esta terapia resulta efectiva. Sin embargo, los efectos proliferativos en útero y mama así como el efecto procoagulante hacen riesgoso el uso amplio y extensivo de esta terapia. Es por eso que se está trabajando para encontrar alternativas que tengan los mismos efectos benéficos del remplazo con estrógenos, pero sin los riesgos mencionados. Para ello se han sintetizado 17b-aminoestrógenos, como el prolame, que tienen efectos periféricos similares al 17b-estradiol, con menor potencia, pero con efectos anti-trombóticos relacionados con la liberación de óxido nítrico. Sin embargo, sus efectos en el sistema nervioso no han sido evaluados, lo que hace necesario el estudio de este compuesto en procesos emocionales y cognitivos.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

Comparar el efecto del tratamiento de remplazo hormonal de 17 β -estradiol con prolame en la reversión de las alteraciones emocionales y cognitivas inducidas por ovariectomía en ratas Wistar hembras jóvenes.

4.2 Objetivos Particulares

Comparar los efectos de prolame con los de estradiol en ratas ovariectomizadas en:

1. Conductas de aprendizaje espacial
2. Conductas similares a ansiedad.
3. La expresión de la nNOS en neuronas piramidales del hipocampo
4. La recuperación de la densidad de espinas dendríticas

5 Hipótesis

La administración de prolame en ratas ovariectomizadas, aumenta la producción de la nNOS, y revirtiendo los efectos deletéreos en la densidad de espinas dendríticas producidos por el descenso agudo de niveles de estrógeno en el cerebro, disminuyendo los efectos adversos de ansiedad y la afectación del aprendizaje espacial.

6 Justificación

Para el uso de prolame como terapia en circunstancias de ovariectomía, no se conocen los efectos en el sistema nervioso central, principalmente en la recuperación de la plasticidad neuronal. Por ello se requiere estudiar sus efectos en pruebas conductuales y cognitivas.

7 Materiales y Métodos

7.1 Síntesis de prolame

Se mantuvo una solución de tolueno 3-hidroxipropilamina y estrona en reflujo por 12h con una trampa Dean-Stark y posteriormente concentrada al vacío. El producto sólido obtenido fue disuelto en metanol y se reaccionó con brohidro de sodio. El producto obtenido fue filtrado, lavado con agua y recristalizado de la solución metanol-agua. La estrona, 3-hidroxipropilamina, el tolueno, el metanol y el brohidro de sodio fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Chemical Co. La fórmula estructural se describe en la figura 1 (Férrandez-G., 1985).

7.2 Animales

Las ratas Wistar hembras fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina. Todos los procesos con animales fueron aprobados por el comité local de ética (*Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, UNAM, ID 044-2011*) de acuerdo con los principios expuestos en el manual para el uso de animales en investigación de neurociencias

(de la Sociedad para las Neurociencias, Washington, DC 1991). Los animales fueron almacenados en un esquema de luz artificial invertido de 12-horas (la luz se enciende a las 20:00) en un cuarto a una temperatura entre 20°C y 24°C con ventilación y con acceso *ad libitum* a comida (rat chow) y agua.

Cuarenta ratas hembra de 90 días postnatales (PND90) se utilizaron. Los animales fueron asignados a los siguientes grupos:

- Grupo de ratas con gónadas intactas (GI, n=10),
- Grupo de ratas ovariectomizadas (Ovx, n=10),
- Grupo de ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol (OvxE, n=10) y
- Grupo de ratas ovariectomizadas tratadas con prolame (OvxP, n=10).

Las ratas fueron ovariectomizadas en el día PND90 por remoción quirúrgica de ambos ovarios (excepto al grupo GI que solo recibió una operación simulada) bajo anestesia intraperitoneal con ketamina (90 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg).

7.3 Tratamiento de Prolame y Estradiol

Se aplicaron inyecciones subcutáneas diarias de 17 β estradiol (50 μ g/kg, usadas clínicamente para terapia de remplazo hormonal) y una dosis equimolar de prolame (60 μ g/kg) durante un mes a los grupos OxvE y OxvP respectivamente, comenzando cuatro semanas después de la cirugía. Se ha observado que esta dosis eleva el estradiol a niveles por arriba de los fisiológicos en hembras ciclando normalmente, pero es necesario para observar algunos efectos, como la formación dendrítica.

Las drogas se diluyen al 10% en un vehículo que contiene glicerol y agua destilada en una proporción 1:1. GI y Oxv recibieron únicamente vehículo. El periodo de cuatro semanas

entre la ovariectomía y la terapia de remplazo se encuentra dentro de la ventana de 2 a 8 semanas en la que se ha visto que la terapia tiene influencia efectiva en el comportamiento (McLaughlin et al., 2005).

7.4 Laberinto elevado de cruz (EPM por sus siglas en inglés)

El EPM se realizó un mes después de empezar la terapia de remplazo hormonal para evaluar el estado de ansiedad incondicionado. El laberinto de madera consiste en una plataforma en forma de cruz elevada a 50 cm del piso, con dos brazos cerrados (50x10x40 cm) y dos brazos abiertos (50x10 cm), conectado por un cuadrado central de 10x10 cm. Los brazos abiertos tienen una orilla de 0.5 cm. Este último impide que las ratas se caigan accidentalmente sin comprometer las características elementales del ajuste. El EPM fue iluminado con una luz roja tenue y monitoreada por TV. El laberinto se limpió con agua y detergente después de que cada rata realizara el ensayo.

Al comienzo de la prueba, las ratas se colocaron en el centro del laberinto, con la cabeza hacia un brazo abierto y luego se les permitió la libre exploración durante 5 min. El tiempo total que pasaron en los brazos abiertos (con las cuatro extremidades fuera del cuadro central) fue registrado como parámetro operacional de la medida de ansiedad incondicionada (exploración contra evasión).

7.5 Laberinto de agua de Morris (MWM por sus siglas en inglés)

La prueba de MWM (Morris, 1984) se realizó un día después de la prueba de EPM. En esta prueba se evalúa el aprendizaje espacial mediante la medición del tiempo que le toma a la rata encontrar una plataforma de escape, debiendo disminuir la latencia de escape en cada prueba, lo que indica el aprendizaje de la localización de la plataforma. Para esta prueba se utilizó un tanque circular negro (156 cm de diámetro y 80 cm de altura) lleno con agua tibia ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta 30 cm de altura. Se colocaron algunas pistas visuales en las paredes del tanque. Una plataforma de escape negra, cilíndrica, de 12 cm de diámetro; fue sumergida 2 cm bajo el nivel del agua.

Las ratas se habituaron las ratas al laberinto, con un entrenamiento de cinco corridas un día antes de la prueba. Estas pruebas siguieron el mismo protocolo mencionado excepto por una distinta localización de la plataforma. La plataforma permaneció oculta en el mismo sitio durante estas 5 corridas de prueba y el sitio de inicio fue en el cuadrante opuesto a la plataforma. El día de la prueba, se les dieron 60 segundos a las ratas en el agua para localizar la plataforma de escape. Pasado este tiempo, si no localizaban la plataforma, se les guiaba hacia ésta. Una vez en la plataforma se les dejaba alrededor de 15 segundos para que pudieran observar su alrededor y ubicaran la plataforma. Se hicieron ocho pruebas de adquisición fueron hechas por cada rata, con un intervalo de 5 minutos entre cada prueba. La plataforma se colocó en un cuadrante distinto del entrenamiento, para evaluar la capacidad de aprendizaje nuevo. Se midió el tiempo que tardaron en encontrar la plataforma (latencia de escape) (Crawley et al., 1997). Las velocidades de nado intra- e inter-grupo no tuvieron diferencias significativas, por lo que no fueron presentadas.

7.6 Inmunotinción de nNOS y tinción de Golgi

Un día después del MWM, 5 ratas (seleccionadas de acuerdo al frotis vaginal, ver adelante) fueron anestesiadas con Pentobarbital (2 ml/Kg. de peso) y perfundidas por el corazón con solución salina al 0.9%, seguida de fijador frío con 4% de paraformaldehído diluido en buffer de fosfatos 0.1 M (PB) por 15 min. Los cerebros fueron separados, enjuagados con PB y seccionados en dos bloques mediante un corte sagital. Una mitad del cerebro se procesó para inmunohistoquímica y la otra para impregnación de Golgi-Cox. Es importante mencionar que las ratas del grupo GI fueron examinadas para determinar su ciclo estral mediante un raspado vaginal con un cotonete y tinción de Papanicolaou, prefiriendo las ratas en estado de proestro. En el frotis vaginal se observan escasos leucocitos (<10%), abundantes células epiteliales de núcleo redondo y voluminoso (>96%) y escasas células cornificadas (<30%) de los estratos superiores. células parabasales, Estos parámetros se tomaron como criterio en la determinación de la etapa de proestro, la fase con mayor secreción de estrógenos del ciclo menstrual (Becker et al., 2005). Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co.

