



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto neuroprotector de la Tibolona ante un evento
isquémico en el modelo de isquemia
cerebral global aguda en ratas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Vania Itzel Solis Pérez

Director

Dr. Marcos García Juárez

Codirector

Dr. Oscar González Flores

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2023



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto neuroprotector de la Tibolona ante un evento
isquémico en el modelo de isquemia
cerebral global aguda en ratas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Vania Itzel Solis Pérez

Comité Tutorial

Dr. Marcos García Juárez

Dr. Oscar González Flores

Dr. Raymundo Domínguez Ordoñez

Dr. Kurt Leroy Hoffman

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2023

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación en Reproducción Animal, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala ubicado en la localidad de Panotla, Tlaxcala.

Proyecto apoyado por el CONACYT en el año 2023. Número de proyecto: CF-2023-G-289 a MGJ.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), otorgando la beca número 1156379, durante el periodo de 01 de agosto de 2021 a 31 de julio de 2023.

La Maestría en Ciencias Biológicas perteneciente al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, se encuentra registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional, así como en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

OFICIO DE AUTORIZACIÓN



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC)
Maestría en Ciencias Biológicas
Proceso: Posgrado CTBC
Registro: Carta Autorización de Impresión de Tesis

Código: 303-RGE-26

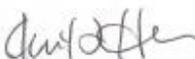
Revisión: 03

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Vania Itzel Solís Pérez** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Efecto neuroprotector de la Tibolona ante un evento isquémico en el modelo de isquemia cerebral global aguda en ratas”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 8 DE DICIEMBRE DEL 2023



DR. KURT LEROY HOFFMAN



DR. MARCOS GARCÍA JUÁREZ



DR. RAYMUNDO DOMÍNGUEZ ORDOÑEZ



DR. HUGO CANO RAMÍREZ



DR. JOSÉ LUIS TLÁCHI LÓPEZ

OFICIO DE AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA



Universidad Autónoma de Tlaxcala

CENTRO DE INVESTIGACION EN REPRODUCCIÓN ANIMAL
(C.I.R.A.)

Apdo. Postal 62. Tlaxcala, Tlax. 90000 México

Comité Académico

Posgrado En Ciencias Biológicas

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por La estudiante Vania Itzel Solís Pérez titulada "Efecto neuroprotector de la Tibolona ante un evento isquémico en el modelo de isquemia cerebral global aguda en ratas" para optar por su grado de Maestra en Ciencias Biológicas. El documento de la tesis de Vania Itzel Solís Pérez fue revisado por mí como director de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de diciembre, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes (3%). Los textos detectados con similitud fueron corregidos por la estudiante. Se volvió a procesar el documento y volvió a marcar 3%; sin embargo, examinando los detalles de la búsqueda se observó que las similitudes están marcadas en pies de figuras, así como en secciones como la introducción y el marco teórico, no obstante, dicho texto contiene las respectivas citas que indican de donde fue tomada la información. Otras similitudes se observaron en la sección del índice y la metodología, correspondiendo a lenguaje técnico común, por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio. Por lo anterior, confirmo que la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE

Tlaxcala, Tlax., a 8 de diciembre del 2023.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marcos García Juárez'.

Dr. Marcos García Juárez
Directora de tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por permitirme crecer académicamente.

Al apoyo recibido de CONACYT por otorgarme la beca número 1156379 durante el periodo de agosto 2021 a agosto del 2023.

A mis codirectores de tesis, los Dres. Marcos García Juárez y Oscar González Flores por aceptarme en el laboratorio y guiarme durante mi estancia.

Al Dr. Marcos García Juárez, por su apoyo y orientación en el área académica. Además de motivarme e impulsarme a seguir aprendiendo que sin duda fue un gran impulso en mi formación.

Al Dr. Oscar González Flores, por su guía y enseñanza durante mi preparación. Así mismo, agradezco al Dr. Raymundo Domínguez Ordoñez y al Dr. Kurt Leroy Hoffman por brindarme su orientación, apoyo y sugerencias tan atinadas durante cada tutoría.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

En primer lugar, quisiera agradecer a Dios y a mis padres. A mi papá por ser mi guía y ejemplo de determinación. A mi madre por ser mi fortaleza e inspiración. A ambos por su amor.

Al Dr. Oscar González por aceptarme en su grupo de trabajo desde la licenciatura. Por permitir que trabajara en su laboratorio. Agradezco sus enseñanzas y consejos brindados. Expreso mi admiración y respeto a su trabajo y trayectoria.

Al Dr. Marcos García por hacerme parte de su línea de investigación, por confiar en mí y brindarme un apoyo honesto durante mi formación académica. Gracias por inspirarme y motivarme a generar nuevos conocimientos. Por su guía y consejos invaluable, sirva también expresar la admiración y estima a su labor como maestro.

A mis compañeros y amigos de laboratorio por su amistad y apoyo durante todo el transcurso de los experimentos ya que de manera directa e indirectamente han contribuido para la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mi compañero de vida Aldo, por su amor y apoyo incondicional en todo lo que me propongo realizar. Por estar en los días buenos y en los días difíciles, alentándome a dar lo mejor de mí.

