



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA TIBOLONA EN UN MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO
EN EL HIPOCAMPO DE RATAS EXPUESTAS A OZONO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

RODOLFO PINTO ALMAZÁN

TUTOR:

DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA

FACULTAD DE MEDICINA

DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO D.F.,

2014



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.

COMITÉ TUTOR

Dra. Christian Humberto Guerra Araiza

Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Dra. Selva Lucia Rivas Arancibia

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Las Especies Reactivas de Oxígeno, la Señalización Celular y el Estrés Oxidativo	1
1.1.1.Los Radicales Libres y las Especies Reactivas de Oxígeno.....	1
1.1.2.Especies Reactivas de Oxígeno y Señalización Celular.....	2
1.1.3.Especies Reactivas de Oxígeno y Estrés Oxidativo	3
1.1.4.Estrés Oxidativo en el Sistema Nervioso Central	4
1.2. Proteína Tau	5
1.2.1.Características de la proteína Tau	5
1.2.2.Estructura, isoformas y dominios de la proteína Tau	6
1.2.3.La proteína Tau: estado fisiológico y estado patológico	9
1.2.3.1.Estado Fisiológico	9
1.2.3.2.Cinasas de Tau	10
1.2.3.3.Fosfatasas de Tau.....	12
1.2.3.4.Estado de Hiperfosforilación de Tau.....	14
1.3. Tau y las Especies Reactivas del Oxígeno	19
1.4. Terapia de Reemplazo Hormonal	20
1.4.1.Efectos Neuroprotectores de las Hormonas Esteroides	21
1.4.2.Efectos Secundarios de las Terapia de Reemplazo Hormonal.....	21
1.5. Tibolona	23
1.5.1.Propiedades químicas	23
1.5.2.Indicaciones terapéuticas	25
1.5.3.Mecanismo de acción	25
1.5.4.Absorción, biotransformación y excreción	27
1.5.5.Efectos de la Tibolona en el Sistema Nervioso Central.	28
1.5.5.1.Efecto de la Tibolona en el déficit cognitivo.....	28
1.5.5.2.Plasticidad Neuronal y Neurotransmisión.....	30
1.6. Hipocampo	32

1.7. Modelo de Estrés Oxidativo Producido por la Exposición	
Crónica a Ozono.....	34
1.7.1.Ozono	34
1.7.2.Daño inducido por el ozono a diferente órganos y sistemas	34
1.7.3.Estrés oxidativo producido por la exposición crónica a ozono	
en el SNC.....	35
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
3. HIPÓTESIS.....	38
4. OBJETIVOS	38
4.1.Objetivo General	38
4.2.Objetivos Específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1.Animales	39
5.2.Tratamientos.....	39
5.3.Exposición al O₃	39
5.4.Exposición al Aire	40
5.5.Prueba de Actividad Motora.....	40
5.6.Prueba de Evitación Pasiva.....	40
5.7.Técnica de Western blot	41
5.8.Análisis Histológico.....	44
5.9.Análisis Estadístico	44
6. RESULTADOS	45
6.1.Efecto de la TIB sobre los Marcadores de EO en el	
hipocampo de ratas expuestas a O ₃	45
6.2.Efecto de la TIB sobre la Muerte Neuronal provocada por el EO	
crónico en el hipocampo de ratas expuestas a O ₃	46
6.3.Efecto de la TIB sobre el Déficit Cognitivo y la Actividad Motora	
en ratas expuestas a O ₃	47
6.3.1.Prueba de Evitación Pasiva para Memoria de Corto y de	
Largo Plazo	47
6.3.2.Prueba de Actividad Motora.	48

6.4. Efecto de la TIB sobre el Estado de Fosforilación de Tau y de GSK3 β , Akt, PTEN y PP2A en el hipocampo de ratas expuestas a O ₃	49
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIONES	67
9. REFERENCIAS	68
10. ANEXO I. ARTÍCULOS PUBLICADOS.	94
11. ANEXO II. SOLUCIONES EMPLEADAS	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma más larga de tau (2+3+10+).	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Modificaciones de la proteína Tau por cinasas y fosfatasas.	18
Figura 3. Estructura química de la TIB, Noretinodrel y la Noretisterona.....	24
Figura 4. Estructura de los metabolitos de la TIB.....	24
Figura 5. Esquema de la estructura del hipocampo..	33
Figura 6. Efecto de la TIB en los Marcadores de EO	45
Figura 7. Efecto de la TIB sobre la Muerte Neuronal provocada por el EO.....	46
Figura 8. Estadística de las Latencias de Adquisición y Latencias de Escape para la Prueba de Evitación Pasiva.....	47
Figura 9. Prueba de Evitación Pasiva	48
Figura 10. Prueba de Actividad Motora	48
Figura 11. Ejemplos de la TIB sobre la fosforilación de Tau en la Ser396, GSK3, y de Akt.....	50
Figura 12. Ejemplos de la TIB sobre la fosforilación de PP2A y PTEN	52

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Afinidad relativa para el RE y RP para Tibolona y sus metabolitos.	25
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en el estudio.....	43

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El estrés oxidativo aumenta la lipoperoxidación, produce déficits de memoria y de actividad motora así como una neurodegeneración progresiva en el sistema nervioso central. La Tibolona es un tratamiento para los síntomas de la menopausia que disminuye los niveles de peroxidación de lípidos y mejora la memoria y el aprendizaje.

OBJETIVO. Estudiar el efecto de la Tibolona sobre la lipoperoxidación, los déficits de memoria y motor, así como en la fosforilación de Tau, GSK3, Akt, PP2A y PTEN en el modelo de estrés oxidativo inducido por la exposición crónica al ozono.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se dividieron aleatoriamente 100 ratas adultas wistar en 10 grupos: Control (C), que recibió aire durante 60 días; (C+Tibolona), aire más 1 mg/kg de Tibolona durante 60 días; los grupos 3-6, ozono durante 7, 15, 30, y 60 días; y los grupos 7-10, 1 mg/kg de Tibolona durante 7, 15, 30 y 60 días previo a la exposición al ozono. Se realizaron pruebas de memoria y motoras y se determinó el contenido del 4-hidroxinonenal, de la nitrotirosina, Tau-P, GSK3-P, Akt-P, PP2A y PTEN-P por Western blot, así como la muerte neuronal en el hipocampo.

RESULTADOS. La administración de Tibolona disminuyó el contenido de lípidos peroxidados, la oxidación de proteínas, la hiperfosforilación de tau por medio de la regulación de las proteínas GSK3, Akt, PP2A y PTEN así como la muerte neuronal en el hipocampo; mejoró la memoria y previno las alteraciones motoras en los animales expuestos a ozono.

CONCLUSIÓN. Nuestros resultados indican un posible papel neuroprotector de la Tibolona como un tratamiento útil para prevenir la neurodegeneración inducida por el estrés oxidativo.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Oxidative stress increases brain lipid peroxidation, memory and motor deficits and progressive neurodegeneration. Tibolone, a treatment for menopausal symptoms, decreases lipid peroxidation levels and improves memory and learning.

AIM. To study the effect of chronic administration of Tibolone on lipid peroxidation, memory and motor deficits and the phosphorylation of Tau, GSK3, Akt, PP2A and PTEN in ozone induced oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS. 100 male wistar adult rats were randomly divided into 10 experimental groups: Control (C) was exposed to an airstream for 60 days; C + Tibolone, airstream exposure plus 1 mg/kg of Tibolone for 60 days; groups 3-6 were exposed to ozone (O₃) for 7, 15, 30, and 60 days, and groups 7-10 received 1 mg/kg of Tibolone treatment by oral gavage for 7, 15, 30 and 60 days (O₃+TIB) and were then exposed to ozone. We determined the effect of Tibolone on memory and motor activity. Hippocampus was processed to determine the content of 4-hydroxynonenal, nitrotyrosine, Tau-P, GSK3-P, Akt-P, PP2A-P and PTEN-P by western blot. Four animals were perfused and processed for analysis of neuronal death.

RESULTS. In the hippocampus, administration of 1 mg/kg of Tibolone for 30 days prevented increased levels of lipid peroxidation, protein oxidation, Tau hyperphosphorylation by the regulation of GSK3, Akt, PP2A and PTEN proteins, whereas after 60 days prevented neuronal death in the CA3 region caused by exposure to ozone. Therefore, Tibolone prevents cognitive deficits in short- and long-term memory on the passive avoidance task and prevents a decrease in exploratory behavior and an increase in freezing behavior.

CONCLUSION. Our results indicate a possible neuroprotective role of Tibolone as a useful treatment to prevent oxidative stress neurodegeneration.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Las Especies Reactivas de Oxígeno, la Señalización Celular y el Estrés Oxidativo

1.1.1. Los Radicales Libres y las Especies Reactivas de Oxígeno

Un radical libre (RL) es una molécula (orgánica o inorgánica), extremadamente inestable debido a que poseen electrones desapareados en alguno de sus orbitales electrónicos, lo cual las hará buscar con avidez completar el par electrónico que anule su campo magnético, favoreciendo así la colisión entre las moléculas y su aproximación con ellas. Por esta razón de que las reacciones en las que intervienen suelen ser muy rápidas, tanto que el tiempo de vida en algunos casos es del orden de nanosegundo [1,2].

Los RL pueden reaccionar con otros radicales, en tal caso ambas especies anularían entre sí sus campos magnéticos provocando que ambos radicales dejen de serlo, o puede suceder que la reacción solo involucre un radical libre que robará electrones de moléculas vecinas formando nuevos RL [2].

Dentro de los principales radicales del oxígeno, encontramos a los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($OH^{\cdot-}$), el alcoxilo ($RO^{\cdot-}$) y el radical peroxilo ($RO_2^{\cdot-}$). A su vez estas moléculas son consideradas junto con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al Ozono (O_3) como Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) [3].

Las ERO se producen en el metabolismo mitocondrial del oxígeno en todos los sistemas biológicos aeróbicos como proceso fisiológico, por lo cual son ubicuas. Ejemplos de ello son que tanto el $O_2^{\cdot-}$ como H_2O_2 se presentan en las células en concentraciones basales de orden nanomolar y micromolar, respectivamente [1].

Por otro lado las ERO son altamente reactivas, de tiempo de vida media muy corto, y reaccionan con todas las moléculas que se encuentran a su alrededor, empezando con aquellas que se encuentran muy cercanas a su sitio de formación [3].

Uno de los compuestos con los cuales puede reaccionar el $O_2^{\cdot -}$ es el óxido nítrico (NO), el cual es una Especie Reactiva del Nitrógeno (ERN), y formar peroxinitrito ($ONOO^-$) que, por tratarse de una molécula no radical libre, es mucho más estable y puede generar efecto tóxico de largo plazo [4].

1.1.2. Especies Reactivas de Oxígeno y Señalización Celular

Algunas células tienen la capacidad de producir ERO de manera fisiológica; sin embargo, son muy escasos los reportes en donde se impliquen a los ERO en la regulación de procesos biológicos generales. Como un ejemplo clásico tenemos a los leucocitos fagocíticos que contienen NADPH oxidasa, misma que produce $O_2^{\cdot -}$ en vesículas fagocíticas durante “la reacción de muerte” [5–7].

En los últimos años se ha postulado a los RL como moléculas transductoras de señales como segundos mensajeros [8]. La participación de ERO y ERN en la transducción de señales sigue siendo controvertido, a pesar del gran número de evidencias sugerentes de su participación en una variedad de vías de señalización [8,9].

Dentro de los problemas que han limitado su aceptación como moléculas de señalización, el más importante es la dificultad en la identificación de los blancos específicos para cada vía así como las reacciones químicas que apoyan la oxidación reversible de estos componentes de señalización [9]. Se ha reportado que los residuos de cisteína en forma de tiolato, es decir ionizado, encontrados en las proteínas, pueden ser blancos específicos de reacción con H_2O_2 y con ERN [9].

El H_2O_2 es un caso particular debido a que diferentes tipos de enzimas pueden modular sus concentraciones, como el caso de las óxido reductasas y en especial la isoforma de la NADPH oxidasa conocida como DuOX, incrementando sus niveles celulares o la actividad de enzimas como la catalasa, glutatión peroxidasa y peroxiredoxinas, que se encargan de disminuir sus concentraciones celulares [8].

Consecuentemente, las ERO producidas en cantidades adecuadas se han vinculado con aspectos de la señalización inter e intra celular. De este modo el que suceda uno u otro, dependerá del balance entre oxidantes y antioxidantes [10].

1.1.3. Especies Reactivas de Oxígeno y Estrés Oxidativo

Para atenuar la oxidación celular por la presencia de RL incluyendo las ERO, las células poseen capacidad antioxidante dada por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos a través de los cuales anulan la reactividad o inhiben la generación de RL [11].

Cuando se incrementa la producción de sustancias oxidantes o bien se produce una deficiencia en los mecanismos antioxidantes intracelulares, las especies reactivas de oxígeno resultan dañinas para la célula. El estrés oxidativo (EO) es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis redox intracelular, es decir el balance entre oxidantes y antioxidantes. Este desbalance hacia los oxidantes conduce a la oxidación de proteínas, lípidos y del DNA de las células [11,12].

En el Sistema Nervioso Central (SNC) se forma el $\text{O}_2^{\cdot -}$ *in vivo* como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, aunque también puede generarse por la acción de enzimas como la xantina oxidasa. Su reacción con la enzima antioxidante, la superóxido dismutasa (SOD), da lugar a la generación de H_2O_2 , una sustancia poco reactiva pero con

capacidad oxidante. El H_2O_2 puede generarse además por la acción de otras enzimas como la monoamina oxidasa. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede reaccionar en presencia de hierro, dando lugar a la formación de radicales hidroxilo ($\text{OH}^{\cdot}$) mediante la reacción de Fenton. Asimismo, el H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar entre sí, en presencia de cationes metálicos, mediante la reacción de Haber-Weiss, generando igualmente radicales hidroxilo, que son especies altamente reactivas y oxidantes [13,14].

1.1.4. Estrés Oxidativo en el Sistema Nervioso Central

El estrés oxidativo tiene un papel importante en el desarrollo de muchas enfermedades degenerativas, como son las enfermedades autoinmunes, el cáncer, las enfermedades cardíacas y la diabetes, pero también juega un rol crucial en las enfermedades neurodegenerativas como son la Enfermedad de Alzheimer (EA) [15], Enfermedad de Parkinson (ED) [16], esclerosis múltiple [17], y otros procesos relacionados con el envejecimiento patológico [18].

La plasticidad del cerebro permite ciertas funciones como son el trabajo normal y los procesos de memoria y aprendizaje. Las sinapsis que se forman entre las neuronas están ampliamente organizadas y son estructuras que permiten interacciones rápidas y altamente selectivas entre las células en respuesta a los cambios constantes en el ambiente que producen la neuroplasticidad [19]. Esto les permite a las células nerviosas ser funcionales, así como poder modificarse estructuralmente de manera continua para establecer nuevas dendritas y conexiones sinápticas. El proceso de plasticidad neuronal puede ser alterado por estrés oxidativo, el cual produce pérdida de procesos, muerte neuronal así como alteraciones en la formación de nuevas células [20].

Por otro lado, se ha demostrado que el estrés oxidativo produce modificaciones en varias proteínas intracelulares lo que ocasionan alteraciones en sus actividades y funciones [21]. Una de las proteínas que es modificada por los cambios en el balance redox intraneuronal es la proteína Tau.

1.2. Proteína Tau

1.2.1. Características de la proteína Tau

Las Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAP) participan en la organización de la estructura del citoplasma neurítico al estabilizar los microtúbulos y promover su polimerización. Estas proteínas, en su mayoría son termoestables y presentan diferentes sitios que son susceptibles de ser fosforilados o glicosilados promoviendo así la unión y estabilización de los microtúbulos [22,23].

La proteína Tau es una MAP que se expresa principalmente en las neuronas. En condiciones fisiológicas, Tau existe como una proteína altamente soluble y de manera nativa en forma desplegada. Tau juegan un papel importante en para la construcción de la red de microtúbulos neuronales, ya que interactúa con los monómeros de tubulina y promueve su montaje en los microtúbulos permitiendo estabilizar su estructura [24–26].

Estudios *in vitro* han mostrado, mediante el uso de oligonucleótidos antisentido para algunos mRNA que codifican para proteínas MAP2 y Tau, que al inhibir su expresión se altera de manera importante la plasticidad de las neuronas, ya que los somas muestran marcada inhibición de la extensión de neuritas y de la formación de dendritas y axones [27–29].

En ratones knockout (KO) para Tau se ha observado que la MAP1A, puede compensar la función de Tau; sin embargo, el diámetro del axón de las neuronas disminuye considerablemente respecto a los animales control [30].

Aunque Tau se encuentra principalmente en los axones de las neuronas, con niveles menores en las dendritas, puede formar filamentos en dendritas y en el cuerpo celular neuronal [24].

En las neuronas del SNP que proyectan un axón muy largo y de diámetro mayor en comparación con el de neuronas del SNC, se ha reportado la presencia de una secuencia adicional en la región N-terminal de Tau, por lo que se ha considerado ésta como una isoforma de Tau de alto peso molecular [31].

Por otro lado, Tau también se encuentra en células no neuronales, generalmente en cantidades tan pequeñas como en trazas [24]. Un ejemplo claro de esto son las células gliales, en las cuales Tau se expresa principalmente en condiciones patológicas [32], y es posible detectar RNAm y proteínas Tau en varios tejidos periféricos tales como corazón, riñón, pulmón, músculo, páncreas, testículos, así como en los fibroblastos [33].

En la rata, la proteína Tau presenta seis isoformas generadas por procesamiento alternativo del RNAm a partir de un solo gen, el cual se encuentra en el cromosoma 17q21 [34]. El transcrito primario de Tau contiene 16 exones y presenta una región 5' que no se traduce que es rica en GC, la cual se ha descrito en el gen como una región de unión para diferentes factores de transcripción [35].

La expresión de las diferentes isoformas de Tau por procesamiento alternativo del RNAm es variable, de esta manera las isoformas de Tau que se encuentran en el SNC no se expresan en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) [36].

1.2.2. Estructura, isoformas y dominios de la proteína Tau

Las isoformas de Tau presentan entre 353 a 441 aminoácidos y sus pesos moleculares van de 45 a 65 kDa [37]. Estas variantes de Tau se diferencian entre sí por la presencia de tres (3R) o cuatro regiones repetidas (4R) de 18 aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de la molécula y la ausencia o presencia de uno o dos insertos (29 ó 58 aminoácidos) en el extremo amino-terminal (N-terminal) (**Figura 1.**) [38,39].

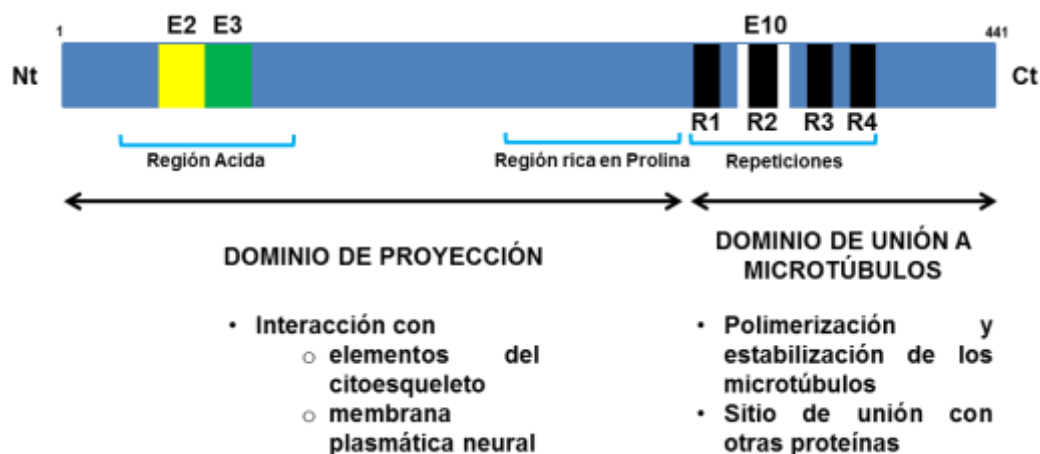


Figura 1. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma más larga de tau (2+3+10+). El dominio de proyección (región N-terminal), incluye la región ácida y la región rica en prolina, la cual interactúa con los elementos del citoesqueleto para determinar las distancias entre los microtúbulos en los axones. El dominio de unión a microtúbulos (región C-terminal), regula la velocidad de polimerización de los microtúbulos. También está implicado en la unión con las proteínas funcionales como la proteína fosfatasa 2A (PP2A) o la presenilina 1 (PS1).

La proteína Tau se une a los microtúbulos por medio de 3R ó 4R a una matriz flexible de enlaces débiles y son estas regiones repetidas, codificadas por los exones 9 a 12, que se disponen hacia el extremo C-terminal. Las regiones 3R y 4R repetidas son altamente conservadas y separadas una de la otra por al menos 13 ó 14 aminoácidos inter repetidos [40]. Se ha identificado que entre mayor número de repeticiones tenga la proteína, más eficiente es para promover el ensamble de los microtúbulos [41–43].

En el cerebro, los niveles de expresión de 3R y de 4R ocurren en una proporción de 1:1 [26]. Es importante destacar que en la mayoría de las “taupatías” se altera la proporción de 3R:4R. Por ejemplo, algunas familias que padecen la demencia fronto-temporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17) tienen mayor proporción de Tau 4R, debido a mutaciones alrededor del exón 10 exacerbando de este modo la capacidad de Tau para interactuar con microtúbulos [26,44] .

Por otro lado, los dos insertos en la parte N-terminal son altamente ácidos y codificados por los exones 2 y 3. Estos insertos adicionales son seguidos por una región básica rica en prolina (**Figura 1.**) [45,46].

El extremo N-terminal se conoce como el dominio de “proyección”, ya que se proyecta desde la superficie de microtúbulos en las que puede interactuar con otros elementos del citoesqueleto [45], con organelos como las mitocondrias [47] y con la membrana plasmática neural [46]. Por ello, la proteína Tau puede actuar como mediador entre los microtúbulos y la membrana plasmática [24,47].

Adicionalmente, se ha sugerido que esta región es crucial para la estabilización y organización de ciertos tipo de axones [24]. Esto se debe a que la longitud particular del dominio N-terminal de las proteínas Tau en los axones específicos determinan las distancias entre los microtúbulos en el axón y pueden aumentar el diámetro axonal [48].

Por lo tanto, resulta fundamental tanto el extremo C-terminal como la N-terminal, ya que ambas partes de la molécula son importantes para las funciones de unión de los microtúbulos, interacción con otros elementos del citoesqueleto, así como el tamaño y diámetro de los axones.

Tau se expresa diferencialmente durante el desarrollo en el cerebro de la rata [24]. Sólo una isoforma de Tau ha sido identificada en el cerebro de la rata en etapa prenatal, mientras que de cuatro a seis isoformas se presentan en la etapa adulta [37].

Se considera que hacia los 20 días de desarrollo postnatal la isoforma Tau juvenil (Tau J), la cual se caracteriza por la ausencia de inserciones N-terminal y la presencia de tres repeticiones C-terminales, se presenta y disminuye considerablemente hasta no presentarse durante la etapa adulta. Hacia este período de disminución significativa de Tau J se presenta Tau en su forma adulta [22].

En la etapa adulta, Tau presenta de una a dos inserciones de 29 aminoácidos en la región N-terminal, pudiendo regular como previamente se mencionó la interacción de Tau con el citoesqueleto y con la membrana plasmática [38,46,47],

y presenta 3R ó 4R en la región C-terminal, los cuales hacen más eficiente el ensamble de microtúbulos, a diferencia del dominio de unión a tubulina presente en etapas fetales que solo presenta 3 repeticiones [41–43].

Por lo cual, las isoformas de Tau puede tener funciones específicas relacionadas con la ausencia o presencia de regiones codificadas por los exones 2, 3 y 10 [24].

Otro dato relevante es que las seis isoformas no se expresan de la misma manera en las neuronas del SNC. Por ejemplo, los mRNA de Tau que contienen el exón 10 no se encuentran en las células granulares del giro dentado [38].

1.2.3. La proteína Tau: estado fisiológico y estado patológico

1.2.3.1. Estado Fisiológico

Como se mencionó anteriormente, la proteína Tau es regulada durante la homeostasis normal y durante respuestas inducidas a estrés por una serie de modificaciones postraduccionales. Una de las modificaciones postraduccionales más importantes que ocurren en Tau son las fosforilaciones, ya que estas afectan la capacidad de las MAPs para unirse a los microtúbulos [23].

La proteína Tau tiene 85 posibles sitios de fosforilación siendo 45 serinas-prolinas (Ser-Pro), 35 treoninas-prolinas (Thr-Pro) y cinco tirosinas (Tyr) en la isoforma más larga de tau (446 aminoácidos) [24,49,50]. La mayoría de estos sitios se encuentran localizados por fuera del dominio de unión a microtúbulos [24].

Por otro lado, la pseudofosforilación en los residuos de Ser (sustitución de la Ser con ácido glutámico o ácido aspártico) localizados dentro de los dominios R1-R4 en sitios específicos tales Ser 262, 293, 324 y 356 indujo cambios conformacionales en tau y disminuyó la unión a microtúbulos [51].

La actividad biológica de Tau está regulada por el grado de fosforilación debido a que a mayor número de grupos fosfato unidos en la región C-terminal, menor es la capacidad de unirse a los microtúbulos [22–25,50,52–55].

Los sitios de fosforilación se encuentran distribuidos a través de toda la proteína. En el cerebro normal, tau tiene entre 2 y 3 moles de fosfato por proteína, los cuales aparentemente son óptimos para la interacción con la tubulina y la promoción del ensamblaje de los microtúbulos[26,53,56]. Sin embargo, la fosforilación de ciertos sitios como Ser214, Thr231, Ser235 y Ser262 de tau interfiere en la asociación de tau y con ello disminuye su interacción la asociación de tau con microtúbulos [57].

Los diferentes estados de fosforilación de tau resultan de la actividad específica de cinasas y fosfatasas de los sitios antes mencionados[24].

1.2.3.2. Cinasas de Tau

Las cinasas pertenecen al grupo de enzimas denominadas "transferasas" ya que transportan un grupo fosfato a partir de moléculas donantes de alta energía, como el ATP o GTP, a sustratos específicos. El núcleo catalítico, donde se produce la reacción de fosforilación, se conserva entre las cinasas [50]

.

La mayoría de las cinasas envueltas en la fosforilación de Tau son parte de las Proteínas Cinasas Dirigidas a Prolinas (PDPK), entre las cuales se encuentra la cinasa del glicógeno sintasa 3 (GSK3), de manera principal y a las cinasas dependientes de ciclinas-5 (cdk-5) también conocidas como tau cinasa I y II; o a las proteínas no dirigidas a prolina, como por ejemplo PKA, MARK cinasas o PKC; y a las Proteínas Cinasas de Tyr (TPK) (Figura 2) [50,58].

La fosforilación por PDPK tienen por objetivo los residuos Ser/ Thr que preceden a un residuo de prolina y por ende tienen lugar principalmente en la región rica en

prolinas, y en la región C-terminal, mientras que las modificaciones por no PDPK ocurren en la región de unión a microtúbulos [50,58].

Aunque dos isoformas de GSK3 α y β están codificadas por genes diferentes, comparten aproximadamente el 85% de homología de secuencia. Aunque los niveles de las isoformas es diferente, GSK3 β es particularmente abundante en cerebro [24,50,59].

GSK3 β es una proteína cinasa multifuncional que actúan sobre los residuos (Ser/Thr) que está implicada en la regulación de la síntesis de glucógeno y tiene la capacidad de fosforilar e inactivar a la glucógeno sintasa [60,61]. Además de estar implicado en el metabolismo de la glucosa, esta regula muchas vías celulares adicionales involucradas en el metabolismo de la energía, apoptosis, el desarrollo de las células neuronales, y formación de los patrones del soma [50,62].

GSK3 β está implicada en la transducción de señales mediada por la insulina, el IGF-1 así como está involucrada en la ruta de señalización wnt/wingless como una enzima clave que regula la estabilidad de la β -catenina y, como consecuencia, su translocación hacia el núcleo y su actividad transcripcional [63]

GSK3 β es la principal cinasa que fosforila a Tau tanto en condiciones normales así como patológicas. La fosforilación en las Ser 9 y la Ser 389 inhiben la actividad de GSK3 β mientras que la fosforilación de la Tyr 216 incrementa su actividad [50,59]. GSK3 β fosforila a Tau en 42 sitios y siendo 29 de ellos encontrados fosforilados en cerebros de pacientes con EA [64].

La sobreexpresión de GSK3 β contribuye a la patogénesis de la EA mediante el decremento en los niveles de la proteína β -catenina nuclear, lo cual resulta en la hiperfosforilación de tau y neurodegeneración en la EA [65]. Además, la sobreexpresión de GSK3 β en líneas celulares causa apoptosis sugiriendo que la fosforilación por GSK puede ser tóxica [50]

Debido al aumento de la actividad de GSK3 β en los cerebros con EA y su implicación en la aceleración de la patología de tau, GSK3 β constituye un objetivo prometedor terapéutica contra taupatías como la EA, ya que la inhibición de la actividad de GSK3 suprime la hiperfosforilación de Tau así como el deterioro de la memoria espacial [50,66].

El balance en la fosforilación-desfosforilación de la proteína Tau determina la estimulación o estabilización de la polimerización de tubulina en células neuronales necesaria para el mantenimiento de la estructura del axón y las dendritas [52].

1.2.3.3. Fosfatasas de Tau

Los estudios de las cinasas que fosforilan a tau, y las proteasas implicadas en la generación de A β son muy importantes, ya que al ser las cinasas posibles objetivos farmacológicos; los inhibidores de las cinasas pueden prevenir o aliviar la patología EA [67,68].

Sin embargo, también se ha reconocido que las proteínas fosfatasas que revierten las acciones de estas proteínas cinasas son igualmente importantes. Al igual que las cinasas, fosfatasas tienen muchos efectos fisiológicos directos, indirectos o fosforilación, y contrarrestan la acción de cinasas y con esto, fungen como moduladores importantes en la actividad celular [24,67,68].

Las fosfatasas de proteínas se clasifican en función de su capacidad para desfosforilar Ser y Thr (PPPs y PPMs) o de residuos de Tyr (proteína Tyr fosfatasa, PTPs o especificidad dual DSPs). La familia de PPP incluye PP1, PP2A, PP2B (también conocida como la calcineurina), PP4, PP5, PP6 y, mientras que la familia PPM incluye diversas formas de PP2C y PPasas mitocondriales El cerebro es una fuente extremadamente rica en fosfatasas [67–69].

La proteína Tau del cerebro y de células de neuroblastoma son rápidamente desfosforiladas por fosfatasa endógenas [24]. Se ha establecido que las fosfatasa de Tau son las PP fosfoseril/fosfotreonil, como la PP1, PP2-A, PP2B y PP2C. Estas fosfatasa están directa e indirectamente asociadas a los microtúbulos [24,70,71].

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) se expresa ampliamente en todo el cuerpo y juega un papel predominante en la desfosforilación de miles de fosfoproteínas diferentes en tejidos de vertebrados [59,68,72].

Conjuntamente, PP2A se expresa en altos niveles en el cerebro, donde actúa sobre diversos sustratos. Esta fosfatasa es responsable de la desfosforilación de muchas proteínas cinasas [72,73].

Fisiológicamente, en los cerebros humanos sin patología neurodegenerativa, el análisis de las actividades de la fosfatasa muestra un predominio de la actividad PP2A ($\approx 71\%$) en comparación con otras fosfatasa como PP2B ($\approx 7\%$), PP5 ($\approx 11\%$) u otras fosfatasa ($\approx 11\%$, PP1 predominantemente) [73]. La disfunción de PP2A conduce a un desequilibrio en varias vías de señalización mediados por cinasas que contribuyen a múltiples patologías [67–74].

PP2A es la principal fosfatasa implicada en la regulación de la fosforilación de Tau. Por un lado, de manera directa la proteína PP2A desfosforila a la proteína en varios sitios con diferente eficiencia (Figura 2). A su vez, PP2A contribuye a la fosforilación de Tau de manera indirecta, al activar a la GSK3 β por la desfosforilación de la Ser9 y permitiendo con ello la fosforilación de Tau [55,74].

Existe evidencia suficiente que indica que las principales modificaciones post-traduccionales que afectan la actividad de PP2A son la fosforilación y la metilación. En el caso de la primera, se reportado que la fosforilación de los residuos de Tyr resulta en la inactivación de la fosfatasa [67–70,72–74].

El sitio de fosforilación de Tyr307 se localiza en el extremo C-terminal de la subunidad catalítica y es un dominio (DYFL) altamente conservado entre todos los PP2As eucariotas. La región C-terminal de la PP2A es la responsable de la regulación biológica de las funciones del PP2A, por lo que la fosforilación de esta Tyr inactiva la enzima impidiendo sus funciones de fosfatasa [67–70,72–74].

1.2.3.4. Estado de Hiperfosforilación de Tau

El balance en la fosforilación-desfosforilación de la proteína Tau regula el crecimiento neurítico, la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica al estabilizar la polimerización de tubulina en células neuronales [51–53].

Cuando se interrumpe el equilibrio de las cinasas y fosfatasas de Tau, se produce una fosforilación sostenida llamada hiperfosforilación. La hiperfosforilación de Tau consiste en la incorporación de 9 a 10 moles de grupos fosfato por proteína en sitios putativos de serina, treonina, y de Tyr, y siendo de tres a cuatro veces mayor que en la proteína normal [26,53,57,74].