Las secciones utilizadas para inmunohistoquímica, consistieron en cortes coronales de 50µm de ancho. Se tomaron rebanadas alternadas (una si una no) de la sección del hipocampo dorsal. Posteriormente se bloquearon con suero, se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-nNOS (1:1000, Sigma Aldrich) y luego con el anticuerpo secundario burro anti- IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen). La densidad de células que contienen nNOS se determinó por medio del conteo de células positivas en un área de 500 µm² (Nikon ECLIPSE 50i Light microscope a 40X con una cabeza de cámara DS-5M), utilizando un rectángulo de 20 µm x 25 µm, recorriendo todo el hipocampo con la ayuda de un tubo de dibujo.

Los bloques restantes se utilizaron para teñirlos con el protocolo de Golgi-Cox con el fin de determinar las variaciones en la densidad de espinas dendríticas en las proyecciones de las neuronas hipocampales. Se formaron tres bloques con cortes sagitales y se tomó el bloque central y se cortó en bloques más pequeños, de aproximadamente 5 μm . Se enjuagó el tejido en PB y luego fue inmerso en las soluciones de impregnación siguiendo las indicaciones del fabricante (FD Rapid GolgiStain kit, FD Neuro Technologies, Ellicott City, MD, USA) dejándolo reposar dos semanas en oscuridad. Se cortaron rebanadas de 150 μm usando un vibratomo y posteriormente se montaron en laminillas cubiertas de gelatina. Las secciones se secaron a temperatura ambiente y posteriormente fueron teñidas con el tinte del kit mencionado anteriormente.

Se determinó la densidad de espinas de la rama basilar primaria, secundaria y terciaria (derecha e izquierda) y en la rama apical. Se utilizaron neuronas piramidales de CA1 y de CA3, y neuronas granulares del giro dentado (GD). Las espinas se contaron en el microscopio de luz a 100X con la ayuda de un tubo de dibujo, escogiendo aleatoriamente segmentos de 10 μm de largo, en las ramas dendríticas correspondientes.

7.7 Análisis estadístico

Los resultados cuantitativos se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (ESM). Se realizaron comparaciones pareadas múltiples con la prueba de Dunnett, tras un ANOVA ordinario de una vía, excepto en el MWM dónde se utilizó un ANOVA de dos vías (variables: número de corrida y grupo) y un análisis *post hoc* de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con una $p < 0.05$. Los análisis se realizaron en el programa GraphPad Prism.

8 Resultados

8.1 Laberinto elevado en cruz

Se efectuó la prueba del laberinto elevado de cruz para analizar los efectos de prolame en la conducta de tipo ansiosa. Las ratas con gónadas intactas tuvieron un promedio de alrededor del 30% del tiempo en los brazos abiertos mientras que las ovariectomizadas, solo el 17%. Estos dos grupos sirvieron de control fisiológico y patológico, respectivamente. Se comparó el efecto de prolame con estradiol y se observaron resultados similares a los de las ratas con gónadas intactas, 33% y 28%, respectivamente. (Fig. 1 y Apéndice I).

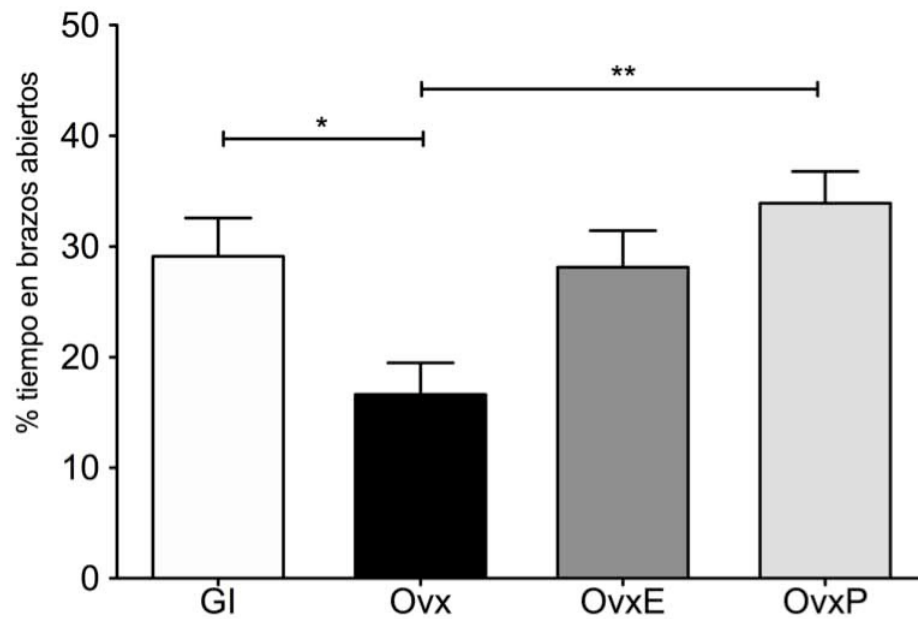


FIGURA 1. Efecto de prolame en la conducta de tipo ansiosa en el laberinto elevado de

cruz. Ratas con gónadas intactas (GI), ovariectomizadas sin tratamiento (Ovx), con prolame (OvxP) o con estradiol (OvxE). Los valores representan la media \pm ESM de los porcentajes de tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos durante la prueba de 5 min. Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía ($F(3, 47) = 5.174, p = 0.0036$). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, $n=10$), seguido de una prueba de Tukey.

8.2 Prueba del laberinto de Morris

Después del mes de tratamiento se realizó la prueba del MWM para evaluar el aprendizaje espacial. Las ratas ovariectomizadas y tratadas con prolame (OvxP) exhibieron una mejora significativa en los tiempos, de alrededor de 20 s en las corridas III, VII y VIII comparados con el grupo ovariectomizado sin tratamiento (Ovx). No se observaron diferencias significativas con los grupos ovariectomizados y tratados con estradiol (OvxE) o los de gónadas intactas (GI) (Fig. 2). Las diferencias observadas se muestran en la Tabla 1 y Apéndice I.

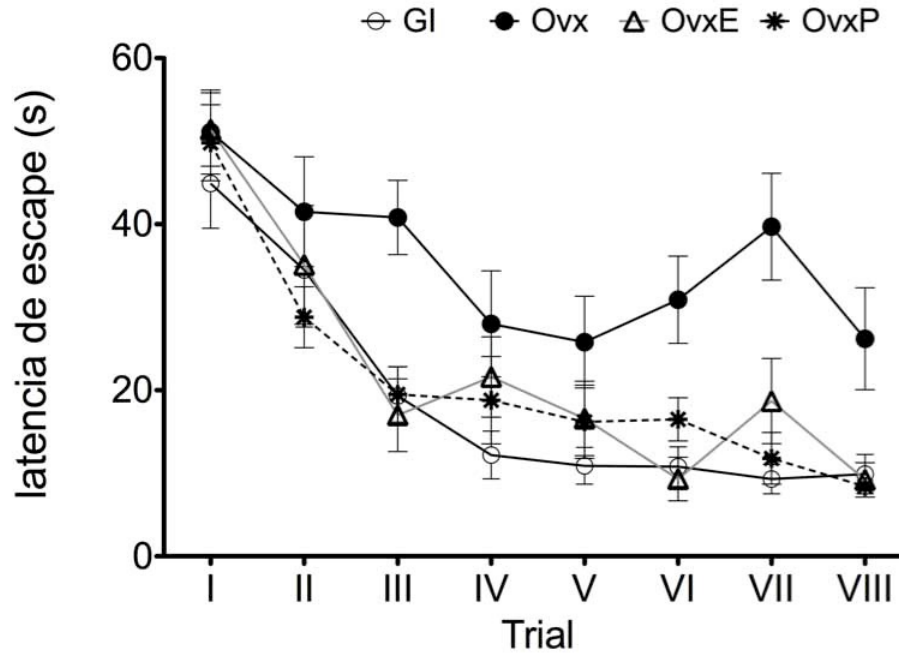


FIGURA 2. Efecto de prolame en la memoria espacial durante la prueba del laberinto de Morris. Ratas con gónadas intactas (GI), ovariectomizadas sin tratamiento (Ovx), con prolame (OvxP) o con estradiol (OvxE). Los valores representan la media \pm ESM.