A mis papás por enseñarme el valor del trabajo, por brindarme las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional y personal. Gracias por todo su amor.

A mis hermanos Julio y Laura, por ser mi apoyo y por su cariño.

A mi abuelo Ángel Solís †, a mi hermana María Inés † y a mi mejor amigo canino Pocholo †.
Donde quiera que se encuentren espero que estén muy orgullosos de mí.

RESUMEN

La isquemia cerebral global es causada por la obstrucción de los vasos sanguíneos que provocan la disminución del flujo sanguíneo hacia el cerebro. Esta condición provoca que las células nerviosas sufran un déficit en la disponibilidad de oxígeno y glucosa que afecta su proceso metabólico. Diversos trabajos han evaluado el efecto neuroprotector de diferentes hormonas ante un daño isquémico, dentro de las hormonas más estudiadas están los estrógenos y la progesterona. Sin embargo, se ha propuesto que la tibolona (un esteroide sintético) que ha sido clínicamente utilizado para disminuir los síntomas que se presentan en mujeres menopáusicas, y que podría ser utilizado como un agente neuroprotector ante el evento isquémico, debido a su afinidad tanto por el receptor de estrógenos, así como por el de progesterona. El objetivo del presente trabajo fue explorar el efecto neuroprotector de la tibolona y el estradiol, ante el daño producido en la población de neuronas piramidales de la región CA1, CA2 y CA3 del hipocampo producido por isquemia cerebral global aguda en ratas. Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso de 350 a 400 g, a los que se sometió a un evento isquémico por oclusión de los 4 vasos (4VO), de acuerdo con el modelo propuesto por Pulsinelli y Brierley (1979). Los animales fueron asignados aleatoriamente en los siguientes grupos: a) grupo sham, b) grupo isquémico sin tx, c) grupo isquémico con tx de estradiol (4mg) y d) el grupo isquémico con tx de tibolona (1mg). Los grupos experimentales recibieron dicho tratamiento a la hora, a las 6 hrs y cada 24 horas posterior al evento isquémico hasta el día del sacrificio en el día 7 pos isquemia, en el que se perfundieron y se obtuvo el tejido cerebral. El tejido fue reservado y posteriormente procesado por medio de la tinción de Nissl para evaluar la sobrevivencia de las neuronas piramidales en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la administración de 4mg/kg de estradiol promovió la sobrevivencia neuronal en la región CA1 del hipocampo en comparación con el grupo control ($p < 0.01$). Además, el grupo tratado con 1mg/kg de tibolona también promovió la sobrevivencia de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo con respecto a los animales del grupo control ($p < 0.001$). En las regiones CA2 y CA3 del hipocampo los conteos celulares no mostraron diferencias significativas, en relación con el grupo control. Adicionalmente, los datos obtenidos en el presente estudio mostraron que la tibolona tuvo un mejor efecto neuroprotector en comparación con el grupo tratado con estradiol ante un episodio de isquemia cerebral global

aguda en la rata. Los resultados sugieren que la tibolona ejerce mayor efecto neuroprotector probablemente debido a la afinidad de unión a distintos receptores hormonales como los de estrógenos y los de progesterona.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad cerebrovascular.....	1
1.1.1 Epidemiología.....	2
1.1.2 Clasificación.....	2
1.1.3 Etiología.....	4
1.1.4 Factores de riesgo.....	4
1.2 Fisiopatología de la isquemia.....	5
1.3 Cascada isquémica.....	5
1.3.1 Necrosis.....	6
1.3.2 Apoptosis.....	7
1.4 Modelos de isquemia cerebral.....	10
1.4.1 Isquemia focal.....	10
1.4.2 Isquemia global.....	11
1.5 Ventana terapéutica.....	11
1.6 Vulnerabilidad selectiva.....	12
1.7 Anatomía del hipocampo.....	13
1.8 Neuroprotección.....	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Hormonas esteroideas en la neuroprotección.....	15
2.1.1 Síntesis de esteroides.....	16
2.2 Neuroprotección por estrógenos.....	17
2.3 Tibolona.....	19
2.3.1 Uso clínico.....	19
2.3.2 Metabolismo de TIB.....	20
2.4 Tibolona como candidato neuroprotector.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24