Diversos estudios sugieren que la desregulación en la actividad de GSK3 β contribuye a la hiperfosforilación de tau por la disminución de los niveles de β -catenina nuclear [64–66,75–79]. En el caso de ratones transgénicos para GSK3 se presentó atrofia hipocampal con incremento en la hiperfosforilación de Tau [80]

La sobreactivación de GSK3 β y CDK5 promueve la formación de marañas neurofibrilares (NFTs) en cerebros con EA por la hiperfosforilación de Tau [65,81–83]. Estudios han reportado que la proteína β -amiloide (A β), principal constituyente de las placas seniles en la EA; es capaz de activar a GSK3 β y CDK5 [65,66,77].

La proteína Tau hiperfosforilada con la cinasa GSK3- β tiene afinidad con los sitios de fosforilación detectados por los anticuerpos para AT8 (Ser202/Thr205), TG3

(Thr231/Ser235) y PHF-1 (Ser396/Ser404), mismos epítomos que son característicos de la EA y otras enfermedades [26].

Como se mencionó anteriormente, otro factor importante para la hiperfosforilación de Tau es la desregulación en la actividad de las fosfatasas. En el caso de PP2A y PP1A, la disminución en la actividad de las fosfatasas contribuye a la hiperfosforilación de tau y a la generación de déficit cognitivo. [71,84]

Se ha observado que las alteraciones generales en la fosforilación de tau inducida por la inhibición de PP2A son el resultado de los efectos combinados en la reducción desfosforilación de tau debido a la inhibición directa de PP2A y por la reducción en la fosforilación por GSK3 β debido a su inhibición [85].

Por lo tanto, cuando existe la desregulación de cinasas y fosfatasas se produce el efecto de hiperfosforilación. Diversos estudios han descrito por lo menos 30 sitios específicos de fosforilación anormal, los cuales son principalmente Ser o Thr, y el 50% de ellos son sitios canónicos (Ser/Pro, Thr/Pro) para cinasas dependientes de prolina. La mayoría de estos sitios de fosforilación se encuentran en la región C-terminal y principalmente en el dominio de unión a microtúbulos. La otra mitad de los sitios son fosforilados por cinasas no-dependientes de prolina. Por otro lado, se ha observado que 16 sitios de fosforilación se encuentran tanto en cerebros con EA como en cerebros normales [49,50,57].

Existe cierta controversia sobre la hiperfosforilación de Tau ya que ha sido asociada tanto a un mecanismo patológico al igual que a un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo [86].

Por años se ha indicado que la hiperfosforilación anormal de Tau perturba su estructura y función aumentando la resistencia a la proteólisis [26] Un ejemplo de esto se observa en la EA, en donde los niveles de tau son 7-10 veces más elevados que los encontrados en el cerebro normal, sin estar los niveles de mARN aumentados en comparación de cerebros normales. Esto sugiere que el

incremento en los niveles de proteína se debe a la hiperfosforilación de tau, su agregación y su resistencia a ser degradada [57].

La proteína Tau hiperfosforilada induce pérdida de su actividad biológica al encontrarse disociada de la β -tubulina con la consecuente desestabilización de los microtúbulos del axón y desestabilización del citoesqueleto así como incrementando su toxicidad al poder asociarse la forma hiperfosforilada con la fosforilada y los cambios conformacionales provocados por esta asociación [75,81,82,87–91].

Existen dos estados conformacionales diferente inducidos por la fosforilación. En el primero, tau hiperfosforilada adquiere la máxima capacidad de unir tau normal y otras MAPS; cuando incorpora alrededor de 4 moles de fosfato por mol de proteína sobre las posiciones 199, 202, 205, 212, 235, 262 y 404 [57,87–91].

En el segundo, en el cual tau es capaz de autoensamblarse y acumularse en filamentos helicales pareados (PHFs) en las neuronas con la incorporación de aproximadamente 10 moles de fosfato por mol de proteína e involucra la fosforilación en las posiciones 202, 231, 396, 404 y 422 [57,87–91]. De manera interesante, GSK-3 β puede fosforilar en las posiciones Thr 231, Ser 396 y la Ser 404 [92].

La proteína Tau normal tiene dominios inhibitorios básicos por los cuales se impide la interacción tau-tau. La fosforilación de tau en la Ser-396 y/o 404 permite la abertura de estos dominios produciéndose la interacción tau-tau a través de las repeticiones. Debido a la interacción tau-tau, los PHFs disminuyen la interacción de Tau con los microtúbulos, promueve el desensamblaje, y altera el transporte axonal [56].

Bramblett y colaboradores (1993) demostraron que la fosforilación anormal de tau en la EA implicaba a la Ser396, y sugirieron que esto se debía a la activación inapropiada de cinasas fetales o la reducción de la actividad de las fosfatasa de

proteína tau. Además, especularon que la fosforilación de la Ser396 desestabilizaba los microtúbulos debido a la proximidad de la Ser396 a la región de unión a los microtúbulos Sin embargo, la fosforilación reversible de la Ser396 y el número de repeticiones de regiones de unión a microtúbulos juegan un papel importante en la modulación de la unión de tau a microtúbulos [93].

Otros estudios han correlacionado fuertemente a la fosforilación de la Ser396 con la estabilidad general de Tau, aún más si existe alguna mutación ya que incrementa la velocidad de fosforilación y de polimerización en filamentos [94–96]. Asimismo, se ha reportado que el estrés oxidativo mitocondrial por la deficiencia de SOD2 exacerba la carga amiloide e incrementa los niveles de fosforilación en la Ser396 de Tau [96].

Mondragón-Rodríguez y colaboradores (2014) han repostado que la fosforilación de las Ser396-404 son unos de las primeras alteraciones observadas en la EA y en el Síndrome de Down. También indicaron que alrededor del 50% de las estructuras que contienen la fosforilación en los sitios Ser396-404 se encuentra ya en forma de agregados fosforilados de tau con un soma neuronal bien conservado. Al mismo tiempo, se observó que la fosforilación de la Ser396 coexiste con eventos de truncamiento tempranos y tardíos [97].

Los PHFs se agregan en polímeros fibrilares de tau anormalmente fosforilada intraneuronalmente formando las NFTs; los cuales se convierten en enredos fantasmas extracelulares que se mantienen presentes después de la muerte de la neurona [87–91]. Los NFTs han sido asociados directamente con la gravedad de la demencia en la EA, debido a su efecto y formación en el citoplasma matan a las neuronas de áreas específicas del cerebro incluyendo la formación del hipocampo, la amígdala y la neocorteza [87–91].

La formación de las NFTs característica morfológica en varias demencias y enfermedades neurodegenerativas conocidas como Taupatías [52]. Algunos ejemplos de estas patologías son la EA, Enfermedad de Pick y otras demencias como la Demencia Frontotemporal ligada al cromosoma 17 (DFT-17), la demencia

frontotemporal con amiotrofia y la demencia pugilística. También han sido descritas NFTs en pacientes con síndrome de Down, en pacientes con la EP; así como en los pacientes que padecen la Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP) y en Degeneración Cortico-Basal-Gangliónica (DCBG) [24,57].

En la EA, se ha reportado que las seis isoformas de Tau están presentes en los PHFs, que forman los NFTs. Los microtúbulos son requeridos para el transporte axoplásmico, y en las neuronas de enredo que devengan de los pacientes con EA, el sistema de microtúbulos son destruidos y reemplazados por los FHA [83].

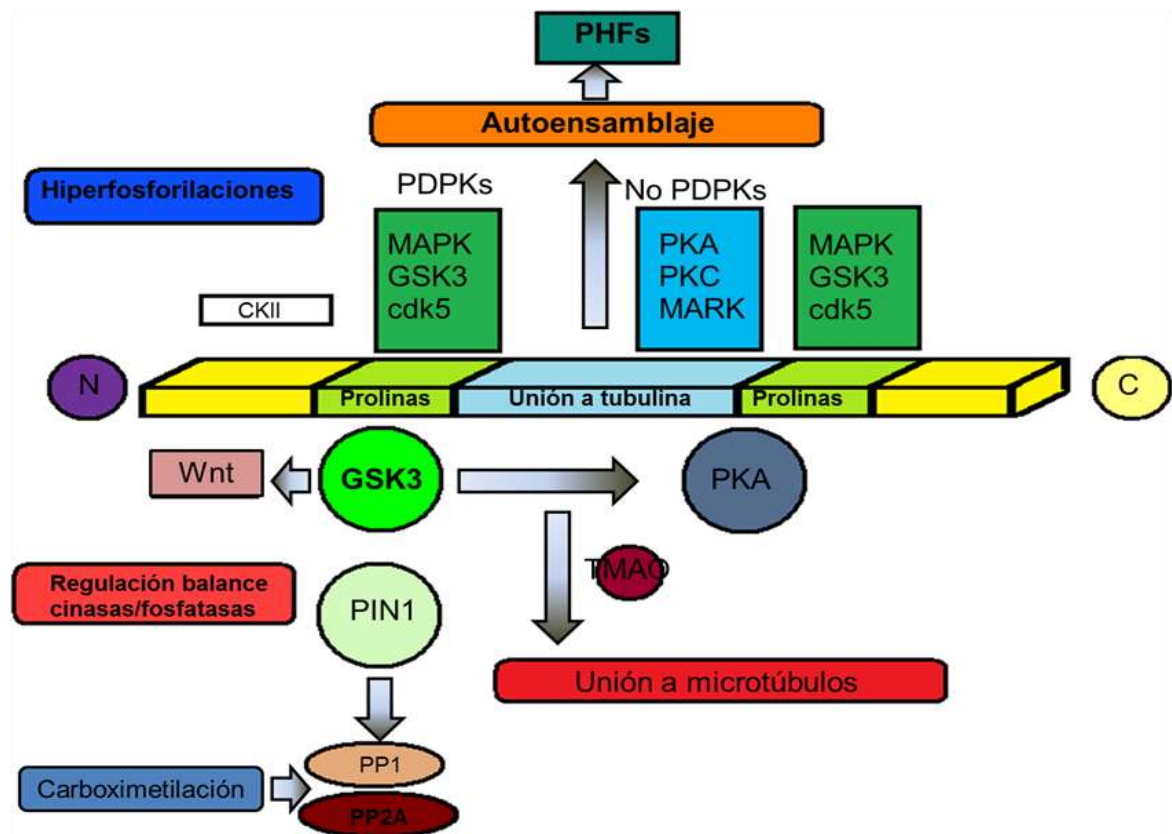


Figura 2. Modificaciones de la proteína Tau por cinasas y fosfatasa, así como su posible relación con la correcta unión de Tau a microtúbulos o la formación de agregados en forma de PHF.

1.3. Tau y las Especies Reactivas del Oxígeno

Los efectos de las especies de oxígeno sobre la fosforilación de la proteína Tau parecen ser dependientes de la dosis y tiempos de exposición [98–108]. En concentraciones bajas de H_2O_2 ($<0.1mM$) [98], condiciones agudas [104–106], así como por concentraciones bajas de Mercurio (Hg) ($<200\text{ nM}$) [107,108] inducen la desfosforilación transitoria de Tau mediante diversos mecanismos indirectos como son la activación de Cdk5 que, a su vez conduce al incremento en la actividad de la proteína fosfatasa 1(PP1) [98].

En estudios realizados en estados de EO crónico [109,110], así como con productos como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) [111] y la acroleína [112,113], se ha observado que inducen la hiperfosforilación de Tau en diferentes epítomos (PHF-1, TG3 y MC1) relacionados con las NFTs.

Además, se reportó que en estudios realizados en células que sobreexpresan el transgen inducible por estrés RCAN1, la inducción de EO produjo incremento en la expresión del gen RCA1, así como de su misma proteína, conduciendo a la inhibición de PP2B así como a la sobreexpresión de GSK-3 β y con ello el incremento de la fosforilación de Tau [102,103].

Además de estos complejos efectos del H_2O_2 sobre la fosforilación, también se ha reportado que, mientras el EO moderado incrementa la susceptibilidad proteolítica de las proteínas intracelulares, el estrés oxidativo crónico promueve la agregación de proteínas, dando como resultado disminución en la proteólisis [114–116].

1.4. Terapia de Reemplazo Hormonal

La menopausia se define como el último periodo menstrual y se confirma después que una mujer ha perdido sus períodos de 12 meses consecutivos y tiene correlaciones fisiológicas como son bochornos, palpitaciones, resequedad vaginal, cambios emocionales, etc. Estos efectos fisiológicos se deben a la pérdida de la secreción de estrógenos por el cese de la función ovárica [117,118].

El objetivo de la Terapia Hormonal (TH) es tratar de disminuir los síntomas vasomotores asociados a la menopausia a cualquier edad, siendo los beneficios superiores a los riesgos en mujeres sintomáticas de menos de 60 años de edad o hasta 10 años después de la menopausia [117,118].

Los sofocos son la queja más común de las mujeres perimenopáusicas y menopáusicas, que afecta del 75-85% de las mujeres. Los sofocos nocturnos son el tipo más común y resultan en alteraciones del sueño, fatiga y depresión. Los sofocos, sudoración, cambios en el humor y la libido, fatiga y depresión tienen importantes implicaciones en la calidad de vida para las mujeres menopáusicas. Estos efectos están relacionados con la disminución de los niveles plasmáticos de estrógenos en mujeres perimenopáusicas y postmenopáusicas [117–119].

La Terapia Estrogénica (TE) funciona al reemplazar el estrógeno que el cuerpo ya no sintetiza. El estrógeno reduce la sensación de calor en la parte superior del cuerpo y los bochornos (sofocamiento por calor), es eficaz en los síntomas de atrofia vulvar y vaginal, así como dificultad para orinar [117,118].

El estradiol (E_2) es la principal hormona entre los estrógenos. Aunque el E_2 ha sido considerado una hormona reproductiva, tiene efectos más allá de los órganos reproductivos en una variedad de órganos diana no reproductivos. Estos órganos son el hueso, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso [117,118].

1.4.1. Efectos Neuroprotectores de las Hormonas Esteroides

El papel neuroprotector de las hormonas está bien establecido. Uno de los datos que mejor apoyan esta afirmación es la existencia de diferencias sexuales en la recuperación de daños del tejido nervioso debido a traumatismos o accidentes cerebrovasculares. Estas diferencias se atribuyeron, en un principio, a diferencias de género en la conectividad y tamaño de los centros nerviosos [120,121]; sin embargo, parece ser más determinante la presencia de esteroides como el E₂ o la P₄ en el sitio y en el momento del daño cerebral [120].

Se ha reportado que la P₄ tienen la capacidad de promover el crecimiento axonal y participar en la plasticidad neuronal, así como también que puede regular la expresión y la activación de Tau en diversas regiones cerebrales [120–122].

Por otro lado, el E₂ y el 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 (RE) y del receptor de IGF-I (IGF-IR) en el cerebro, es por medio de regulación cruzada con la proteína p-85 así como con la activación del receptor en sí [123].

De particular interés son los datos que hacen referencia a las enfermedades neurodegenerativas, ya que varios estudios han descrito que la TE disminuye el riesgo de padecerlas [124–126] pero incrementa el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer [118].

1.4.2. Efectos Secundarios de las Terapia de Reemplazo Hormonal

Desde hace mucho tiempo, la TE ha sido reconocida como un tratamiento efectivo para aliviar los síntomas de la menopausia. Lamentablemente, se ha reportado que la TE aumenta la incidencia de cáncer de endometrio al ser este tejido muy

sensible a los estrógenos. Estos efectos no deseados de la TE se han visto disminuidos con el uso de la Terapia Combinada Estrogénica-Progestacional (TCEP) [118].

La TCEP, consiste en una combinación de un estrógeno y un progestágeno, que se administran en una forma continua o secuencial. El progestágeno se añade para reprimir la acción proliferativa sobre el endometrio y el útero, siendo obligatoria la presencia del progestágeno en presencia de útero. Desafortunadamente, el aumento del riesgo de cáncer de mama se asocia principalmente al añadir un progestágeno al tratamiento con estrógenos y se relaciona con el tiempo de uso [118].

Debido a esto, la industria farmacéutica se ha dado a la tarea de sintetizar fármacos con los efectos benéficos de los estrógenos pero sin los efectos adversos producidos en los órganos sexuales.

1.5. Tibolona

La Tibolona (TIB) (**Figura 3.**) es un fármaco usado como tratamiento completo de primera elección para el alivio de los síntomas climatéricos y la prevención de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas [127].

Este fármaco fue sintetizado por primera vez y sus propiedades probadas a finales de los 1960s y principios de los 1970s. Varias pruebas biológicas revelaron que posee propiedades estrogénicas, progestagénicas y androgénicas basado en su estructura. 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 [127].

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 colaboradores (1996) demostraron el efecto positivo en los huesos pero, adicionalmente, parecía que, si bien la TIB 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 [127].

A la fecha, la TIB está registrada en 90 países para aliviar los síntomas del climaterio y en 45 para la prevención de la osteoporosis [128].

1.5.1. Propiedades químicas

La TIB (3) [(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 (**Figura 3.**) que tiene una ligera afinidad a los RE, a los receptores de andrógenos (RA) y a los receptores a P₄ (RP), y por ello presenta triple actividad hormonal [129].

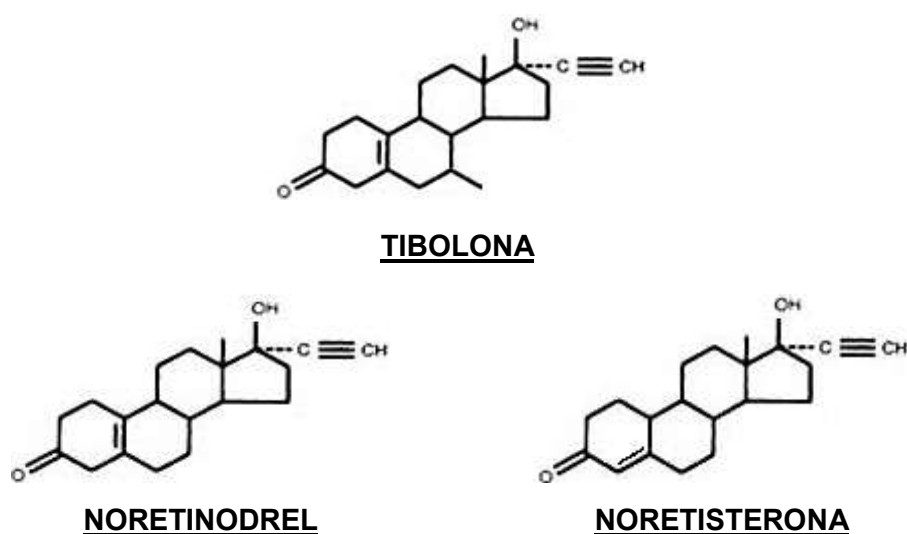


Figura 3. Estructura química de la Tibolona, Noretinodrel y la Noretisterona

Estructuralmente es diferente a los moduladores selectivos del receptor a estrógenos, (SERMs) con una configuración 3-ceto- Δ^5 -10 con 2 sustituyentes, un grupo α -metilo en la posición 7, así como un 17α -etilo [127].

El metabolismo de la TIB se realiza rápidamente originándose 3α - (3α -OH Tibo) y 3β hidrox-TIB (3β -OH Tibo) en las formas sulfatadas e inactivas; a partir de ellas o directamente de la TIB se produce un tercer compuesto que es el Δ^4 isómero [129]. Los isómeros α y β tienen una gran afinidad por los RE mientras que el Δ^4 sólo tiene afinidad por el RA y RP (**Figura 4.**).

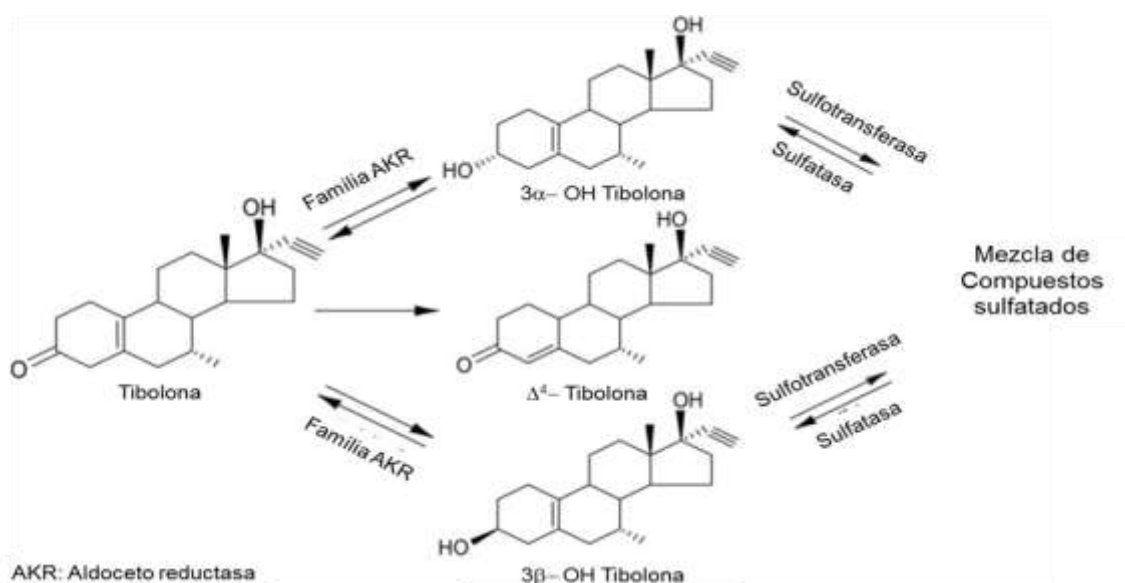


Figura 4. Estructura de los metabolitos de la TIB

La **Tabla 1.** nos muestra la unión con los RE y RP tanto de la TIB así como de los metabolitos.

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

Tabla 1. Afinidad relativa para el RE y RP para TIB y sus metabolitos. Adaptado de [130], Org 2058 [(16 α -etil-21-hidroxi-19-nor-pregn-4 ene-3,20-diona)- 6,7-3H]]

El efecto biológico de la TIB se determina directamente por la característica y capacidad química de cada tejido así como el contenido de receptores tanto para estrógenos como para andrógenos y P₄. Es decir los SERMs regulan la actividad de los RE, en cambio la acción de la TIB se modula específicamente en los tejidos [129].

1.5.2. Indicaciones terapéuticas

En un principio fue usado para la prevención de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas con alto riesgo de fracturas pero después se demostró que tenía efectos benéficos sobre los síntomas de deficiencia estrogénica en mujeres posmenopáusicas, después de más de un año de la menopausia [127].

1.5.3. Mecanismo de acción

La TIB tiene efectos estrogénicos, progestagénicos y androgénicos, así como reduce a nivel central los niveles de las hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) [131].

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 pues 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 TIB es una molécula de acción tejido específica [127]

Consecuentemente, el efecto de la TIB está determinado por el tipo de tejido y los metabolitos que se forman, la 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 [132].

La TIB tiene un efecto similar a los estrógenos sobre 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 [131].

En el caso de la mama, se reportó que la TIB aumentó la expresión de los receptores de P_4 A (PRA) y B (PRB), sin afectar $ER\alpha$ y de expresión $ER\beta$ en los senos de macacos. Estos resultados indican que los efectos de la TIB en el tejido mamario puede ser mediada a través de la regulación diferencial de las isoformas del PRA y PRB y con ello distintas de las observadas con la TRH convencional [132].

Se tenía evidencia de que la TIB aumenta la densidad ósea [133,134], pero se tenía duda si reducía el riesgo de fracturas atribuibles a osteoporosis. Gallagher comunicó el efecto de varias dosis de TIB vs placebo en la densidad ósea de columna lumbar y cuello femoral en 656 mujeres seguidas por dos años. Gallagher reportó que el uso de TIB 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 TIB 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 [135].

Por otro lado, en un estudio aleatorio de 4.538 mujeres, que estaban entre las edades de 60 y 85 años, la TIB 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 [128].

Por último, la TIB tiene efectos sobre algunos parámetros metabólicos y hematológicos, tales como una disminución plasmática del colesterol en lipoproteínas de alta densidad, de triglicéridos, de lipoproteína (A) y un aumento de la actividad fibrinolítica de la sangre. La implicación clínica del efecto de la TIB 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 se desconocen [136].

1.5.4. Absorción, biotransformación y excreción

Después de la administración oral, la TIB es rápida y absorbida ampliamente. Debido a su rápido metabolismo en el intestino los niveles plasmáticos de TIB son muy bajos [137].

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 TIB y el Δ^4 isómero sólo están presentes durante las primeras 6 horas tras la ingesta oral [137].

En mujeres posmenopáusicas se reportó que el 98% de los metabolitos con actividad estrógena se encuentran en forma disulfurada en suero y tejidos. De los metabolitos conjugados, el 3 α -hidroxi-TIB predomina en el suero, mientras que

el Δ^4 TIB 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 [137].

La excreción de TIB se produce principalmente en la forma de metabolitos polares y muy 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 [137].

En resumen, la TIB es un esteroide estructuralmente diferente al E_2 y a los moduladores selectivos del receptor a estrógenos, (SERMs por las siglas en inglés) con una configuración 3-ceto- Δ^5 -10 con dos sustituyentes, un grupo α metilo en la posición 7, así como un 17- α etilo. Este esteroide tiene diferente actividad según el tejido blanco. Se sabe que sus metabolitos tienen diferente efecto, la 3α - y 3β -hidroxi-TIB tienen efecto estrogénico y el Δ^4 isómero tiene actividad como progestágeno/andrógeno [138].

Debido a que la TIB tiene un efecto selectivo tanto en la activación del receptor así como de las enzimas que la metabolizan es considerado como regulador de la actividad estrogénica tejido-selectivo (por sus siglas en inglés STEAR) [139].

1.5.5. Efectos de la Tibolona en el Sistema Nervioso Central.

1.5.5.1. Efecto de la Tibolona en el déficit cognitivo

Uno de los aspectos que se ve afectado durante la menopausia es la memoria. En este aspecto las mujeres postmenopáusicas que fueron tratadas con estradiol mejoran la recolección de información, la memoria, así como otros aspectos de las funciones cognitivas, incluyendo el deterioro cognitivo. Esto se correlaciona directamente con la presencia en plasma del E_2 biodisponible [140]. En los últimos años, se han realizado diversos estudios sobre los efectos de la TIB sobre la memoria y la cognición [141–148].

A pesar de que los aspectos cognitivos y la neuroprotección no han sido completamente aclarados, los estudios en animales y humanos sugieren que la TIB podría ser útil contra ciertos tipos de daño neuronal. Entre los factores inductores de daño que han sido estudiados son la menopausia [141–143]; administración de fármacos [144], la ovariectomía (OVX) [145–147], y el envejecimiento [148]. Por otro lado, la TIB ha sido propuesta como un modulador endocrino [141] y de neurotransmisores [147].

En el estudio piloto previamente mencionado de Albertazzi y colaboradores (2000) [143], reportaron que las mujeres postmenopáusicas tratadas durante 6 meses con 2.5 mg de TIB tuvieron una mejora en la memoria semántica a largo plazo similar a la de las mujeres que reciben TCEP con Kliogest® [143]. Esto puede deberse a que la TIB disminuye la GFES y con esto podría incrementar la biodisponibilidad de E₂ y de T [149].

Un estudio sobre los efectos cognitivos en mujeres después de 10 años de tratamiento con diferentes TRH, y después de ser sometidas a una prueba de estrés leve, demostró que las mujeres que no recibieron TIB presentaron mayores síntomas de ansiedad en comparación con las que sí recibieron tratamiento [142]. En el mismo estudio, las mujeres que recibieron TIB tuvieron 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). Por último, se reportó que el grupo de TIB tuvo peores resultados en una tarea de atención sostenida y una tarea de planificación, tareas que están asociadas con la función del lóbulo frontal [142].

En otro estudio, se ha reportado que en mujeres premenopáusicas, la administración de TIB revierte el daño sobre la cognición que es causado por el acetato de leuprolide, y mejora el humor y la calidad de vida de los pacientes que reciben agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para el tratamiento de los síntomas de los leiomiomas uterinos [144].

También se ha estudiado el efecto a largo plazo del uso de la TIB en diferentes modelos animales. En ratas OVX jóvenes, adultas y viejas, la TIB mejoró la memoria en la prueba de evitación pasiva Step-down [146]. Aunque en este mismo estudio en ratas con OVX simulada (Sham) y tratadas con una dosis de 0.5 mg/kg de TIB, así como las ratas jóvenes OVX tratadas con la misma dosis de TIB tuvieron un peor desempeño comparados con los otros grupos en el laberinto de agua [141]. En un modelo de menopausia simulada (OVX por 18 semanas), altas dosis de TIB (1 y 10 mg / kg) mejoraron su aprendizaje, al incrementar las latencias en laberinto en forma de T en comparación con el vehículo [147].

1.5.5.2. Plasticidad Neuronal y Neurotransmisión

Como se ha hecho mención en la presente revisión, los tratamientos a largo plazo con TIB han tenido buenos resultados en cuanto al tratamiento del climaterio, en el mantenimiento de ciertos aspectos psicológicos así como cognoscitivos. En los efectos neuroprotectores de la TIB se ha observado que la TIB es capaz de disminuir el estrés oxidativo en diferentes modelos animales [148]. En la corteza y el hipocampo de ratas OVX jóvenes, adultas y viejas tratadas con dosis de 0.5 y 1 mg/kg de peso de TIB, se observó una disminución en los niveles de lípidos peroxidados y produjo un incremento en la capacidad antioxidante total comparándolos contra animales Sham [148].

En un estudio realizado en neuronas hipotalámicas de cobayo, la administración de TIB atenuó rápidamente la respuesta de los receptores GABA_B agonista para baclofeno [150]. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, Espinosa-Raya y colaboradores (2012) reportaron un incremento en el aprendizaje animales con tratamientos crónicos con altas dosis de TIB (1 y 10 mg / kg) en un modelo de menopausia; siendo estos resultados correlacionados con una disminución en el contenido de acetilcolintranseferasa (ChAT) a dosis crecientes de TIB, mientras que el contenido de la triptófano hidroxilasa (TPH) aumentó [147].

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gibbs y colaboradores (2002) quienes reportaron reducciones significativas tanto en la ChAT y acetilcolinesterasa (AChE) en el septo medial / banda diagonal de Broca, siendo este efecto dosis-dependiente en macacos OVX tratados por dos años con TIB [145]. Esto nos indica que la mejora en los efectos de los procesos cognoscitivos de la TIB, probablemente no sean debido a un efecto sobre la ChAT y AChE.

En estudios previos realizados en el laboratorio, se reportó que tratamientos crónica con 0.5 mg/kg de TIB durante 60 días a ratas adultas ovariectomizadas (OVX), disminuyeron el contenido de proteína de Tau hiperfosforilada, incrementó el contenido de la proteína en su forma desfosforilada en el hipocampo y el cerebelo. Estos resultados se correlacionaron con el incremento en el contenido de las formas fosforiladas de GSK3 β , Akt y PI3K en el hipocampo. Estos resultados nos indican que la TIB puede regular el estado de fosforilación de Tau a través de esta vía de señalización; y con ello podría ayudar a evitar los efectos observados en Taupatías como son el Alzheimer y otras demencias [151].

En el 2012, en un estudio se reportó mayor intensidad en la tinción por inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y c-Fos en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas hembra tratadas con TIB que en los animales control. Al ser la función principal de la GFAP el proteger la organización interna de los astrocitos y el incremento en la expresión de c-Fos un marcador de actividad neuronal, esto nos indica efectos benéficos de la TIB en estos dos aspectos [152].

1.6. 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 [153].

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 [153].

La región hipocampal se subdivide en dos partes [154–156] la formación hipocampal, consistente en el hipocampo propiamente: el Cuerno de Amón, 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 [156].

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 (75), 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 [154]. Un análisis morfológico más detallado permitió a Lorente de Nó, 1934 subdividir el hipocampo en cuatro campos: CA1, CA2, CA3 y CA4 (**Figura 5.**). 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 [155].

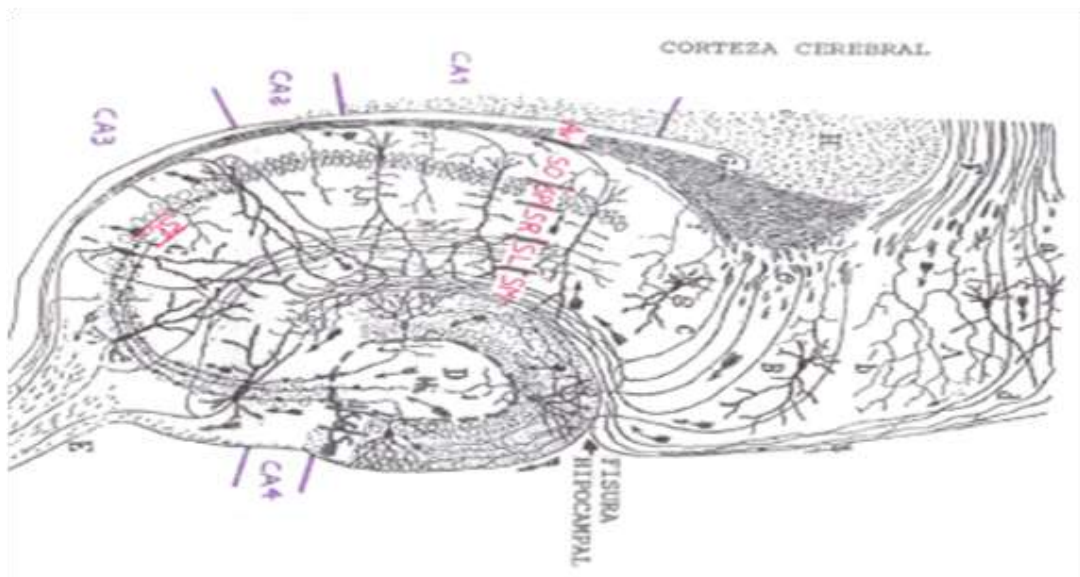


Figura 5. Esquema de la estructura del hipocampo. CA: Cuerno de Amón.