Tabla 1. Diferencias estadísticas en la Prueba Acuática de Morris						
Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de Bonferroni.						
F tratamiento: (3, 252) = 13.13, $p < 0.0001$. ** $P < .01$, *** $P < .001$, $n = 10$.						
Corrida	GI/Ovx	GI/OvxE	GI/OvxP	OvxE/Ovx	OvxE/OvxP	OvxP/Ovx
I	ns	ns	ns	ns	ns	ns
II	ns	ns	ns	ns	ns	ns
III	**	ns	ns	**	ns	**
IV	ns	ns	ns	ns	ns	ns
V	ns	ns	ns	ns	ns	ns
VI	*	ns	ns	**	ns	ns
VII	***	ns	ns	*	ns	***
VIII	ns	ns	ns	ns	ns	*

8.3 Inmunoreactividad de la nNOS

Se contaron en el hipocampo dorsal, las neuronas marcadas con nNOS de las regiones CA1, CA3 y GD. Se observaron diferencias significativas entre OvxP y Ovx, en todas las regiones, siendo OvxP mayor por 7 neuronas/área en CA1 y CA3, y por 4 neuronas/área en el giro dentado (Fig. 3A y Apéndice I). Además, el tratamiento con prolame aumentó la inmunoreactividad en las dendritas (Fig. 3B, flechas dobles), la cual se había perdido con la ovariectomía, expresándose sólo en el soma (Fig. 3B, flecha simple).

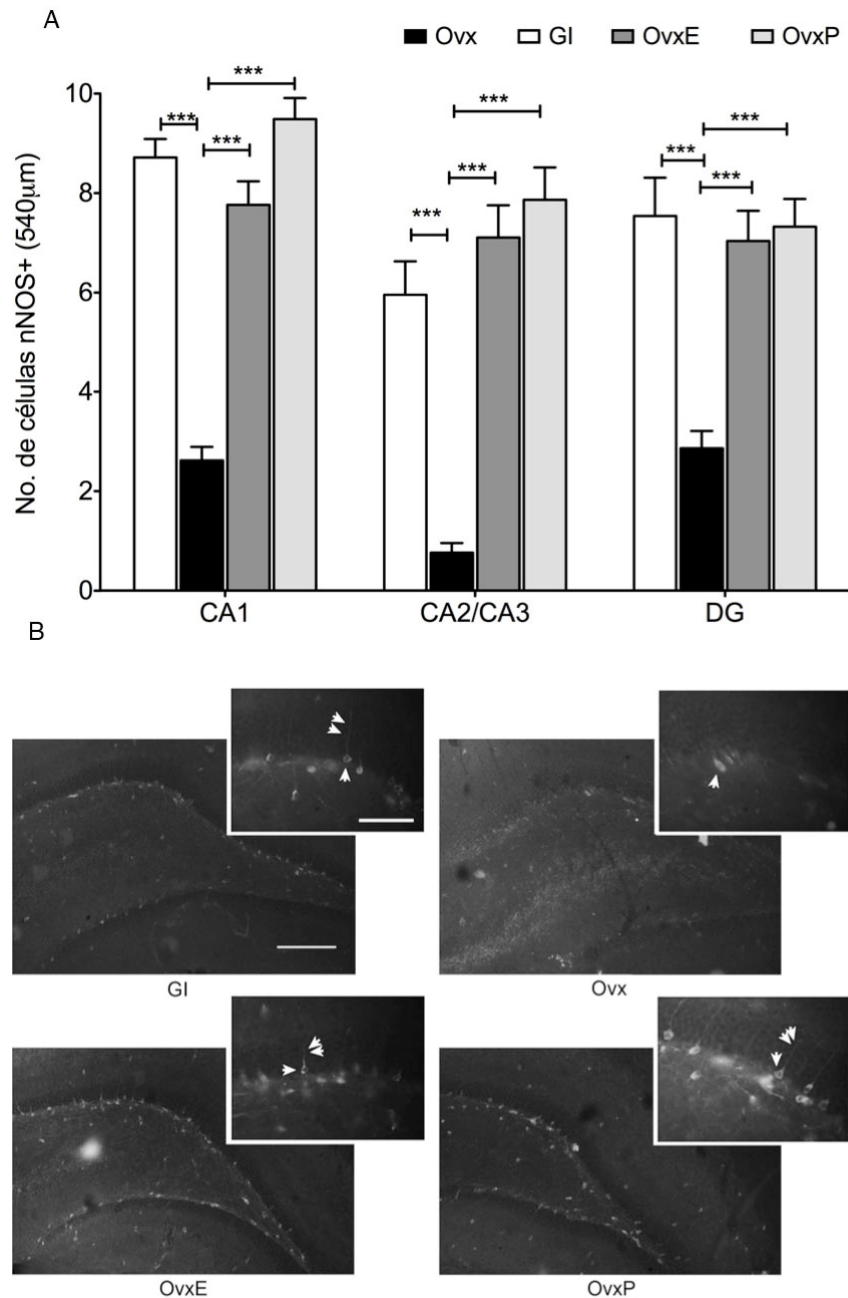
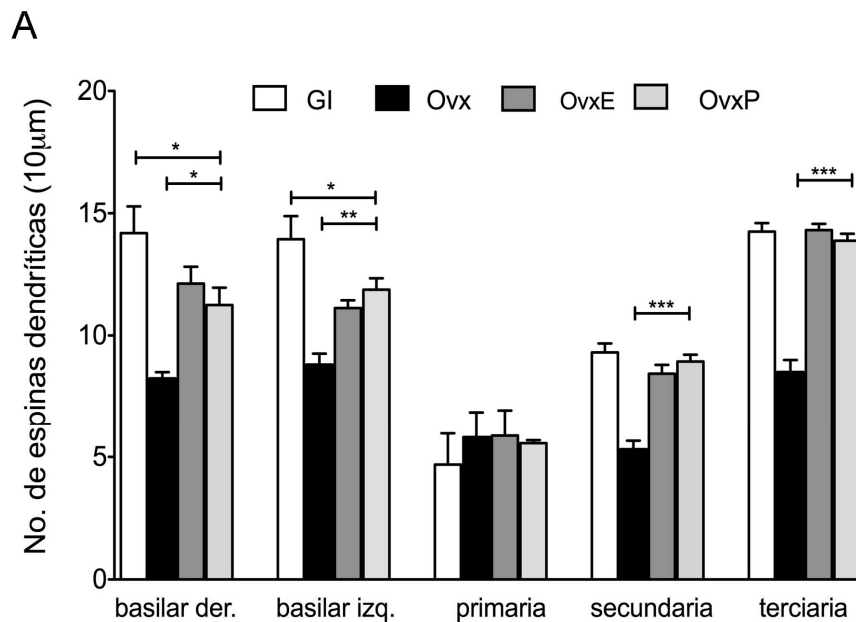


FIGURA 3. Aumento de la densidad de neuronas nNOS inmunoreactivas y su patrón de expresión en el hipocampo. Ratas con las gónadas intactas (GI), ovariectomizadas sin tratamiento (Ovx), con prolame (OvxP) o con estradiol (OvxE). (A) Los valores representan la media \pm ESM del número de neuronas inmunoreactivas en tres zonas del hipocampo: CA1, CA2/CA3 y giro dentado (GD). (B) Fotomicrografías representativas de las neuronas nNOS positivas en el giro dentado del hipocampo. (Barras de escala: 250µm para las fotos de baja

magnificación y 100µm para los insertos). Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos vías: $F(3, 300) = 90.81$, $p < 0.0001$, seguido de una prueba de Bonferroni. *** $P < 0.001$, $n=10$ (Apéndice I).

8.4 Densidad de espinas dendríticas

El grupo Ovx mostró una disminución de espinas dendríticas con respecto al grupo GI en las neuronas piramidales hipocampales, excepto por las ramificaciones primarias apicales. Prolame, al igual que estradiol, recuperó la densidad de espinas dendríticas en las ramificaciones basilares, y apicales secundarias y terciarias (Fig. 4 y Apéndice I). Estas diferencias se mostraron en CA1 (Fig. 4A) y CA2/CA3 (Fig. 4B). El giro dentado no muestra diferencias (Fig. 4C).