5.1 Objetivo general	24
5.2. Objetivos específicos	24
6. METODOLOGÍA	24
6.1 Animales	24
6.2 Cirugías.....	24
6.3 Inducción a la isquemia.....	26
6.4 Tratamientos.....	26
6.5 Diseño experimental.....	27
6.5.1 Experimento 1	27
6.5.2 Experimento 2.....	27
6.6 Evaluación histológica.....	27
6.6.1. Perfusión.....	27
6.6.2. Tinción.....	28
6.6.3. Plan de análisis.....	29
7. RESULTADOS	30
8. DISCUSIÓN.....	37
9. CONCLUSIONES	42
10. PERSPECTIVAS	42
11. REFERENCIAS	43
12. GLOSARIO DE TÉRMINOS	53
13. PUBLICACIONES	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su naturaleza.....	4
Figura 2. Prototipo de lesión cerebral durante la isquemia cerebral: núcleo, región donde las células sufren necrosis.....	7
Figura 3. Cascadas de señalización apoptótica tras la isquemia cerebral.....	9
Figura 4. Esquema de la estructura hipocampal y laminación.....	14
Figura 5. Estructura química de la tibolona y su metabolización.....	17
Figura 6. Esquema general de la síntesis de esteroides en el sistema nervioso.....	21
Figura 7. Diagrama de la anatomía cerebrovascular de ratas del método para inducir isquemia global.....	25
Figura 8. Microscopia del hipocampo teñido con violeta de cresilo.....	29
Figura 9. Efecto de la administración de 1mg/kg de TIB, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico.....	30
Figura 10. Efecto de la administración de 1mg/kg de TIB, sobre el número de células piramidales de la región CA2 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico.....	31
Figura 11. Efecto de la administración de 1mg/kg de TIB, sobre el número de células piramidales de la región CA3 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico.....	32
Figura 12. Efecto de la administración de 4mg/kg de estradiol, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico.....	33
Figura 13. Efecto de la administración de 4mg/kg de estradiol, sobre el número de células piramidales de la región CA2 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico.....	34

Figura 14. Efecto de la administración de 4mg/kg de estradiol, sobre el número de células piramidales de la región CA3 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico.....	35
Figura 15. Efecto de la administración de 4mg/kg de estradiol y 1mg/kg de TIB, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico. Conteo de células piramidales en 1000µm ² de la región CA1 del hipocampo.....	36

1. INTRODUCCIÓN

El accidente cerebrovascular o enfermedad vascular cerebral (ACV; EVC) es una de las causas principales de muerte en la población mexicana y ocupa el segundo lugar a nivel mundial. La enfermedad cerebrovascular se refiere a un trastorno en el cual un área del encéfalo es afectada de forma transitoria o permanente debido al efecto de una isquemia o bien por una hemorragia cerebral (Díez y cols. 2001). El ACV se produce por la interrupción del flujo sanguíneo hacia el cerebro que provoca que se genere un proceso de excitotoxicidad producida por el glutamato, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, el rompimiento de la barrera hematoencefálica, la inflamación y la muerte celular. Los efectos terapéuticos tienen como objetivo fundamental la identificación y evaluación de los eventos deletéreos de esta cascada (neuroprotección), o la inducción de procesos endógenos de reparación cerebral (neurorestauración; Campos y cols. 2016).

Desafortunadamente, los tratamientos clínicos que existen actualmente y que son aplicados para reducir la morbilidad, reparar o prevenir el daño causado por eventos isquémicos, como el manitol, los barbitúricos, los corticoesteroides, la hiperventilación y el drenaje del líquido cefalorraquídeo, no han sido muy efectivos (Roberts y Counsell 1998). Por esta razón, el objetivo de la neuroprotección es intervenir en el proceso para que las células comprometidas por un episodio isquémico que están a punto de morir puedan salvarse, ya que, aunque la cascada isquémica ha sido intensamente estudiada, no ha sido completamente entendida.

1.1. Enfermedad vascular cerebral

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la enfermedad vascular cerebral (EVC) como los síntomas y signos neurológicos focales, cuyo inicio es súbito y puede llevar a la muerte debido a la insuficiente aportación de sangre al cerebro (González y Landínez 2016). Cuando los síntomas del padecimiento persisten durante más de 24 horas se le denomina enfermedad vascular cerebral, si los síntomas remiten en menos de un día se le denomina ataque isquémico transitorio (Cabrera y cols. 2008). El accidente o ataque cerebrovascular, apoplejía y el término latino ictus, son términos semejantes, al igual que su correspondiente en idioma inglés: stroke, significa golpe, indicando el carácter brusco y súbito de la patología (Amarencó y cols. 2009).

1.1.1. Epidemiología

En el ser humano, las enfermedades cerebrovasculares son un problema de salud pública a nivel mundial debido a que ocasionan altas cifras de incapacidad permanente, mortalidad y un fuerte gasto económico para las instituciones de salud ya que al año mueren en el mundo 5.5 millones de personas, de las cuales el ataque isquémico representa el 87% de todos los casos (Go y cols. 2014). Esta patología, representa la segunda causa de muerte en el mundo y la primera causa de discapacidad en los adultos (Bejot y cols. 2007). En el 2013, en los Estados Unidos, aproximadamente 795,000 personas experimentaron un daño cerebrovascular por primera vez o de manera recurrente (isquémico o hemorrágico). En promedio cada 40 segundos alguna persona en los Estados Unidos presenta alguna enfermedad cerebrovascular (Fernández y cols. 2008). El alto porcentaje de la presencia de estos padecimientos se puede asociar a la edad avanzada y sobre todo a los principales factores de riesgo como dislipidemias, hipertensión arterial, diabetes mellitus, enfermedades cardíacas y tabaquismo (Ávila y cols. 2012). Además, en países desarrollados, alrededor del 10% de las muertes también se deben a enfermedades vasculares cerebrales; de este porcentaje, el 80% de los ictus son de origen isquémico.