1.7. Modelo de Estrés Oxidativo Producido por la Exposición Crónica a Ozono

1.7.1. Ozono

El ozono (O_3) es una ERO cuya molécula está compuesta por tres átomos de oxígeno, formada al disociarse los 2 átomos que componen el gas de oxígeno. Cada átomo de oxígeno liberado se une a otra molécula de O_2 , formando moléculas de O_3 . A temperatura y presión ambientales el ozono es un gas de olor acre y generalmente incoloro, pero en grandes concentraciones puede volverse ligeramente azulado.

El O_3 se descompone rápidamente en presencia de O_2 a temperaturas mayores de $100^\circ C$, en condiciones normales, puede demorar varias horas en reconvertirse nuevamente en O_2 . Si se respira en grandes cantidades, puede provocar daño a diferentes órganos y sistemas induciendo un aumento del EO celular, una irritación en los ojos y/o garganta, la cual suele pasar luego de respirar aire fresco por algunos minutos [157].

1.7.2. Daño inducido por el ozono a diferente órganos y sistemas

En los últimos años se ha reportado que la inhalación del O_3 (incluso en dosis bajas) puede aumentar los RLs en el organismo. El EO producido por el O_3 se ha relacionado con la toxicidad inmediata en el sistema respiratorio produciendo lipoperoxidación en el tejido pulmonar; también se ha observado lipoperoxidación en otros tejidos como el corazón [158,159].

Por otro lado, también se ha observado daño en la difusión de la barrera hematoencefálica, inflamación neuronal, bloqueo de procesos de neurogénesis, cambios estructurales y muerte neuronal en el SNC de ratas expuestas durante varios días a este gas [159].

1.7.3. Estrés oxidativo producido por la exposición crónica a ozono en el SNC.

El SNC es vulnerable al estado de estrés oxidativo por la exposición al O₃. Esto se debe a que las membranas de las neuronas están constituidas por un gran contenido de ácidos grasos poliinsaturados y poseen un mecanismo antioxidante pobre en comparación con otros órganos como son hígado, riñones y pulmones [160].

El daño en el SNC producido por el ozono puede ser reversible o irreversible dependiendo del tiempo de exposición así como de la concentración de la exposición. Rivas-Arancibia y colaboradores (2000) reportaron que el EO inducido por la exposición crónica a 0.25 p.p.m. de O₃, produce lipoperoxidación de la membrana celular, oxidación de proteínas, inactivación enzimática, destrucción del DNA, apoptosis celular [161]. También reportaron en el mismo modelo daño en diferentes tipos de conducta como déficit cognitivo de corto así como de largo plazo [20], la disminución de la percepción olfativa y la memoria olfativa de reconocimiento social [162], y disminución en la actividad motora [20].

Otros reportes indican que la exposición crónica a ozono disminuye los niveles de neurotransmisores como la serotonina [162] y de dopamina [163]; incrementa la activación de procesos inflamatorios cerebrales y genera la acumulación de la proteína β -amiloide 1-42 en el hipocampo y la corteza cerebral [164].

En trabajos previos, se ha reportado que la administración de varios compuestos exógenos, tales como la taurina [161], la vitamina E [165], y el E₂ [23], tienen efectos antioxidantes y pueden disminuir la peroxidación lipídica inducida por la exposición al O₃. En el caso del E₂, también disminuye la muerte neuronal, el déficit cognitivo y el deterioro de la memoria de reconocimiento social causado por la exposición al O₃ en ratas adultas [166,167]. Estos efectos del E₂ probablemente se deban a la actividad antioxidante a través de su capacidad inherente para secuestrar EROs y poder inhibir la lipoperoxidación [168,169].

Desafortunadamente, se ha observado que la administración crónica de E₂, solo y en combinación con progestinas usadas como terapia hormonal, tiene efectos secundarios como cáncer de mama y de endometrio, así como sobre eventos cardiovasculares [117,118].

La TRH con TIB ha demostrado tener efectos antioxidantes así como neuroprotectores en diferentes modelos de daño neuronal. Sin embargo, se desconoce el efecto de la administración crónica de la TIB sobre el estrés oxidativo, el déficit cognitivo y las alteraciones motoras, la muerte neuronal y fosforilación patológica de Tau en el modelo de estrés oxidativo en ratas expuestas al O₃. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la administración crónica de TIB sobre la lipoperoxidación, el déficit cognitivo, las alteraciones motoras y la muerte neuronal en un modelo de estrés oxidativo no invasivo, utilizando animales expuestos crónicamente a dosis bajas de O₃ similares a un día de alta contaminación en Ciudad de México.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés oxidativo tiene un papel crucial en las enfermedades neurodegenerativas como son la EA [15], EP [16], esclerosis múltiple [17], y otros procesos relacionados con el envejecimiento patológico [18]

Se ha descrito que la terapia sustitutiva con estrógenos disminuye el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas aunque aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama y cérvico-uterino. La TIB se ha administrado desde hace varios años para el tratamiento de los síntomas del climaterio así como para prevenir la osteoporosis en mujeres post-menopáusicas.

A pesar que el efecto de la TIB sobre los aspectos cognitivos y la neuroprotección no han sido completamente aclarados, los estudios en animales y humanos sugieren que la TIB podría tener un efecto neuroprotector [132–137], aunque se necesitan aún más estudios en modelos específicos para poder afirmar

Debido a que el estrés crónico, el déficit de memoria, y los cambios de fosforilación de proteínas como Tau son fundamentales en el desarrollo de varias enfermedades neurodegenerativas es necesario estudiar el efecto de la TIB sobre ellos.

Para lograr esta meta utilizaremos un modelo animal de estrés oxidativo inducido por la exposición crónica a ozono. Estos animales exhiben deterioro en la memoria de corto y de largo plazo, aumento en la activación de procesos inflamatorios cerebrales. Sin embargo, no se han realizado los estudios de efecto del ozono en la hiperfosforilación de la Tau con la consecuente formación de NFTs. Este análisis permitirá comprender los mecanismos moleculares del proceso neurodegenerativo en este modelo, así como desarrollar terapias alternativas a las actuales para combatir los síntomas de algunas enfermedades neurodegenerativas.

3. HIPÓTESIS

La administración crónica de TIB disminuirá el estrés oxidativo y el déficit cognitivo, así como regulará la fosforilación de Tau a través de las proteínas GSK3b, Akt y las fosfatasas PTEN y PP2A en el modelo de daño neuronal inducido por la exposición crónica a ozono.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estudiar el efecto de la administración crónica de TIB sobre el estrés oxidativo y el déficit cognitivo, así como sobre la regulación de la fosforilación de Tau a través de las proteínas GSK3b, Akt y las fosfatasas PTEN y PP2A en el modelo de daño neuronal inducido por la exposición crónica a ozono.

4.2. Objetivos Específicos

- A. Determinar el efecto de 1mg/kg/día de TIB sobre el estrés oxidativo crónico en el hipocampo de las ratas expuestas a O₃ mediante el análisis de marcadores de estrés oxidativo (oxidación de lípidos y proteínas) por Western Blot.
- B. Determinar el efecto de 1mg/kg/día de TIB sobre la muerte neuronal provocada por el estrés oxidativo crónico en el hipocampo de las ratas expuestas a O₃ por medio del análisis histológico con la tinción de Nissl.
- C. Evaluar el efecto de 1mg/kg/día de TIB sobre el déficit cognitivo y la actividad motora provocado por la exposición crónica a O₃.
- D. Determinar el efecto de 1mg/kg/día de TIB sobre el incremento en la fosforilación de la proteína Tau en la ser 396 y sobre las proteínas GSK3β, Akt, PTEN y PP2A en el hipocampo de la rata inducido por exposición crónica a ozono.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Se utilizaron 100 ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal de 250-300 g, que se colocaron en cajas de acrílico (cinco animales por caja) con libre acceso a agua y comida (Purina, Minnetonka, MN) y mantenidas en un cuarto con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (inicio del ciclo de luz a las 8:00 h). Los animales fueron tratados de acuerdo con las directrices y requerimientos de la Declaración de Helsinki por la Asamblea Médica Mundial y por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2. Tratamientos

Los animales fueron divididos al azar en 10 grupos experimentales, con 10 animales por grupo. En el primer grupo (C), los animales fueron expuestos a una corriente de aire libre de O₃ durante 60 días; en el segundo grupo (C+TIB) los animales fueron expuestos a una corriente libre de O₃ y recibieron 1 mg/kg de TIB (Livial ® Organon, México) durante 60 días. Los grupos 3, 4, 5 y 6 fueron expuestos a O₃ durante 7, 15, 60 y 60 días respectivamente. Los grupos 7, 8, 9 y 10 recibieron 1 mg/kg de TIB por vía oral durante 7, 15, 30 y 60 días (O₃+TIB) respectivamente y fueron expuestos a O₃ durante esos mismos períodos. Se eligieron estas dosis y estos períodos debido a que en estudios previos se ha comunicado que la TIB ejerce efectos sobre los procesos cognitivos durante los dos primeros meses de tratamiento con dosis de 0,5 y 1 mg/kg [146,147].

5.3. Exposición al O₃

Los animales fueron expuestos a 0,25 ppm de O₃ durante cuatro horas al día, dentro de una cámara con un difusor conectado a un generador de O₃ (5 L/s). El procedimiento utilizado se ha descrito previamente [1,17,21,24].

5.4. Exposición al Aire

Se utilizó la misma cámara en el tratamiento del grupo control en el que se usó el flujo de aire puro libre de O₃.

5.5. Prueba de Actividad Motora.

Inmediatamente después de la última exposición a O₃ o al aire, los animales fueron devueltos a sus jaulas. Dos horas más tarde, se analizó la actividad motora de cada animal de cada grupo. La prueba de campo abierto es una evaluación comprensiva mediante la cual múltiples conductas del repertorio natural de las ratas son observadas simultáneamente en una caja o arena novedosa para el animal.

Se colocó a la rata durante 5 minutos dentro de una caja de acrílico donde se filmó la conducta de exploración, congelamiento así como el acicalamiento del animal y con ayuda del Programa OACIF (Omniaiva, México) se determinó el tiempo de cada una de ellas. Concluidas las pruebas de conducta se sacrificaron a los animales para llevar acabo los estudios de Western blot [170].

5.6. Prueba de Evitación Pasiva

El entrenamiento y la Prueba de Evitación Pasiva (PEP) fué realizada en una cámara con dos compartimentos del mismo tamaño (30 × 30 × 30 cm), uno denominado compartimento de seguridad y el otro de castigo, separados por una puerta tipo guillotina. En el compartimento de seguridad, el piso consiste en una rejilla de aluminio hecha de barras de 0,5 cm de diámetro separadas por una distancia de 1,5 cm. Las paredes laterales y el piso del compartimento de castigo están cubiertas por una capa de acero inoxidable, con un hueco de 1 cm en medio del piso. El piso fue conectado a una unidad de corriente constante (Grass, modelo PSIU6), la que, a su vez, se conectó a un estimulador Grass (modelo S48)

que libera 50 pulsos cuadrados por segundo con una intensidad de 2 a 4 mA, con una duración de 5 ms por pulso por 5 s.

La prueba de retención constó de 2 sesiones con 24 h de separación entre cada una de ellas. En la primera sesión (memoria de corto plazo), inicio el entrenamiento al colocarse el animal en el compartimento de seguridad y transcurridos 20 segundos se levantó la puerta de guillotina, anotándose la latencia de entrada al compartimento de castigo e inmediatamente se bajó la puerta de la guillotina. Dentro del compartimento de castigo, el animal recibió un shock eléctrico de 3 mA durante 3 segundos. A continuación se levantó la puerta y la rata abandonó el compartimento donde recibió el estímulo negativo (Latencia de escape). Se aisló al animal por 10 minutos en la jaula de alojamiento. Transcurridos los 10 minutos se dio inicio a la Prueba de memoria de corto plazo. El animal fue colocado en el compartimento de seguridad y 10 segundos después se le permitió el acceso al compartimento de castigo. La prueba consto de 600 segundos, en los cuales el animal debería ser capaz de recordar que en la sección oscura recibió el estímulo adverso. Si el animal entró antes de los 600 segundos se anotó la latencia de entrada y se concluyó la prueba.

La segunda sesión (Memoria de largo plazo) se efectuó 24 h después llevándose a cabo el mismo procedimiento de la primera sesión y anotándose el tiempo de latencia. El animal logró el aprendizaje si el tiempo requerido para entrar al compartimento oscuro no fue diferente, pero el comportamiento en una prueba de retención significativamente diferente de la conducta durante el condicionamiento [170].

5.7. Técnica de Western blot

Se sacrificaron los animales y se les diseco el hipocampo (38). Se extrajeron las proteínas de los tejidos antes mencionados, utilizando un amortiguador de lisis de proteínas con inhibidores de proteasas. Se realizará la técnica de Western blot para analizar la activación y contenido de todas las proteínas de la cascada con el uso de anticuerpos que reconocen a Tau Total, y la fosforilación de la proteína

Tau en la Ser396; anticuerpos que reconocen a GSK3 β total y su forma fosforilada en el epítoto Ser9, anticuerpos para la proteína de Akt total y su forma fosforilada en el epítoto Ser 473, para las fosfatasa PP2A y PTEN en sus formas fosforiladas y sus totales así como para Tubulina que se utilizó como control de carga de las proteínas analizadas. Posteriormente se realizó un análisis densitométrico y estadístico de los datos obtenidos [151].

Después del análisis de la conducta, seis animales de cada grupo fueron seleccionados al azar, se sacrificaron por decapitación y sus hipocampos fueron disecados de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson [171] y procesados para la técnica de Western blot.

Las muestras de tejido se homogeneizaron en solución amortiguadora de lisis (150 mM NaCl, 20 mM de Tris-HCl, 10% de glicerol, 5 mM de EDTA y 1% de NP-40; Roche, Mannheim, Alemania) adicionada con inhibidores de la proteasa (50 g/mL de fenil metil sulfonil fluoruro, 10 mg/mL de aprotinina, 25 mg/mL de leupeptina; Sigma, St. Louis, MO). Las proteínas se obtuvieron por centrifugación durante 15 min a 15.000 rpm a 4 °C, los sobrenadantes se cuantificaron usando un ensayo de Bradford modificado (BioRad, Múnich, Alemania). Las proteínas (30 mg) se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (10% de SDS-PAGE) con un sistema Mini-Protean (BioRad) y se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, anteriormente Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, EE. UU.).

Para verificar que la cantidad de proteína fue la misma en cada carril, se tiñeron las membranas con solución de rojo Ponceau (**Anexo II**) (0,1% w/v en ácido acético al 5%, Sigma, St. Louis, MO) y luego se lavaron con una solución amortiguadora tris/salina con 0,05% de Tween-20 hasta que el color desapareció. Las membranas se bloquearon con una solución al 5% de leche en polvo sin grasa diluida en solución amortiguadora TRIS/salina con 0,05% de Tween-20 y se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios. Se incluyeron

marcadores de peso molecular (BioRad) para la determinación del peso molecular de las proteínas. Se utilizaron anticuerpos mencionados en la **Tabla 2**.

Proteína	Número de Catálogo	Compañía
Nitrotirosina	ab42789	Abcam
4-Hidroxinonenal	MAB3249	R&D
Tau fosforilada en la Ser 396	ab32057-100	Abcam
Tau total	sc-5587	Santa Cruz
GSK3 fosforilada en la Ser 9	sc-11757-R	Santa Cruz
GSK3 Total	sc-9166	Santa Cruz
Akt fosforilada en la Ser 473	sc-7985	Santa Cruz
Akt Total	sc-8312	Santa Cruz
PTEN fosforilada en el Ser 380	#9551	Cell Signaling,
PTEN Total	sc-7974	Santa Cruz
PP2a fosforilada en la Tyr 307	sc-12615	Santa Cruz
PP2a Total		BD Transduction Lab.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para determinar el efecto de la exposición a ozono sobre el estado de fosforilación de la proteína tau y de las proteínas GSK3 β , AKT, PTEN Y PP2a en el hipocampo de la rata con y sin tratamiento de TIB.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (Santa Cruz, diluido 1:10.000). La intensidad de las bandas de las proteínas se cuantificó por densitometría usando un escáner HP para la captura de imágenes y el programa 1D Image Analysis Software Kodak para el análisis densitométrico. Se cuantificaron cinco bandas inmunorreactivas (50, 65, 80, 94 y 120 kDa) en los dos marcadores de estrés oxidativo y para las demás proteínas las bandas inmunoreactivas correspondientes a su peso molecular. La suma de la densidad óptica de las cinco bandas se utilizó para realizar la gráfica correspondiente. Para minimizar las variaciones intraensayo, las muestras de todos los grupos de animales en cada experimento se procesaron simultáneamente y en las mismas condiciones.

5.8. Análisis Histológico

Para la evaluación histológica del daño en el hipocampo, los otros cuatro animales fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% en PBS al final de las pruebas de conducta. Rebanadas del cerebro que contenían el hipocampo dorsal se procesaron para su inclusión en parafina y las secciones coronales (10 μ m) fueron teñidas con la técnica de Nissl.

El número de neuronas piramidales presentes que tenían morfología normal, distintos contornos citoplásmicos y nucleares, y nucléolos visibles en la parte media de la capa de células piramidales CA3, se contaron bilateralmente en dos secciones por animal bajo un microscopio óptico (ampliación, 400 $\times$). El recuento de las células del hipocampo derecho e izquierdo en cada una de las dos secciones se promedió para proporcionar un valor único para cada animal. De estos valores, la media de las neuronas remanentes se calculó para cada uno de los grupos experimentales.

5.9. Análisis Estadístico

Los resultados de Western Blot se analizaron usando el Análisis de Varianza (ANOVA) seguido por un estudio Post Hoc de Tukey's usando el programa Prisma Stat Versión 5.0. Los resultados de conducta fueron evaluados por la Prueba de Kruskal-Wallis y la Prueba de U de Mann-Whitney. En el caso del análisis histológico, la media de las neuronas remanentes se calculó para cada uno de los grupos experimentales.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de la TIB sobre los Marcadores de EO en el hipocampo de ratas expuestas a O₃.

La **Figura 6** muestra imágenes representativas de 6 animales así como los efectos en la expresión de los aductos de NT como marcador de la oxidación de proteínas, (Fig. 6a) y del 4-HNE (Fig. 6b) como marcador de lipoperoxidación; en el hipocampo de ratas expuestas a O₃ y a O₃+TIB (1 mg/kg) previo a la exposición por periodos de 7,15, 30 y 60 días.

El EO inducido por la exposición a O₃ aumentó los niveles de los productos de la descomposición de los peróxidos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados y de los ésteres de lipoperoxidación, así como de la oxidación de proteínas; y siendo estadísticamente significativo a partir de los 15 días de la exposición a O₃. Sin embargo, el tratamiento con TIB mantuvo los niveles de estos marcadores de estrés oxidativo en valores similares a los de los controles durante el mismo período (**Figura 6A. y 6B.**).

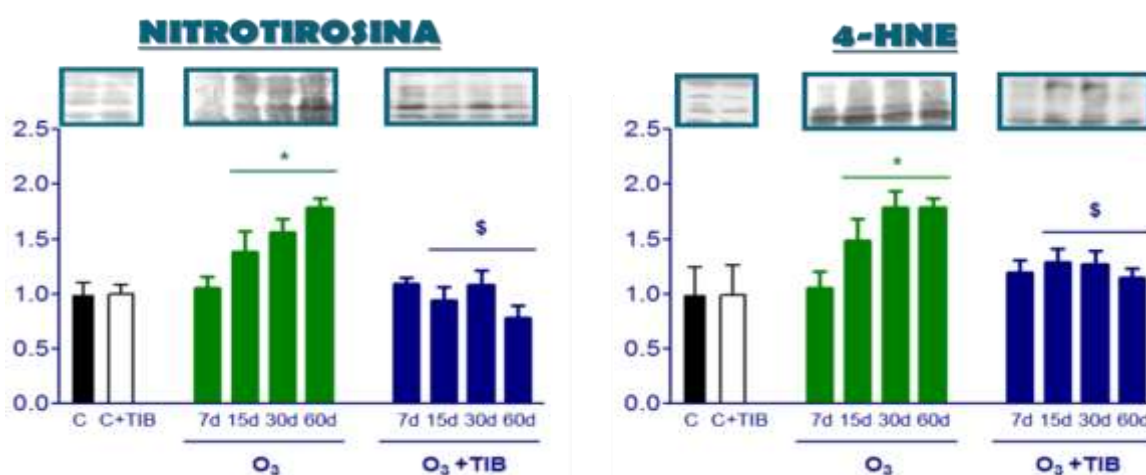


Figura 6. Ejemplos de blots y de los efectos en el hipocampo con respecto a la oxidación de proteínas (nitrotirosina) y en la lipoperoxidación (4-HNE) en animales expuestos a corriente de aire sin ozono (C), expuestos a corriente de aire sin ozono con tratamiento de 1mg/kg de TIB (C+T); así como a la exposición crónica a ozono con y sin tratamiento a 1mg/kg de TIB. Los subgrupos de los animales son de 7 días (7d), 15 días (15d), 30 días (30d) y 60 días (60d) de exposición a ozono con y sin tratamiento previo a la exposición de TIB. Ratas control (Vehículo, n=6). Los datos fueron expresados con media $\pm$ SEM. El asterisco significa diferencia estadísticamente significativa de la exposición a ozono por 7, 15, 30, 60 con y sin tratamiento previo a TIB ($p < 0.05$) vs de los valores de las ratas control.

6.2. Efecto de la TIB sobre la Muerte Neuronal provocada por el EO crónico en el hipocampo de ratas expuestas a O₃.

La **Figura 7** muestra ejemplos de cortes histológicos del hipocampo de ratas expuestas a O₃, TIB y a O₃+TIB por 60 días teñidos con la Técnica de Nissl. La tinción de Nissl demostró que la exposición crónica al O₃ provocaba un aumento en el número de neuronas muertas en la región CA3 del hipocampo (**Figuras 7E, 7F, 7I**). En los animales expuestos a O₃ y tratados con TIB, se observó una disminución de la muerte neuronal en la región CA3 (**Figuras 7G, 7H, 7I**); el número de neuronas de este grupo fue similar al observado en los grupos C (**Figuras 7A, 7B, 7I**) o C+TIB (**Figuras 7C, 7D, 7I**).

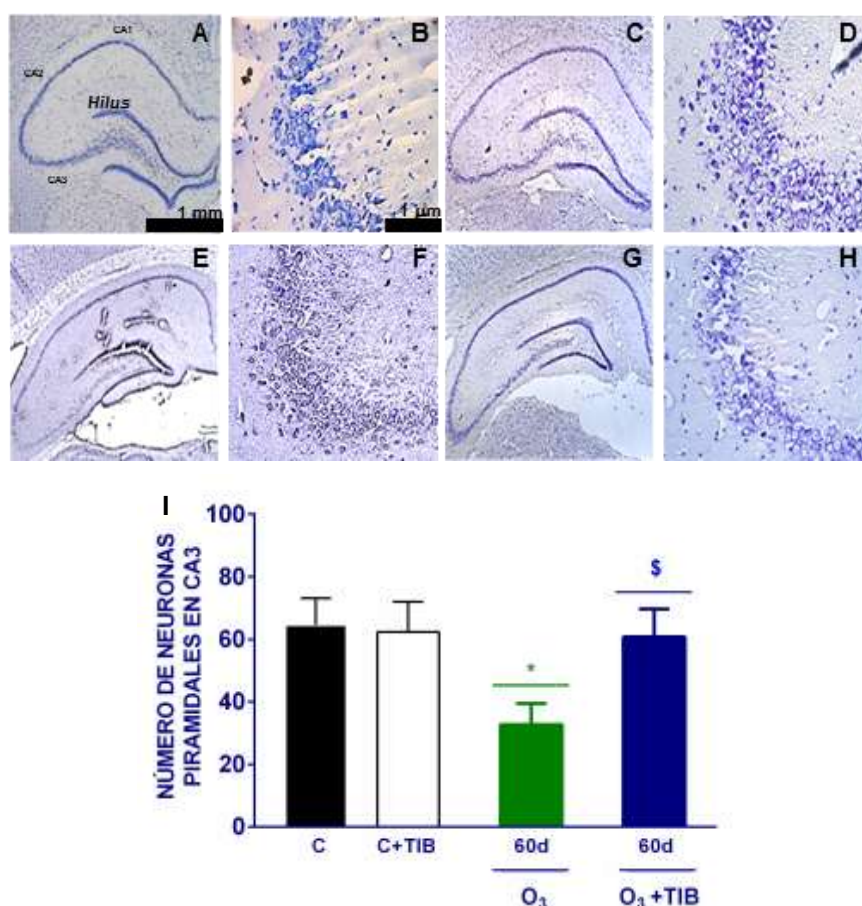


Figura 7. La TIB reduce parcialmente la pérdida de neuronas piramidales en la región CA3 del hipocampo inducida por la exposición crónica a O₃. En la parte izquierda: tinción de Nissl a secciones coronales del hipocampo dorsal de ratas sometidas a corriente de aire libre de O₃ (C; A, B) o corriente de aire libre O₃ con tratamiento de 1mg/kg de TIB durante 60 días (C+TIB, C, D), o con la exposición O₃ durante 60 días (O₃ 60d; E,F) o a la exposición de O₃+1mg/kg de TIB por 60 días (O₃+T 60d G,H), obtenidos en el último día de la exposición a O₃. En la parte inferior: Número (media ± EE) de las neuronas piramidales de la región CA3 en cuatro grupos experimentales (I). Las barras de escala: 1 mm (hipocampo), 100 µm (CA3). Prueba post hoc de Tukey: *p<0.05 vs. C, C+TIB y O₃+TIB; \$p<0.05 vs. O₃ 60d.

6.3. Efecto de la TIB sobre el Déficit Cognitivo y la Actividad Motora en ratas expuestas a O₃.

6.3.1. Prueba de Evitación Pasiva para Memoria de Corto y de Largo Plazo

Primero se analizó si los animales estaban recibiendo y sintiendo el estímulo negativo por medio de las Latencias de Adquisición y Latencias de Escape (Figura 8.).

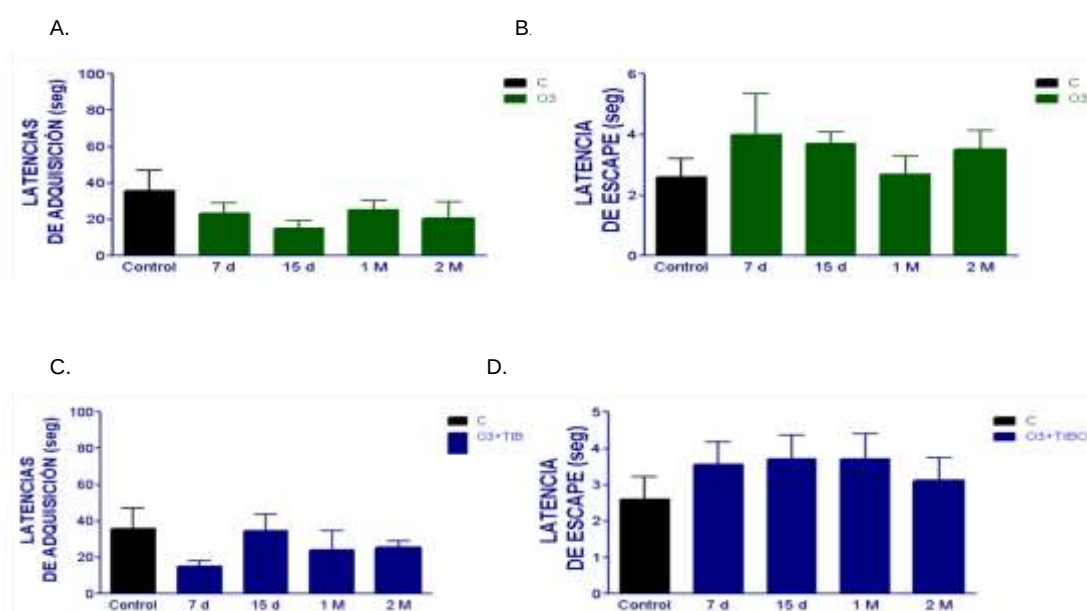


Figura 8. Estadística de las Latencias de Adquisición y Latencias de Escape para la PEP de A y B ratas machos expuestos a corriente de aire sin O₃ (C), expuestos a O₃ 7 días (7d), 15 días (15 d), 30 días (30d) y 60 días (60d). Ratas control n=10 y cada grupo n=10. C y D. Ratas machos con exposición a corriente de aire sin O₃ (C), exposición a O₃ y tratamiento concomitante de TIB por 7 días (7d), 15 días (15 d), 30 días (1 M) y 60 días (2 M). Ratas control n=10 y cada grupo n=10. Los datos son expresados con media ± SEM.

Los resultados no indicaron diferencia estadística en ambas latencias de los dos grupos experimentales con lo cual podemos concluir que los animales si recibieron el impulso eléctrico y pudieron aprender el efecto adverso de entrar a la compartimento de seguridad.

La **Figura 9.** muestra los resultados del PEP a 10 min y 24 h después de la última exposición al O₃ ó con O₃ y el tratamiento con 1 mg/kg de TIB.

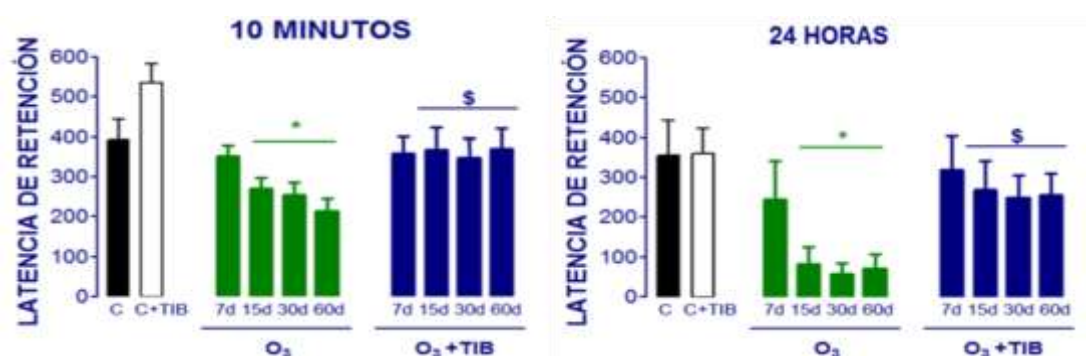


Figura 9. Estadística de la PEP para evaluar la Memoria de corto y de largo plazo de ratas machos con exposición a: en negro corriente de aire sin O₃ (C), en blanco corriente de aire sin O₃ con 1 mg/kg de TIB por 60 días (C+TIB), exposición a O₃ en verde durante 7 días (7d), 15 días (15d), 30 días (30d) y 60 días (60d) y en azul exposición a O₃ con 1 mg/kg de TIB por 7 días (7d), 15 días (15d), 30 días (30d) y 60 días (60d). Ratas control n=4 y cada grupo n=10. Los datos son expresados con media ± SEM. El asterisco, significa diferencia estadística de la exposición a O₃ por 7, 15, 30 así como 60 días (p<0.05) vs de los valores de las ratas control. El signo de pesos (\$) significa diferencia estadística de los animales expuestos a O₃ con de 1mg/kg de TIB (p<0.05) vs de los valores de las ratas expuestas a O₃ a los mismo periodos de tiempo.

Se observó que la exposición crónica a O₃ disminuyó la latencia de retención tanto en la memoria de corto y como en la de largo plazo; esta disminución es estadísticamente significativa a partir de los 15 días de exposición y se mantuvo hasta 60 días de exposición a O₃ (**Figura 9A y 9B**). Los animales expuestos a O₃ y tratados con TIB, la latencia de retención se mantuvo en niveles similares a los de los controles a los 10 minutos (**Figura 9B**). A pesar de que se observó una reducción en la latencia de retención a las 24h en los animales tratados con TIB, los valores fueron más altos que los de los animales expuestos a O₃ (**Figura 9B**).

6.3.2. Prueba de Actividad Motora.

La **Figura 10**, muestra los resultados del PEP a 10 min y 24h después de la última exposición al O₃ o al O₃ más el tratamiento con 1 mg/kg de TIB.

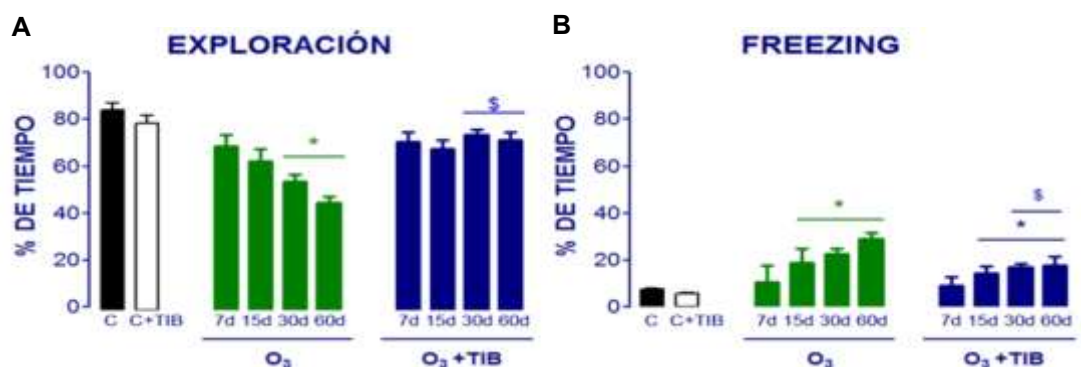


Figura 10. Estadística de la PAM de ratas machos con exposición a: en negro corriente de aire sin O₃ (C), en blanco corriente de aire sin O₃ con 1 mg/kg de TIB por 60 días (C+TIB), en verde exposición a O₃ durante 7 días (7 d), 15 días (15 d), 30 días (30d) y 60 días (60d) y en azul exposición a O₃ con 1 mg/kg de TIB por 7 días (7 d), 15 días (15 d), 30 días (30d) y 60 días (60d) en de cada grupo n=10. Los datos son expresados con media ± SEM. El asterisco significa diferencia estadística de los animales expuestos a O₃ por 15, 30, 60 (p<0.05) vs de los valores de las ratas control. El signo de pesos (\$) significa diferencia estadística de los animales expuestos a O₃ con de 1mg/kg de TIB (p<0.05) vs de los valores de las ratas expuestas a O₃ a los mismo periodos de tiempo.