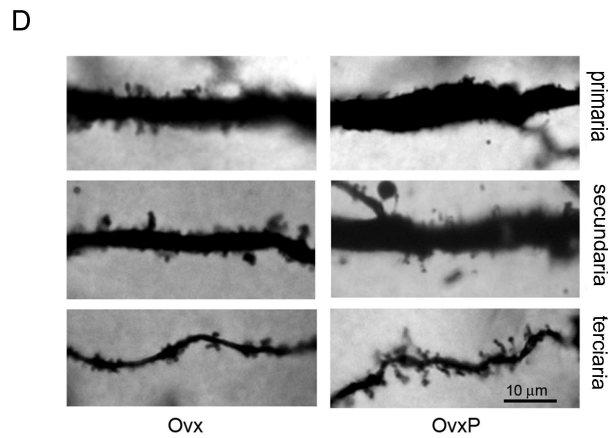
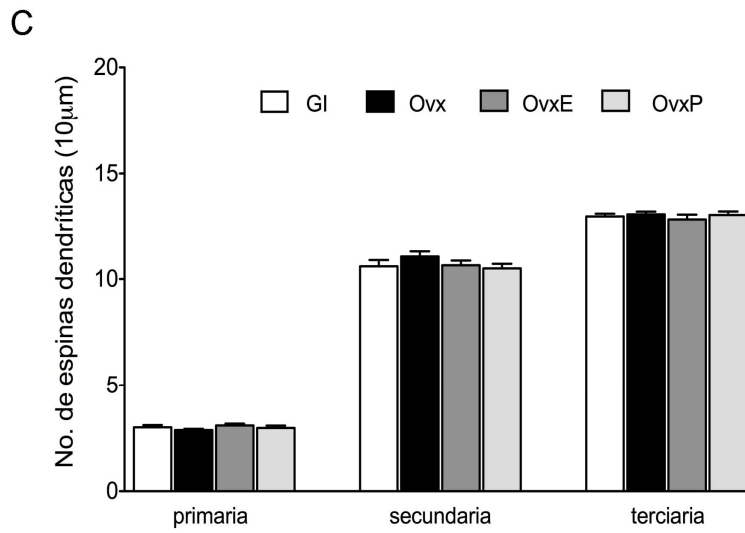
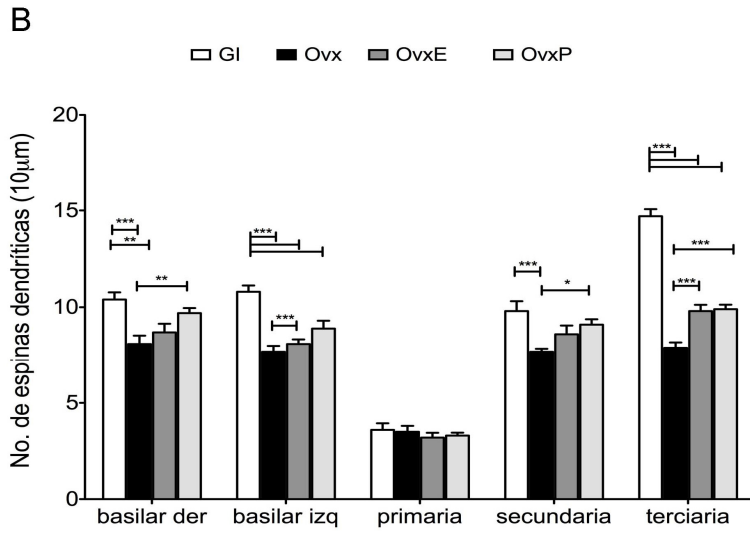


FIGURA 4. Densidad de espinas dendríticas en el hipocampo. Histogramas del análisis de la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de las capas CA1 (A), CA2/CA3 (B) y Giro Dentado (C) del hipocampo. Se analizaron segmentos de 10 μm de las ramas basales derecha e izquierda y segmentos de las ramificaciones primarias, secundarias y terciarias de la rama apical. Los valores representan la media \pm ESM del número de espinas en cada uno de estos segmentos. (D) fotomicrografías de las ramificaciones apicales primaria, secundaria y terciaria de una neurona piramidal de CA1 contrastada con tinción de Golgi-Cox. Los datos fueron analizados con un ANOVA de dos vías: F (3, 180), $p < 0.0001$, seguido de una prueba de Bonferroni. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 10$.

9 Discusión

El presente estudio demuestra por primera vez que el prolame, un amino estrógeno que ha probado tener efectos estrogénicos débiles en el útero, de 22 a 36 veces menos potente que el estradiol (Lemini et al., 2005) puede revertir la ansiogénesis y déficits en el aprendizaje espacial, causados por la pérdida de hormonas tras ovariectomía en ratas jóvenes. Asimismo, el prolame es capaz de incrementar la expresión de la nNOS y recuperar la localización de esta enzima en las dendritas del hipocampo de las ratas ovariectomizadas, de forma similar al estradiol. Además la reducción del número de espinas dendríticas en las neuronas principales en ratas ovariectomizadas, también fue restaurada después del tratamiento con prolame, emparejándose los números con los de las ratas de gónadas intactas, y las tratadas con estradiol.

Relacionado con la conducta similar a la ansiedad, hay estudios que han mostrado disminuciones en las pruebas de ansiedad como el EPM y el nado forzado, en ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol (Rachman et al., 1998) (Walf and Frye, 2006). Los resultados de este estudio muestran que el tratamiento con prolame concuerda con el efecto producido por estradiol, en este aspecto. En la prueba de MWM, las latencias observadas en las corridas 3, 7 y 8 fueron significativamente más cortas que las de OvxP comparadas con Ovx, y sin diferencias con los grupos OvxE y GI. La mejora observada en el MWM es comparable con la de estradiol reportada por Talboom (Talboom et al., 2008). La inhibición farmacológica y genética de la nNOS ha probado causar daños en el aprendizaje

mediante la disminución de los potenciales a largo plazo, que se requieren para el aprendizaje espacial probado en MWM (para una revisión vea (Zhou and Zhu, 2009). Las evidencias anteriores junto con los resultados de la expresión de la nNOS presentados aquí, confirman reportes previos en los que la deficiencia de estrógenos causada por la remoción de los ovarios causa ansiedad y dificultades para el aprendizaje, relacionados con la pérdida de la plasticidad sináptica (Maggi et al., 2004) y la baja actividad de nNOS (Komsuoglu-Celikyurt et al.). Además, también se ha visto que el estradiol promueve la formación de espinas dendríticas en las células piramidales del hipocampo, aumentando las potenciaciones a largo plazo en esta región (Woolley and McEwen, 1992) (Roepke et al., 2011)(Spencer et al., 2008). El aumento en la densidad de espinas por medio del estradiol ha sido relacionado con la activación de receptores NMDA (Spencer et al., 2008). Los estrógenos promueven la formación de complejos con el NMDA y la nNOS, aumentando su activación y expresión (d'Anglemont de Tassigny et al., 2009). Nuestros resultados con prolame también concuerdan con la expresión de la nNOS.

Algo interesante es que a pesar de que se conoce que prolame tiene un efecto estrogénico débil comparado con el 17 β -estradiol (Lemini et al., 2005), los parámetros evaluados en el presente trabajo resultaron similares para ambos compuestos. Experimentos *in vitro* han mostrado que, prolame es menos eficiente en desplazar al estradiol unido al ER citosólico y en activar la expresión del gen reportero CAT dependiente de ER (Jaimez et al., 2000). Sin embargo es posible que la menor eficacia del prolame observada en este estudio represente una subestimación debido a las limitaciones de los experimentos *in vitro*. Una opción puede ser que la estructura de prolame, altera la interacción con los ERs, modificando sus sitios de unión al promotor, activando la transcripción de genes responsivos a estrógenos de manera similar al estradiol. Otra posibilidad podría ser que la regulación negativa de los mecanismos clásicos y no-clásicos inducidos por este aminoestrógeno se encuentran disminuidos en comparación a los de

estradiol, promoviendo una respuesta aumentada. Una tercera posibilidad podría ser que la respuesta de prolame sea más dependiente de mecanismos no clásicos, utilizando ERs asociados a membrana o receptores a E2 acoplados a proteínas G (Ronnekleiv et al., 2007; Vasudevan and Pfaff, 2008). Aunque se requieren más estudios para dilucidar el mecanismo preciso que subyace a nuestras observaciones, la última opción parece ser la más probable para explicar los resultados presentados aquí, mediante una combinación de mecanismos clásicos y no-clásicos.