En México esta patología es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad y afecta a toda la población, aunque aumenta a partir de los 55 años (Fernández y cols. 2008). La prevalencia de infarto cerebral en personas de 55 a 65 años es alrededor del 11%; esta prevalencia aumenta a 22% entre los 65 y 69 años, 28% entre 70 y 74 años, 32% entre 75 y 79 años, 40% entre 80 y 85 años y 43% en mayores de 85 años. Una encuesta realizada en el 2007, sobre la prevalencia en pacientes mayores de 65 años que viven en áreas urbanas de países con ingresos bajos como Cuba, República Dominicana, Perú, Venezuela, México y China, mostraron tasas que oscilaron entre 65 y 91 por cada 1000 habitantes (González y Landínez. 2016).

1.1.2. Clasificación

El EVC es una condición heterogénea que se clasifica bajo distintos criterios, de acuerdo con su naturaleza, se han descrito dos subtipos patológicos: isquemia cerebral y hemorragia (González y Landínez 2016).

La isquemia cerebral puede ser de tipo global o focal, en donde en ambos casos la causa puede ser la obstrucción de los vasos sanguíneos que suministran sangre a la totalidad o a la mayor parte del cerebro; si la disminución del flujo de sangre se produce hacia todo el cerebro se denomina isquemia global, la que suele ocurrir durante un ataque cardíaco o una hipotensión sistémica aguda. Sin embargo, sí sólo se produce la oclusión de los vasos que suministran sangre a un área determinada del cerebro generará una isquemia focal (Durukan y Tatlisumak 2007).

La duración del proceso en la isquemia focal se clasifica en infarto cerebral o accidente isquémico transitorio (AIT), en función del déficit isquémico y si éste es revertido o no antes de 24 horas (Díez y cols. 2001).

La isquemia cerebral global afecta de forma difusa los hemisferios cerebrales y puede asociarse o no a una lesión del tronco del encéfalo y/o cerebelo. Las derivaciones clínicas van desde un déficit cognitivo leve (memoria y atención) o bien un estado vegetativo persistente por necrosis neocortical. En caso extremo se puede producir la muerte cerebral por una afectación tronco-encefálica si la duración es prolongada (Díez y cols. 2001).

La hemorragia cerebral se define como el derrame sanguíneo producido en el interior del cerebro debido a una rotura vascular. Esta patología representa de un 15 a un 20% de todos los ictus. De acuerdo con su localización, se subclasifica en dos tipos. En primera instancia la hemorragia intracerebral (HIC), es producto de la ruptura espontánea (no traumática) de un vaso, dando lugar a una colección hemática en el parénquima cerebral (hemorragia cerebral) o en el espacio subaracnoideo, es decir una hemorragia subaracnoidea (HSA) (González y Landínez 2016; Díez y cols. 2001).

El impacto de la isquemia cerebral depende de la gravedad y la duración de la reducción del flujo sanguíneo (Cassiani y Borrero 2013). Una isquemia poco grave pero prolongada produce cambios equivalentes a una isquemia corta y grave; sin embargo, se ha determinado que algunos fenómenos moleculares, como la inhibición de la síntesis proteica, son los mismos sin importar la duración del evento isquémico (Mies y cols. 1991).