Observamos que la exposición crónica a O₃ disminuyó la conducta exploración y fue estadísticamente significativa a partir de 30 días, mientras que los animales tratados con TIB antes de la exposición al O₃ presentaron niveles similares de conducta de exploración a los observados en los controles (**Figura 10A**). Este resultado se correlaciona con el aumento en el comportamiento de congelación, que fue estadísticamente significativo después de los 15 días de la exposición al O₃ (**Figura 10B**). En los animales expuestos a O₃ más el tratamiento con TIB, se observó un aumento en el comportamiento de congelación, aunque este aumento fue estadísticamente inferior al observado en los animales expuestos sólo a O₃ (**Figura 10B**).

6.4. Efecto de la TIB sobre el Estado de Fosforilación de Tau y de GSK3 β , Akt, PTEN y PP2A en el hipocampo de ratas expuestas a O₃.

La **Figura 11** muestra blots representativos de 6 animales sobre la expresión y contenido de las proteínas así como los efectos en la fosforilación de la Ser396 y Total de Tau; la fosforilación en la Ser9 y Total de GSK3 β ; y la fosforilación en la Ser473 y Total de Akt en el hipocampo de ratas macho expuestas a O₃ por periodos de 7,15, 30 y 60 días con y sin tratamiento previo de TIB.

El EO crónico producido por la exposición a O₃ incremento la fosforilación de Tau en la Ser396 en comparación de los animales C y C+TIB, siendo estadísticamente significativo a partir de los 15 días de exposición a O₃ y no siendo afectada la expresión de Tau Total. El tratamiento previo de los animales con TIB mantuvo la fosforilación de Tau en la Ser396 en valores similares a los animales control (**Figura 11A.**). Además, la exposición a O₃ disminuyó la fosforilación en la Ser9 de GSK3 β en comparación de los animales C y C+TIB, siendo estadísticamente significativo a partir de los 15 días de exposición a O₃. El tratamiento previo de los animales con TIB mantuvo la fosforilación de GSK3 β en la Ser9 en valores similares a los animales control y sin ser afectada la expresión de la proteína GSK3 β Total (**Figura 11B.**).

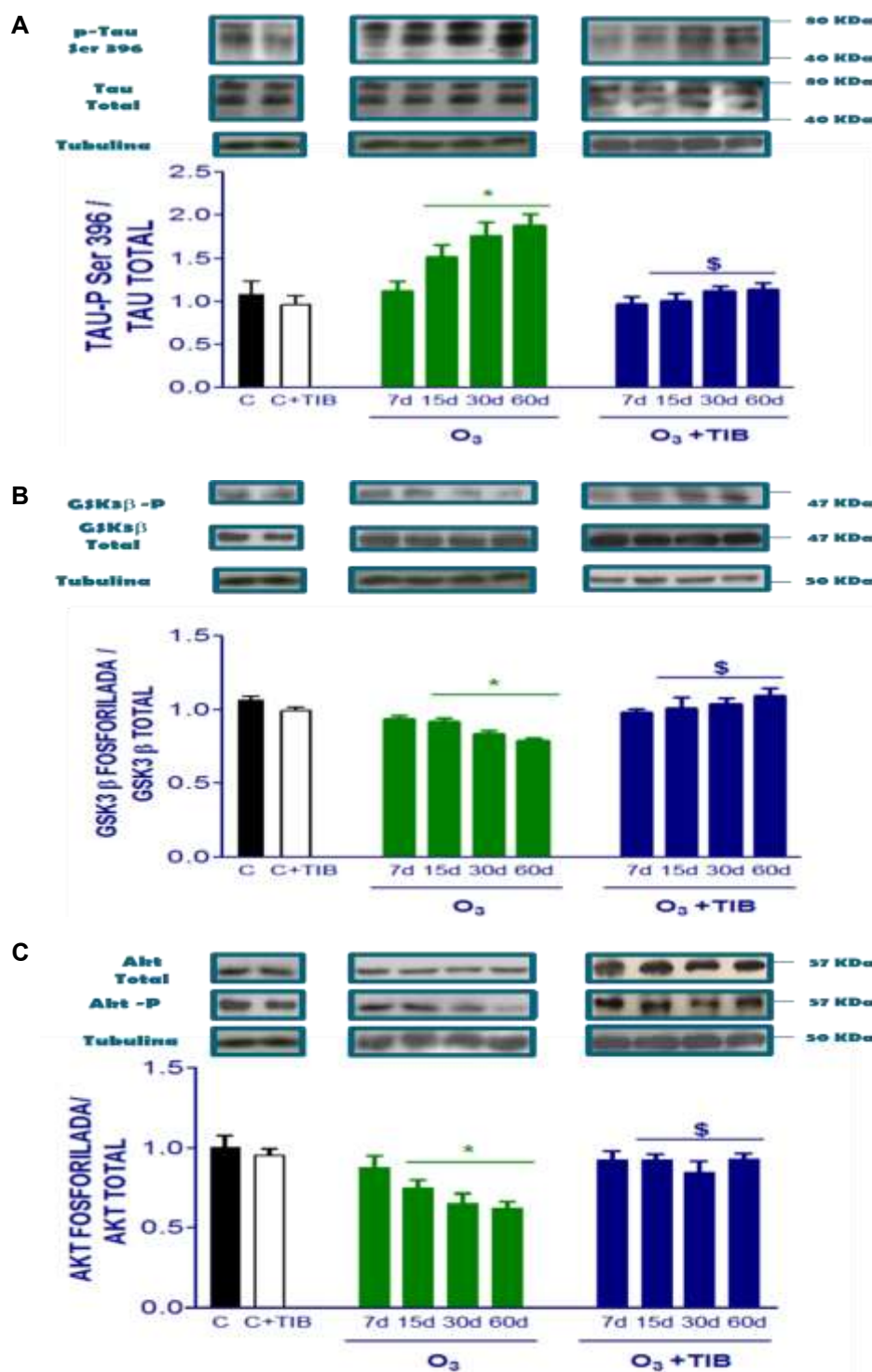


Figura 11. Ejemplos de Western blots y de los efectos en el hipocampo en la expresión de la proteína fosforilada Tau en la Ser396, Tau Total; en la fosforilación en la Ser9 de GSK3, GSK3 Total y en la fosforilación en la Ser473 de Akt y de Akt Total en animales expuestos a corriente de aire sin O₃ (C), expuestos a corriente de aire sin ozono con tratamiento de 1mg/kg de TIB (C+T); así como a la exposición crónica a O₃ con y sin tratamiento a 1mg/kg de TIB. Los subgrupos de los animales son de 7 días (7d), 15 días (15d), 30 días (30d) y 60 días (60d) de exposición a O₃ con y sin tratamiento previo a la exposición de TIB. Ratas control (Vehículo, n=6). Los datos fueron normalizados con los valores de Tubulina y expresados con media $\pm$ SEM. El asterisco significa diferencia estadísticamente significativa de los animales expuestos a O₃ por 15, 30, 60 (p<0.05) vs de los valores de las ratas control. El signo de pesos (\$) significa diferencia significativa de los animales expuestos a O₃ con tratamiento previo de 1mg/kg de TIB (p<0.05) vs de los valores de las ratas expuestas a O₃ a los mismo periodos de tiempo.

El EO crónico producido por la exposición a O₃ disminuyó la fosforilación en la Ser473 de Akt en comparación de los animales control, y siendo estadísticamente significativa a partir de los 15 días de exposición a O₃. En los mismos animales, no se observó cambio en la expresión de la proteína Akt Total (**Figura 11C.**).

La **Figura 12.** muestra blots representativos de 6 animales sobre la expresión y contenido de las proteínas así como los efectos en la fosforilación de la Tyr307 y Total de PP2A y en la Ser380 y Total de PTEN en el hipocampo de ratas macho expuestas a O₃ por periodos de 7,15, 30 y 60 días con y sin tratamiento previo de TIB.

La exposición crónica a O₃ produjo disminución en la fosforilación de la Tyr307 de PP2A en comparación de los animales control, siendo estadísticamente significativo a partir de los 15 días de exposición a O₃ y no siendo afectada la expresión de PP2A Total (**Figura 12A.**). El tratamiento previo de los animales con TIB mantuvo la fosforilación de la Tyr307 de PP2A en valores similares a los de los controles; sin ser afectada la expresión de la proteína PP2A Total (**Figura 12A.**).

Además, la exposición a O₃ disminuyó la fosforilación en la Ser380 de PTEN en comparación de los animales C y C+TIB, siendo estadísticamente significativo a partir de los 15 días de exposición a O₃. El tratamiento previo de los animales con TIB mantuvo la fosforilación de PTEN en la Ser380 en valores similares a los animales control y sin ser afectada la expresión de la proteína PTEN Total (**Figura 12B.**).

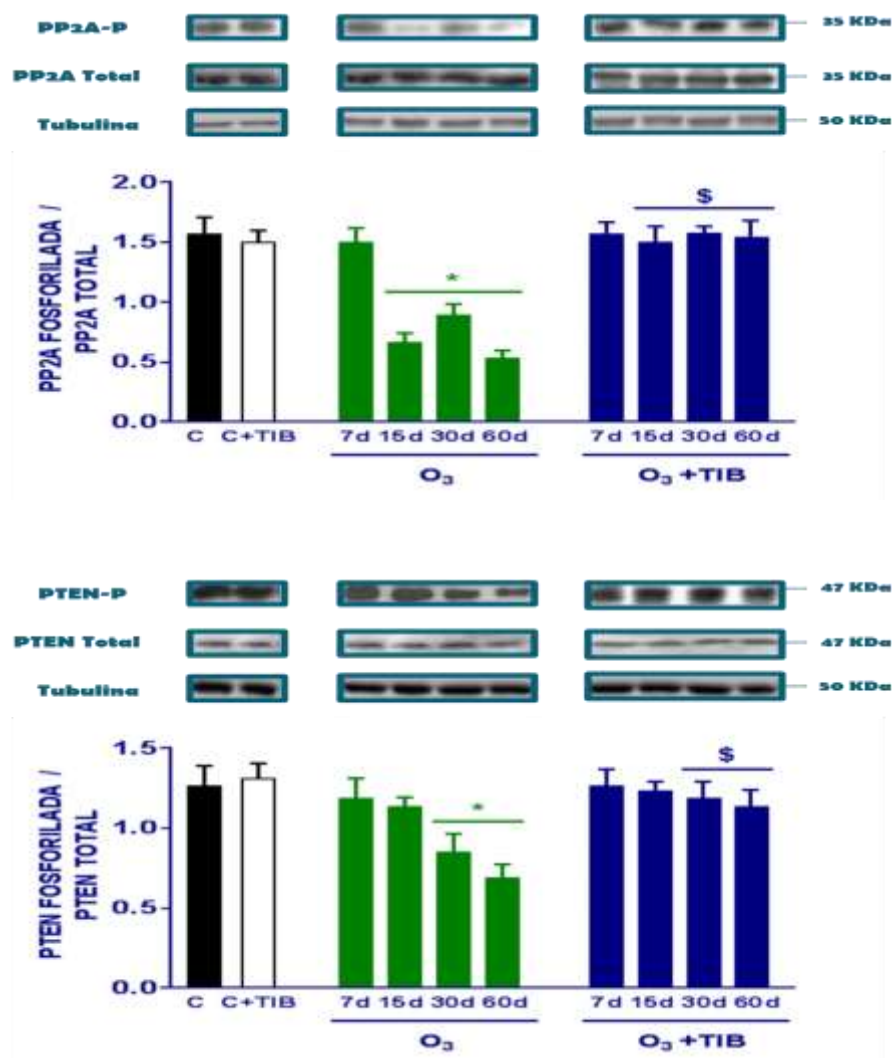


Figura 12. Ejemplos de Western blots y de los efectos en el hipocampo en la expresión de las fosfatasa PP2a Y PTEN totales y de las fosforilaciones en la Tyr 307 en PP2A y en la Ser 380 de PTEN en animales expuestos a corriente de aire sin ozono (C), expuestos a corriente de aire sin ozono con tratamiento de 1mg/kg de TIB (C+T); así como a la exposición crónica a ozono con y sin tratamiento a 1mg/kg de TIB. Los subgrupos de los animales son de 7 días (7d), 15 días (15d), 30 días (30d) y 60 días (60d) de exposición a ozono con y sin tratamiento previo a la exposición de TIB. Ratas control (Vehículo, n=6). Los datos fueron normalizados con los valores de Tubulina y expresados con media $\pm$ SEM. El asterisco significa diferencia estadística de los animales expuestos a ozono por 15, 30, 60 ($p < 0.05$) vs de los valores de las ratas control. El signo de pesos (\$) significa diferencia significativa de los animales expuestos a ozono con tratamiento de TIB ($p < 0.05$) vs de los valores de las ratas expuestas a ozono en los mismo periodos de tiempo

7. DISCUSIÓN

El O_3 , también conocido como oxígeno activado u oxígeno trivalente, es un agente oxidante muy reactivo porque por un lado es inestable y también puede generar RL citotóxicos a través de la transferencia de átomos de oxígeno a las macromoléculas del cuerpo. El O_3 es uno de los principales agentes contaminantes con un impacto estructural y funcional significativo en los sistemas respiratorio, sistema cardiovascular, el hígado y el cerebro, incluso en las concentraciones más pequeñas [172–175].

Cuando los niveles de O_3 sobrepasan los sistemas de defensa antioxidantes en los pulmones [176,177], las ERO's pueden alcanzar el SNC a través del torrente sanguíneo, causando EO [170,175,178]. El EO en el SNC juega un papel importante en la muerte neuronal debido a la severa vulnerabilidad del cerebro a la pérdida del equilibrio de oxidación-reducción [179].

En el SNC, el EO causado por O_3 aumenta la LPO [159], siendo las zonas más vulnerables el bulbo olfatorio, hipocampo, cuerpo estriado, cerebelo y la corteza prefrontal [163,174,180–182]. En el hipocampo, el EO inducido por el O_3 causa muerte neuronal y puede conducir a problemas en la plasticidad del cerebro, dando lugar a déficits de aprendizaje, de memoria y motor, terminando en una neurodegeneración progresiva [20].

El modelo de EO por exposición crónica a O_3 es un modelo no invasivo de daño neuronal bien establecido. En este modelo, el O_3 produce incremento en la LPO provocando deterioro de la plasticidad cerebral, induce pérdida en la reparación cerebral en el hipocampo, déficits en la memoria, el aprendizaje, la memoria de reconocimiento social y la actividad motora [161,163,166].

En el presente estudio, se observó que la exposición crónica de O_3 aumenta el contenido de la NT y del 4-HNE en el hipocampo de la rata a partir de los 15 días de exposición y que estos niveles se mantienen hasta los 60 días (**Figura 6.**). Estos

resultados concuerdan con trabajos anteriores, en los cuales se reportó que la exposición crónica a O_3 aumenta los niveles de LPO en este tejido [166]. El cerebro es especialmente vulnerable a la LPO por ERO, ya que el cerebro ocupa aproximadamente una quinta parte del oxígeno consumido por el ser humano, tiene una escasez relativa de sistemas antioxidantes y contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) [183]. El 4-NHE es un aldehído altamente reactivo generado por la exposición de ácidos grasos poliinsaturados al peróxido de ERO, también es utilizado como indicador de la presencia y el grado de EO en las enfermedades neurodegenerativas [184,185].

Se ha reportado que el E_2 ejerce su actividad antioxidante por medio de la donación de átomos de hidrógeno, a partir del hidroxilo del anillo fenólico a los radicales lipídicos peroxilo así como a otros radicales perjudiciales. Esta acción puede inhibir la LPO y retrasar el deterioro de la memoria [166,169].

En los últimos años, los efectos de la TIB en el SNC han sido ampliamente investigados [141–148,150–152,186–189]. Aunque los aspectos cognitivos y neuroprotectores de esta hormona no han sido completamente dilucidados. Diversos estudios en modelos animales así como en humanos sugieren que la TIB podría tener un uso benéfico contra el daño inducido por la menopausia [142], la administración de acetato de leuprolide [144], la OVX a largo plazo [147], y durante el envejecimiento [148]. La TIB se ha propuesto como un modulador neuroendocrino [186] y de neurotransmisores [147]; también se ha observado que reduce la formación de PHF al disminuir la fosforilación de la proteína Tau [151].

En los resultados obtenidos, se observó que la administración de TIB a los animales expuestos a O_3 mantuvo los niveles de los marcadores de EO analizados en valores similares al de los grupos controles en comparación con los animales expuestos solo a O_3 (**Figura 6.**). Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que se observó que la administración de TIB redujo la LPO inducida por el envejecimiento en el hipocampo de rata [148]. En nuestro conocimiento, este es el primer reporte sobre el efecto de la TIB sobre los niveles de oxidación de proteínas en el hipocampo. Por

otro lado, los biomarcadores de estrés oxidativo y nitrosativo se mantuvieron en niveles similares a los observados en los animales control, incluso después de la exposición crónica de O₃. Estudios anteriores han informado que la administración crónica de TIB reduce la LPO producida por OVX en el cerebro de rata y en la sangre de mujeres postmenopáusicas. Estos resultados podrían deberse a las características moleculares de la TIB de poder donar hidrógenos de su anillo hidroxilo, al igual que lo hacen los estrógenos, incrementando la capacidad de barrer los RL, y o mediante la estimulación de mecanismos directos e indirectos sobre algunos antioxidantes como el tocoferol, aumentando sus concentraciones plasmáticas como se reporta en algunos estudios previos [148,190].

En el presente estudio, la TIB redujo la oxidación de lípidos y proteínas hipocampales en el modelo de estrés oxidativo crónico inducido por la exposición crónica a O₃. Sin embargo, el mecanismo por el cual la TIB realiza estas acciones aún no está bien esclarecido y requiere mayor investigación.

En el análisis histológico, se observó que la exposición a O₃ induce la muerte neuronal después de 60 días de exposición en la región CA3 del hipocampo (**Figura 7.**). Estos resultados concuerdan con informes anteriores donde se encontró que el O₃ induce la muerte neuronal y la pérdida de la reparación del cerebro en el hipocampo de ratas adultas [20,191]. También se observó que el pre tratamiento con TIB redujo el número de neuronas muertas por la exposición crónica O₃, probablemente debido a la capacidad antioxidante de esta hormona [148,190].

Esta reducción de la muerte neuronal nos provee una posible explicación del porqué la alteraciones motoras se ven disminuidas. El mismo efecto observado en el hipocampo podría estar ocurriendo en la sustancia nigra, en donde se habría una reducción de la muerte de neuronas dopaminérgicas y con ello el restablecimiento de la comunicación dopaminérgica. Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

La PEP es una prueba Pavloviana de evitación inducida por miedo que es útil para evaluar el efecto de nuevos fármacos que participan en la regulación del aprendizaje y la memoria, así como el estudio de los mecanismos implicados en la cognición.

En este trabajo, la exposición crónica a O₃ disminuyó la latencia de retención en la memoria de corto y de largo plazo (**Figura 9.**). Estos resultados concuerdan con reportes previos, en los cuales se ha observado que la exposición crónica a O₃ puede provocar alteraciones en la plasticidad neuronal y producir déficits de aprendizaje y de memoria [161,163]. En contraste, se observó que el pre tratamiento con TIB, mantuvo la retención de latencia en niveles similares a los controles en la memoria de corto plazo (**Figura 9A**).

Por otro lado, a pesar de que hubo disminución en la latencia de retención a las 24 h (memoria de largo plazo) en los animales previamente tratados con TIB, la retención fue mayor que la de los animales expuestos solo a O₃ (**Figura 9B**). Del mismo modo, se ha reportado que el valerato de E₂ y la TIB afectan a la memoria de manera dosis y edad dependientes en ratas hembras [148]. En un estudio previo, se informó que la TIB mejoró el aprendizaje y tuvo efecto sobre la modulación de los sistemas colinérgicos y serotoninérgicos en el hipocampo [147].

Además, la exposición crónica de O₃ disminuyó la conducta de exploración y aumentó la conducta de congelación. Estos resultados concuerdan con informes previos sobre las alteraciones en la actividad motora observadas después de diferentes concentraciones y períodos de exposición al O₃ [161,163,170]. En los animales previamente tratados con TIB antes de la exposición al O₃, los niveles de comportamiento exploratorio se mantuvieron similares a los observados en los controles (**Figura 10A.**). Aunque también hubo un incremento en la conducta de congelación, este aumento fue estadísticamente inferior al de los animales expuestos solo a O₃ (**Figura 10B.**).

Se ha reportado que en el mismo modelo de EO se produjo un deterioro de la morfología celular y una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra de

ratas OVX. Este efecto fue contrarrestado después de 60 días de tratamiento con 17β -E₂, cuando los niveles sanguíneos de esta hormona fueron más altos [167]. Otro estudio informó que el tratamiento con 17β -E₂ disminuyó significativamente tanto el deterioro motor, el proceso de peroxidación lipídica, y restauró los niveles de antioxidantes en un modelo de neurotoxicidad inducida por el etanol [192]. Todos estos resultados indican que la TIB disminuye el deterioro de la actividad motora inducida por el EO en el modelo de exposición O₃ probablemente debido a su actividad de los estrogénica en el SNC [151,193].

El ensamblaje y la estabilización del citoesqueleto son eventos esenciales en el establecimiento de la morfología de las neuronas maduras y es una condición importante para el crecimiento neuronal, desarrollo del sistema nervioso, el mantenimiento de su funcionalidad, y las redes neuronales integridad [194–196].

Tau es una proteína de unión de microtúbulos, que se produce en el cerebro sano y funciones en el transporte axonal, el montaje y la estabilización de los microtúbulos [24]. Tau puede influir en el crecimiento y la forma, y el transporte axonal asociada con los microtúbulos. Su fosforilación se lleva a cabo por proteínas quinasas tales como la GSK3 β y Cdk-5. GSK3 β , a diferencia de la mayoría de las cinasas, se inactiva cuando fosforilada y por lo tanto pierde su actividad [77].

Durante la neurodegeneración en la EA, la proteína tau está anormalmente fosforilada en la región rica de prolinas en los aminoácidos Ser y Thr [197]. El incremento de la fosforilación de la proteína tau en la EA ha sido asociado a un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo [86].

Durante años, se reportó que la hiperfosforilación de Tau induce la desestabilización de microtúbulos y fueron asociados como los únicos responsables en la formación de los NFTs [24,83].

Sin embargo, en un estudio en NFTs se encontró evidencias de microtúbulos intactos [198]. Este hallazgo hizo sugerir que una fracción de la proteína tau fosforilada sigue asociada a los microtúbulos [86]

Cabe recalcar que la determinación de la participación de la hiperfosforilación de la proteína tau en la génesis de los PHFs ha sido limitada al estudio de NFTs “maduras”, lo cual impide una interpretación adecuada del proceso; ya que existen diversos procesos patológicos ocurriendo de manera simultánea y dentro de ellos está inmersa la hiperfosforilación [199–202] .

Los efectos de las especies de oxígeno sobre la fosforilación de la proteína tau parecen ser dosis y tiempos dependientes [98–102,104–107,203].

En concentraciones bajas [98,107,108], así como condiciones agudas [104–106]; el EO pudiera fungir como un mecanismo neuroprotector ya que regula la desfosforilación transitoria de algunos residuos de tau [98,104–108], al igual que puede aumentar la fosforilación de la proteína tau en Ser214; pudiendo prevenir este último sitio la formación de PHF [106].

De nuestro particular interés, son los efectos del EO crónico sobre la fosforilación de Tau. Estudios in vitro revelaron que el EO induce la hiperfosforilación de tau en diferentes epítomos (PHF-1, TG3 y MC1) los cuales están presentes previo a la formación de las NFTs [109,110].

En uno de estos reportes, Lovell y colaboradores (2011) promovieron la fosforilación de Tau identificada por inmunoquímica para TG3 y MC1; por medio del tratamiento de con cuprizona, un quelante del cobre; en combinación con EO con $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Además, demostraron que la hiperfosforilación de Tau se encontraba correlacionada con el incremento en la actividad de GSK3 β ; ya que al adicionar un tratamiento concomitante con Litio se disminuía significativamente la actividad de GSK3 β así como la tinción para TG3 [109].

Su y colaboradores (2011) reportaron que el tratamiento con BSO, el cual es inhibidor de la síntesis de GSH; aumento la fosforilación de las serinas 396 y la 404 (epítomo

PHF-1) y este efecto fue mediado por el aumento en la actividad de JNK y p38 así como la disminución de la actividad de PP2A [110].

Asimismo, se ha observado que productos del EO como el 4-HNE [111] y la acroleína pueden contribuir a la hiperfosforilación de Tau [112,113]. Asimismo, se ha reportado que estos dos productos de peroxidación de la membrana ocurre en un estadio temprano de la EA [204].

En el caso el primer caso, el tratamiento con 4-HNE (producto aldehídico de membrana peroxidación lipídica) en cultivo de neuronas del hipocampo, provocó un aumento moderado de los niveles basales de la fosforilación de tau, al igual que previene la desfosforilación por la fosfatasa alcalina en las neuronas previamente tratadas con ácido okadaico, el cual es inhibidor de PP1/PP2A [111].

También, se comprobó que la acroleína, el cual es un producto de la peroxidación del ácido araquidónico; aumenta la fosforilación de tau en el sitio reconocido por PHF-1 tanto en células de neuroblastoma humano y en cultivos primarios de neuronas corticales de embrión de ratón [113].

Estos resultados sugieren, que el EO y la posterior formación de productos de peroxidación de lípidos pueden contribuir a la fosforilación de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer y taupatías [111,113]. Cabe mencionar que todos los epítomos de Tau (PHF-1, TG3 y MC1) previamente mencionados han sido mencionados como eventos tempranos en algunas taupatías [97,109,110].

En el presente estudio, se observó que la exposición crónica al ozono durante 15, 30 y 60 días produjo un aumento significativo en la expresión de tau fosforilada en la Ser 396 en el hipocampo (**Figura 11A.**).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos *in vitro*, a los cuales se les indujo la hiperfosforilación de tau por medio del EO crónico o con productos generados por el EO. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el cual se reporta la

fosforilación de Tau en la Ser396, uno de los residuos de Tau más importantes para pérdida de la estabilidad de los microtúbulos así como para la formación de NFTs [87–91,93–96]; en un modelo *in vivo* de EO crónico.

Un aspecto importante a ser considerado, es el hecho que el mecanismo en contra del EO vía la fosforilación de tau ha sido observado en modelos de estrés oxidativo tanto en concentraciones bajas así como en tratamientos agudos. Los resultados del presente estudio, sugieren que en el modelo de EO crónico inducido por el O₃, este mecanismo de protección así como los sistemas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa; pueden operar en los primeros 7-15 días de exposición [159]. En el caso de las exposiciones por periodos más prologados (30 y 60 días), el estrés oxidativo sobrepasa las barreras antioxidantes al ser insuficientes para contrarrestar el daño y por ende, se produce la muerte neuronal [20,159].

En el caso de los animales expuestos con O₃ y tratamientos concomitantes con TIB la fosforilación de Tau en la Ser396 se mantiene similar a los observados en los animales C y C+TIB; sugiriéndonos que la TIB regula la fosforilación de la proteína Tau (**Figura 11A**).

Con respecto a lo anterior, estos resultados concuerdan con lo reportado por Pinto-Almazán y colaboradores (2012) en el cual observaron que el tratamiento crónico (2 meses) con TIB disminuyó significativamente el contenido de la proteína de tau hiperfosforilada (PHF-1) y correlacionado con el incremento de la Tau desfosforilada en el hipocampo y cerebelo de ratas adultas OVX [151].

La fosforilación fisiológica de las proteínas asociadas a los microtúbulos por GSK3 β puede estar implicado en la regulación de la dinámica de los microtúbulos, el crecimiento neurítico, sinaptogénesis y la plasticidad sináptica [78,205]. Se ha informado que la actividad de GSK3 β está regulada positivamente por la fosforilación de las Tyr 216 y 279 y regulada negativamente por la fosforilación de Ser 9 [206,207]. GSK3 β puede ser responsable de la hiperfosforilación de tau en la enfermedad de Alzheimer [65] y su inhibición se asocia con la activación de las vías de supervivencia en las neuronas [63,206].

Hooper y colaboradores (2007) reportaron que la inhibición de la fosforilación en la Ser9 es aumentada cuando la potenciación a largo plazo (LTP) es inducida en CA1 o giro dentado. Igualmente, se reportó que la sobreexpresión de GSK3 β deteriora la LTP en una manera litio-sensible. Estos resultados sugieren un posible papel directo de GSK3 β en el deterioro de la memoria causada en las enfermedades neurodegenerativas [208].

En otro estudio, se reportó que la resistencia al estrés oxidativo en la línea celular hipocampal HT22 estaba asociada a la disminución en la actividad de GSK3 β [209]. GSK3 β -P también ha sido involucrada en el mecanismo de muerte celular inducida por la exposición a una baja concentración (100 μ m) de H₂O₂ [210]. Además, existe cierta evidencia que indica que inhibidores GSK3 β reducen la toxicidad al estrés oxidativo [211–213].

En el presente estudio, la expresión de GSK3 β fosforilada en la Ser9 disminuye de manera significativa después de 15 días de exposición al ozono, lo que indica que esta enzima, aumenta su actividad a partir de ese momento. Este resultado es consistente con el aumento en la fosforilación de tau en este momento y sugiere que GSK3 β participa en la regulación de tau en el hipocampo de las ratas expuestas al ozono (**Figura 11B.**).

Los resultados en el modelo de estrés oxidativo crónico concuerdan con estudios realizados en células Tet-off PC12, que sobreexpresan el transgen inducible por estrés RCAN1, se informó que GSK3 β incrementa su expresión y con ello el aumento en la fosforilación de Tau transitoria de Tau [102]. Cabe señalar que RCAN1 inhibe a la calcineurina y protege en contra de estrés oxidativo [203]. En el mismo modelo, se produjo la inhibición de la degradación de Tau por el proteasoma en condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂, con el consecuente incremento de GSK3 β y fosforilación de Tau y la inhibición de la desfosforilación de Tau por medio del ácido oxaídico; el cual es inhibidor de PP1/PP2A [103].

En nuestro estudio, la expresión de GSK3 β fosforilada en la Ser9 en los animales tratados con TIB se mantienen en similar a la observada en los animales control (**Figura 11B.**). Este resultado concuerda con el obtenido por Pinto-Almazán y colaboradores (2012) donde se reportó que el tratamiento crónico (2 meses) con TIB regula la actividad de GSK3 β al incrementar el contenido de la forma fosforilada en la Ser9 (forma inactiva) y esto con llevo a la disminución significativa del contenido de la proteína de tau hiperfosforilada (PHF-1) y correlacionado con el incremento de la Tau desfosforilada en el hipocampo y cerebelo de ratas adultas OVX [151].

Blair y colaboradores (1999) informaron que el H₂O₂ puede reducir la actividad de GSK3 β en una manera dependiente de PI3K, lo que implica a Akt como la cinasa mediadora de este proceso [214].

Akt en su forma activa fosforila una serie de sustratos para la sobrevivencia celular y para la regulación del crecimiento y de la apoptosis, la síntesis del glucógeno, la expresión de genes y por la captación de glucosa [215].

En nuestro estudio, el estrés oxidativo crónico inducido por O₃ produjo la inactivación de Akt al disminuir la fosforilación en la Ser473 (**Figura 11C.**). Cabe recordar que Akt fosforilada en la Ser473 está activa; por lo cual, este resultado nos explica el sostenimiento en la actividad de GSK3 β ya que Akt no la puede fosforilar la Ser9. Estos resultados concuerdan con los reportados por Durgados y colaboradores (2012), los cuales observaron disminución de la fosforilación de Akt en la Ser473 por la inducción de estrés oxidativo con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina en células dopaminérgicas de la región ventral del cerebro medio [216].

Se ha reportado que un nivel moderado de ROS activa la señalización de PI3K/Akt y promueve la supervivencia celular, mientras que el estrés oxidativo sostenido puede inhibir esta vía, lo que permite que se produzca la muerte celular y la apoptosis en varios tipos celulares [217].

Resulta relevante el efecto dual (supervivencia/apoptosis) de esta proteína; se debe a que Akt es una proteína sensible al estado redox; teniendo durante un pH fisiológico los dos residuos de cisteínas (Cys297 y Cys311) en su bulce de activación en forma de tioles y en forma de puentes disulfuro u otras formas oxidadas en condiciones de estrés oxidativo [218]. Se ha informado que las modificaciones que ocurren durante el estrés oxidativo en estas cys disminuyen la fosforilación de pAkt y con ello el contenido de pAkt [216,218,219].

Estos datos pudieran explicar lo que se observó que en el modelo de estrés oxidativo crónico inducido por O₃, en el cual el estrés oxidativo crónico disminuyó la fosforilación de Akt en la Ser473, por lo cual; los efectos anti-apoptóticos de Akt pueden ser inhibidos debido al estado redox de las neuronas explicando en parte, la muerte celular producida en este modelo (**Figura 7.**).