El análisis de los resultados obtenidos por cuantificación de la densidad de las espinas dendríticas mostró que prolame, al igual que el estradiol, revierte la pérdida de las espinas dendríticas en el hipocampo. Esto se puede explicar por el hecho de que los estrógenos, y probablemente el prolame, pueden activar la vía de PI3K/Akt por medio del receptor ER α (Belcher and Zsarnovszky, 2001; Malyala et al., 2005; Mendez et al., 2003). La activación de Akt ha sido observada en múltiples regiones del cerebro y se ha asociado con la formación de espinas. Además, la vía de Akt juega un papel bien conocido en la supervivencia de las células, igualmente se ve implicado en actividades neuroprotectoras de los estrógenos (para una revisión leer (Spencer et al., 2008)). Akt tiene varios blancos, incluyendo Bcl-2, un componente anti-apoptótico, y nNOS, entre otros. Recientemente, se ha mostrado que el receptor GABA A es sustrato de fosforilación de Akt, por medio de la cual aumenta su translocación a la membrana celular, lo cual une la señalización de ER α mediada por PI3K/Akt, con la regulación de la plasticidad sináptica.

Otra observación interesante de este estudio fue la diferencia en la distribución subcelular de la nNOS entre las ratas Ovx en comparación con las tratadas con prolame o estrógenos. La inmunoreactividad de la nNOS se restringió al soma en las ratas Ovx, mientras que en los otros grupos se observa su presencia tanto en el soma como en las dendritas. En otros estudios se ha observado que la enzima nNOS se localiza en las dendritas

interactuando con un gran número de proteínas. La distribución observada más detalladamente, es similar a la de un reporte reciente, en donde la proteína que interactúa con NOS (NOSIP por sus siglas en inglés) modula la localización subcelular de la nNOS (Dreyer et al., 2004). En este estudio también se observa que la nNOS se localiza principalmente en el soma hasta que se evoca una respuesta por medio del receptor NMDA de las neuronas hipocampales, regulando la producción de NO.

10 Conclusiones

La inyección subcutánea de prolame en las ratas, con una dosis equimolar a la usada de estradiol para la terapia de remplazo hormonal, tiene efectos importantes en el sistema nervioso central, como se muestra en este estudio. Los efectos sobre la conducta incluyen: la recuperación del aprendizaje espacial y disminución de la ansiedad causada por la ovariectomía en ratas jóvenes. A nivel anatómico neurofarmacológico, se muestra que este proceso se correlaciona con un incremento en la expresión de la nNOS y la consecuente restauración de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas principales de la formación hipocampal. En conjunto con sus efectos antitrombóticos y bajos efectos estrogénicos en el útero, prolame podría representar una opción terapéutica alternativa para el síndrome de deficiencia de estrógenos.

11 Bibliografía

- Agmo, A., Pfaff, D. W., 1999. Research on the neurobiology of sexual behavior at the turn of the millennium. *Behav Brain Res.* 105, 1-4.
- Becker, J. B., et al., 2005. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology.* 146, 1650-73.
- Belcher, S. M., Zsarnovszky, A., 2001. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 299, 408-14.
- Bell, S. E., 1990. Sociological perspectives on the medicalization of menopause. *Ann N Y Acad Sci.* 592, 173-8; discussion 185-92.
- Bon, C. L., Garthwaite, J., 2003. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* 23, 1941-8.
- Crawley, J. N., et al., 1997. *Current Protocols in Neuroscience.*
- d'Anglemont de Tassigny, X., et al., 2009. Estradiol induces physical association of neuronal nitric oxide synthase with NMDA receptor and promotes nitric oxide formation via estrogen receptor activation in primary neuronal cultures. *J Neurochem.* 109, 214-24.
- Daly, E., et al., 1996. Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet.* 348, 977-80.
- De la Pena, A., et al., 1993. Comparative effect of synthetic aminoestrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids.* 58, 407-9.

- Dreyer, J., et al., 2004. Nitric oxide synthase (NOS)-interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. *J Neurosci.* 24, 10454-65.
- Férrnandez-G., J. M., 1985. Synthesis and molecular structure of Prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17b-yl)-3-hydroxypropylamine; an amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids.* 45, 151-157.
- Gonzalez, G., et al., 2010. The antithrombotic effect of the aminoestrogen prolame (N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17B-YL)-3-hydroxypropylamine) is linked to an increase in nitric oxide production by platelets and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 208, 62-8.
- Hawkins, R. D., et al., 1998. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res.* 118, 155-72.
- Jaimez, R., et al., 2000. In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17beta-aminoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 73, 59-66.
- Kelly, M. J., et al., 1976. Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen during the estrous cycle. *Brain Res.* 114, 152-7.
- Komsuoglu-Celikyurt, I., et al., Evidence for the involvement of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase on cognitive functions in rats. *Life Sci.* 89, 905-10.
- Kuiper, G. G., et al., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 5925-30.
- Lemini, C., Canchola, E., 2009. Effects of 17beta-aminoestrogens on the sexual behavior of female rats. *Physiol Behav.* 96, 662-6.
- Lemini, C., et al., 2005. Estrogenic effects of 17 beta-aminoestrogens assessed in uteri of rats and mice. *Eur J Pharmacol.* 510, 235-9.

- Lemini, C., et al., 1993. Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17 beta-aminoestrogens, butolame [17 beta-(4-hydroxy-1-butylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] and pentolame [17 beta-(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol]. *Steroids*. 58, 457-61.
- Maggi, A., et al., 2004. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu Rev Physiol*. 66, 291-313.
- Malyala, A., et al., 2005. Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids*. 70, 397-406.
- Mammen, E. F., 2000. Oral contraceptive pills and hormonal replacement therapy and thromboembolic disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 14, 1045-59, vii-viii.
- McLaughlin, K. J., et al., 2005. Chronic stress enhances spatial memory in ovariectomized female rats despite CA3 dendritic retraction: possible involvement of CA1 neurons. *Neuroscience*. 135, 1045-54.
- Mendez, P., et al., 2003. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 112, 170-6.
- Micevych, P. E., Mermelstein, P. G., 2008. Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain. *Mol Neurobiol*. 38, 66-77.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 11, 47-60.
- Numan, M., Sheehan, T. P., 1997. Neuroanatomical circuitry for mammalian maternal behavior. *Ann N Y Acad Sci*. 807, 101-25.
- O'Dell, T. J., et al., 1991. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 11285-9.

- O'Malley, B. W., Tsai, M. J., 1992. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biol Reprod.* 46, 163-7.
- Palmeri, R., et al., 1987. [Sequential therapy with antiestrogens and progestational drugs in carcinoma of the breast in an advanced stage]. *Chir Ital.* 39, 185-92.
- Panzica, G. C., et al., 2006. Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *Neuroscience.* 138, 987-95.
- Phan, A., et al., 2011. Rapid effects of estrogen receptor alpha and beta selective agonists on learning and dendritic spines in female mice. *Endocrinology.* 152, 1492-502.
- Prange-Kiel, J., et al., 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus.* 13, 226-34.
- Rachman, I. M., et al., 1998. Estrogen alters behavior and forebrain c-fos expression in ovariectomized rats subjected to the forced swim test. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 13941-6.
- Roepke, T. A., et al., 2011. Physiological consequences of membrane-initiated estrogen signaling in the brain. *Front Biosci.* 16, 1560-73.
- Ronnekleiv, O. K., et al., 2007. Membrane-initiated signaling of estrogen in the brain. *Semin Reprod Med.* 25, 165-77.
- Rosendaal, F. R., et al., 2002. Female hormones and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22, 201-10.
- Schuman, E. M., Madison, D. V., 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science.* 254, 1503-6.
- Spencer, J. L., et al., 2008. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol.* 29, 219-37.
- Stahlberg, C., et al., 2004. Increased risk of breast cancer following different regimens of hormone replacement therapy frequently used in Europe. *Int J Cancer.* 109, 721-7.

- Stefanick, M. L., 2005. Estrogens and progestins: background and history, trends in use, and guidelines and regimens approved by the US Food and Drug Administration. *Am J Med.* 118 Suppl 12B, 64-73.
- Szego, C. M., Davis, J. S., 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 58, 1711-8.
- Talboom, J. S., et al., 2008. Higher levels of estradiol replacement correlate with better spatial memory in surgically menopausal young and middle-aged rats. *Neurobiol Learn Mem.* 90, 155-63.
- Tsai, M. J., O'Malley, B. W., 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 63, 451-86.
- Vasudevan, N., Pfaff, D. W., 2008. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol.* 29, 238-57.
- Walf, A. A., Frye, C. A., 2006. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology.* 31, 1097-111.
- Walf, A. A., Frye, C. A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2, 322-8.
- Walf, A. A., et al., 2009. Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology.* 34, 909-16.
- Weiser, M. J., et al., 2008. Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res Rev.* 57, 309-20.
- Woolley, A. L., et al., 1990. First place--Resident Basic Science Award 1990. Fibronectin-laminin combination enhances peripheral nerve regeneration across long gaps. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 103, 509-18.