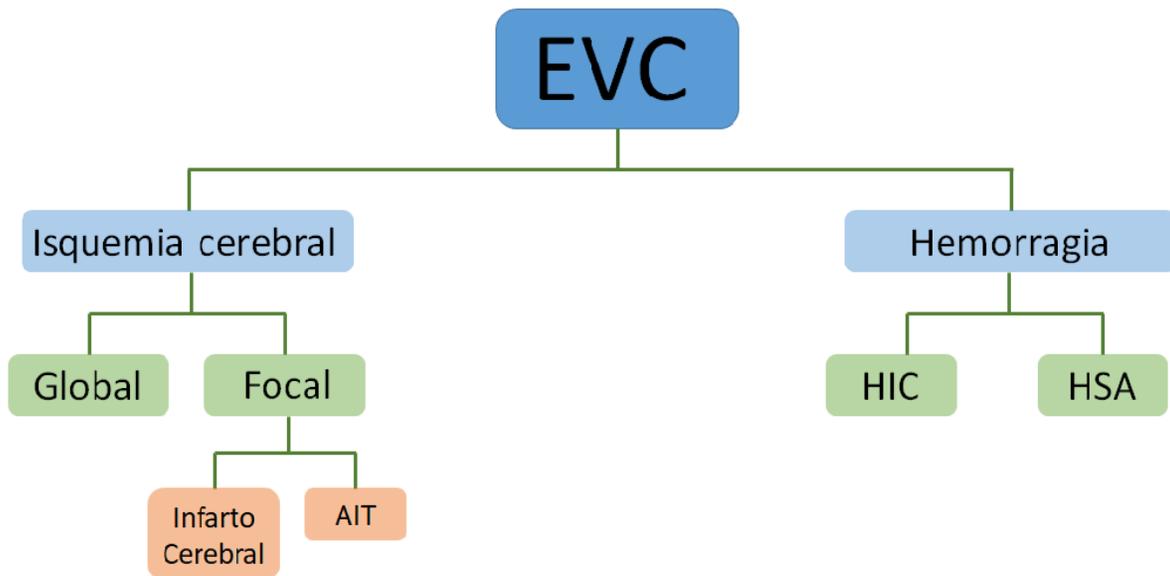


Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su naturaleza. EVC: enfermedad vascular cerebral; AIT: accidente isquémico transitorio; HIC: hemorragia intracerebral; HSA: hemorragia subaracnoidea. Modificado de Díez y cols. 2001.

1.1.3. Etiología

Las causas frecuentes para desarrollar algún tipo de EVC son aterosclerosis de grandes arterias, causas de origen cardioembólico, enfermedad de pequeños vasos, hipertensión, malformación arteriovenosa, angiopatía amiloide, trastorno hemorrágico, aneurisma cerebral, fármacos, drogas, toxemia del embarazo, peri mesencefálica, puerperio, uso de anticonceptivos orales, síndrome antifosfolípido y algunas otras causas no determinadas (Cantú y cols. 2011).

1.1.4. Factores de riesgo

Los factores de riesgo pueden clasificarse en: no modificables, mayores y menores. Los primeros incluyen edad avanzada, sexo, herencia y raza; en los factores mayores engloba la hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemias y enfermedades cardiacas (isquémicas, valvulares y arrítmicas); mientras que los factores menores agrupan el hábito de fumar, sedentarismo, obesidad y alcoholismo (Pérez y cols. 1998).

1.2. Fisiopatología de la isquemia

La enfermedad cerebrovascular isquémica es resultado de la disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) global y como consecuencia principal general la falta de oxígeno y glucosa necesarios para el metabolismo celular cerebral (Neumar 2000), y puede ser a consecuencia de la oclusión de una arteria que irriga un territorio específico del encéfalo afectando áreas vulnerables como el tallo cerebral, hipocampo, cerebelo y corteza cerebral (López 2003; Durukan y Tatlisumak 2007). Cuando se presenta la cascada de eventos bioquímicos que inicia con la pérdida de energía y que culmina en muerte neuronal, también se produce un exceso de aminoácidos excitatorios extracelulares, inflamación, formación de radicales libres y la entrada de calcio a la neurona (Arauz y Ruíz 2012).

Las características del daño cerebral dependen de la gravedad y duración de la reducción del FSC (Durukan y Tatlisumak 2007). En condiciones fisiológicas normales, el activo metabolismo cerebral se mantiene en estrecha relación con el FSC ej. 50-60 ml/100g/min en el hombre (Guevara y cols. 2004) y de 100-120 ml/100g/min en la rata (Ginsberg 2003), el cual se mantiene regulado de forma dinámica con la presión arterial y con la barrera hematoencefálica. Los valores normales de flujo sanguíneo cerebral garantizan una liberación continua de oxígeno y glucosa como substratos imprescindibles en el mantenimiento de los potenciales de membrana celular y la homeostasis iónica, de manera local en las distintas regiones cerebrales, que reflejan adaptaciones específicas de acuerdo con la especie (Candelario 2009).

1.3. Cascada isquémica

La reducción del flujo sanguíneo cerebral es un evento crítico que origina una serie de cambios funcionales, bioquímicos y estructurales que culminan en la muerte neuronal irreversible (Zarco y cols. 2008).

El deterioro energético está relacionado con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y el déficit en la producción de adenosín trifosfato (ATP; Arango y cols. 2004), la falla en las bombas iónicas y estimulación persistente de los receptores de glutamato que produce toxicidad sobre las neuronas del área comprometida (Brott y Bogousslavsky 2000). Esta sobrecarga de glutamato conduce a la estimulación prolongada de receptores ionotrópicos

de glutamato de tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) y de receptores ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), que aumentan drásticamente el influjo de Ca^{+} , Na^{+} , K^{+} y agua en las neuronas (Won y cols. 2002). El sodio y el cloro ingresan al citosol por los canales iónicos monovalentes acompañado de difusión pasiva de agua que más tarde produce edema citotóxico. Por otro lado, el incremento masivo de Ca^{+} activa fosfolipasas que lesionan la membrana de la célula, generan ácidos grasos libres y producen a su vez ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos. Además, el calcio estimula la activación de proteasas, lipooxigenasas, ciclooxigenasas oxidasa de xantinas y sintetasa de óxido nítrico que da como resultado acumulación de radicales libres citotóxicos (Zarco y cols. 2008).