Varias sustancias han demostrado efectos citoprotectores en contra de la muerte celular por estrés oxidativo al inhibir la activación de la vía PI3K/Akt y con ello la fosforilación de GSK3 β en Ser9 [210,219–235].

Con respecto a los efectos de la TIB en el modelo de estrés oxidativo crónico inducido por O₃, los tratamientos concomitantes con TIB regularon la fosforilación de Tau; previniendo la disminución de la fosforilación de Akt en la Ser 473 así como el contenido y la expresión de Akt Total (**Figura 11C.**).

Este resultado concuerda con diferentes estrategias neuroprotectoras; como las mediadas por eritropoyetina [232], preacondicionamiento [233], la insulina [229–231], estrógenos [234], y la misma TIB [235]; las cuales se ha demostrado que se producen a través de la regulación de pAkt. En el caso de los efectos de la TIB en el hipocampo de ratas OVX, se reportó que la TIB incrementó la fosforilación de Akt a través de la fosforilación de PI3K permitiendo con ello la inhibición de GSK3 y la disminución en la hiperfosforilación de Tau [235].

En el caso de los animales tratados concomitantemente con TIB, la muerte neuronal puede que haya sido evitada por la prevención en la disminución de la fosforilación de

Akt en la Ser473 al no presentarse el EO crónico (**Figura 6.**); y con ello pudiendo activar factores para la supervivencia de las neuronas (**Figura 7.**).

Para el mantenimiento adecuado en la función de las cinasas previamente mencionadas, es necesaria la desfosforilación de estas una vez concluida su función. Las fosfatasas son enzimas del grupo de las esterasas que cataliza la eliminación de grupos fosfatos de algunos sustratos, dando lugar a la liberación de una molécula de ion fosfato y la aparición de un grupo hidroxilo en el lugar en el que se encontraba esterificado el grupo fosfato [67].

PP2A y PTEN se expresa en altos niveles en el cerebro, donde actúa sobre diversos sustratos y tienen diversos procesos celulares [67]. Estas proteínas actúa sobre la desfosforilación de Tau, GSK3 y Akt, siendo PP2a de manera directa y PTEN de manera indirecta [71].

Al igual que Akt, la actividad de estas fosfatasas depende del estado redox celular y por ello ser consideradas fosfatasas dependientes de Cys (CDP). A pH fisiológico, la Cys existe como un anión tiolato, que se requiere para su actividad de la fosfatasa. El estrés oxidativo produce modificaciones ya sea a través de un enlace disulfuro-intramolecular o por la S-nitrosilación de las Cys; las cuales inhiben significativamente las actividades de estas enzimas [218].

En el modelo de estrés oxidativo crónico inducido por O₃, se observó que la fosforilación de PP2a en la Tyr307 es disminuida a partir de los 15 días e incrementando ligeramente su fosforilación a los 30 días y disminuyendo nuevamente a los 60 días (**Figura 12.**).

Reportes previos indican que la fosforilación de la Tyr307 inactiva la PP2A y pudiendo generarse esta fosforilación a través de la forma activa de GSK3 β [236]. En nuestro estudio, aun cuando existe mayor cantidad de GSK3 β en su estado activo no se incrementó la fosforilación de la Tyr307.

Existen diversos estudios en los cuales se ha reportado que las EROS inactivan las proteínofosfatasas de Ser/Tyr por medio de la oxidación de residuos de cisteína catalíticos resultantes en la formación del ácido sulfónico (SOH solo enlace) intermedio que puede formar enlaces disulfuro o residuos de sulfenamida ; lo cual muy probablemente ocurra en este modelo aunque se necesitan se requieren más estudios para comprobar dicho efecto [218,237].

Con respecto a la recuperación momentánea de la fosforilación de PP2a, existe un reporte previo en el cual se informó en este modelo de estrés oxidativo un efecto similar en la tinción para DARPP-32 en la sustancia nigra y el estriado [182]. Estos aumentos en la fosforilación pueden deberse a que el organismo trata producir respuesta al estrés oxidativo incrementando transitoriamente esta fosforilación pero al continuar el insulto oxidativo se produce un nuevo decaimiento en la fosforilación a los 60 días

PTEN, la cual es una 3'-fosfatasa que convierte el PI(3,4)P₂ a PI(4)P y el PI(3,4,5)P₃ a PI(4,5)P₂, es activada de manera que las PI3K son inactivadas como resultado de los bajos niveles de PI(3,4,5)P₃ y no pueden promover la fosforilación de Akt. Debido al decremento de la pAkt se reduce la fosforilación reducida de GSK-3 [238,239].

Asimismo, existen reportes que indican que la cola de PTEN es necesaria para mantener la estabilidad así como para la regulación de su actividad; la cual depende de las fosforilaciones ocurridas en la cola de PTEN; sobre todo en tres residuos (S380, T382, T383) [240]. En el modelo de estrés oxidativo crónico, se observó una disminución paulatina en la fosforilación en la Ser380 de PTEN, lo cual indica que la proteína no se encuentra de manera estable modificando con ello su actividad fosfatasa (**Figura 12.**).

Estos resultados indican que la exposición crónica al O₃ induce un estado de estrés oxidativo en el hipocampo de ratas adultas; que causa un aumento en el estado de fosforilación de la proteína tau, y que está relacionado con el aumento en la actividad de GSK3β y la inactivación de Akt y las fosfatasas. La inactivación de Akt impide que

sea fosforilada GSK3 β en la Ser9 y pasar a un estado inactivo; y la inactivación de las fosfatasas impide que Tau sea desforilada y con ello su hiperfosforilación. El daño producido por la fosforilación con lleva al aumento del déficit cognitivo en estos animales; y que la TIB puede evitar todos los efectos producidos por el estrés oxidativo crónico.

En general, este trabajo nos demuestra los efectos neuroprotectores relevantes de la TIB sobre un modelo de estrés oxidativo crónico *in vivo*, lo cual podría beneficiar a las usuarias para prevenir la neurodegeneración en la vejez así como el padecimiento de enfermedades neurodegenerativas

8. CONCLUSIONES

- La exposición crónica a ozono con 0.25 ppm constantes durante 4 horas por día genera un proceso de estrés oxidativo en el hipocampo de los animales, provocando pérdida neuronal en la zona CA3 del hipocampo, déficit cognitivo en la memoria de corto y de largo plazo, disfunciones en la actividad motora; y siendo todos estos efectos disminuidos por el tratamiento previo a la exposición a O₃ con 1 mg//kg de TIB.
- La exposición crónica a O₃ con 0.25 ppm constantes durante 4 horas por día incrementó el estado de fosforilación de la proteína Tau, generando una hiperfosforilación modulada por la regulación de GSK3 β ; por la disminución en la fosforilación de Akt así como la inactivación y pérdida de la estabilidad de las fosfatasas PP2A y PTEN en el hipocampo de la ratas y estos efecto se evitaron con el tratamiento previo a la exposición a O₃ con 1 mg/kg de TIB.

9. REFERENCIAS

1. IUPAC. radical (free radical). In: Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson, editor. Compendium of Chemical Terminology. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997. p. 1115.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York, NY: Oxford University Press; 1999.
3. Dawson VL, Dawson TM. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death and Differ.* 1996;3(1):71–8.
4. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:1424–1437.
5. Segal A, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci.* 1993;18:43–47.
6. Babior B. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93:1464–76.
7. Babior BM, El Benna J, Chanock SJ, Smith RM. The NADPH oxidase of leukocytes: The respiratory burst oxidase. *Oxidative stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p. 737–83.
8. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS letters.* 2000;475(2):121–6.
9. Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(2):C246–C256.
10. Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* 2004;10(5):387–399.
11. Berlett B, Stadtman E. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J Biol Chem.* 1997;272(33):20313–20316.
12. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231–55.
13. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992;59:1609–1623.

14. Peuchen S, Bolanos JP, Heales SJ, Almeida A, Duchen MR, Clark JB. Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1997;52:261–81.
15. Xiao-dong P, Yuan-gui Z, Nan L, Jing Z, Qin-yong Y, Hua-pin HP H, Xiao-chun C. Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* BioMed Central; 2011;6:45.
16. Sevcsik E, Trexler AJ, Dunn JM, Rhoades E. Allosteric in a disordered protein: oxidative modifications to α -synuclein act distally to regulate membrane binding. *J Am Chem Soc.* 2011;133(18):7152–7158.
17. Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and a Cell Therapy Approach to Treatment. *Autoimmune diseases.* SAGE-Hindawi Access to Research; 2011;164608:11.
18. Floyd R, Towner R, He T, Hensley K, Maples K. Translational research involving oxidative stress and diseases of aging. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):931–41.
19. Bruel-Jungerman, E. Lucassen PJ, Francis F. Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):379–388.
20. Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzmán R, López-Vidal Y, Rodríguez-Martínez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Pérez M, Raisman-Vozari R. Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicol Sci.* 2010 Jan;113(1):187–97.
21. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews.* 2002;82(1):47–95.
22. Matus A. Neurofilament protein phosphorylation--where, when and why. *Trends Neuroscience.* 1988;11:291–2.
23. Avila J, Domínguez J, Díaz-Nido J. Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *International Journal of Developmental Biology.* 1994;38:13–25.
24. Buée L, Bussi  re T, Bu  e-Scherrer V, Delacourte A, Hof PRR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews.* 2000 Aug;33(1):95–130.

25. Avila J, Lim F, Moreno F, Belmonte C, Cuello AC. Tau function and dysfunction in neurons: its role in neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*. 2002;25:213–31.
26. Medeiros R, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2011 Oct;17(5):514–24.
27. Dinsmore JH, Solomon F. Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell*. 1991;64:817–26.
28. Cáceres A, Kosik KS. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature*. 1990;343(6257):461–3.
29. González-Billault C, Engelke M, Jiménez-Mateos E, Wandosell F, Cáceres A, Avila J. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res*. 2002;67(6):713–9.
30. Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*. 1994;369(6480):488–491.
31. Georgieff IS, Liem RK, Couchie D, Mavilia C, Nunez J, Shelanski ML. Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *Journal of Cell Science*. 1993;105(Pt. 3):729–37.
32. Chin SS, Goldman JE. Glial inclusions in CNS degenerative split personality. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1999;31:817–36.
33. Gu Y, Oyama F, Ihara Y. Tau is widely expressed in rat tissues. *Journal of Neurochemistry*. 1996;67 (1996):1235–1244.
34. Kosik KS, Crandall JE, Mufson EJ, Neve RL. Tau in situ hybridization in normal and Alzheimer brain: localization in the somatodendritic compartment. *Annals of Neurology*. 1989;26:352–61.
35. Andreadis A, Wagner BK, Broderick JA, Kosik KS. A Tau promoter region without neuronal specificity. *Journal of Neurochemistry*. 1996;66:2257–63.
36. Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RK, Shelanski ML, Niñez J. Primary structure of high Tau present in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89:4378–81.

37. Francon J, Lennon AM, Fellous A, Mareck A, Pierre M, Nunez J. Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development. *European Journal of Biochemistry*. 1982;129:465–471.
38. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 1989;3(4):519–26.
39. Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DWJ. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Molecular and Cellular Biology*. 1989;9(4):1381–8.
40. Bohm KJAHS (1990) 357–364., Vater W, Steinmetzer P, Kusnetsov SA, Rodionov VI, Gelfand VI, Unger E. Effect of MAP1, MAP2, and tau proteins on structural parameters of tubulin assemblies. *Acta histochemica Supplementband*. 1990;39:357–64.
41. Butner KA, Kirschner MW. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol*. 1991;115:717–30.
42. Lee G, Neve RL, Kosik KS. The microtubule binding domain of tau protein,. *Neuron*. 1989;2:1615–1624.
43. Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y. Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *The Journal of Cell Biology*. 1996;132:667–79.
44. Spillantini M, Bird T, Ghetti B. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: A new group of tauopathies. *Brain Pathology*. 1998;8:387–402.
45. Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *The Journal of cell biology*. 1988;107:1449–59.
46. Brandt R, Léger J, Lee G. Interaction of Tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol*. 1995;131:1327–40.

47. Rendon A, Jung D, Jancsik V. Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochemical Journal*. 1990;269:555–6.
48. Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 1992;360:674–7.
49. Luna-Muñoz J, Zamudio S, De Cruz F, Minjarez-Vega B, Mena R. Acción protectora de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 2012;13(3):160–7.
50. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin M-L, Yardin C, Terro F. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*. Elsevier B.V.; 2013 Jan;12(1):289–309.
51. Gendron TF, Petrucelli L. The role of tau in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*. 2009;4(13):1–19.
52. Avila J. Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Letters*. 2006;580(12):2922–7.
53. Kopke E, Tung YY, S S, Alonso AAC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Shaikh S, Grundke-iqbals I. Microtubule-associated protein tau: Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1993;268(18):24374–24384.
54. Drubin DG, Kirschner MW. Tau protein function in living cells. *The Journal of cell biology*. 1986 Dec;103(6 Pt 2):2739–46.
55. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Bloom GS, Mumby MC. Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. *Neuron*. 1996 Dec;17(6):1201–7.
56. Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Alonso ADC, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta neuropathologica*. 2009 Jul;118(1):53–69.
57. Alonso A del C. Mecanismo de la neurodegeneración inducida por la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer y taupatías relacionadas. *Alzheimer Realidades e Investigación en demencia*. 2009;42:23–31.

58. Sánchez M, Alvarez-Tallada V, J. A. [The microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases. Tauopathies]. *Revista de Neurología*. 2001;31:169–77.
59. Langa E, Cuadros R, Villanueva N. Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010;2:211–5.
60. Balaraman Y, Limaye a R, Levey a I, Srinivasan S. Glycogen synthase kinase 3beta and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *CMLS*. 2006 Jun;63(11):1226–35.
61. Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR. Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain research Molecular brain research*. 2005 Jun 13;137(1-2):193–201.
62. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Progress in neurobiology*. 2001 Nov;65(4):391–426.
63. Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *British Journal of Pharmacology*. 2009 Mar;156(6):885–98.
64. El Khoury NB, Gratuze M, Papon M-A, Bretteville A, Planel E. Insulin dysfunction and Tau pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014 Jan;8:22.
65. Hernández F, de Barreda EG, Fuster-Matanzo A, Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J. The role of GSK3 in Alzheimer disease. *Brain research bulletin*. 2009 Oct 28;80(4-5):248–50.
66. Jayapalan S, Natarajan J. The role of CDK5 and GSK3B kinases in hyperphosphorylation of microtubule associated protein tau (MAPT) in Alzheimer's disease. *Bioinformation*. 2013;9(20):1023–30.
67. Braithwaite SP, Stock JB, Lombroso PJ, Nairn AC. Protein phosphatases and Alzheimer's disease. 1st ed. *Progress in molecular biology and translational science*. Elsevier Inc.; 2012.
68. Van Hoof C, Goris J. Protein phosphatases. In: Marks F, editor. *Protein Phosphorylation*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2007. p. 329–66.

69. Simpkins JW, Yi KD, Yang S-H. Role of protein phosphatases and mitochondria in the neuroprotective effects of estrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Elsevier Inc.; 2009 Jul;30(2):93–105.
70. Yu Y, Run X, Liang Z, Li Y, Liu F, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong C-X. Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *Journal of neurochemistry*. 2009 Mar;108(6):1480–94.
71. Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin M-L, Terro F. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing research reviews*. Elsevier B.V.; 2013 Jan;12(1):39–49.
72. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*. 2001;353:417–439.
73. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings B a. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in biochemical sciences*. 1999 May;24(5):186–91.
74. Qian W, Shi J, Yin X, Iqbal K, Grundke-iqbal I, Gong C. PP2A Regulates Tau Phosphorylation Directly and also Indirectly via Activating GSK-3 β . *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;19:1221–9.
75. Braak H, Braak E. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathology*. 1991;1:213–216.
76. Hernández F, Gómez E, Barreda D, Fuster-matanzo A, Lucas JJ, Avila J, Gómez de Barreda E. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental neurology*. Elsevier Inc.; 2010 Jun;223(2):322–5.
77. Engmann O, Giese KP. Crosstalk between Cdk5 and GSK3beta: Implications for Alzheimer's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2009 Jan;2(May):2.
78. Avila J, León-Espinosa G, García E, García-Escudero V, Hernández F, Defelipe J. Tau Phosphorylation by GSK3 in Different Conditions. *IJAD*. 2012 Jan;2012:578373.
79. Hernández Pérez F, Ávila de Grado J, Lucas Lozano JJ. Modelo de enfermedad neurodegenerativa. *Oficina Española de Patentes y Marcas*. 2007. p. 1–23.
80. Engel T, Lucas J, Gomez-Ramos P, Moran M, Avila J, Hernandez F. Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau

- polymerization and neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*. 2006;27:1258–68.
81. Alonso A, Grundke-Iqbal I, Ibarra H, Iqbal K. Abnormal phosphorylation of Tau and mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated protein 1 and 2 and the disassembly of microtubule by abnormal Tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94:298–303.
 82. Filipcik P, Cente M, Kucerak J, Kovacech B, Skrabana R, Novak M. Tau protein aggregates induce dysregulation of gene expression in specific brain regions of rat model of tauopathy. *Alzheimer's & Dementia. The Alzheimer's Association*; 2010 Jul;6(4):S219.
 83. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 Jul;83(13):4913–7.
 84. Arendt T, Holzer M, Fruth R, Brückner MK, Gärtner U. Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of β /A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A. *Neuroscience*. 1995;69(3):691–8.
 85. Goldbaum O, Richter-Landsberg C. Activation of PP2A-like phosphatase and modulation of tau phosphorylation accompany stress-induced apoptosis in cultured oligodendrocytes. *Glia*. 2002 Dec;40(3):271–82.
 86. Lee H-G, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Smith MA. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends in molecular medicine*. 2005 Apr;11(4):164–9.
 87. Sánchez MP, Alvarez-Tallada V, Avila J. [The microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases. Tauopathies]. *Revista de Neurología*. 2001;33(02):169–77.
 88. García T, Jay D. Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer. *Gac Méd Méx*. 2004;140(3):329–33.
 89. Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *IJAD*. 2012 Jan;2012:731526.

90. Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98:6923–8.
91. Hernandez F. GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiology of Aging*. 2003 Dec;24(8):1087–94.
92. Lang E, Szendrei GI, Lee VM, L. Jr. Otvos. Immunological and conformation characterization of a phosphorylated immunodominant epitope on the paired helical filaments found in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;187:783–790.
93. Bramblett GT, Coedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. Abnormal Tau Phosphorylation at Ser396 in Alzheimer ' s Disease Recapitulates Development and Contributes to Reduced Microtubule Binding. *Neuron*. 1993;10:1089–99.
94. Frost D, Meechoovet B, Wang T, Gately S, Giorgetti M, Shcherbakova I, Dunckley T. β -carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PloS one*. 2011 Jan;6(5):e19264.
95. Alonso ADC, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Aug 13;279(33):34873–81.
96. Melov S, Adlard P a, Morten K, Johnson F, Golden TR, Hinerfeld D, Schilling B, Mavros C, Masters CL, Volitakis I, Li Q-X, Laughton K, Hubbard A, Cherny R a, Gibson B, Bush AI. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PloS one*. 2007 Jan;2(6):e536.
97. Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2014 Feb;40(2):121–35.
98. Zambrano CA, Egana JT, Nunez MT, Maccioni RB, Gonzalez-Billault C. Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of Cdk5 and PP1. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:1393–402.

99. Shea TB, Prabhakar S, Ekinci FJ. β -Amyloid and ionophore A23187 evoke tau hyperphosphorylation by distinct intracellular pathways: differential involvement of the calpain/protein kinase C system. *Journal of Neuroscience Research*. 1997;49:759–68.
100. Xie HQ, Johnson G V. Calcineurin inhibition prevents calpain-mediated proteolysis of tau in differentiated PC12 cells. *J Neurosci Res*. 1998;53:153–164.
101. Hartigan JA, Johnson GV. Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3 β -dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:21395–21401.
102. Ermak G, Harris CD, Battocchio D, Davies KJA. RCAN1 (DSCR1 or Adapt78) stimulates expression of GSK3. *The FEBS journal*. 2006;273:2100–2109.
103. Poppek D, Keck S, Ermak G, Jung T, Stolzing A, Ullrich O, Davies KJ a, Grune T. Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochem J*. 2006 Dec 15;400(3):511–20.
104. Olivieri G, Baysang G, Meier F, Müller-Spahn F, Stähelin H, Brockhaus M, Brack C. N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity: effects on beta-amyloid secretion and tau phosphorylation. *Journal of Neurochemistry*. 2001;76(1):224–33.
105. Lopresti P, Konat GW. Hydrogen peroxide induces transient dephosphorylation of tau protein in cultured rat oligodendrocytes. *Neurosci Lett*. 2001;311(2):142–4.
106. Taga M, Mouton-Liger F, Paquet C, Hugon J. Modulation of oxidative stress and tau phosphorylation by the mTOR activator phosphatidic acid in SH-SY5Y cells. *FEBS letters*. 2011;585(12):1801–6.
107. Petroni D, Tsai J, Agrawal K, Mondal D, George W. Low-Dose Methylmercury-Induced Oxidative Stress, Cytotoxicity, and Tau-Hyperphosphorylation in Human Neuroblastoma (SH-SY5Y) Cells. *Environmental Toxicology*. 2012;27(9):549–55.
108. Olivieri G, Brack C, Müller-Spahn F, Stähelin HB, Herrmann M, Renard P, Brockhaus M, Hock C. Mercury induces cell cytotoxicity and Oxidative stress

- and Increases Beta- Amyloid Secretion and Tau Phosphorylation in SHSY5Y Neuroblastoma Cells. *J Neurochem*. 2000;74(1):231–6.
109. Lovell MA, Xiong S, Xie C, Davies P, Markesbery WR. Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2004 Dec;6:659–671.
 110. Su B, Wang X, Lee H-G, Tabaton M, Perry G, Smith MA, Zhu X. Chronic oxidative stress causes increased tau phosphorylation in M17 neuroblastoma cells. *Neurosci Lett*. 2010 Jan 14;468(3):267–71.
 111. Mattson MP, Fu W, Waeg G, Uchida K. 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Neuroreport*. 1997 Jul 7;8(9-10):2275–81.
 112. Gomez-Ramos A, Díaz-Nido J, Smith MA, Perry G, Avila J. Effect of the Lipid Peroxidation Product Acrolein on Tau Phosphorylation in Neural Cells. *J Neurosci Res*. 2003 Mar 15;71(6):863–870.
 113. Dang TN, Arseneault M, Murthy V, Ramassamy C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. *Current Molecular Pharmacology*. 2010;3(2):66–78.
 114. Pacifici RE, Kono Y, Davies KJA. Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:15405–11.
 115. Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJA. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:2344–51.
 116. Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:15504–9.
 117. North American Menopause Society, North American Menopause Society. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2010;17:242–55.

118. North American Menopause Society. The 2012 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2012;19:257–71.
119. Ziaei S, Moghasemi M, Faghihzadeh S. Comparative effects of conventional hormone replacement therapy and tibolone on climacteric symptoms and sexual dysfunction in postmenopausal women. *Climacteric*. 2010;13(2):147–56.
120. Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Progress in Neurobiology*. 1994;44(3):279–307.
121. Ferreira A, Caceres A. Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J Neurosci* 1991; 392-400. *Journal of Neuroscience*. 1991;11(2):392–400.
122. Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly *. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984;259(8):5301–5.
123. Cardona-Gomez P, Perez M, Avila J, Garcia-Segura L, Wandosell F. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci*. 2004;25:363–73.
124. Tang M, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*. 1996;348:429–32.
125. Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen Therapy in Postmenopausal Women. *JAMA*. American Medical Association; 1998 Mar 4;279(9):688.
126. Costa MM, Reus VI, Wolkowitz OM, Manfredi F, Lieberman M. Estrogen replacement therapy and cognitive decline in memory-impaired postmenopausal women. *Biol Psychiat*. 1999 Jul 15;46(2):182–8.
127. Reed MJ, Kloosterboer HJ. Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR). *Maturitas*. 2004;48:S4–S6.
128. Cummings, Steven R. Ettinger B, Delmans P, Kenemans P, Stathopoulos V, Verweij P, Mol-arts M, Christiansen C, Bilezikian J, Kerzberg EM, Johnson S,

- Zanchetta J, Grobbee DE, Ph D. The Effects of Tibolone in Older Postmenopausal Women. *N Engl J Med*. 2008;697–708.
129. Blom MJ, Groot-Wassink M, Ederveen AG., Kloosterboer HJ, Lambert JGD, Goos HJT. The metabolism of Org OD14 and its derivatives in rat and human target tissues for hormone replacement therapy. In: Blom MJ, editor. *Steroids and steroid analogues for hormone replacement therapy; metabolism in target tissues*. Utrecht, Holanda; 2001. p. 63–80.
130. Markiewicz L, Gorpide E. In vitro evaluation of estrogenic, estrogen antagonistic and progestagenic effects of a steroidal drug (Org OD-14) and its metabolites on human endometrium. *J Steroid Biochem*. 1990;35(5):535–41.
131. Reed MJ. Role of enzymes and tissue-specific actions of steroids. *Maturitas*. 2004;48(Suppl 1):S18–23.
132. Ma L, Hofling M, Masironi B, von Schoultz B, Cline JM, Sahlin L. Effects of tibolone and conventional HRT on the expression of estrogen and progesterone receptors in the breast. *Maturitas* 2008: 345-9. 2008;61(4):345–9.
133. Bjarnason NH, Bjarnason K, Haarbo J, Rosenquist C, Christiansen C. Tibolone: prevention of bone loss in the late postmenopausal women. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 1996;81(7):2419–22.
134. Berning B, Kuijk C V., Kuiper JW, Bennink HJ, Kicovic PM, Fauser BC. Effects of two doses of Tibolone on trabecular and cortical bone loss in early postmenopausal women: a two-year randomized, placebo-controlled study. *Bone*. 1996 Oct;19(4):395–399.
135. Gallagher JC, Baylink DJ, Freeman R, McClung M. Prevention of bone loss with tibolone in postmenopausal women: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding studies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001 Oct;86(10):4717–26.
136. Garefalakis M, Hickey M. Role of androgens, progestins and tibolone in the treatment of menopausal symptoms: a review of the clinical evidence. *Clin Interv Aging*. 2008;3(1):1–8.
137. Verheul HA, Blok LJ, Burger CW, Hanifi-Moghaddam, P. Kloosterboer HJ. 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.* 2007;14:160–8.
138. Kloosterboer HJ. Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001;76(1-5):231–8.
 139. Kloosterboer HJ. Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas.* 2004 Aug 30;48(S1):S30–S40.
 140. Sherwin BB. Estrogen and Cognitive Functioning in Women. *Endocrine Reviews.* 2003 Apr 1;24(2):133–51.
 141. Genazzani AR, Pluchino N, Bernardi F, Centofanti M, Luisi M. Beneficial effect of tibolone on mood, cognition, well-being, and sexuality in menopausal women. *Neuropsychiatr Dis Treat.* Dove Medical Press; 2006;2(3):299–307.
 142. Fluck E, File SE, Rymer J. Cognitive effects of 10 years of hormone-replacement therapy with tibolone. *J Clin Psychopharmacol.* 2002;22(1):62–7.
 143. Albertazzi P, Natale V, Barbolini C, Teglio L, Di Micco R. The effect of tibolone versus continuous combined norethisterone acetate and oestradiol on memory, libido and mood of postmenopausal women: a pilot study. *Maturitas.* 2000;36:223–9.
 144. Palomba S, Orio F, Falbo A, Oppedisano R, Tolino A, Zullo F. Tibolone reverses the cognitive effects caused by leuprolide acetate administration, improving mood and quality of life in patients with symptomatic uterine leiomyomas. *Fertil Steril.* 2008;90(1):165–73.
 145. Gibbs R, Nelson D, Anthony M, Clarkson T. Effects of long-term hormone replacement and of tibolone on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the brains of ovariectomized. *Neuroscience.* 2002;113(4):907–14.
 146. Aguiar R, Dickel O, Cunha R. Estradiol valerate and tibolone: effects on memory. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006 Dec;85(4):689–96.
 147. Espinosa-Raya J, Neri-Gomez T, Orozco-Suarez S, Campos MG, Guerra-Araiza C. Chronic administration of tibolone modulates anxiety-like behavior and enhances cognitive performance in ovariectomized rats. *Horm and Behav.* Elsevier B.V.; 2012 Jan;61(1):76–83.

148. Aguiar R De, Dickel O, Cunha R. Estradiol valerate and tibolone: effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology*. 2008 Oct;9(5):285–98.
149. Hofling M, Carlström K, Svane G, Azavedo E, Kloosterboer H, Von Schoultz B. Different effects of tibolone and continuous combined estrogen plus progestogen hormone therapy on sex hormone binding globulin and free testosterone levels--an association with mammographic density. *Gynecol Endocrinol*. 2005;20(2):110–5.
150. Qiu J, Bosch MA, Rønnekleiv OK, Kloosterboer HJ, Kelly MJ. Tibolone Rapidly Attenuates the GABAB Hypothalamic Neurones Response in Hypothalamic Neurones. *J Neuroendocrinol*. 2009;20(12):1310–8.
151. Pinto-Almazán R, Calzada-Mendoza CC, Campos-Lara MG, Guerra-Araiza C. Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. *J Neurosci Res*. 2012 Apr;4(4):878–86.
152. Ceylan U, Akhan S, Bastu E, Gungor-Ugurlucan, F Iyibozkurt A, Topuz S. Comparison of tibolone and 17beta-estradiol administration on the expression of zonula occludens-1, occludin, glial fibrillary acidic protein and c-fos levels in the brain cortex and hippocampus of female rats. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33(5):505–10.
153. Reznikov KY. Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. 1991 Jan;122:1–74.
154. Ramón y Cajal Junquera S. *Histología del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, Volume 1. Martínez Murillo R, Ramón y Cajal Junquera S, editors. Editorial CSIC - CSIC Press; 2007.
155. Lorente De Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie*. 1934;46:113–7.
156. Isaacson RL. Hippocampus. Adelman, G. *Encyclopedia of Neurosciences*. Birkhäuser Boston; 1987. p. 492—495.

157. Goodman PG, Dockery DW, Clancy L. Cause-Specific Mortality and the Extended Effects of Particulate Pollution and Temperature Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 2003 Nov 12;112(2):179–85.
158. Borja-Aburto VH, Loomis DP, Bangdiwala SI, Shy CM, Rascon-Pacheco RA. Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico City. *American journal of epidemiology*. 1997 Feb 1;145(3):258–68.
159. Rivas-Arancibia S, Vazquez-Sandoval R, Gonzalez-Kladiano D, Schneider-Rivas S, Lechuga-Guerrero A, Álvaro L-G. Effects of Ozone Exposure in Rats on Memory and Levels of Brain Dismutase, Pulmonary Superoxide. *Environmental Research*. 1998;76(1):33–9.
160. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1992 Jun;119(6):598–620.
161. Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Borgonio-Pérez G, Hiriart-Urdanivia M, Verdugo-Diaz L, Durán-Vázquez A, Colin-Baranque L, Avila-Costa MR. Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. *Environ Res*. 2000;82(1):7–17.
162. Paz C, Huitron-Resendiz S. The effects of ozone exposure on the sleep-wake cycle and serotonin contents in the pons of the rat. *Neurosci Lett*. 1996 Feb 2;204(1-2):49–52.
163. Rivas-Arancibia S. Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharmacol Biochem and Behav*. 2003 Mar;74(4):891–900.
164. Rivas-Arancibia S, Gallegos-Ríos C, Gomez-Crisostomo N, Ferreira-Garcidueñas E, Flores-Briseño D, Navarro L, Rodríguez-Martínez E. Oxidative stress and neurodegenerative disease. In: Chuen-Chung Chang R, editor. *Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring*. 2011. p. 53–88.
165. Guerrero AL, Dorado-Martínez C, Rodriguez A, Pedroza-Ríos K, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *NeuroReport*. 1999;10(8):1689–92.
166. Guevara-Guzmán R, Arriaga V, Kendrick KM, Bernal C, Vega X, Mercado-Gómez OF, Rivas-Arancibia S. Estradiol prevents ozone-induced increases in

- brain lipid peroxidation and impaired social recognition memory in female rats. *Neuroscience*. IBRO; 2009 Mar 31;159(3):940–50.
167. Angoa-Pérez M, Jiang H, Rodríguez A, Lemini C, Levine R, Rivas-Arancibia S. Estrogen counteracts ozone-induced oxidative stress and nigral neuronal death. *Neuroreport*. 2006;17(6):629–33.
168. Behl C, Moosmann B, Manthey D, Heck S. The female sex hormone oestrogen as neuroprotectant: activities at various levels. *Novartis Found Symp*. 2000;230:221–234; discussion 234–238.
169. Bednarek-Tupikowska G. Antioxidant properties of estrogens. *Ginekol Pol*. 2002;73(1):61–7.
170. Dorado-Martínez C, Paredes-Carbajal C, Mascher D, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels, in rats. *International Journal of Neuroscience*. 2001;108(3-4):149–61.
171. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. Elsevier Science & Technology Books; 2007.
172. Crețu DI, Sovrea A, Ignat RM, Filip A, Bidian C, Crețu A. Morpho-pathological and physiological changes of the brain and liver after ozone exposure. *Rom J Morphol Embryol*. 2010 Jan;51(4):701–6.
173. Health Canada. *Human Health Effects of Ozone: Update in Support of the Canada-Wide Standards for Particulate Matter and Ozone*. Canada H, editor. 2004.
174. Colín-Barenque L, Avila-Costa MR, Fortoul T, Rugerio-Vargas C, Machado-Salas JP, Espinosa-Villanueva J, Rivas-Arancibia S. Morphologic alteration of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neurosci Lett*. 1999;274(1):1–4.
175. Martínez-Lazcano JG-GE, Del Carmen Rubio M, Franco-Pérez J, Custodio V, Hernández-Cerón M, Livera C, Paz C. The effects of ozone exposure and associated injury mechanisms on the central nervous system. *Rev Neurosci*. 2013;24(3):337–52.