- Woolley, C. S., McEwen, B. S., 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci.* 12, 2549-54.
- Woolley, C. S., et al., 1997. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci.* 17, 1848-59.
- Zhou, L., Zhu, D. Y., 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide.* 20, 223-30.
- Znamensky, V., et al., 2003. Estrogen levels regulate the subcellular distribution of phosphorylated Akt in hippocampal CA1 dendrites. *J Neurosci.* 23, 2340-7.
- Zorumski, C. F., Izumi, Y., 1998. Modulation of LTP induction by NMDA receptor activation and nitric oxide release. *Prog Brain Res.* 118, 173-828.
- Mendoza, D.A., 2007. Menopausia y Climaterio. *Gineco*; 14(92): 27 - 48
- Rozenberg S., Vandromme J., Antoine C., 2011. Menopausal hormone treatment in 2011. *Rev. Med. Brux.* 32(4): 239-42

12 Apéndice I: Análisis Estadístico

12.1 Laberinto Elevado en Cruz

One-way analysis of variance

P value	0.0036	Bartlett's test for equal variances	
P value summary	**	Bartlett's statistic (corrected)	1.134
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	P value	0.769
Number of groups	4	P value summary	ns
F	5.174	Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No
R square	0.2483		

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1992	3	664.2
Residual (within columns)	6033	47	128.4
Total	8026	50	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Sign	Summary	95% CI of diff
GI vs Ovx	12.49	3.974	Yes	*	0.6340 to 24.34
GI vs OvxE	0.9949	0.3224	No	ns	-10.64 to 12.63
GI vs OvxP	-4.781	1.457	No	ns	-17.16 to 7.599
Ovx vs OvxE	-11.49	3.724	No	ns	-23.13 to 0.1473
Ovx vs OvxP	-17.27	5.261	Yes	**	-29.65 to -4.888
OvxE vs OvxP	-5.776	1.789	No	ns	-17.95 to 6.400

12.2 Prueba del Laberinto de Morris

Two-way ANOVA Matching by cols

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	4.01	0.2607

Time	33.85	< 0.0001
Column factor	11.33	< 0.0001
Subjects (matching)	10.3568	0.0055

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Time	***	Yes
Column factor	***	Yes
Subjects (matching)	**	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	21	4721	224.8	1.189
Time	7	39870	5696	30.13
Column factor	3	13346	4449	13.13
Subjects (matching)	36	12198	338.8	1.792
Residual	252	47645	189.1	

Bonferroni posttests

Ovx vs GI				
Trial	Ovx	GI	Difference	95% CI of diff.
I	51.1	44.9	-6.2	-27.56 to 15.16
II	41.5	34.5	-7	-28.36 to 14.36
III	40.8	19.3	-21.5	-42.86 to -0.1441
IV	28	12.2	-15.8	-37.16 to 5.556
V	25.8	10.9	-14.9	-36.26 to 6.456
VI	30.9	10.8	-20.1	-41.46 to 1.256
VII	39.7	9.3	-30.4	-51.76 to -9.044
VIII	26.2	9.9	-16.3	-37.66 to 5.056
Column factor	Difference	t	P value	Summary
I	-6.2	0.9618	P > 0.05	ns
II	-7	1.086	P > 0.05	ns
III	-21.5	3.335	P < 0.01	**
IV	-15.8	2.451	P > 0.05	ns
V	-14.9	2.311	P > 0.05	ns
VI	-20.1	3.118	P < 0.05	*
VII	-30.4	4.716	P < 0.001	***
VIII	-16.3	2.528	P > 0.05	ns

Ovx vs OvxET				
Column factor	Ovx	OvxET	Difference	95% CI of diff.
I	51.1	51.4	0.3	-21.06 to 21.66
II	41.5	35.1	-6.4	-27.76 to 14.96
III	40.8	17	-23.8	-45.16 to -2.444
IV	28	21.6	-6.4	-27.76 to 14.96
V	25.8	16.6	-9.2	-30.56 to 12.16
VI	30.9	9.3	-21.6	-42.96 to -0.2441
VII	39.7	18.7	-21	-42.36 to 0.3559
VIII	26.2	9.2	-17	-38.36 to 4.356
Column factor	Difference	t	P value	Summary
I	0.3	0.04654	P > 0.05	ns
II	-6.4	0.9928	P > 0.05	ns
III	-23.8	3.692	P < 0.01	**
IV	-6.4	0.9928	P > 0.05	ns
V	-9.2	1.427	P > 0.05	ns
VI	-21.6	3.351	P < 0.01	**
VII	-21	3.258	P < 0.05	*
VIII	-17	2.637	P > 0.05	ns

Ovx vs OvxPT				
Column factor	Ovx	OvxPT	Difference	95% CI of diff.
I	51.1	49.8	-1.3	-22.66 to 20.06
II	41.5	28.8	-12.7	-34.06 to 8.656
III	40.8	19.5	-21.3	-42.66 to 0.05589
IV	28	18.8	-9.2	-30.56 to 12.16
V	25.8	16.2	-9.6	-30.96 to 11.76
VI	30.9	16.5	-14.4	-35.76 to 6.956
VII	39.7	11.8	-27.9	-49.26 to -6.544
VIII	26.2	8.4	-17.8	-39.16 to 3.556
Column factor	Difference	t	P value	Summary
I	-1.3	0.2017	P > 0.05	ns
II	-12.7	1.97	P > 0.05	ns
III	-21.3	3.304	P < 0.01	**
IV	-9.2	1.427	P > 0.05	ns
V	-9.6	1.489	P > 0.05	ns
VI	-14.4	2.234	P > 0.05	ns
VII	-27.9	4.328	P < 0.001	***
VIII	-17.8	2.761	P < 0.05	*

GI vs OvxET				
Column factor	GI	OvxET	Difference	95% CI of diff.
I	44.9	51.4	6.5	-14.86 to 27.86

II	34.5	35.1	0.6	-20.76 to 21.96
III	19.3	17	-2.3	-23.66 to 19.06
IV	12.2	21.6	9.4	-11.96 to 30.76
V	10.9	16.6	5.7	-15.66 to 27.06
VI	10.8	9.3	-1.5	-22.86 to 19.86
VII	9.3	18.7	9.4	-11.96 to 30.76
VIII	9.9	9.2	-0.7	-22.06 to 20.66
Column factor	Difference	t	P value	Summary
I	6.5	1.008	P > 0.05	ns
II	0.6	0.09307	P > 0.05	ns
III	-2.3	0.3568	P > 0.05	ns
IV	9.4	1.458	P > 0.05	ns
V	5.7	0.8842	P > 0.05	ns
VI	-1.5	0.2327	P > 0.05	ns
VII	9.4	1.458	P > 0.05	ns
VIII	-0.7	0.1086	P > 0.05	ns

GI vs OvXPT				
Column factor	GI	OvXPT	Difference	95% CI of diff.
I	44.9	49.8	4.9	-16.46 to 26.26
II	34.5	28.8	-5.7	-27.06 to 15.66
III	19.3	19.5	0.2	-21.16 to 21.56
IV	12.2	18.8	6.6	-14.76 to 27.96
V	10.9	16.2	5.3	-16.06 to 26.66
VI	10.8	16.5	5.7	-15.66 to 27.06
VII	9.3	11.8	2.5	-18.86 to 23.86
VIII	9.9	8.4	-1.5	-22.86 to 19.86
Column factor	Difference	t	P value	Summary
I	4.9	0.7601	P > 0.05	ns
II	-5.7	0.8842	P > 0.05	ns
III	0.2	0.03102	P > 0.05	ns
IV	6.6	1.024	P > 0.05	ns
V	5.3	0.8221	P > 0.05	ns
VI	5.7	0.8842	P > 0.05	ns
VII	2.5	0.3878	P > 0.05	ns
VIII	-1.5	0.2327	P > 0.05	ns

OvXET vs OvXPT				
Column factor	OvXET	OvXPT	Difference	95% CI of diff.
I	51.4	49.8	-1.6	-22.96 to 19.76
II	35.1	28.8	-6.3	-27.66 to 15.06
III	17	19.5	2.5	-18.86 to 23.86
IV	21.6	18.8	-2.8	-24.16 to 18.56