La acumulación excesiva de iones y la desregulación simultánea de varias vías de señalización provocan la alteración de la función neuronal y conducen a la muerte celular (Won y cols. 2002), a través de la producción de necrosis y apoptosis (Spada y cols. 2003). La necrosis prevalece en el centro del infarto mientras que la apoptosis en el área de penumbra isquémica (Zarco y cols. 2008). Ambos tipos de muerte celular están relacionados en el daño cerebral producido por la isquemia, ya que en una misma lesión algunas células mueren por necrosis, otras por apoptosis y otras por una combinación de ambas (Graham y Chen 2001).

1.3.1. Necrosis

La muerte celular por necrosis es un proceso donde existe depleción súbita de energía (Ashe y Berry 2003), en especial de ATP, seguida de daño a la membrana plasmática y de la consecuente alteración en el intercambio de iones. Cuando el flujo sanguíneo de una región cerebral disminuye, la supervivencia del tejido en riesgo depende de la intensidad y de la duración de la isquemia y de la disponibilidad de circulación colateral (Spada y cols. 2003).

La necrosis se produce en el cerebro de manera indiscriminada y desordenada, como consecuencia de la pérdida de la homeostasis celular secundaria a la anoxia o la interrupción brusca del aporte de nutrientes. Morfológicamente, la célula necrótica se identifica principalmente por la pérdida de integridad de su membrana plasmática, la fragmentación de la cromatina, una condensación y reducción del volumen del citoplasma, agregados de mitocondria, ribosoma y condensación del núcleo. Habitualmente la necrosis, afecta a un gran número de células, ya que crecen a medida que captan agua y al final terminan por fragmentarse

vertiendo todo el material celular al tejido circundante. Los fragmentos celulares que se generan son denominados “cuerpo apoptótico” (Mehta y cols. 2007; Zarco y cols. 2008).

1.3.2. Apoptosis

La apoptosis se genera mediante una serie de cambios ordenados y estrechamente regulados por la expresión de genes que suprimen o promueven la muerte celular y la actividad de una familia de proteasas, dependientes de la cisteína y específicas del aspartato, denominadas caspasas (Zarco y cols. 2008). Así, inicialmente, se libera citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca) al citoplasma, donde interactúa con factores citosólicos como factor de activación de la peptidasa apoptótica 1 (Apaf1) y caspasa-9; además, activa la caspasa-3 con el subsecuente clivaje de proteínas sustratos, dentro de las que se incluye la poli-ADP-ribosa polimerasa (Yuan 2009). Por otra parte, algunas señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca; Nagata 1999).

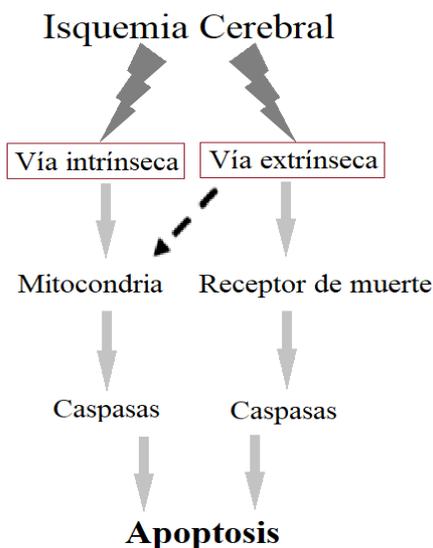


Figura 2. *Cascadas de señalización apoptótica tras la isquemia cerebral.* La apoptosis puede iniciarse por eventos internos (es decir, la "vía intrínseca") que implican la ruptura de las mitocondrias y la liberación del citocromo C, que conduce a la activación posterior de las caspasas. Alternativamente, los receptores de la superficie celular pueden ser activados por ligandos específicos que se unen a los "receptores de la muerte" (es decir, la "vía extrínseca").

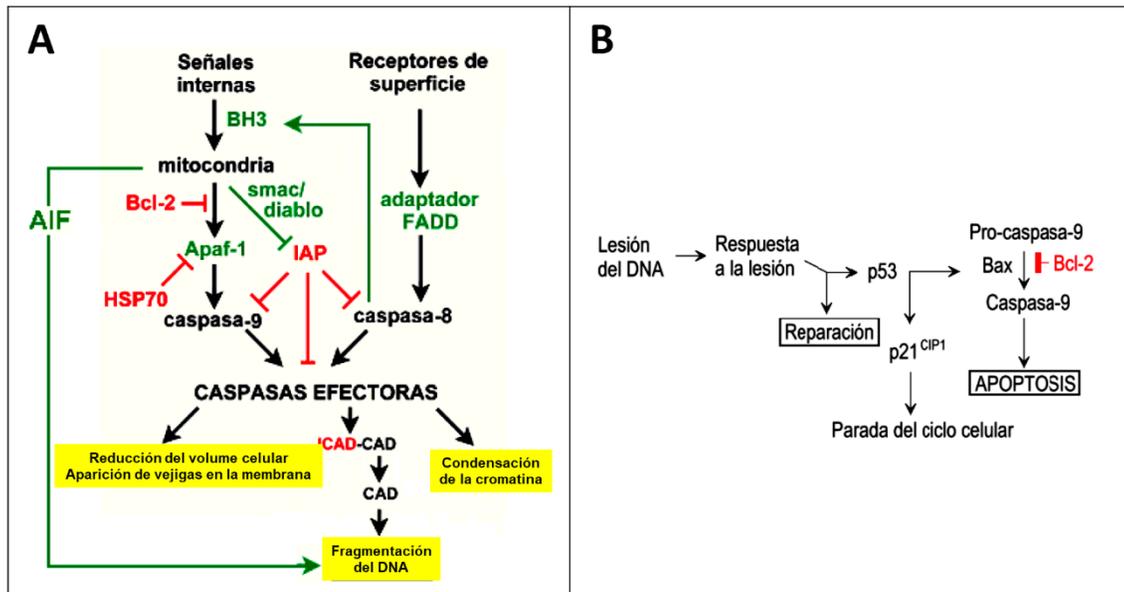
El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis; por último, en la tercera etapa o de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Hengartner 2000), la cual es caracterizada por la fragmentación de la cromatina, reducción de volumen y condensación del citoplasma, agregados de mitocondria y ribosoma y condensación del núcleo. Los fragmentos celulares generados conforman el denominado “cuerpo apoptótico” (Zarco y cols. 2008).