176. Sunil V, Vayas K, Massa C, Gow A, Laskin J, Laskin D. Ozone-induced injury and oxidative stress in bronchiolar epithelium are associated with altered pulmonary mechanics. *Toxicol Sci.* 2013;133(2):309–19.
177. Groves A, Gow A, Massa C, Laskin J, Laskin D. Prolonged injury and altered lung function after ozone inhalation in mice with chronic lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(6):776–83.
178. Gackière F, Saliba L, Baude A, Bosler O, Strube C. Ozone inhalation activates stress-responsive regions of the CNS. *J Neurochem.* 2011;117(6):961–972.
179. Zhong Z, Zeng T, Xie K, Zhang C, Chen J, Bi Y, Zhao X. Elevation of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde modified protein levels in cerebral cortex with cognitive dysfunction in rats exposed to 1-bromopropane. *Toxicology.* 2013;306:16–23.
180. Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas JP, Espinosa-Villanueva J, Rugerio-Vargas C, Borgonio G, Dorado C, Rivas-Arancibia S. Motor impairments in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat striatum and prefrontal cortex. *International Journal of Neuroscience.* 2001;108(3-4):193–200.
181. Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas P, Espinosa-Villanueva J, Rugerio-Vargas C, Rivas-Arancibia S. Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci Lett.* 1999 Jul 30;270(2):107–9.
182. Pereyra-Muñoz N, Rugerio-Vargas C, Angoa-Pérez M, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *J Chem Neuroanat.* 2006 Feb;31(2):114–23.
183. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2007;85(14):3036–40.
184. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* Elsevier; 2003;42(4):318–43.
185. Perluigi M, Coccia R, Butterfield D. 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17:1590–609.

186. Gibbs RB, Edwards D, Lazar N, Nelson D, Talameh J. Effects of long-term hormone treatment and of tibolone on monoamines and monoamine metabolites in the brains of ovariectomised, Cynomologous monkeys. *J Neuroendocrinol.* 2006 Sep;18(9):643–54.
187. Celik O, Erdem G, Hascalik S. Resonance spectroscopic comparison of the effects of resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy stilbene) to conjugated equine estrogen, tibolone and raloxifene on ovariectomized. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 May 1;120(1):73–9.
188. Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Farfán-García ED, Rodríguez-Martínez E, Guerra-Araiza C. Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure. *REV NEUROL.* 2014;58(10):441–9.
189. Genazzani A, Bernardi F, Pluchino N. Effect of tibolone administration on central and peripheral levels of allopregnanolone and μ -endorphin in female rats. *Menopause.* 2006;13(1):57–64.
190. Vural P, Akgül C, Canbaz M. Effects of menopause and tibolone on antioxidants in postmenopausal women. *Ann Clin Biochem.* 2005;42(Pt 3):220–3.
191. Jones B. Neurodegenerative disease: Oxidative stress in cells near amyloid plaques linked to neuronal death. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(6):300.
192. Ramezani A, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, Ghorbanian MMT, Salmani MEM, Abrari K. Neuroprotective effects of the 17 β -estradiol against ethanol-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological and behavioral changes. *Pharmacol Biochem Behav.* Elsevier Inc.; 2011;100, 144-5(1):144–51.
193. Verheul HAM, Kloosterboer HJ. Metabolism of exogenous sex steroids and effect on brain functions with a focus on tibolone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Dec;102(1-5):195–204.
194. Aronov S, Heicklen-Klein A, Ginzburg I. Tau promoter activity in neuronally differentiated P19 cells. *Brain Res.* 2009;874:1–9.
195. Hall GF, Chu B, Lee S, Y L, Yao J. The single neurofilament subunit of the lamprey forms filaments and regulates axonal caliber and neuronal size in vivo. *Cell Motil Cytoskel.* 1999;46(3):166–182.

196. Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *Journal of Cell Biology*. 2000;150:989–1000.
197. Castellani RJ, Nunomura A, Lee HG, Perry G, Smith MA. Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *Journal of Alzheimer Disease*. 2008;14:377–83.
198. Cash AD, Aliev G, Siedlak S. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *American Journal of Pathology*. 2003;162(5):1623–7.
199. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow E-M, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* [Internet]. 2002 Jan [cited 2014 Mar 26];103(1):26–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11837744>
200. García-Sierra F, Ghoshal N, Quinn B, Berry RW, Binder LI. Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* [Internet]. 2003 Apr [cited 2014 Apr 24];5(2):65–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719624>
201. Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Reynolds MR, Horowitz PM, Fu Y, Wang T, Cahill ME, Bigio EH, Berry RW, Binder LI. Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* [Internet]. 2005 Jul [cited 2014 Apr 24];26(7):1015–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748781>
202. Ghoshal N, García-Sierra F, Fu Y, Beckett LA, Mufson EJ, Kuret J, Berry RW, Binder LI. Tau-66: evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* [Internet]. 2001 Jun [cited 2014 Apr 3];77(5):1372–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389188>
203. Ermak G, Harris CD, Davies KJA. The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calpypressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *FASEB J*. 2002;16:814–24.

204. Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell M a. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2006 Aug;27(8):1094–9.
205. Hall GF, Chu B, Lee G, Yao J. Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an in vivo model of neurofibrillary degenerative disease. *J Cell Sci* [Internet]. 2000 Apr;113 (Pt 8:1373–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725221>
206. Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical journal* [Internet]. 2001 Oct 1;359(Pt 1):1–16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1222116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
207. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* [Internet]. 1995 [cited 2014 Mar 20];378(6559):785–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524413>
208. Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, Hernandez F, Anderton B, Rosenblum K, Bliss T, Cooke SF, Avila J, Lucas JJ, Giese KP, Stephenson J, Lovestone S. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *The European journal of neuroscience*. 2007 Jan;25(1):81–6.
209. Schäfer M, Goodenough S, Moosmann B, Behl C. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta is involved in the resistance to oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Brain research* [Internet]. 2004 Apr 16 [cited 2013 Oct 29];1005(1-2):84–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044068>
210. Koh S-H, Kim SH, Kwon H, Kim JG, Kim JH, Yang K-H, Kim J, Kim SU, Yu H-J, Do BR, Kim KS, Jung HK. Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and GSK-3 mediated cytoprotective effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress-injured neuronal-differentiated N18D3 cells. *Neurotoxicology* [Internet]. 2004

- Sep [cited 2013 Oct 29];25(5):793–802. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288510>
211. Koh S-H, Lee Y-B, Kim KS, Kim H-J, Kim M, Lee YJ, Kim J, Lee KW, Kim SH. Role of GSK-3 β activity in motor neuronal cell death induced by G93A or A4V mutant hSOD1 gene. *The European journal of neuroscience* [Internet]. 2005 Jul [cited 2014 Apr 28];22(2):301–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16045483>
 212. Zhang Y-J, Xu Y-F, Liu Y-H, Yin J, Wang J-Z. Nitric oxide induces tau hyperphosphorylation via glycogen synthase kinase-3 β activation. *FEBS letters* [Internet]. 2005 Nov 7 [cited 2014 Apr 28];579(27):6230–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16253246>
 213. Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol Protects Mitochondria against Oxidative Stress through AMP-Activated Protein Kinase-Mediated Glycogen Synthase Kinase-3 α Inhibition Downstream of Poly (ADP- ribose) polymerase-LKB1 Pathway. 2009;76(4):884–95.
 214. Blair AS, Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Dec 17 [cited 2014 May 2];274(51):36293–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593919>
 215. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling*. Elsevier Inc.; 2011 Oct;23(10):1515–27.
 216. Durgadoss L, Nidadavolu P, Valli RK, Saeed U, Mishra M, Seth P, Ravindranath V. Redox modification of Akt mediated by the dopaminergic neurotoxin MPTP, in mouse midbrain, leads to down-regulation of pAkt. *FASEB J* [Internet]. 2012 Apr [cited 2014 May 4];26(4):1473–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198382>
 217. Leslie NR. The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxidants & redox signaling* [Internet]. 2006 [cited 2014 May 4];8(9-10):1765–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16987030>

218. Trachootham D, Lu W, Ogasawara M a, Nilsa R-DV, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling*. 2008 Aug;10(8):1343–74.
219. Wang X, Tao L, Hai CX. Redox-regulating role of insulin: the essence of insulin effect. *Molecular and cellular endocrinology* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Feb 26 [cited 2014 Apr 28];349(2):111–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878367>
220. Dai R, Xia Y, Mao L, Mei Y, Xue Y, Hu B. Involvement of PI3K/Akt pathway in the neuroprotective effect of Sonic hedgehog on cortical neurons under oxidative stress. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban* [Internet]. 2012 Dec [cited 2014 May 3];32(6):856–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271286>
221. Shi C, Wu F, Zhu XC, Xu J. Incorporation of beta-sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3beta signaling. *Biochimica et biophysica acta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 Mar [cited 2014 Apr 28];1830(3):2538–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266618>
222. Salinas M, Diaz R, Abraham NG, Ruiz de Galarreta CM, Cuadrado A. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Apr 18 [cited 2013 Apr 3];278(16):13898–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12578834>
223. Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Steckert A V, Mina F, Rosa DVF, Santana C V, Romano-Silva MA, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effects of lamotrigine on behavior, oxidative parameters and signaling cascades in rats exposed to the chronic mild stress model. *Neurosci Res* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society; 2013 Apr [cited 2013 Oct 29];75(4):324–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416280>
224. Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J, Inoue S, Kondo T. 17Beta-estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardiac H9c2

- cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 May 12 [cited 2014 May 3];281(19):13092–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549430>
225. Wang X. Epidermal Growth Factor Receptor-dependent Akt Activation by Oxidative Stress Enhances Cell Survival. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 May 5 [cited 2014 May 3];275(19):14624–31. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.19.14624>
 226. Rojo AI, Rada P, Egea J, Rosa AO, López MG, Cuadrado A. Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Molecular and cellular neurosciences* [Internet]. 2008 Sep [cited 2013 Oct 29];39(1):125–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18619545>
 227. Ikeyama S, Kokkonen G, Shack S, Wang X, Holbrook NJ. Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities 1. *The Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16:114–6.
 228. Kim HJ, Joe Y, Kong JS, Jeong S-O, Cho GJ, Ryter SW, Chung HT. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via ROS-dependent Akt signaling and inhibition of glycogen synthase kinase 3 β . *Oxidative medicine and cellular longevity* [Internet]. 2013 Jan;2013:306421. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3880761&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 229. Duarte AI, Proença T, Oliveira CR, Santos MS, Rego a C. Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes* [Internet]. 2006 Oct [cited 2014 May 2];55(10):2863–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17003354>
 230. Duarte AI, Santos P, Oliveira CR, Santos MS, Rego a C. Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3beta signaling pathways and changes in protein expression. *Biochimica et biophysica acta* [Internet]. 2008 Jun [cited 2014 May 2];1783(6):994–1002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348871>

231. Ramalingam M, Kim S-J. Insulin on hydrogen peroxide-induced oxidative stress involves ROS/Ca²⁺ and Akt/Bcl-2 signaling pathways. *Free radical research* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 May 5];48(3):347–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286466>
232. Wu Y, Shang Y, Sun S, Liang H, Liu R. Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* [Internet]. 2007 Aug [cited 2014 May 4];12(8):1365–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508273>
233. Leak RK, Liou AKF, Zigmond MJ. Effect of sublethal 6-hydroxydopamine on the response to subsequent oxidative stress in dopaminergic cells: evidence for preconditioning. *Journal of neurochemistry* [Internet]. 2006 Nov [cited 2014 May 4];99(4):1151–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16956375>
234. Quesada A, Lee BY, Micevych PE. Neuronal Neuroprotection Against a Unilateral Rat Model of. *Developmental neurobiology*. 2009;68(5):632–44.
235. Pinto-Almazán R. Efecto de la Tibolona sobre la Activación de la Proteína Asociada a Microtúbulos Tau y de la Cascada de Señalización GSK3/Akt/PI3K en el Hipocampo y en el Cerebelo de Ratas Hembra Adultas. 2008. p. 86.
236. Sontag J-M, Sontag E. Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease. *Frontiers in molecular neuroscience* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 May 5];7(March):16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3949405&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
237. Papaconstantinou J. Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;299(1):89–100.
238. Rickle A, Behbahani H, Ankarcrona M, Winblad B, Cowburn RF. PTEN, Akt, and GSK3 β signalling in rat primary cortical neuronal cultures following tumor necrosis factor- α and trans-4-hydroxy-2-nonenal treatments. *Journal of*

- neuroscience research [Internet]. 2006 Aug 15 [cited 2014 Apr 24];84(3):596–605. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16802321>
239. Endersby R, Baker SJ. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene* [Internet]. 2008 Sep 18 [cited 2014 May 5];27(41):5416–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794877>
240. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Molecular and cellular biology*. 2000 Jul;20(14):5010–8.

10. ANEXO I. ARTÍCULOS PUBLICADOS.

Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure

Rodolfo Pinto-Almazán, Selva Rivas-Arancibia, Eunice D. Farfán-García, Erika Rodríguez-Martínez, Christian Guerra-Araiza

Introduction. Oxidative stress increases brain lipid peroxidation, memory and motor deficits and progressive neurodegeneration. Tibolone, a treatment for menopausal symptoms, decreases lipid peroxidation levels and improves memory and learning.

Aim. To study the effect of chronic administration of tibolone on lipid peroxidation, memory and motor deficits in ozone induced oxidative stress.

Materials and methods. 100 male Wistar adult rats were randomly divided into 10 experimental groups: control (C) was exposed to an airstream for 60 days; C + tibolone, airstream exposure plus 1 mg/kg of tibolone for 60 days; groups 3-6 were exposed to ozone for 7, 15, 30, and 60 days, and groups 7-10 received 1 mg/kg of tibolone treatment by oral gavage for 7, 15, 30 and 60 days and were then exposed to ozone. We determined the effect of tibolone on memory and motor activity. Hippocampus was processed to determine the content of 4-hydroxynonenal and nitrotyrosine by Western blot. Four animals were perfused and processed for analysis of neuronal death.

Results. In the hippocampus, administration of 1 mg/kg of tibolone for 30 days prevented increased levels of lipid peroxidation and protein oxidation, whereas after 60 days prevented neuronal death in the CA3 region caused by exposure to ozone. Therefore, tibolone prevents cognitive deficits in short- and long-term memory on the passive avoidance task and prevents a decrease in exploratory behavior and an increase in freezing behavior.

Conclusion. Our results indicate a possible neuroprotective role of tibolone as a useful treatment to prevent oxidative stress neurodegeneration.

Key words. 4-hydroxynonenal. Hippocampus. Learning. Lipoperoxidation. Memory. Oxidative stress. Neurodegeneration. Nitrotyrosine. Ozone. Tibolone.

Introduction

Ozone (O₃) is a primary component of air pollution in large cities and due to the accumulation of photochemical smog [1-3]. Damage caused by O₃ exposure depends on the dose inhaled [1,4]. O₃ causes an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS), oxidation or peroxidation of biomolecules with loss of functional groups of proteins and cell damage or death [4-6].

When the O₃ level overwhelms the antioxidant defense systems in the lungs [7,8], ROS can then reach the central nervous system (CNS) through the bloodstream, causing oxidative stress (OS) [9-11], OS in the CNS plays a major role in neuronal death caused by severe vulnerability of the brain to a lost oxidation-reduction balance [12].

In the CNS, OS caused by O₃ increases lipoperoxidation (LPO) [13], with the olfactory bulb, hippocampus, striatum, cerebellum and prefrontal

cortex being the most vulnerable areas [14-18]. In the hippocampus also causes neuronal death [1] and can lead to impaired brain plasticity, resulting in learning, memory and motor deficits and ending in progressive neurodegeneration [1]. OS has also been described in the pathophysiology of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer and Parkinson [19,20].

It has been reported that the administration of several exogenous compounds, such as taurine [21], vitamin E [22] and estradiol (E₂) [23], have antioxidant effects and may decrease lipid peroxidation induced by O₃ exposure. E₂ also decreases neuronal death, cognitive deficit and impaired social recognition memory caused by exposure to O₃ in adult rats [23,24]. E₂ is likely to exert antioxidant activity through its inherent ability to scavenge ROS and may inhibit LPO [25,26]. However, it is well known that the chronic administration of E₂ alone and in combination with progestins as hormone therapy

Unidad de Investigación Médica en Farmacología; Hospital de Especialidades; Centro Médico Nacional Siglo XXI; Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS (R. Pinto-Almazán, E.D. Farfán-García, C. Guerra-Araiza). Departamento de Fisiología; Facultad de Medicina; Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM (S. Rivas-Arancibia, E. Rodríguez-Martínez). Escuela Superior de Medicina; Instituto Politécnico Nacional (E.D. Farfán-García). México DF, México.

Corresponding author:

Dr. Christian Guerra Araiza. Unidad de Investigación Médica en Farmacología. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Avda. Cuauhtémoc, 330. Colonia Doctores. Delegación Cuauhtémoc. C.P. 06720. México DF, México.

E-mail:

christianguerrea2001@gmail.com

Funding:

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree of R.P.A. at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at UNAM. This study was supported by FIS/IMSS project no. FIS/IMSS/PROT/G09/751 and FIS/IMSS/PROT/G11-2/1013 from IMSS. R.P.A. and E.D.F.G. received financial support from CONACyT and CIS/IMSS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments:

Special acknowledgment to R.M. Aguilar Ojeda for editing this paper.

Accepted:

30.10.13.

How to cite this paper:

Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Farfán-García ED, Rodríguez-Martínez E, Guerra-Araiza C. Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure. *Rev Neurol* 2014; 58: 441-9.

(HT) has side effects as endometrial and breast cancers and cardiovascular events [27,28].

Tibolone (TIB) is a selective tissue estrogenic activity regulator that is widely prescribed to treat menopausal symptoms and to prevent bone loss [29]. TIB is metabolized into three biologically active metabolites, the 3- α -hydroxyestrogenic metabolite, the 3- β -hydroxyestrogenic metabolite, and the Δ^4 -TIB, which display progestogenic and androgenic effects [30,31]. TIB metabolites circulate in inactive forms, and their conversion to bioactive forms depends on tissue-specific desulfation [32,33].

Previous reports have indicated that the 3- α - and 3- β -hydroxy-TIB are the predominant free metabolites in the brain tissues of ovariectomized (OVX) cynomolgus monkeys [32-34]. High doses of TIB (1 and 10 mg/kg) improved learning observed in T-maze compared to the vehicle. In this same study, in the hippocampus, the choline acetyl transferase content decreased with increasing doses of TIB, whereas the tryptophan hydroxylase content increased with doses of 1 and 10 mg/kg of TIB [35]. TIB causes less vaginal bleeding, breast tenderness, and mammographic density with cardiovascular safety not different from other HTs [27,28].

In premenopausal women, TIB administration has reversed the cognitive damage caused by leuprolide acetate and improved the mood and quality of life in patients receiving uterine leiomyoma treatment [36]. In hypothalamic neurons, TIB administration rapidly attenuated the response of γ -aminobutyric acid receptor B [37]. In the cortex and hippocampus of OVX rats, TIB decreased lipoperoxidation levels, produced greater total antioxidant capacity [38], and improved memory in a inhibitory avoidance task [39]. Another study reported more intense staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and c-fos in the brain cortex and hippocampus of female rats treated with TIB than in control animals [40]. In hippocampal and cerebellar tissues, the chronic administration of TIB significantly decreased the protein content of hyperphosphorylated tau and increased the levels of dephosphorylated tau, and these correlated with increases in the phosphorylated form of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) [41]. All these results indicate that the chronic administration of TIB may exert a neuroprotective effect.

However, the effects of the chronic administration of TIB on memory deficits and motor impairment in an OS rat model induced by O₃ exposure are unknown. Therefore, in this work, we analyzed the effect of administering TIB at different times on memory deficit and motor impairment using the passive avoidance task and the motor activity test.

We also analyzed the correlation of TIB treatment with the expression of OS markers and neuronal death in the male rat hippocampus.

The aim of this work was to study the effects of chronic administration of TIB on lipoperoxidation, memory and motor deficits, and neuronal death on a well-established noninvasive OS model using a chronic exposure of animals to low doses of O₃ similar to a day of high pollution in México City.

Materials and methods

Animals

One hundred male Wistar rats weighing 250-300 g were housed in acrylic boxes (five animals per cage) with free access to water and food (Purina, Minnetonka, MN) and kept in a clear air room maintained on an artificial 12 h light/dark cycle (lights on at 08:00 h). Animals were treated in accordance with the guidelines and requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki and those of the Ethical Committee of the Faculty of Medicine at the Universidad Nacional Autónoma de México.

Treatments

The animals were randomly divided into ten experimental groups, with ten animals per group. In the first group (C), ten animals were exposed to an airstream free of O₃ for 60 days; in the second group (C+TIB), ten animals were exposed to an airstream free of O₃ and received 1 mg/kg of TIB (Livial® Organon, Mexico) for 60 days. Groups 3, 4, 5, and 6 were exposed to O₃ for 7, 15, 30, and 60 days, respectively. Groups 7, 8, 9, and 10 received 1 mg/kg of TIB treatment by oral gavage for 7, 15, 30, and 60 days (O₃+TIB), respectively, and were then exposed to O₃. We selected this dose and time periods because previous studies have reported that TIB exerts effects on cognitive processes during the first two months of treatment with doses of 0.5 and 1 mg/kg [35,39].

O₃ exposure

Animals were put daily for 4 h, exposed to 0.25 ppm of O₃ inside a chamber with a diffuser connected to an ozone generator (5 L/s). The procedure used has been described elsewhere [1,17,21,24].

Air exposure

The same chamber was used when treating the con-

trol group where flow of ozone-free purified air was used [1,17,21,24].

Passive Avoidance Task (PAT)

The PAT described in reference [13] was employed. Training was performed in a conditioning chamber with two compartments of the same size (30 × 30 × 30 cm), one considered the safe compartment and the other the punishment compartment. They were separated by a guillotine-style door. In the safe compartment the floor consisted of an aluminum grill made of bars 0.5 cm in diameter separated by a distance of 1.5 cm. A stainless-steel layer covered the lateral walls and the floor of the punishment compartment. There was a gap of 1 cm in the middle of the floor. The floor was connected to a constant-current unit (Grass, Model PSIU6), which in turn was connected to a Grass stimulator (Model S48) that delivered 50 square pulses per second at an intensity of either 2 to 4 mA, with a duration of 5 ms per pulse for 5 s. Passive avoidance training of 10 rats per group with a 3 mA footshock was performed two hours following the last air or O₃ exposure. Either 10 min (short-term memory) or 24 h (long-term memory) after this training procedure, a retention test was performed.

Motor Activity Test (MAT)

The MAT described in reference [13] was employed. Immediately after air or ozone exposure had finished, animals were returned to their home cages. Two hours later, motor activity of each animal of each group was quantified. The home cage was positioned on a locomotion sensitive plate, while the animal remained inside it. Motor activity was measured using an electronic activity monitor (EAM; Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Ten minutes after having placed the cage on the plate, so as for the animal to adapt to the new location of the cage, motor activity was measured for 5 min. Quantification of the motor activity (exploratory and freezing) was carried out in all 10 animals of each group. The motor activity of the rats in the control groups was compared to that of the animals in the other experimental groups.

Western blot analysis

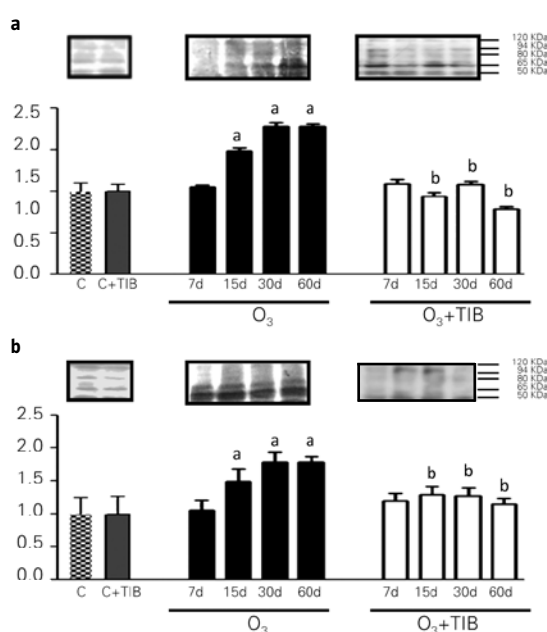
After analysis of the different behaviors, six animals from each group were randomly selected and killed by decapitation, and their hippocampus were dissected and processed for Western blotting. The

Western blot analysis described in reference [41] was employed. Tissue samples were homogenized in lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 5 mM EDTA, and 1% NP-40; Roche, Mannheim, Germany) supplemented with protease inhibitors (50 µg/ml of phenyl methyl sulfonyl fluoride, 10 µg/mL aprotinin, 25 µg/mL leupeptin, all from Sigma). Proteins were obtained by centrifugation for 15 min at 15,000 rpm at 4 °C, and the supernatants were quantified using a modified Bradford assay (BioRad, Munich, Germany). Proteins (30 mg) were resolved using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% SDS-PAGE) with a Mini-Protean system (BioRad) and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, formerly Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). To verify that the amount of protein was the same in each lane, the membrane was stained with Ponceu S solution (0.1% w/v in 5% acetic acid, Sigma) and washed with 0.05% Tween-20 Tris-buffered saline until the stain disappeared. The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk diluted in 0.05% Tween-20 Tris-buffered saline and incubated overnight with the primary antibodies. Pre-stained markers (BioRad) were included for size determination. The following antibodies were used: rabbit polyclonal antibody against nitrotyrosine (NT) (Abcam, diluted 1:1,000); mouse monoclonal antibody against 4-hydroxynonenal (4-HNE) (R&D, diluted 1:1,000). After incubation with the primary antibody, the membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Santa Cruz, diluted 1:10,000). The intensity of the protein bands was quantified by densitometry using a HP Scanner for capturing data and the Kodak 1D Image Analysis Software for densitometric analysis. Five immunoreactive bands were quantified (50, 65, 80, 94 and 120 kDa) in both oxidative stress markers. The sum of the optical density of the 5 bands was used to perform the corresponding graph. To minimize intra-assay variations, samples from all animal groups in each experiment were processed concurrently and under the same conditions.

Histological assessment

For histological assessment of hippocampal damage, the other four animals were perfused with 4% paraformaldehyde in PBS at the end of the last O₃ exposure. Brain slices containing the dorsal hippocampus were processed for paraffin embedding and coronal sections (10 µm) were stained with the Nissl technique. The number of remaining pyrami-

Figure 1. Examples of Western blots and effects of chronic exposure to O_3 and O_3 +TIB on NT and 4-HNE content in the hippocampus of rats. Animals were randomly divided into ten experimental groups, (C) animals exposed to an airstream for 60 days; C+TIB animals exposed to an airstream and received 1 mg/kg of TIB for 60 days. O_3 groups were exposed to O_3 for 7, 15, 30, and 60 days, respectively. O_3 +TIB groups received 1 mg/kg of TIB treatment for 7, 15, 30 and 60 days respectively, and were then exposed to O_3 . Bands immunodetected and densitometric analysis of NT (a) and 4-HNE antibody (b) are showed. Results are expressed as mean $\pm$ standard error. $n = 10$. ^a $p < 0.05$ compared to C and C+TIB; ^b $p < 0.05$ 15d, 30d and 60d O_3 +TIB compared to 15d, 30d and 60d O_3 respectively.



dal neurons showing normal morphology, distinct cytoplasmic and nuclear outlines, and visible nucleolus, per 385 μ m length in the middle part of the CA3 pyramidal cell layer, was counted bilaterally in 2 sections per animal under a light microscope (magnification, 400 $\times$). Cell counts from the right and left hippocampus on each of the two sections were averaged to provide a single value for each animal.

Statistical analysis

Behavioral data were analyzed using nonparametric tests: Kruskal-Wallis analysis of variance among all groups and the Mann-Whitney test to compare the control and experimental groups. Western blot data and histological assessment were analyzed using ANOVA followed by a post hoc analysis with

Tukey's test. Prism 2.01 software (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Figure 1 shows Western blot data for OS markers of protein oxidation as NT (Fig. 1a) and lipoperoxidation, such as 4-HNE (Fig. 1b) from animals exposed to O_3 and exposed to O_3 plus treatments of 1 mg/kg of TIB. We observed that the OS produced by chronic exposure to O_3 increased the levels of products of the decomposition of peroxides derived from polyunsaturated fatty acids and the levels of ester lipoperoxidation and protein oxidation. We further observed that these increases were statistically significant upon at least 15 days of exposure. However, treatment with TIB maintained the levels of these OS markers at values similar to those of controls over the same time period (Figs. 1a and 1b).

Figure 2 shows the results of the PAT at 10 min and 24 h after the last exposure to O_3 or to O_3 with 1 mg/kg of TIB treatment. We observed that chronic exposure to O_3 decreased the retention latency in both short- and long-term memory; this decrease was statistically significant after 15 days of exposure and was maintained until 60 days of exposure to O_3 (Figs. 2a and 2b). In animals exposed to O_3 and treated with TIB, the retention latency remained at levels similar to those of the controls at 10 minutes (Fig. 2a). Although we observed a decrease in the retention latency at 24 h in animals treated with TIB, the values were higher than those of animals exposed to O_3 only (Fig. 2b).

We observed that chronic O_3 exposure decreased exploratory behavior and that this decrease was statistically significant after 30 days, whereas animals treated with TIB before exposure to O_3 retained levels of exploratory behavior similar to those observed in the controls (Fig. 3a). This result is related to the increase in freezing behavior, which was statistically significant beginning at 15 days of exposure (Fig. 3b). In animals pretreated with TIB, an increase in freezing behavior was observed, although this increase was statistically lower than that observed in animals exposed to O_3 without TIB treatment (Fig. 3b).

Finally we analyzed whether TIB may alter CA3 neuronal death provoked by O_3 exposure. Nissl staining showed O_3 induced neuronal death in CA3 region of the hippocampus (Figs. 4e, 4f, 4i). In animals previously treated with TIB, reduced CA3 neuronal death was observed (Figs. 4g, 4h, 4i) not

Figure 2. Effects of O_3 and O_3 +TIB on PAT. Short-term (a) and long-term (b) memory retention latency. Mean latencies in seconds are on the ordinate and treatments on the abscissa. ^a $p < 0.05$ compared to C and C+TIB; ^b $p < 0.05$ 15d, 30d and 60d O_3 +TIB compared to 15d, 30d and 60d O_3 respectively.

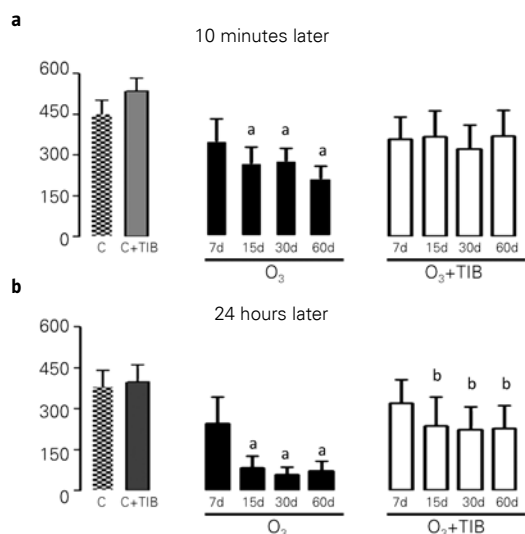
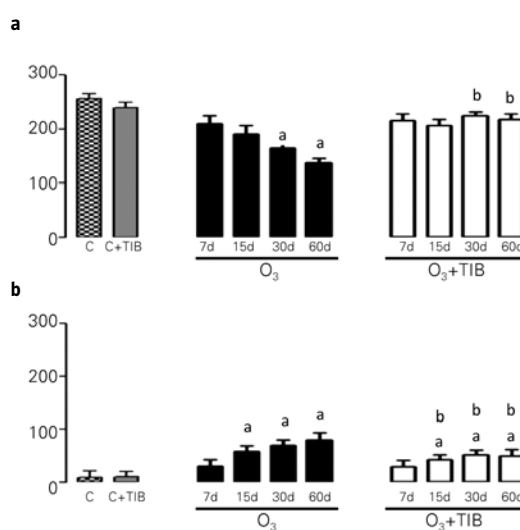


Figure 3. Effects of O_3 and O_3 +TIB on exploratory and freezing behavior. Exploratory (a) and freezing (b) behaviors in mean ($n \pm$ standard error (s)) are depicted on the ordinate. The different treatments are depicted on the abscissa ($n = 10$ for each group). ^a $p < 0.05$ compared to C and C+TIB; ^b $p < 0.05$ 15d, 30d and 60d O_3 +TIB compared to 15d, 30d and 60d O_3 respectively.



being statistically different to animals treated with air (C) (Figs. 4a, 4b, 4i) or air plus TIB (C+TIB) (Figs. 4c, 4d, 4i).

Discussion

Our team developed a well-established noninvasive OS induced by O_3 exposure. These OS damage can lead impaired brain plasticity, resulting in learning, memory and motor activity deficits [18,21], by increasing LPO levels [23].