V	16.6	16.2	-0.4	-21.76 to 20.96
VI	9.3	16.5	7.2	-14.16 to 28.56
VII	18.7	11.8	-6.9	-28.26 to 14.46
VIII	9.2	8.4	-0.8	-22.16 to 20.56
Column factor	Difference	t	P value	Summary
I	-1.6	0.2482	P > 0.05	ns
II	-6.3	0.9773	P > 0.05	ns
III	2.5	0.3878	P > 0.05	ns
IV	-2.8	0.4343	P > 0.05	ns
V	-0.4	0.06205	P > 0.05	ns
VI	7.2	1.117	P > 0.05	ns
VII	-6.9	1.07	P > 0.05	ns
VIII	-0.8	0.1241	P > 0.05	ns

12.3 Inmunoreactividad de la nNOS

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	2.02	0.0588
TREATMENT	44.7	< 0.0001
AREA	3.43	< 0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
TREATMENT	***	Yes
AREA	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	6	85.38	14.23	2.052
TREATMENT	3	1889	629.8	90.81
AREA	2	144.9	72.45	10.45
Residual	300	2080	6.935	

Bonferroni posttests

WT vs Ovx

AREA	WT	Ovx	Difference	95% CI of diff.
CA1	8.714	2.618	-6.097	-8.124 to -4.070
CA2/CA3	5.952	0.7619	-5.19	-7.642 to -2.739
DG	7.536	2.862	-4.674	-6.778 to -2.569
AREA	Difference	t	P value	Summary
CA1	-6.097	9.072	P<0.001	***
CA2/CA3	-5.19	6.387	P<0.001	***
DG	-4.674	6.699	P<0.001	***

WT vs OvxET				
AREA	WT	OvxET	Difference	95% CI of diff.
CA1	8.714	7.762	-0.9524	-3.245 to 1.341
CA2/CA3	5.952	7.105	1.153	-1.362 to 3.668
DG	7.536	7.036	-0.5	-2.623 to 1.623
AREA	Difference	t	P value	Summary
CA1	-0.9524	1.253	P > 0.05	ns
CA2/CA3	1.153	1.383	P > 0.05	ns
DG	-0.5	0.7104	P > 0.05	ns

WT vs OvxPT				
AREA	WT	OvxPT	Difference	95% CI of diff.
CA1	8.714	9.485	0.7706	-1.270 to 2.811
CA2/CA3	5.952	7.864	1.911	-0.5120 to 4.335
DG	7.536	7.321	-0.2143	-2.337 to 1.909
AREA	Difference	t	P value	Summary
CA1	0.7706	1.139	P > 0.05	ns
CA2/CA3	1.911	2.379	P > 0.05	ns
DG	-0.2143	0.3045	P > 0.05	ns

Ovx vs OvxET				
AREA	Ovx	OvxET	Difference	95% CI of diff.
CA1	2.618	7.762	5.144	2.940 to 7.349
CA2/CA3	0.7619	7.105	6.343	3.828 to 8.858
DG	2.862	7.036	4.174	2.069 to 6.278
AREA	Difference	t	P value	Summary
CA1	5.144	7.038	P<0.001	***
CA2/CA3	6.343	7.608	P<0.001	***
DG	4.174	5.982	P<0.001	***

Ovx vs OvxPT				
AREA	Ovx	OvxPT	Difference	95% CI of diff.
CA1	2.618	9.485	6.867	4.926 to 8.808
CA2/CA3	0.7619	7.864	7.102	4.678 to 9.525
DG	2.862	7.321	4.459	2.355 to 6.564
AREA	Difference	t	P value	Summary

CA1	6.867	10.67	P<0.001	***
CA2/CA3	7.102	8.84	P<0.001	***
DG	4.459	6.391	P<0.001	***

OvxET vs OvxPT				
AREA	OvxET	OvxPT	Difference	95% CI of diff.
CA1	7.762	9.485	1.723	-0.4944 to 3.940
CA2/CA3	7.105	7.864	0.7584	-1.729 to 3.246
DG	7.036	7.321	0.2857	-1.837 to 2.409
AREA	Difference	t	P value	Summary
CA1	1.723	2.344	P > 0.05	ns
CA2/CA3	0.7584	0.9195	P > 0.05	ns
DG	0.2857	0.406	P > 0.05	ns

12.4 Densidad de Espinas Dendríticas: CA1

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	6.22	< 0.0001
TREATMENT	16.62	< 0.0001
AREA	61.16	< 0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
TREATMENT	***	Yes
AREA	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	141.1	11.76	5.83
TREATMENT	3	377.2	125.7	62.34
AREA	4	1387	346.9	172
Residual	180	363	2.017	

Bonferroni posttests

GI vs Ovx				
AREA	GI	Ovx	Difference	95% CI of diff.
basilar der	11.1	8.5	-2.6	-4.627 to -0.5727

basilar izq	11.6	7.8	-3.8	-5.827 to -1.773
R1	4.6	4.1	-0.5	-2.527 to 1.527
R2	9.2	5.1	-4.1	-6.127 to -2.073
R3	14.2	8.1	-6.1	-8.127 to -4.073
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	-2.6	4.094	P<0.001	***
basilar izq	-3.8	5.983	P<0.001	***
R1	-0.5	0.7873	P > 0.05	ns
R2	-4.1	6.456	P<0.001	***
R3	-6.1	9.605	P<0.001	***

GI vs OvxE				
AREA	GI	OvxE	Difference	95% CI of diff.
basilar der	11.1	10.6	-0.5	-2.527 to 1.527
basilar izq	11.6	10.4	-1.2	-3.227 to 0.8273
R1	4.6	4.7	0.1	-1.927 to 2.127
R2	9.2	8.5	-0.7	-2.727 to 1.327
R3	14.2	14.2	0	-2.027 to 2.027
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	-0.5	0.7873	P > 0.05	ns
basilar izq	-1.2	1.89	P > 0.05	ns
R1	0.1	0.1575	P > 0.05	ns
R2	-0.7	1.102	P > 0.05	ns
R3	0	0	P > 0.05	ns

GI vs OvxE				
AREA	GI	OvxE	Difference	95% CI of diff.
basilar der	11.1	9.5	-1.6	-3.627 to 0.4273
basilar izq	11.6	10.8	-0.8	-2.827 to 1.227
R1	4.6	5.6	1	-1.027 to 3.027
R2	9.2	8.9	-0.3	-2.327 to 1.727
R3	14.2	14.1	-0.1	-2.127 to 1.927
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	-1.6	2.519	P > 0.05	ns
basilar izq	-0.8	1.26	P > 0.05	ns
R1	1	1.575	P > 0.05	ns
R2	-0.3	0.4724	P > 0.05	ns
R3	-0.1	0.1575	P > 0.05	ns

Ovx vs OvxE				
AREA	Ovx	OvxE	Difference	95% CI of diff.
basilar der	8.5	10.6	2.1	0.07270 to 4.127
basilar izq	7.8	10.4	2.6	0.5727 to 4.627
R1	4.1	4.7	0.6	-1.427 to 2.627

R2	5.1	8.5	3.4	1.373 to 5.427
R3	8.1	14.2	6.1	4.073 to 8.127
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	2.1	3.307	P<0.01	**
basilar izq	2.6	4.094	P<0.001	***
R1	0.6	0.9448	P > 0.05	ns
R2	3.4	5.354	P<0.001	***
R3	6.1	9.605	P<0.001	***

Ovx vs OvxP				
AREA	Ovx	OvxP	Difference	95% CI of diff.
basilar der	8.5	9.5	1	-1.027 to 3.027
basilar izq	7.8	10.8	3	0.9727 to 5.027
R1	4.1	5.6	1.5	-0.5273 to 3.527
R2	5.1	8.9	3.8	1.773 to 5.827
R3	8.1	14.1	6	3.973 to 8.027
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	1	1.575	P > 0.05	ns
basilar izq	3	4.724	P<0.001	***
R1	1.5	2.362	P > 0.05	ns
R2	3.8	5.983	P<0.001	***
R3	6	9.448	P<0.001	***

OvxE vs OvxP				
AREA	OvxE	OvxP	Difference	95% CI of diff.
basilar der	10.6	9.5	-1.1	-3.127 to 0.9273
basilar izq	10.4	10.8	0.4	-1.627 to 2.427
R1	4.7	5.6	0.9	-1.127 to 2.927
R2	8.5	8.9	0.4	-1.627 to 2.427
R3	14.2	14.1	-0.1	-2.127 to 1.927
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	-1.1	1.732	P > 0.05	ns
basilar izq	0.4	0.6298	P > 0.05	ns
R1	0.9	1.417	P > 0.05	ns
R2	0.4	0.6298	P > 0.05	ns
R3	-0.1	0.1575	P > 0.05	ns