Las células reciben constantemente señales de vida y muerte, es el contexto celular el que determina el resultado final. De manera normal, las células poseen internamente la maquinaria enzimática necesaria para ejecutar el programa apoptótico. Se ha propuesto que la señal apoptótica induce la muerte celular a través de la degradación de proteínas anti-apoptóticas que están regulando la vida de las células. Se han descrito varias moléculas que participan en esta regulación, y de acuerdo con su estructura se pueden agrupar en familias.

Entre las más importantes se pueden citar a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs; inhibitors of apoptosis proteins), a las proteínas miembro de la familia de Bcl-2 y a las FLIP (del inglés FLICE caspasa 8-inhibitory proteins; Sánchez y Diosdado 2003).

Parte de la familia Bcl-2, se encuentran moléculas pro y anti-apoptóticas.

Las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL), contienen moléculas que participan regulando la apoptosis al controlar la permeabilidad mitocondrial y la liberación del citocromo C (Kroemer y cols. 1997; Hengartner 2000). (Boise y Thompson 1997). Mientras que los miembros pro-apoptóticos (Bad, BID, Bax, y Bim) residen en el citosol y se translocan a la mitocondria después de recibida la señal de muerte donde promueven la liberación del citocromo C (Yoshino y cols. 2001).



AIF, Induce la degradación del DNA cromosómico independientemente de las caspasas.
 APAF-1, factor activador de las proteasas apoptogénicas.
 BH3, dominio pro-apoptótico.
 CAD, desoxirribonucleasa activada por caspasa.
 ICAD/CAD, heterodímero inhibidor/desoxirribonucleasa.
 FADD, dominio de muerte asociado a Fas.
 Smac/DIABLO, inhibidor de IAP.
 p53, un poderoso inductor de la apoptosis.

Bcl-2, promueve la supervivencia celular.
 Hsp70 y las IAP, factores anti-apoptóticos.

Figura 3. Mecanismo general de la apoptosis y anti-apoptosis. (A) Las células están protegidas por los factores anti-apoptóticos de la familia Bcl2, los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma, por la HSP70 que secuestra el dominio CARD de Apaf-1 y por IAP que actúa sobre las propias caspasas. La mitocondria inicia la cascada apoptótica liberando citocromo c, pero este efecto puede ser anulado si IAP mantiene su efecto inhibitorio sobre las caspasas. La señal apoptótica tiene que ser sostenida por la liberación de smac/diablo. Smac/diablo es la segunda proteína mitocondrial activadora de la caspasa que se une directamente a IAP y antagoniza su función. Un tercer activador de la apoptosis de procedencia mitocondrial es AIF, que se traslada al núcleo donde interviene en la condensación de la cromatina. (B) El papel de las proteínas p53 y Bcl-2 en la ejecución de la apoptosis. Cuando el DNA es lesionado, la p53 se eleva desencadenando la apoptosis por inducción de la expresión de Bax y las proteínas BH3 reguladas por p53. La parada del ciclo celular está mediada por estimulación de la expresión de la proteína p21^{CIP1}, inhibidora de la ciclina quinasa. Sin embargo, la sobreexpresión de Bcl-2 contrarresta el efecto apoptogénico de esta proteína. Modificado de Agosto 2002.

1.4. Modelos de isquemia cerebral

Durante las últimas cuatro décadas se han desarrollado una variedad de modelos en animales de enfermedades cerebrovasculares con el objetivo de identificar los mecanismos que subyacen a la isquemia cerebral y desarrollar nuevos agentes para el tratamiento del ictus (Fluri y cols. 2015).