We observed that chronic inhaled exposure of O_3 increases 4-HNE and NT in the rat hippocampus after 15 days of exposure and that these levels are maintained until 60 days (Fig. 1a). These results are in agreement with our previous works in which we reported that chronic exposure to O_3 increases LPO [23]. The brain is especially vulnerable to LPO by ROS because it consumes approximately one fifth of a human's oxygen intake, has a relative paucity of antioxidant systems and contains high concentrations of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [42]. 4-NHE is a highly reactive aldehyde generated by the exposure of polyunsaturated fatty acids to peroxide and ROS and is a biomarker for the occur-

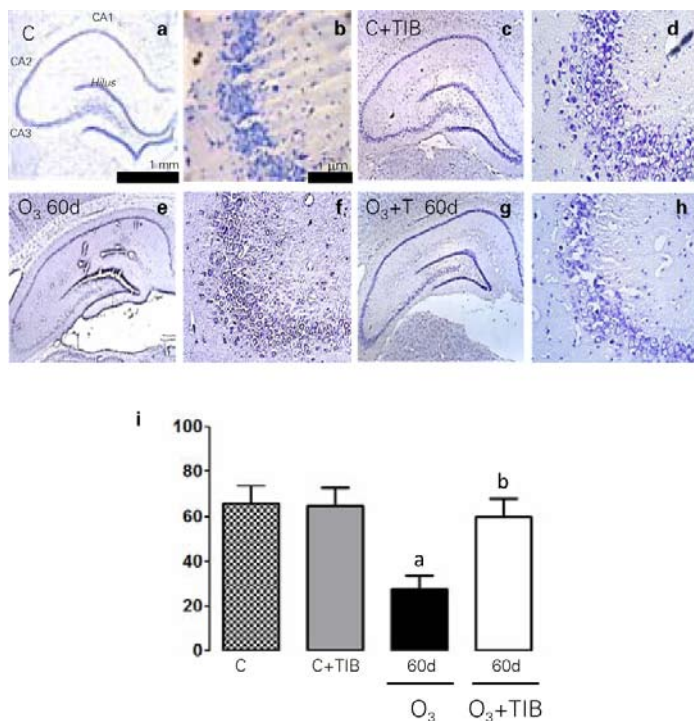
rence and extent of OS in neurodegenerative diseases [43,44].

As discussed above, E_2 exerts antioxidant activity, donating hydrogen atoms from its phenolic hydroxyl structure to lipid peroxy radicals, ROS and other damaging radicals, which can inhibit LPO and block memory deterioration [23,26].

In the last few years, the CNS effects of TIB have been extensively researched [35-41,45-50]. Although the cognitive and neuroprotective aspects have not been fully elucidated, studies in animals and humans suggest that TIB could be helpful against damage induced by long-term OVX [35], menopause [46], leuprolide acetate administration [36] and aging [38]. TIB has been proposed as a neuroendocrine modulator [45] and as a neurotransmitter modulator [35], and it reduces the formation of paired helical filaments (PHF) by increasing the proportion of dephosphorylated Tau [41].

On our study, we observed that treatment with TIB maintains the levels of these markers of OS at values similar to those of the controls along the same time-course as O_3 treatment (Figs. 1a and 1b). These results are in agreement with previous reports in which the administration of TIB reduced the LPO induced by aging in rat hippocampus [38].

Figure 4. TIB partially reduced the CA3 pyramidal neuron loss induced by chronic O_3 exposure. Left: Nissl stained coronal sections of the dorsal hippocampus of rats subjected either to airstream free of O_3 exposure (C; a, b) or airstream free of O_3 exposure + 1 mg/kg of TIB for 60 days (C+TIB; c, d), or to O_3 exposure for 60 days (O_3 60d; e, f) or to O_3 exposure + 1 mg/kg of TIB for 60 days (O_3 +T 60d; g, h), obtained at the last day of O_3 exposure. Down (i): number (mean $\pm$ standard error) of pyramidal neurons in the CA3 in three experimental groups. Scale bars: 1 mm (hippocampus), 100 μ m (CA3). Tukey test: ^a $p < 0.05$ vs. C, C+TIB and O_3 +TIB; ^b $p < 0.05$ vs. O_3 60d.



To our knowledge, this is the first published report of protein oxidation levels upon chronic treatment with TIB. We observed maintenance in the values of the oxidative and nitrosative stress biomarkers as normalized to the control rats' values, even with chronic exposure. Previous studies have reported that chronic administration of TIB reduces the LPO produced by OVX in the rat brain and in the blood of menopausal women. These results might be due to the property of TIB to donate hydrogens from its A ring with a resulting increased capacity of scavenging oxyradicals, and/or by stimulating direct and indirect mechanisms of antioxidants (e.g. tocopherol) within increased plasma concentrations of them as observed in previous references [38,50].

Our results indicate that TIB reduces the oxidation of hippocampal lipids and proteins in this model. However, the mechanisms through which TIB

performs this action are unknown and deserve further investigation.

The PAT is a Pavlovian fear-motivated avoidance task useful for evaluating the effect of novel chemical entities on learning and memory as well as studying the mechanisms involved in cognition.

In our study, chronic O_3 exposure decreased the retention latency in short- and long-term memory. These results are in agreement with previous reports, which demonstrated that chronic O_3 exposure can lead to impaired brain plasticity and produce learning and memory deficits [18,21]. In contrast, we observed that pretreatment with TIB, retention latency remained at levels similar to the controls at the 10-minute time point (Fig. 2a). Despite the decrease in retention latency at 24 h in animals treated with TIB, the values are higher than those of animals treated with O_3 only (Fig. 2b). Similarly [38], have reported that E_2 valerate and TIB affect memory differently in females in a dose- and age-dependent manner. In a previous study, our group reported that TIB improved learning, modulating the hippocampal cholinergic and serotonergic systems [35]. All these results indicate that the chronic administration of TIB could be helpful against some types of damage that induce memory impairment.

In addition, we observed that chronic O_3 exposure decreases exploratory behaviors and increases freezing behaviors. These results are in agreement with previous reports of impairments in motor activity after different periods and concentrations of O_3 exposure [9,18,21]. In animals treated with TIB before exposure to O_3 , exploratory behavior levels remained similar to those observed in the controls (Fig. 3a). Although there was also an increase in freezing behavior, this increase was statistically lower than in animals exposed to O_3 without TIB treatment (Fig. 3b).

A previous report indicated that O_3 inhalation produced impaired nigral cell morphology and a loss of dopamine neurons in (OVX) rats. This effect was counteracted after 60 days of 17β - E_2 treatment, when blood levels were highest [24]. Other study reported, that treatment with 17β - E_2 significantly attenuated both motor impairment and the lipid peroxidation process, and it restored the levels of antioxidants in a neurotoxicity model induced by ethanol [51]. All these results indicate that TIB attenuated the motor activity impairment induced by OS in the O_3 exposure model could be by its estrogenic activity on the CNS [34,41].

In respect to the histological assessment we observed neuronal death induced by O_3 after 60 days of exposure. These results reinforces our previous

reports where we found O₃ induced neuronal death and loss of brain repair in the hippocampus of adult rats [1]. We also observed that TIB pretreatment reduces the number of neurons death by chronic O₃ exposure probably because of that antioxidant ability discussed before [38,50].

This reduce of neuronal death provides a possible explanation of why motor activity impairment was also diminished. The same effect observed on hippocampus might be happening in the substantia nigra with a lowering loss of dopaminergic neurons and restore of dopaminergic communication. Moreover, further studies on that region have to be performed to confirm such hypothesis.

References

- Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzmán R, López-Vidal Y, Rodríguez-Martínez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Pérez M, et al. Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicol Sci* 2010; 113: 187-97.
- Crețu DI, Sovrea A, Ignat RM, Filip A, Bidian C, Crețu A. Morpho-pathological and physiological changes of the brain and liver after ozone exposure. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51: 701-6.
- Lodovici M, Bigagli E. Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol* 2011; 2011: 48707.
- Kadiiska M, Basu S, Brot N, Cooper C, Saari Csallany A, Davies M, et al. Biomarkers of oxidative stress study V: ozone exposure of rats and its effect on lipids, proteins, and DNA in plasma and urine. *Free Radic Biol Med* 2013; 61C: 408-15.
- Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 245-65.
- Cross CE, Reznick AZ, Packer L, Davis PA, Suzuki YJ, Halliwell B. Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. *Free Radic Res Commun* 1992; 15: 347-52.
- Sunil V, Vayas K, Massa C, Gow A, Laskin J, Laskin D. Ozone-induced injury and oxidative stress in bronchiolar epithelium are associated with altered pulmonary mechanics. *Toxicol Sci* 2013; 133: 309-19.
- Groves A, Gow A, Massa C, Laskin J, Laskin D. Prolonged injury and altered lung function after ozone inhalation in mice with chronic lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47: 776-83.
- Dorado-Martínez C, Paredes-Carbajal C, Mascher D, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels, in rats. *Int J Neurosci* 2001; 108: 149-61.
- Martínez-Lazcano JG, Del Carmen Rubio M, Franco-Pérez J, Custodio V, Hernández-Cerón M, Livera C, et al. The effects of ozone exposure and associated injury mechanisms on the central nervous system. *Rev Neurosci* 2013; 24: 337-52.
- Gackière F, Saliba L, Baude A, Bosler O, Strube C. Ozone inhalation activates stress-responsive regions of the CNS. *J Neurochem* 2011; 117: 961-72.
- Zhong Z, Zeng T, Xie K, Zhang C, Chen J, Bi Y, et al. Elevation of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde modified protein levels in cerebral cortex with cognitive dysfunction in rats exposed to 1-bromopropane. *Toxicology* 2013; 306: 16-23.
- Rivas-Arancibia S, Vázquez-Sandoval R, González-Kladiano D, Schneider-Rivas S, Lechuga-Guerrero A. Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. *Environ Res* 1998; 76: 33-9.
- Ávila-Costa MR, Colín-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas JP, Espinosa-Villanueva J, Rugerio-Vargas C, et al. Motor impairments in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat striatum and prefrontal cortex. *Int J Neurosci* 2001; 108: 193-200.
- Ávila-Costa MR, Colín-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas P, Espinosa-Villanueva J, Rugerio-Vargas C, et al. Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci Lett* 1999; 270: 107-9.
- Colín-Barenque L, Ávila-Costa MR, Fortoul T, Rugerio-Vargas C, Machado-Salas JP, Espinosa-Villanueva J, et al. Morphologic alteration of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neurosci Lett* 1999; 274: 1-4.
- Pereyra-Muñoz N, Rugerio-Vargas C, Angoa-Pérez M, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *J Chem Neuroanat* 2006; 31: 114-23.
- Rivas-Arancibia S. Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 74: 891-900.
- Kovacic P, Somanathan R. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr Neuropharmacol* 2012; 10: 289-302.
- Jones B. Neurodegenerative disease: Oxidative stress in cells near amyloid plaques linked to neuronal death. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 300.
- Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Borgonio-Pérez G, Hiriart-Urdanivia M, Verdugo-Díaz L, Durán-Vázquez A, et al. Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. *Environ Res* 2000; 82: 7-17.
- Guerrero AL, Dorado-Martínez C, Rodríguez A, Pedroza-Ríos K, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *NeuroReport* 1999; 10: 1689-92.
- Guevara-Guzmán R, Arriaga V, Kendrick KM, Bernal C, Vega X, Mercado-Gómez OF, et al. Estradiol prevents ozone-induced increases in brain lipid peroxidation and impaired social recognition memory in female rats. *Neuroscience* 2009; 159: 940-50.
- Angoa-Pérez M, Jiang H, Rodríguez A, Lemini C, Levine R, Rivas-Arancibia S. Estrogen counteracts ozone-induced oxidative stress and nigral neuronal death. *Neuroreport* 2006; 17: 629-33.
- Behl C, Moosmann B, Manthey D, Heck S. The female sex hormone oestrogen as neuroprotectant: activities at various levels. *Novartis Found Symp* 2000; 230: 221-34.
- Bednarek-Tupikowska G. Antioxidant properties of estrogens. *Ginek Pol* 2002; 73: 61-7.
- Conner P, Christow A, Kersemaekers W. A comparative study on breast cell proliferation during HRT effects of tibolone and continuous combined estrogen progestogen treatment. *Climacteric* 2004; 7: 50-8.
- Kenemans P. Postmenopausal hormone therapy and breast cancer: what is the problem? *Maturitas*. 2005; 15: 75-82.
- Reed MJ, Kloosterboer HJ. Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR). *Maturitas* 2004; 48: S4-6.
- Campisi R, Marengo FD. Cardiovascular effects of tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator. *Cardiovasc Drug Rev* 2007; 25: 132-45.
- Kloosterboer HJ. Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 76: 231-8.
- Verheul HAM, Van Iersel MLPS, Delbressine LPC, Kloosterboer HJ. Selective tissue distribution of tibolone metabolites in mature ovariectomized female cynomolgus monkeys after multiple doses of tibolone. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1105-11.
- Verheul HAM, Timmer CJ, Van Iersel MLPS, Delbressine LPC, Kloosterboer HJ. Pharmacokinetic parameters of tibolone and metabolites in plasma, urine, feces, and bile from ovariectomized cynomolgus monkeys after a single dose or multiple doses of tibolone. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1112-8.
- Verheul HAM, Kloosterboer HJ. Metabolism of exogenous sex steroids and effect on brain functions with a focus on tibolone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102: 195-204.

35. Espinosa-Raya J, Neri-Gómez T, Orozco-Suárez S, Campos MG, Guerra-Araiza C. Chronic administration of tibolone modulates anxiety-like behavior and enhances cognitive performance in ovariectomized rats. *Horm Behav* 2012; 61: 76-83.
36. Palomba S, Orio F, Falbo A, Oppedisano R, Tolino A, Zullo F. Tibolone reverses the cognitive effects caused by leuprolide acetate administration, improving mood and quality of life in patients with symptomatic uterine leiomyomas. *Fertil Steril* 2008; 90: 165-73.
37. Qiu J, Bosch MA, Rønnekleiv OK, Kloosterboer HJ, Kelly MJ. Tibolone rapidly attenuates the GABA_B hypothalamic neurones response in hypothalamic neurones. *J Neuroendocrinol* 2009; 20: 1310-8.
38. Aguiar R, Dickel O, Cunha R. Estradiol valerate and tibolone: effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology* 2008; 9: 285-98.
39. Aguiar R, Dickel O, Cunha R. Estradiol valerate and tibolone: effects on memory. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 85: 689-96.
40. Ceylan U, Akhan S, Bastu E, Gungor-Ugurlucan, F Iyibozkurt A, Topuz S. Comparison of tibolone and 17 β -estradiol administration on the expression of zonula occludens-1, occludin, glial fibrillary acidic protein and c-fos levels in the brain cortex and hippocampus of female rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2012; 33: 505-10.
41. Pinto-Almazán R, Calzada-Mendoza CC, Campos-Lara MG, Guerra-Araiza C. Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. *J Neurosci Res* 2012; 90: 878-86.
42. Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2007; 85: 3036-40.
43. Uchida K. 4-hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003; 42: 318-43.
44. Perluigi M, Coccia R, Butterfield D. 4-hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17: 1590-609.
45. Gibbs RB, Edwards D, Lazar N, Nelson D, Talameh J. Effects of long-term hormone treatment and of tibolone on monoamines and monoamine metabolites in the brains of ovariectomized, cynomolgous monkeys. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 643-54.
46. Celik O, Erdem G, Hascalik S. Resonance spectroscopic comparison of the effects of resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy stilbene) to conjugated equine estrogen, tibolone and raloxifene on ovariectomized. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 120: 73-9.
47. Genazzani AR, Pluchino N, Bernardi F, Centofanti M, Luisi M. Beneficial effect of tibolone on mood, cognition, well-being, and sexuality in menopausal women. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2006; 2: 299-307.
48. Genazzani A, Bernardi F, Pluchino N. Effect of tibolone administration on central and peripheral levels of allopregnanolone and -endorphin in female rats. *Menopause* 2006; 13: 57-64.
49. Fluck E, File SE, Rymer J. Cognitive effects of 10 years of hormone-replacement therapy with tibolone. *J Clin Psychopharmacol* 2002; 22: 62-7.
50. Vural P, Akgül C, Canbaz M. Effects of menopause and tibolone on antioxidants in postmenopausal women. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 220-3.
51. Ramezani A, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, Ghorbanian M, Salmani M, Abrari K. Neuroprotective effects of the 17 β -estradiol against ethanol-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological and behavioral changes. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 100: 144-5.

Efecto neuroprotector de la tibolona contra el estrés oxidativo inducido por la exposición a ozono

Introducción. El estrés oxidativo aumenta la lipoperoxidación, produce déficits de memoria y de actividad motora así como una neurodegeneración progresiva en el sistema nervioso central. La tibolona es un tratamiento para los síntomas de la menopausia que disminuye los niveles de peroxidación de lípidos y mejora la memoria y el aprendizaje.

Objetivo. Estudiar el efecto de la tibolona sobre la peroxidación de lípidos, los déficits de memoria y motor en el modelo de estrés oxidativo inducido por la exposición crónica al ozono.

Materiales y métodos. Se dividieron aleatoriamente 100 ratas adultas Wistar en 10 grupos: control (C), que recibió aire durante 60 días; (C + tibolona), aire más 1 mg/kg de tibolona durante 60 días; los grupos 3-6, ozono durante 7, 15, 30, y 60 días; y los grupos 7-10, 1 mg/kg de tibolona durante 7, 15, 30 y 60 días previo a la exposición al ozono. Se realizaron pruebas de memoria y motoras y se determinó el contenido del 4-hidroxinonenal y de la nitrotirosina por *Western blot*, así como la muerte neuronal en el hipocampo.

Resultados. La administración de tibolona disminuyó el contenido de lípidos peroxidados, la oxidación de proteínas y la muerte neuronal en el hipocampo; mejoró la memoria y previno las alteraciones motoras en los animales expuestos a ozono.

Conclusión. Nuestros resultados indican un posible papel neuroprotector de la tibolona como un tratamiento útil para prevenir la neurodegeneración inducida por el estrés oxidativo.

Palabras clave. 4-hidroxinonenal. Aprendizaje. Estrés oxidativo. Hipocampo. Lipoperoxidación. Memoria. Ozono. Neurodegeneración. Nitrotirosina. Tibolona.

Tibolone Prevents Oxidation and Ameliorates Cholinergic Deficit Induced by Ozone Exposure in the Male Rat Hippocampus

E. D. Farfán-García · M. C. Castillo-Hernández ·
R. Pinto-Almazán · S. Rivas-Arancibia ·
J. M. Gallardo · C. Guerra-Araiza

Received: 20 March 2014 / Revised: 4 July 2014 / Accepted: 7 July 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Oxidative stress is related to the development of central nervous system diseases involving memory processes. Cholinergic system and memory processes are disrupted by ozone exposure. In rats, ozone induces motor disturbances and memory deficits as well as biochemical changes in brain regions related to memory processes. In this work, we analyzed the effect of chronic tibolone (TIB) administration in central nervous system, specifically the content of choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, acetylcholine and oxidative stress markers in the hippocampus of male rats exposed to ozone. Our results reveal a neuroprotective effect of TIB treatment on neuronal damage induced by chronic ozone exposure. Furthermore, we

suggest that TIB can prevent memory deficits by providing a protective effect against oxidative stress and the cholinergic system disruption induced by ozone exposure. Together, these findings present a potential neuroprotective effect of TIB in processes linked to memory deficits induced by aging or neurodegenerative diseases.

Keywords Tibolone · Oxidative stress · Male rat · Cholinergic system · Memory · Hormone replacement therapy

Introduction

Oxidative stress is associated with the development of chronic degenerative processes occurring in some central nervous system (CNS) diseases [1, 2], including those involving memory processes [3, 4]. This oxidative stress can be induced by exposure to some agents, as has been demonstrated for ozone [5]. In rats, ozone (O₃) exposure induces motor disturbances and memory deficits, as well as biochemical changes in CNS regions such as the hippocampus [6, 7]. Notable changes in specific neurotransmitter systems related to motor disturbances have been reported; for example, damage to the dopaminergic system [8]. However, to the best of our knowledge, the effects on neurotransmitter systems related to memory processes have not been studied yet.

Increasing incidence of neurodegenerative disorders in an age-dependent manner has guided us to relate these disorders to decreasing levels of compounds with steroidal effects, i.e., estrogens, androgens and progestogens [9, 10]. The administration of several exogenous compounds to replace the effects of the diminished endogenous steroids is a strategy used to elicit protective and therapeutic effects

E. D. Farfán-García · C. Guerra-Araiza (✉)
Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, C.P. 06720. México, D.F., Mexico
e-mail: christianguerrea2001@gmail.com

E. D. Farfán-García · M. C. Castillo-Hernández
Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, 11340 México, D.F., Mexico

R. Pinto-Almazán
Unidad de Investigación, HRAE Ixtapaluca, Carretera Federal México-Puebla, km 34.5, C.P. 56530 Ixtapaluca, Edo. de México, Mexico

S. Rivas-Arancibia
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

J. M. Gallardo
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., Mexico

for neurodegenerative disorders. The success of this strategy is supported by recent studies [10–12].

Tibolone (TIB), a synthetic steroid that has been used as an elective treatment for the relief of menopausal symptoms, and its various metabolites have estrogenic as well as progestogenic/androgenic effects [13]. Additionally, it has been suggested that its administration could protect against some cognitive disturbances [14]. Recent studies from our workgroup have shown that this hormone has effects on neuronal plasticity in the cerebellum and hippocampus by modulating the expression of cytoskeletal proteins such as tau [15] and enhances the cognitive performance in ovariectomized rats, suggesting an essential role of estrogenic effects [16]. Moreover, another report by our group has shown the protective effects of TIB administration on the lipid and protein oxidative effects induced by O₃ exposure in CNS of rats [17]. However, the mechanisms for these effects are partially known, and the protective effects via androgenic or progestogenic mechanisms remain unclear.

On the other hand, cholinergic neurotransmission in the hippocampus has been determined to be significantly involved in memory processes [18, 19]. Diminished activity in this system has been recognized as a relevant factor in neurodegenerative diseases [20]; the loss of cholinergic neurons may be partially responsible for the cognitive decline associated with aging and neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease [21, 22]. Cholinergic neurons from the basal forebrain, including those in the nucleus basalis magnocellularis, the septum medial, and the vertical and horizontal limbs of the diagonal band of Broca project to the cortex and hippocampus. They have been implicated in learning, memory, arousal and attention processes [23]. Thus, although it is known that TIB has neuroprotective effects in the CNS [17] and enhances the cognitive performance, the effects of its chronic administration on memory and cholinergic deficits caused by oxidative stress in rats exposed to O₃ are unknown. Therefore, in this work we analyzed the effects of TIB administration on memory and cholinergic deficits induced by O₃ exposure; and its correlation with the expression of oxidative stress markers in the hippocampus.

Experimental Procedure

Animals

Animals were treated in accordance with the guidelines and requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki and those of the Ethical Committee of the Faculty of Medicine at the National Autonomous University of Mexico. One hundred male Wistar rats of the same

age, weighing 250–300 g were housed in acrylic boxes (five animals per cage) with free access to water and food (Purina, Minnetonka, MN) and kept in a clear air room maintained on an artificial 12-h light/dark cycle (lights on at 08:00 h).

Ozone Exposure

For 4 h every day animals were exposed to O₃ at a constant dose of 0.25 ppm. The dose was chosen to mimic moderate levels of pollution exposure encountered in humans living in industrialized cities. In a previous study it has been shown that this dose provokes oxidative stress-related damage to the brain on rats [17]. Briefly, animals were put inside a chamber with a diffuser connected to a variable-flux O₃ generator (5 L/s), as previously described [8, 17]. The air feeding the O₃ converter was filtered purified air. O₃ production levels were proportional to the current intensity and to the airflow. A PCI Ozone and Control System Monitor (PCI Ozone and Control Systems, West Caldwell, NJ) was used to measure the O₃ concentration inside the chamber during the experiments and to keep the O₃ concentration constant. Although control animals were exposed to an airstream free of O₃, the same exposure protocols were used for these groups. Animals were immediately returned to their home cages after the exposure.

Treatments

Animals were randomly divided into ten groups, with ten animals per group. Group 1 was used as control group (C); in this group animals were exposed to an airstream free of O₃ for 60 days. Previous data by our workgroup and others have demonstrated that airstream exposure for 7–60 days has no effect in behavior or changes in biochemical markers [17, 24, 25]. Group 2 were animals also exposed to an airstream free of O₃ but received 1 mg/kg/day of tibolone (TIB; Livial[®] Organon, México) for 60 days (C + TIB). Groups 3, 4, 5 and 6 were animals exposed for 7, 15, 30 and 60 days to O₃, respectively. Groups 7, 8, 9 and 10 were exposed for 7, 15, 30 and 60 days to O₃, respectively, and received 1 mg/kg/day of TIB by oral administration.

Passive Avoidance Task

Two hours after the last air or O₃ exposure, the passive avoidance task (PAT) was performed for every group.

The PAT test was applied as Rivas-Arancibia et al. [24] have reported previously. In brief, each animal was placed in a safety compartment for 10 s. Then, the sliding door was lifted. The time taken to the animal to cross the

threshold to the shock compartment was recorded (acquisition latency). If an animal took more than 100 s to cross to the other side, it was dropped from the experiment. Once the animal crossed with all four paws into the next compartment, the door was closed and a 3-mA electric shock was delivered for 5 s. Then the door was opened and the time that the animal took to return to the safety compartment was measured (escape latency).

The animal remained there for 30 s before being returned to its individual cage. Either 10 min (short-term memory) or 24 h (long-term memory) after this training procedure, a retention test was performed. The animal was again placed in the safety compartment for 10 s, the door was opened, and the time the animal remained in the safety compartment before entering the shock compartment was recorded (retention latency). The test session ended when the animal either entered the shock compartment or remained in the safety compartment for 600 s.

Animals were decapitated immediately after the PAT test and the hippocampus was dissected. Samples were kept at -80°C until its processing.

Determination of Oxidative Stress Markers

The determination of superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated by the Marklund method [26], based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide radicals. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity was indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm. A part of the hippocampus was homogenized with Tris 1 M-sucrosa 0.25 M buffer at pH 7.4 and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4°C . Supernatant was recovered. In a quartz cuvette 50 μL of homogenate, 930 μL of 50 mM Tris 1 mM EDTA pH 8.2 buffer and 20 μL of 25 mM pyrogallol prepared in 10 mM HCl were added. A calibration curve was performed with purified SOD as standard in order to calculate the activity of SOD present in the samples. Results were reported as units of SOD/mg protein.

The malondialdehyde (MDA) is the final product of the peroxidation of fatty acids and a marker for the activity of free radicals. MDA plasma levels were determined as described previously by thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) spectrophotometric test [27]. A portion of homogenate (100 μL) was mixed with 1 mL of a solution containing 15 % (w/v) trichloroacetic acid, 0.8 % (w/v) thiobarbituric acid (Acros Organics, Belgium) and 0.25 N of HCl (JT Baker, Xalostoc, México). The mixture was heated at 100°C for 90 min and, after centrifugation, the absorbance in the organic phase (1-butanol) (Sigma) was measured at 535 nm. Total MDA content of serum samples was determined by the difference between test and standard

samples absorbance using a solution of MDA as standard. The results were expressed as TBARs $\mu\text{mol/L}$.

Expression of 4-hidroxy-nonenal (HNE) and nitrotyrosine (NT) in hippocampal neurons was determined by immunohistochemistry. SOD-2 content was determined by Western blot.

Western Blot Analysis

Samples randomly chosen from six animals from each group were processed for Western blot. Tissue samples (100 mg) were homogenized for 30 s in 500 μL of lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 % glycerol, 5 mM EDTA, 1 % NP-40; Roche, Mannheim, Germany) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (50 $\mu\text{g/ml}$ of phenyl methyl sulfonyl fluoride, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 25 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin and 100 nM orthovanadate, all from Sigma) using the equipment Tissuemiser (Fisher Scientific). Proteins were obtained by centrifugation at 15,000 rpm for 15 min at 4°C , and the supernatant was quantified by a modified Bradford assay (BioRad, Munchen, Germany). Proteins (30 μg) were resolved using sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10 % SDS-PAGE) with a Mini-Protean system (BioRad) and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, formerly Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). Membranes were blocked with 5 % non-fat dry milk diluted in 0.05 % Tween-20 Tris-buffered saline and incubated overnight with the primary antibodies. Pre-stained markers (BioRad) were included for size determination.

The following antibodies were used: rabbit polyclonal antibody against choline acetyltransferase (ChAT) (Millipore-AB143, diluted 1:1,000), mouse monoclonal antibody against choline acetyltransferase (AChE) (Millipore-AB304, diluted 1:1,000), rabbit polyclonal antibody against SOD-2 (Santa Cruz sc-30080, diluted 1:1,000) and mouse monoclonal antibody against α -tubulin (Millipore, AB05-82, diluted 1:1,000). After incubation with the primary antibody, the membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Santa Cruz, diluted 1:10,000). Immunoreactive bands were detected using an enhanced chemiluminescence system (GE Healthcare-Amersham). When necessary, membranes were stripped using a commercial solution (Chemicon). Films were analyzed using the ChemImager 4400_v3.2.1_W2000_XP program. To minimize inter-assay variations, all samples were processed in parallel for each experiment.

Dot Blot Analysis

To determine the acetylcholine (ACh) concentration, hippocampus samples of six animals from each group were processed for dot blot analysis. This procedure consisted on

the use of a grid nitrocellulose membrane on which 30 μg of protein of each sample were spotted. After drying, the non-specific sites were blocked by soaking the membrane in 5 % bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline with Tween (TBS-T). The membrane was then incubated with primary mouse monoclonal antibody against ACh (Millipore-AB5302, diluted 1:5,000) dissolved in BSA/TBS-T for 30 min at room temperature (RT) and washed three times with TBS-T (3×5 min). Afterwards, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Santa Cruz, diluted 1:10,000) for 30 min at RT and washed three times with TBS-T (3×5 min). Immunoreactive dots were detected using an enhanced chemiluminescence system (GE Healthcare-Amersham). When necessary, the membranes were stripped using a commercial solution (Chemicon). Films were analyzed by comparative analysis using the ChemiImager 4400_v3.2.1_W2000_XP program, taking as a reference a concentration curve built with standards of acetylcholine iodide (AChI, from Sigma-Aldrich®) ranging from 1 nM to 100 mM.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical analysis, the remaining four animals were perfused with 4 % paraformaldehyde in PBS at the end of the last O₃ exposure. Brain slices containing the dorsal hippocampus were processed for paraffin embedding. Coronal sections (10 μm) were blocked and processed for labeling with either primary antibody, anti-NT (Abcam, diluted 1:1,000) or anti-4-hydroxynonenal (R&D Systems, diluted 1:1,000) at 4 °C for 48 h. Then, sections were incubated with a biotinylated secondary antibody and a peroxidase-labeled streptavidin reagent (LSAB kit, DAKO, Carpinteria, CA, USA), followed by 3-3-diaminobenzidine (DAKO, Carpinteria, CA, USA) counterstained with hematoxylin. The images were captured under a light microscope (400 $\times$). Immunopositive neurons per 385 μm length in the middle part of the CA3 pyramidal cell layer were counted bilaterally in two sections per animal. Cell counts from the right and left hippocampus on each of the two sections were averaged to provide a single value for each animal.

Statistical Analysis

Behavioral data were analyzed using the Kruskal–Wallis test for analysis of variance among all groups and the Mann–Whitney U test to compare control and experimental groups. Western and dot blot data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a post hoc analysis with Tukey's test. The Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used to calculate probability

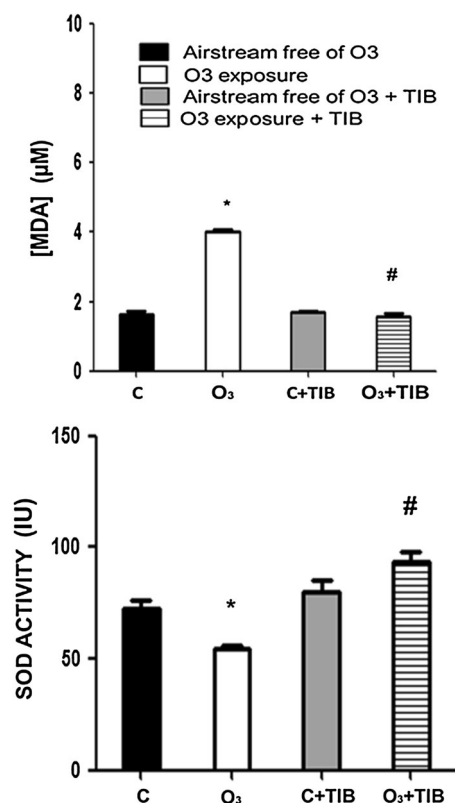


Fig. 1 Effects on MDA content (upper panel) and SOD activity (lower panel) in hippocampus of male rats after 60 days of exposure to different treatments. C: control group exposed to an airstream free of O₃; O₃: exposure to O₃; C + TIB: exposure to an airstream free of O₃ that received 1 mg/kg/day of tibolone; O₃ + TIB: O₃ exposure group that received 1 mg/kg/day of tibolone. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E. (n = 10). * $p \leq 0.05$ compared to C; # $p \leq 0.05$ compared to O₃ exposure group without tibolone treatment

values. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Oxidative Stress

We analyzed changes in oxidative stress markers in the hippocampus of male rats. MDA levels increased significantly after 60 days of O₃ exposure in comparison to the 60 days exposure to an airstream free of O₃. Conversely, SOD activity decreased after day 60 of O₃ exposure. Administration of TIB (1 mg/kg) for 60 days limited the changes in the levels of these markers induced by O₃ exposure. Furthermore, SOD activity increased and MDA levels decreased after 60 days of O₃ exposure and TIB treatment, and were significantly different from control groups (Fig. 1). In addition to SOD activity, we determined the content of SOD2. We observed that exposure to O₃ for

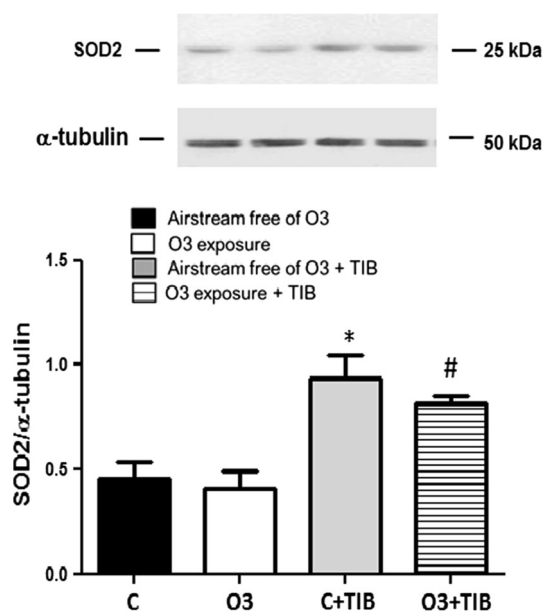


Fig. 2 Effects of ozone (O₃) on the SOD2 content in the hippocampus of male rats after 60 days of exposure to different treatments. Figure shows a representative blot. C: animals exposed to an airstream free of O₃; O₃: group exposed to O₃; C + TIB: animals exposed to an airstream free of O₃ that received 1 mg/kg/day of tibolone; O₃ + TIB: group exposed to O₃ that received 1 mg/kg/day of tibolone. Results are expressed as the mean ± S.E. (n = 10). **p* ≤ 0.05 compared to C; #*p* ≤ 0.05 compared to O₃ group

60 days did not modify the content of SOD2, while treatment of TIB with air or TIB with O₃ for the same period of time increase the content of this protein (Fig. 2).