12.5 Densidad de Espinas Dendríticas: CA3

Two-way ANOVA

Source of Variation	% variation	P value
Interaction	7.79	< 0.0001
TREATMENT	12.61	< 0.0001
AREA	68.3	< 0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	***	Yes
TREATMENT	***	Yes
AREA	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	12	139.4	11.62	10.35
TREATMENT	3	225.6	75.21	66.98
AREA	4	1222	305.4	272
Residual	180	202.1	1.123	

Bonferroni posttests

GI vs OvX				
AREA	GI	Ovx	Difference	95% CI of diff.
basilar der	10.4	8.1	-2.3	-3.813 to -0.7873
basilar izq	10.8	7.7	-3.1	-4.613 to -1.587
primaria	3.6	3.5	-0.1	-1.613 to 1.413
secundaria	9.8	7.7	-2.1	-3.613 to -0.5873
terciaria	14.7	7.9	-6.8	-8.313 to -5.287
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	-2.3	4.854	P<0.001	***
basilar izq	-3.1	6.542	P<0.001	***
primaria	-0.1	0.211	P > 0.05	ns
secundaria	-2.1	4.432	P<0.001	***
terciaria	-6.8	14.35	P<0.001	***

GI vs OvxE				
AREA	GI	OvxE	Difference	95% CI of diff.
basilar der	10.4	8.7	-1.7	-3.213 to -0.1873
basilar izq	10.8	8.1	-2.7	-4.213 to -1.187
primaria	3.6	3.2	-0.4	-1.913 to 1.113
secundaria	9.8	8.6	-1.2	-2.713 to 0.3127
terciaria	14.7	9.8	-4.9	-6.413 to -3.387

AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	-1.7	3.587	P<0.01	**
basilar izq	-2.7	5.698	P<0.001	***
primaria	-0.4	0.8441	P > 0.05	ns
secundaria	-1.2	2.532	P > 0.05	ns
terciaria	-4.9	10.34	P<0.001	***

GI vs Ovxp				
AREA	GI	Ovxp	Difference	95% CI of diff.
basilar der	10.4	9.7	-0.7	-2.213 to 0.8127
basilar izq	10.8	8.9	-1.9	-3.413 to -0.3873
primaria	3.6	3.3	-0.3	-1.813 to 1.213
secundaria	9.8	9.1	-0.7	-2.213 to 0.8127
terciaria	14.7	9.9	-4.8	-6.313 to -3.287
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	-0.7	1.477	P > 0.05	ns
basilar izq	-1.9	4.01	P<0.001	***
primaria	-0.3	0.6331	P > 0.05	ns
secundaria	-0.7	1.477	P > 0.05	ns
terciaria	-4.8	10.13	P<0.001	***

Ovx vs OvxE				
AREA	Ovx	OvxE	Difference	95% CI of diff.
basilar der	8.1	8.7	0.6	-0.9127 to 2.113
basilar izq	7.7	8.1	0.4	-1.113 to 1.913
primaria	3.5	3.2	-0.3	-1.813 to 1.213
secundaria	7.7	8.6	0.9	-0.6127 to 2.413
terciaria	7.9	9.8	1.9	0.3873 to 3.413
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	0.6	1.266	P > 0.05	ns
basilar izq	0.4	0.8441	P > 0.05	ns
primaria	-0.3	0.6331	P > 0.05	ns
secundaria	0.9	1.899	P > 0.05	ns
terciaria	1.9	4.01	P<0.001	***

Ovx vs Ovxp				
AREA	Ovx	Ovxp	Difference	95% CI of diff.
basilar der	8.1	9.7	1.6	0.08732 to 3.113
basilar izq	7.7	8.9	1.2	-0.3127 to 2.713
primaria	3.5	3.3	-0.2	-1.713 to 1.313
secundaria	7.7	9.1	1.4	-0.1127 to 2.913
terciaria	7.9	9.9	2	0.4873 to 3.513
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	1.6	3.376	P<0.01	**

basilar izq	1.2	2.532	P > 0.05	ns
primaria	-0.2	0.4221	P > 0.05	ns
secundaria	1.4	2.954	P < 0.05	*
terciaria	2	4.221	P < 0.001	***

OvxE vs OvxP				
AREA	OvxE	OvxP	Difference	95% CI of diff.
basilar der	8.7	9.7	1	-0.5127 to 2.513
basilar izq	8.1	8.9	0.8	-0.7127 to 2.313
primaria	3.2	3.3	0.1	-1.413 to 1.613
secundaria	8.6	9.1	0.5	-1.013 to 2.013
terciaria	9.8	9.9	0.1	-1.413 to 1.613
AREA	Difference	t	P value	Summary
basilar der	1	2.11	P > 0.05	ns
basilar izq	0.8	1.688	P > 0.05	ns
primaria	0.1	0.211	P > 0.05	ns
secundaria	0.5	1.055	P > 0.05	ns
terciaria	0.1	0.211	P > 0.05	ns

12.6 Densidad de Espinas Dendríticas: GD

Two-way ANOVA

Source of Variation	% of total variation	P value
Interaction	0.1	0.6166
TREATMENT	0.01	0.9158
AREA	97.35	< 0.0001

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
TREATMENT	ns	No
AREA	***	Yes

Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	6	2.371	0.3951	0.7425
TREATMENT	3	0.2729	0.09097	0.1709
AREA	2	2210	1105	2077
Residual	108	57.48	0.5322	

Bonferroni posttests

GI vs Ovx				
AREA	GI	Ovx	Difference	95% CI of diff.
primaria	3	2.9	-0.1	-1.099 to 0.8989
secundaria	10.75	11.05	0.3	-0.6989 to 1.299
terciaria	12.95	12.95	0	-0.9989 to 0.9989
AREA	Difference	t	P value	Summary
primaria	-0.1	0.3065	P > 0.05	ns
secundaria	0.3	0.9196	P > 0.05	ns
terciaria	0	0	P > 0.05	ns

GI vs OvxET				
AREA	GI	OvxET	Difference	95% CI of diff.
primaria	3	3	0	-0.9989 to 0.9989
secundaria	10.75	10.55	-0.2	-1.199 to 0.7989
terciaria	12.95	12.95	0	-0.9989 to 0.9989
AREA	Difference	t	P value	Summary
primaria	0	0	P > 0.05	ns
secundaria	-0.2	0.613	P > 0.05	ns
terciaria	0	0	P > 0.05	ns

GI vs OvxPT				
AREA	GI	OvxPT	Difference	95% CI of diff.
primaria	3	3	0	-0.9989 to 0.9989
secundaria	10.75	10.45	-0.3	-1.299 to 0.6989
terciaria	12.95	13.2	0.25	-0.7489 to 1.249
AREA	Difference	t	P value	Summary
primaria	0	0	P > 0.05	ns
secundaria	-0.3	0.9196	P > 0.05	ns
terciaria	0.25	0.7663	P > 0.05	ns

Ovx vs OvxET				
AREA	Ovx	OvxET	Difference	95% CI of diff.
primaria	2.9	3	0.1	-0.8989 to 1.099
secundaria	11.05	10.55	-0.5	-1.499 to 0.4989
terciaria	12.95	12.95	0	-0.9989 to 0.9989
AREA	Difference	t	P value	Summary
primaria	0.1	0.3065	P > 0.05	ns
secundaria	-0.5	1.533	P > 0.05	ns
terciaria	0	0	P > 0.05	ns

Ovx vs OvxPT				
AREA	Ovx	OvxPT	Difference	95% CI of diff.
primaria	2.9	3	0.1	-0.8989 to 1.099
secundaria	11.05	10.45	-0.6	-1.599 to 0.3989
terciaria	12.95	13.2	0.25	-0.7489 to 1.249

AREA	Difference	t	P value	Summary
primaria	0.1	0.3065	P > 0.05	ns
secundaria	-0.6	1.839	P > 0.05	ns
terciaria	0.25	0.7663	P > 0.05	ns

OvxET vs OvxPT				
AREA	OvxET	OvxPT	Difference	95% CI of diff.
primaria	3	3	0	-0.9989 to 0.9989
secundaria	10.55	10.45	-0.1	-1.099 to 0.8989
terciaria	12.95	13.2	0.25	-0.7489 to 1.249
AREA	Difference	t	P value	Summary
primaria	0	0	P > 0.05	ns
secundaria	-0.1	0.3065	P > 0.05	ns
terciaria	0.25	0.7663	P > 0.05	ns