We analyzed the expression of 4-HNE and NT in the hippocampus of male rats (after 60 days of O₃ exposure) by immunohistochemistry (Fig. 3). The greatest expression of these markers was observed in the CA3 region. We observed that O₃ exposure increased the number of immunopositive neurons for 4-HNE (Fig. 3b, h) and NT (Fig. 3e, i), whereas the administration of TIB reduced these expressions (Fig. 3c, f).

Effects on Cholinergic Neurotransmission in the Hippocampus

Western blot analysis showed that exposure to O₃ significantly decreased ChAT content in the rat hippocampus after 30 days compared to animals exposed to air. This ChAT decrease was not observed in animals exposed to O₃ and treated with TIB (Fig. 4). AChE content was significantly increased at day 15 of the O₃ exposure, compared to animals exposed to air (O₃ control); however, for longer periods of O₃ exposure, AChE content decreased to levels similar or lower than those of the control group (Fig. 5). TIB administration to animals exposed to air (C + TIB) increased AChE expression, while in animals exposed to

O₃ + TIB this expression decreased beyond control levels but remained higher than values observed for animals exposed to O₃ without TIB treatment (Fig. 5).

The dot blot procedure showed a decrease in ACh levels after 7 days of O₃ exposure; this decrease did not occur when animals were treated with TIB (Fig. 6). In those groups administered with TIB for 30 and 60 days, ACh levels were significantly higher than those found in the hippocampus in their respective controls groups and also with those groups with O₃ exposure at the same periods of time without TIB treatment (Fig. 6).

Passive Avoidance Task

PAT was conducted immediately after the last exposure to O₃ with/without treatment of 1 mg/kg/day of TIB. In this task, rats exposed to O₃ for more than 15 days displayed decreased retention latency in short- and long-term memory (10 min and 24 h, respectively). This decrease did not occur in animals that were exposed to O₃ and treated with TIB in the test at 10 min, and though this decrease was observed at 24 h in animals treated with TIB, the effect was minor compared to that of animals that were not treated with TIB (Table 1). Also, it was interesting to observe that the performance of rats treated only with TIB was not different from that of untreated rats.

Discussion

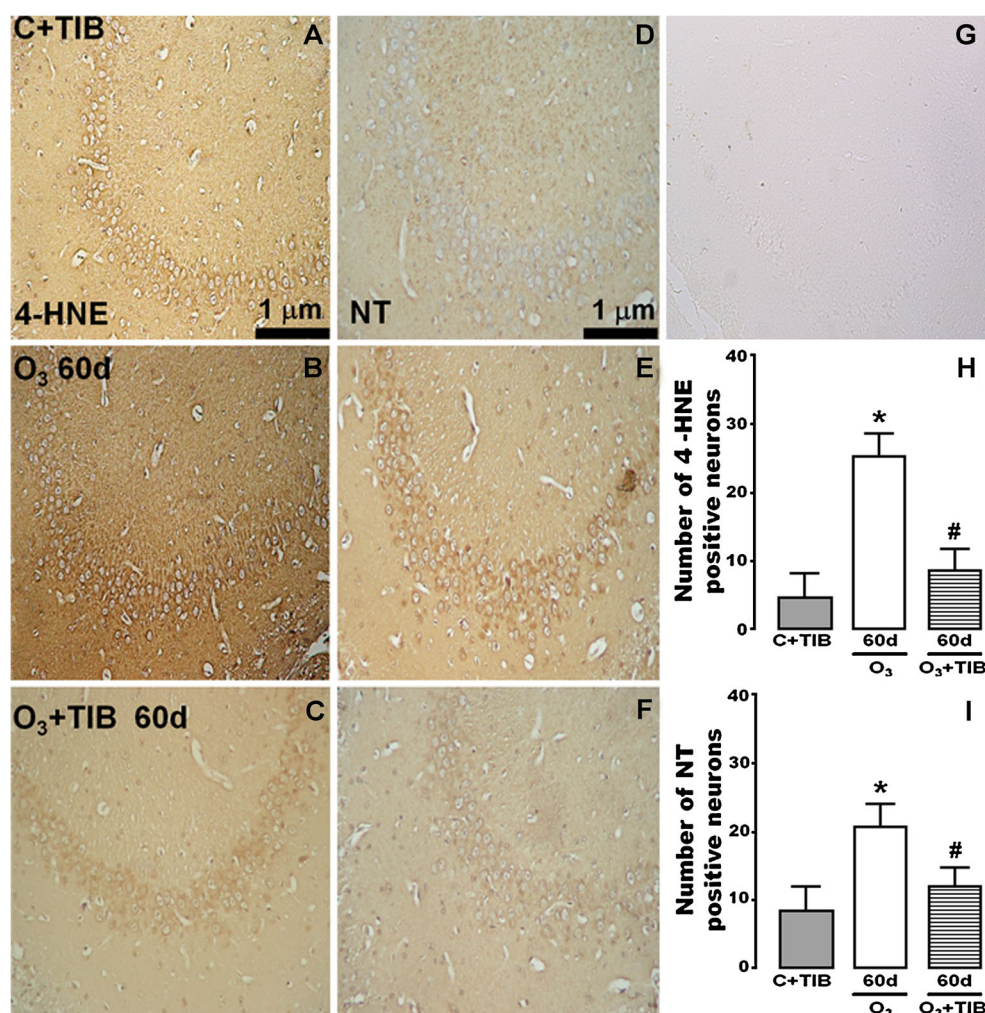
It has been reported that acute and chronic O₃ exposure causes oxidative stress damage that can lead to impaired brain plasticity, resulting in learning, memory and motor activity deficits [17, 28]. This damage is related to increasing enzymatic activity against cellular oxidation and lipid peroxidation (LPO) levels [29].

It has been suggested that there are two mechanisms by which O₃ exposure may cause oxidative stress in the brain. First, O₃ directly affects the nasal epithelium and olfactory bulb and from there to the rest of the brain. Second, where antioxidant capacity of lung is exceeded and a state of oxidative stress in a systemic manner is caused affecting several organs, including the brain [30].

The CNS seems to be especially vulnerable to LPO induced by free radicals; this can be related to the high rate of oxygen consumption, a relative paucity of antioxidant systems and high concentrations of polyunsaturated fatty acids [31].

In the current work, three oxidative stress markers, i.e. MDA, 4-HNE and NT, were commonly increased in the rat hippocampus after 15 days of O₃ exposure compared to controls. These levels were maintained until 60 days

Fig. 3 Effects on 4-HNE (A, B, C) and NT (D, E, F) expression in the CA3 region of male rats hippocampus after 60 days of exposure to different treatments measured by immunohistochemistry assay. C + TIB: exposure to an airstream free of ozone that received that received 1 mg/kg/day of tibolone (A and D). O₃: exposure to ozone (B and E); O₃ + TIB: exposure to ozone that received 1 mg/kg/day of tibolone (C and F). G: negative control without primary antibody. H and I: comparison of 4-HNE and NT positive neurons between treatments. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E. (n = 10). * $p \leq 0.05$ compared to C + TIB group; # $p \leq 0.05$ compared to O₃ group without tibolone treatment



(Figs. 1, 3). Conversely, SOD activity decreased after day 60 of O₃ exposure (Fig. 1) in the hippocampus of male rat.

All of these results are in agreement with the previously reported increases of LPO [29] and disruption of enzymatic activity against oxidative processes in the brain [24] after chronic O₃ exposure. The increase of some of these markers, particularly 4-HNE, has been clearly associated with neurodegenerative diseases and ischemic damage to the brain [32].

Steroid hormone treatment has been tested against neurodegenerative disorders. For example, estradiol (E2) administration reduced LPO levels and blocked memory deterioration [26, 33]. The diminished LPO has been related to the antioxidant activity of E2 through its inherent ability as a scavenger of reactive oxygen species and other radicals [34], as well as through hydrogen atom donation from its phenolic hydroxyl structure to lipid peroxyradicals [35]. The administration of dehydroepiandrosterone produced a significant reduction in MDA and increased SOD activity in the brain [36].

In this sense, TIB administration has shown effects on the neurodegenerative processes in the CNS [37–39]. Thus,

TIB protected against CNS damage induced by long-term ovariectomy (OVX) [40], menopause [41], leuprolide acetate administration [42] and aging [43]. The mechanism(s) by which TIB exerts these effects is poorly understood. Also, TIB has been proposed as a neuroendocrine modulator [44], neurotransmitter modulator [40] and modulator of the content of Tau [15], but it is not clearly known if common processes related to oxidative stress are involved. However, it has been established that chronic administration of TIB reduces the LPO produced by OVX in the rat brain and the blood of menopausal women, and these reductions are correlated with an increase in the capability to scavenge reactive oxygen species (ROS) and alpha-tocopherol species [43, 45]. In this regard, we have reported the effective use of TIB as a protective agent against oxidative lipid/protein effects induced in rats by O₃ exposure [17].

Regarding these findings about antioxidative effects of TIB on CNS, in the current contribution we observed that 60 days of TIB (1 mg/kg/day) administration increased SOD activity, and decreased the levels of other markers. In

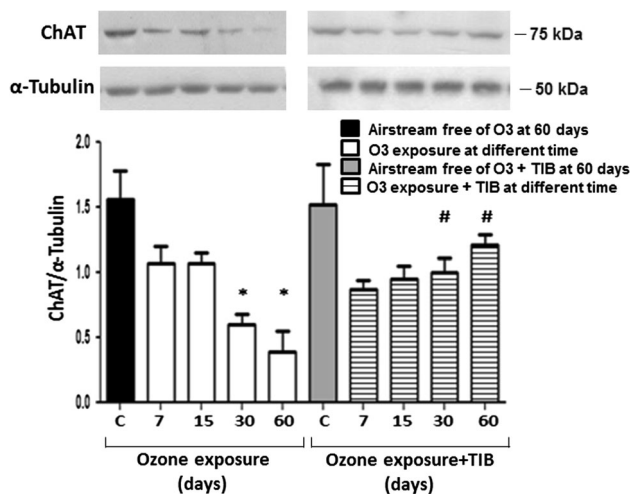


Fig. 4 The effects of O₃ exposure or O₃ and tibolone treatment on ChAT content in the hippocampus of male rats. Figure shows a representative blot. C: control groups exposed to an airstream free of O₃ without (black bar) or with tibolone treatment (1 mg/kg/day, gray bar). 7, 15, 30 60: groups exposed to O₃ in different periods of time without (white bars) or with tibolone treatment (striped bars). Proteins detected by Western blot were quantified by densitometric analysis. The results are expressed as the mean $\pm$ S.E. (n = 10). * $p \leq 0.05$ compared to C (dark bar) and C + TIB (gray bar); # $p \leq 0.05$ compared to the corresponding group of the same O₃-exposure time

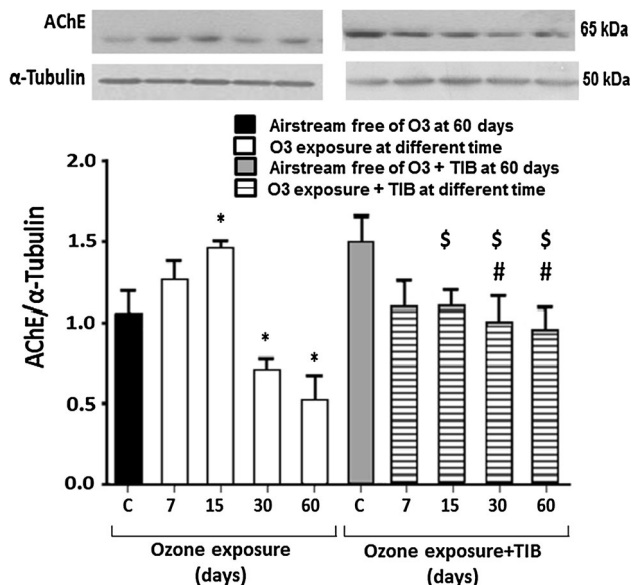


Fig. 5 Effects of O₃ exposure and O₃ + TIB treatment on the AChE content in the hippocampus of male rats. Figure shows a representative blot. Proteins detected by Western blot were quantified by densitometric analysis. The results are expressed as the mean $\pm$ S.E. (n = 10). * $p \leq 0.05$ compared to air control (C, dark bar), \$ $p \leq 0.05$ compared to tibolone control (C + TIB, grey bar); # $p \leq 0.05$ compared to the corresponding group of the same O₃-exposure time

addition to these results, we also observed that TIB increased the content of SOD2 (Fig. 2). This finding expanded our understanding of TIB effects, at least

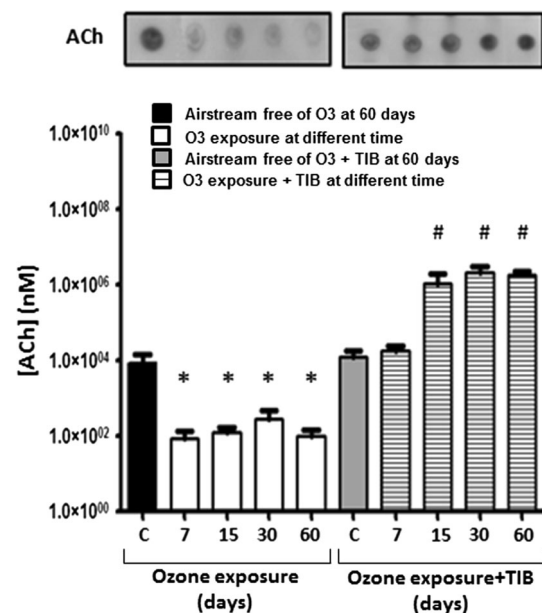


Fig. 6 Effects of O₃ exposure and O₃ + TIB treatment on the ACh content in the hippocampus of male rats. Figure shows a representative blot. ACh detected by dot blot were quantified by densitometric analysis, with a concentration curve built with acetylcholine iodide ranging from 1 nM to 100 mM as a reference. The results are expressed as the mean $\pm$ S.E. (n = 10). * $p \leq 0.05$ compared to air control (dark bar), # $p \leq 0.05$ compared to the corresponding group of the same O₃-exposure time

suggesting that the activity of TIB induces a greater effect on the enzymatic regulation of oxidative stress than that on the non-enzymatic regulation. This implies that antioxidative effects of TIB in CNS are not limited to those related to its ability to act as a scavenger of ROS as is often proposed for several chemical unsaturated systems as tocopherol or steroids [39], but also changes the expression of proteins, related or not with membrane receptors. Further studies are necessary to establish the exact mechanisms of TIB in inhibiting oxidative stress on some biological systems.

However, from our observations there is no doubt that TIB administration reduces the increased levels of oxidative markers in CNS induced by O₃ exposure. Moreover, the decreased SOD activity and the increase MDA levels after 60 days of O₃ exposure were significantly different from control groups when TIB was administered. This reduction of LPO in the rat hippocampus induced by chronic O₃ exposure and TIB administration has been previously reported [17, 43]; however, we also evaluated protein oxidation and SOD activity in this study. It has been observed that the rise of oxidative stress or the increase in the production of free radicals increases SOD activity in the CNS [24]. It has also been shown that the reduced activity of SOD is related to long periods of oxidative stress and leads to cognitive decline in humans and

Table 1 Effect of O₃ exposure on short/long-term memory evaluated by Passive Avoidance Task retention latency. Data are represented as mean $\pm$ S.E. of 10 male rats/group

	Ozone exposure (days)					Ozone exposure + TIB (days)				
	Control	7 d	15 d	30 d	60 d	Control	7 d	15 d	30 d	60 d
Passive Avoidance Task										
Retention latency (sec)										
Short-term memory										
(10 min)	392.60 $\pm$ 81.34	351.60 $\pm$ 81.43	241.20 $\pm$ 69.00*	220.50 $\pm$ 40.60*	184.80 $\pm$ 40.60*	390.60 $\pm$ 78.30	358.00 $\pm$ 82.78	367.50 $\pm$ 94.00*	323.00 $\pm$ 86.57*	370.00 $\pm$ 93.99*
Long-term memory										
(24 h)	392.60 $\pm$ 77.00	246.80 $\pm$ 47.00	100.10 $\pm$ 37.00*	96.63 $\pm$ 37.00*	56.88 $\pm$ 21.81*	396.60 $\pm$ 47.00	320.60 $\pm$ 47.00	236.60 $\pm$ 63.00*	223.00 $\pm$ 54.00*	228.00 $\pm$ 45.00*

* $p \leq 0.05$ compared with control group

rodents [46, 47]. Still, some studies have demonstrated that E2 administration in cultured mammary cells increases SOD expression [48]. Therefore, we propose that E2 or TIB might increase SOD expression in the brain through the effects on estrogen receptors or signaling and that this E2-mediated increase in SOD expression might play a protective role in the CNS of treated rats. Thus, our results indicate that TIB reduces the oxidation of lipids and proteins induced by exposure to O₃ in the hippocampus of the rat, probably through action on the enzymatic regulation systems in the rat CNS. The mechanism of these effects is unknown but may be related to the estrogenic properties of TIB [13].

The PAT is a Pavlovian-conditioning trial fear-motivated avoidance task. The latency to refrain from crossing into a punishing compartment serves as an index of the ability to avoid and allows memory to be assessed [49]. In our assays, chronic exposure to O₃ decreases the retention latency in short- (10 min) and long-term memory (24 h). These results are in agreement with those that have reported that learning and memory deficits are related to impaired brain plasticity produced by chronic O₃ exposure [17, 28, 50]. However, in this task retention latency in TIB administered animals was similar to the control group at 10 min and was higher compared to values for animals only exposed to O₃ at 24 h (Table 1). These findings are consistent with some works that have reported that chronic TIB administration limits the damage that induces memory impairment [40], including the damage induced by O₃-related oxidative stress [17, 43].

In terms of the effects on the cholinergic system in the hippocampus, it is well known that oxidative stress reduces the levels, the release and the activity of ChAT and ACh in early stages of AD. In the elderly, a loss of cholinergic function occurs in the absence of neurodegeneration [19, 51–53], and AChE activity is increased by cytotoxicity mechanisms in neurons [54, 55]. We observed that oxidative stress induced by O₃ exposure exerted effects on the cholinergic system of the hippocampus in the form of a decrease in ChAT levels after 30 days (Fig. 4), an increase in the AChE content after 15 days (but not in other exposure times, Fig. 5) and a decrease in the content of ACh after 7 days of O₃ exposure (Fig. 6). To the best of our knowledge, these effects induced by O₃ exposure are reported for the first time in this work; previously, only the effects in the respiratory system [56] and in the cholinceptive hypothalamic medial preoptic area, the last area involved in the regulation of sleep, have been reported [57]. All of these effects induced by O₃ exposure were modified by TIB administration: the decrease in ChAT and the increase in AChE were not observed in animals treated with TIB, and ACh levels were increased after day 15 of TIB treatment. Thus, chronic administration of TIB exerted

a protective effect in the cholinergic system of male rat hippocampus.

Previous reports have indicated that estrogenic metabolites of TIB are distributed in greater proportion in the brain suggesting an estrogenic effect of TIB in this tissue [13]. Since TIB effects are often associated to its estrogenic activity, it should be mentioned that the presence of both, α and β estrogen receptors (ER), has been demonstrated in the hippocampus [58]. Also, it is well documented that hormone replacement therapy can enhance cholinergic system functions. So, chronic administration of dehydroepiandrosterone reduced AChE activity and increased ACh levels [36], while E2 and progesterone increased ChAT levels in OVX rats [40]. These data suggest that TIB may be regulating the expression of these proteins through interaction with estrogen receptors, although this deserves further research.

There are only few reports concerning the effects of TIB on the cholinergic system. The modulation of the cholinergic and serotonergic systems by TIB was reported recently in female rats, suggesting that modulation of these neurotransmitter systems is related to learning improvement evaluated by mean tasks in which memory processes can be involved [16]. Additionally, the administration of TIB reduced both ChAT and AChE in the medial septum/diagonal band of the Broca of monkeys in a dose-related manner, which is related to cognitive processes [39]. Our results indicate that TIB administration can also affect the cholinergic system in pathways involved in memory, favoring the increased levels of ACh in the hippocampus and the action of this neurotransmitter.

Conclusions

Taken together, the results presented in this study are a contribution to the evaluation of TIB treatment and its possible neuroprotective role in the neuronal damage induced by chronic O₃ exposure that causes negative effects on memory. Furthermore, our results suggest that TIB can be used to prevent memory deficits via a protective effect against oxidative stress-induced modulation in the rat brain, but also on the function of the cholinergic system. Additional studies are required to evaluate the relationship between these mechanisms.

The findings from the current study show a potential neuroprotective effect of tibolone in neurodegenerative processes linked to memory deficits. This has relevant implications in those neurodegenerative processes induced by aging or related to neurodegenerative diseases.

Acknowledgments This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree of Eunice D. Farfán-García at Doctorado en Investigación en Medicina (ESM/IPN). This study

was supported by FIS/IMSS project no. FIS/IMSS/PROT/G09/751 and FIS/IMSS/PROT/G11-2/1013. Rodolfo Pinto-Almazán and Eunice D. Farfán-García received financial support from CONACYT and from CIS/IMSS.

References

1. Melo A, Monteiro L, Lima RM, Oliveira DM, Cerqueira MD, El-Bachá RS (2011) Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev* 2011:467180
2. Hayashi M, Miyata R, Tanuma N (2012) Oxidative stress in developmental brain disorders. *Adv Exp Med Biol* 724:278–290
3. Cai Z, Zhao B, Ratka A (2011) Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *NeuroMol Med* 13:223–250
4. Verri M, Pastoris O, Dossena M, Aquilani R, Guerriero F, Cuzzoni G, Venturini L, Ricevuti G, Bongiorno AI (2012) Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 25:345–353
5. Dorado-Martínez C, Paredes-Carbajal C, Mascher D, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S (2001) Effects of different O₃ doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels, in rats. *Int J Neurosci* 108:149–161
6. Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzmán R, López-Vidal Y, Rodríguez-Martínez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Pérez M, Raisman-Vozari R (2010) Oxidative stress caused by O₃ exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicol Sci* 113:187–197
7. Mokoena ML, Harvey BH, Oliver DW, Brink CB (2010) O₃ modulates the effects of imipramine on immobility in the forced swim test, and nonspecific parameters of hippocampal oxidative stress in the rat. *Metab Brain Dis* 25:125–133
8. Pereyra-Muñoz N, Rugerio-Vargas C, Angoa-Pérez M, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S (2006) Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to O₃. *J Chem Neuroanat* 2:114–123
9. Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E (2011) Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med* 32:305–315
10. Daniel JM (2013) Estrogens, estrogen receptors, and female cognitive aging: the impact of timing. *Horm Behav* 63:231–237
11. Tan RS, Pu SJ, Culbertson JW (2004) Role of androgens in mild cognitive impairment and possible interventions during andropause. *Med Hypotheses* 62:14–18
12. Maki PM, Dennerstein L, Clark M, Guthrie J, Lamontagne P, Fornelli D, Little D, Henderson VW, Resnick SM (2011) Perimenopausal use of hormone therapy is associated with enhanced memory and hippocampal function later in life. *Brain Res* 1379:232–243
13. Kloosterboer HJ (2004) Tissue-selectivity: the mechanism of action of Tibolone. *Maturitas* 1:30–40
14. Garefalakis M, 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
15. Pinto-Almazán R, Calzada-Mendoza CC, Campos-Lara MG, Guerra-Araiza C (2012) Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and Tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. *J Neurosci Res* 90:878–886
16. Espinosa-Raya J, Neri-Gómez T, Orozco-Suárez S, Campos MG, Guerra-Araiza C (2012) Chronic administration of Tibolone modulates anxiety-like behavior and enhances cognitive performance in ovariectomized rats. *Horm Behav* 61:76–83

17. Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Farfán-García ED, Rodríguez-Martínez E, Guerra-Araiza C (2014) Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure. *Rev Neurol* 58:441–449
18. Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16:710–715
19. Micheau J, Marighetto A (2011) Acetylcholine and memory: a long, complex and chaotic but still living relationship. *Behav Brain Res* 221:424–429
20. Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221:555–563
21. Luine VN (1985) Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. *Exp Neurol* 89:484–490
22. Decker MW, McGaugh JL (1991) The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 7:151–168
23. Gibbs RB (2000) Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience* 101:931–938
24. Rivas-Arancibia S, Vazquez-Sandoval R, Gonzalez-Kladiano D, Schneider-Rivas S, Lechuga-Guerrero A (1998) Effects of O₃ exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. *Environ Res* 76:33–39
25. Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Borgonio-Pérez G, Hiriart-Urdanivia M, Verdugo-Díaz L, Durán-Vázquez A, Colin-Baranque L, Avila-Costa MR (2000) Effects of taurine on O₃-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. *Environ Res* 82:7–17
26. Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469–474
27. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML (2000) Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem* 8:619–625
28. Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Colin-Baranque L, Kendrick KM, de la Riva C, Guevara-Guzmán R (2003) Effect of acute O₃ exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharmacol Biochem Behav* 74:891–900
29. Guevara-Guzmán R, Arriaga V, Kendrick KM, Bernal C, Vega X, Mercado-Gómez OF, Rivas-Arancibia S (2009) Estradiol prevents O₃-induced increases in brain lipid peroxidation and impaired social recognition memory in female rats. *Neuroscience* 159:940–950
30. Martínez-Lazcano JC, González-Guevara E, del Carmen Rubio M, Franco-Pérez J, Custodio V, Hernández-Cerón M, Livera C, Paz C (2013) The effects of ozone exposure and associated injury mechanisms on the central nervous system. *Rev Neurosci* 24:337–352
31. Markesbery WR, Lovell MA (2007) Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 64:954–956
32. Perluigi M, Coccia R, Butterfield A (2012) 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxid Redox Signal* 11:1590–1609
33. Guerrero AL, Dorado-Martínez C, Rodríguez A, Pedroza-Ríos K, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S (1999) Effects of vitamin E on O₃-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *NeuroReport* 10:1689–1692
34. Behl C (2000) Vitamin E protects neurons against oxidative cell death in vitro more effectively than 17-beta estradiol and induces the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J Neural Transm* 107:393–407
35. Bednarek-Tupikowska G (2002) Antioxidant properties of estrogens. *Ginekol Pol* 73:61–67
36. Aly HF, Metwally FM, Ahmed HH (2011) Neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in rat model of Alzheimer's disease. *Acta Biochim Pol* 58:513–520
37. Celik O, Erdem G, Hascalik S, Karakas HM, Tamser M (2005) Magnetic resonance spectroscopic comparison of the effects of resveratrol (3,4',5-trihydroxy stilbene) to conjugated equine estrogen, Tibolone and raloxifene on ovariectomized rat brains. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 120:73–79
38. De Aguiar RB, Dickel OE, Cunha RW, Monserrat JM, Barros DM, Martinez PE (2006) Estradiol valerate and Tibolone: effects on memory. *Pharmacol Biochem Behav* 85:689–696
39. Gibbs RB, Nelson D, Anthony MS, Clarkson TB (2002) Effects of long-term hormone replacement and of Tibolone on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the brains of ovariectomized, cynomolgus monkeys. *Neuroscience* 113:907–914
40. Espinosa-Raya J, Plata-Cruz N, Neri-Gómez T, Camacho-Arroyo I, Picazo O (2011) Effects of short-term hormonal replacement on learning and on basal forebrain ChAT and TrkA content in ovariectomized rats. *Brain Res* 1375:77–84
41. Fluck E, File SE, Rymer J (2002) Cognitive effects of 10 years of hormone-replacement therapy with Tibolone. *J Clin Psychopharmacol* 22:62–67
42. Palomba S, Orio FJ, 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* 90:165–173
43. De Aguiar RB, Dickel OE, Cunha RW, Monserrat JM, Barros DM, Martinez PE (2008) Estradiol valerate and Tibolone: effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology* 9:285–298
44. Genazzani AR, Pluchino N, Bernardi F, Centofanti M, Luisi M (2006) Beneficial effect of Tibolone on mood, cognition, well-being, and sexuality in menopausal women. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2:299–307
45. Vural P, Akgül C, Canbaz M (2005) Effects of menopause and Tibolone on antioxidants in postmenopausal women. *Ann Clin Biochem* 42:220–223
46. Floyd RA (1999) Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:236–245
47. Levin ED, Christopher NC, Crapo JD (2005) Memory decline of aging reduced by extracellular superoxide dismutase overexpression. *Behav Genet* 35:447–453
48. Rao AK, Dietrich AK, Ziegler YS, Nardulli AM (2011) 17β-Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: a mechanism to protect neurons from ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 27:382–389
49. Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24:897–931
50. Sorace A, De Acetis L, Alleva E, Santucci D (2001) Prolonged exposure to low doses of O₃: short- and long-term changes in behavioral performance in mice. *Environ Res* 85:122–134
51. Götz EM, Koing G, Riederer P, Youdim MBH (1994) Oxidative stress: free radical production in neuronal degeneration. *Pharmacol Ther* 63:37–122
52. Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S (2001) Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense. *Ann NY Acad Sci* 928:168–175
53. Amenta F, Tayebati SK (2008) Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Curr Med Chem* 5:488–498

54. Barbosa-Melo J, Agostinho P, Resende-Oliveira C (2003) Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci Res* 45:117–127
55. Bond CE, Patel P, Crouch L, Tetlow N, Day T, Abu-Hayyeh S, Williamson C, Greenfield SA (2006) Astroglia up-regulate transcription and secretion of 'readthrough' acetylcholinesterase following oxidative stress. *Eur J Neurosci* 24:381–386
56. Schultheis AH, Bassett DJ, Fryer AD (1994) O₃-induced airway hyperresponsiveness and loss of neuronal M2 muscarinic receptor function. *J Appl Physiol* 76:1088–1097
57. Alfaro-Rodríguez A, González-Piña R (2005) O₃-induced paradoxical sleep decrease is related to diminished acetylcholine levels in the medial preoptic area in rats. *Chem Biol Interact* 151:151–158
58. Pau CY, Pau KY, Spies HG (1998) Putative estrogen receptor beta and alpha mRNA expression in male and female rhesus macaques. *Mol Cell Endocrinol* 146:59–68

11. ANEXO II. SOLUCIONES EMPLEADAS.

❖ BUFFER DE TBS 10X, pH 7.5

Tris-Base	60.5g
NaCl	87.6g

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

❖ BUFFER DE CORRIDA 10X

Tris-Base	29g
Glicina	144g
SDS	10g

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

❖ TBS TWEEN (TTBS)

TBS 1X	1000 mL
TWEEN 20	1 mL

❖ BUFFER DE CARGA 5X (LB5X)

SDS	20g
Glicerol	100 mL
Dithiothreitol(DTT)	15.4g
Tris 0.5M pH 8.5	26 mL
Azul Bromofenol	0.1g

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

❖ BUFFER TRANSFERENCIA 10X

Tris-Base	29g
-----------	-----

Glicina	144g
SDS	2g

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

❖ BUFFER DE TBS 1X, pH 7.5

Se toman 100 mL de TBS 10X, pH 7.5 y se afora a 1L. con agua destilada.

❖ BUFFER DE CORRIDA 1X

Se toman 100mL de Buffer de Corrida 10X y se afora a 1 L. con H₂O destilada

❖ SÓLUCIÓN DE BLOQUEO

(Dos membranas)2.5g de leche descremada en polvo en 50 mL de TBS 1X

❖ BUFFER LISIS PROTEÍNAS(PIK)

NaCl	1.75g
Tris HCl	0.485g
EDTA stock 0,5M	2 mL
Glicerol 10%	20 mL
NP 40 1%	2 mL

Se ajusta el pH a 7.4

Se afora a 200 mL con agua desionizada. Los inhibidores de proteasas Leupeptina, Pepstatina, Aprotinina se utilizan en proporción 1:1000 con el Buffer de Lisis de Proteínas

❖ BUFFER TRANSFERENCIA 1X

Se toman 100 mL de Buffer de Transferencia 10X y se afora a 1 L. con agua destilada

❖ **SOLUCIÓN ROJO PONCEAU**

Ácido Acético concentrado	5 mL
Agua destilada	95 mL
Rojo Ponceau	0.1g

❖ **PERSULFATO DE AMONIO**

Persulfato de Amonio (APS)	0.1g
Agua destilada	1 mL

❖ **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