Las especies comúnmente utilizadas en estos modelos son principalmente ratas y ratones, los cuales son una herramienta indispensable de investigación en el campo de la enfermedad cerebrovascular (Graham y cols. 2004; Durukan y Tatlisumak 2007). En los últimos años se han elaborado métodos menos invasivos, seguros y reproducibles, respondiendo a la necesidad de refinar técnicas quirúrgicas enfocadas específicamente a minimizar el riesgo de muerte o las posibles complicaciones que puedan afectar el curso fisiopatológico de la lesión (Gerriets y cols. 2004; Sicard y Fisher 2009). En general, existen cuatro modelos animales para este propósito: la isquemia cerebral focal, la isquemia cerebral multifocal, la isquemia global incompleta y la isquemia cerebral global completa (Graham y cols. 2004). Para efectos de esta investigación solo serán descritos dos modelos importantes: isquemia focal y global.

1.4.1. Isquemia focal

El modelo más utilizado para generar isquemia focal transitoria es la oclusión temporal de la arteria cerebral media (Longa y cols. 1988; Belayev y cols. 1999). Esta técnica consiste en ocluir temporalmente la arteria carótida común, introducir una sutura directamente en la arteria carótida interna y avanzar la sutura hasta que interrumpa el suministro de sangre a la arteria cerebral media (Liu y cols. 2009). Este modelo produce grados variables de isquemia que dependen del tiempo de oclusión y de la permanencia de la oclusión (Sicard y Fisher 2009).

En isquemia focal existen tres regiones. La primera región no recibe flujo sanguíneo y responde igual que el tejido isquémico global; la segunda región, llamada penumbra, recibe flujo colateral y es parcialmente isquémica; la tercera región es normalmente perfundida. Si la oclusión se mantiene durante un período prolongado, las neuronas de la penumbra mueren. Más neuronas en la región de la penumbra sobreviven si el flujo sanguíneo colateral se incrementa o si la

reperfusión se establece de manera oportuna mediante la apertura del vaso bloqueado (Zola y cols. 1986; Wang y cols. 2007).

1.4.2. Isquemia global

El modelo de oclusión de los cuatro vasos (4-VO, del inglés Four Vessel Occlusion) es uno de los más utilizados para producir lesiones isquémicas globales e infartos hemisféricos en ratas (Pulsinelli y Brierley 1979; Pulsinelli y Buchan 1998; Traystman 2003). Esta técnica, consiste en la oclusión temporal de las arterias carótidas, después de cauterizar las arterias vertebrales (Céspedes y cols. 2013). Se espera que ocurra lesión cerebral cuando el flujo sanguíneo cerebral se reduce a menos del 10-20% del valor normal; a mayor duración, el daño se incrementa (Ginsberg y Busto 1989; Pulsinelli 1985).

La isquemia cerebral global es una condición patológica que puede ocurrir principalmente durante el paro cardíaco y la reanimación cardiopulmonar, pero también durante la asfixia, choque hipotensor o circulación extracorpórea (Madl y Holzer 2004).

El daño neurológico selectivo después de la supervivencia posterior a la isquemia global se debe principalmente a la sensibilidad diferencial de ciertas neuronas y regiones cerebrales. El hipocampo, especialmente las células piramidales de la región de CA1, es extremadamente vulnerable al daño isquémico; la pérdida de aprendizaje y la memoria es común después de la isquemia global y la hipoxia (Zola y cols. 1986; Wang y cols. 2007).

1.5. Ventana terapéutica

Es conocido como un periodo variable durante el cual la restitución del flujo y/o la inhibición de los mediadores de daño celular isquémico (citoprotección) evitarían la muerte de las células potencialmente más vulnerables, mientras que, si el mismo es sobrepasado, cualquier medida que sea terapéutica será inútil (Brierley 1979).

Existen tratamientos que pueden tener efectos benéficos frente al daño isquémico tales como: la hipotermia, el tratamiento con antioxidantes, la albumina y la eritropoyetina, así como estrategias neuroprotectoras (Alcaraz y Ríos 2004).

El tratamiento de neuroprotección en el ictus isquémico es entendido como el conjunto de medidas terapéuticas que tienen como intención prevenir o limitar la lesión del tejido nervioso, de tal manera que interfieren uno o más componentes de la cascada isquémica. Sin embargo, estos tratamientos presentan diversos problemas ya que las posibilidades de los pacientes de poder ser candidatos al tratamiento son escasas (Fernández y cols. 2008).

1.6. Vulnerabilidad selectiva

Las neuronas en el sistema nervioso central presentan diferente vulnerabilidad a la lesión isquémica de una manera bastante heterogénea. Las áreas del hipocampo son excepcionalmente susceptibles al daño isquémico. Por ejemplo, la circunvolución dentada que se encuentra en las proximidades de la zona vulnerable del hipocampo puede tolerar un considerable grado de isquemia. El hecho de que cierto grupo de neuronas son particularmente sensibles al ataque isquémico se le conoce como vulnerabilidad selectiva (Brierley 1976).

Las áreas encefálicas más susceptibles a sufrir daño por déficit de oxígeno y glucosa incluyen: la capa piramidal del hipocampo, específicamente la región CA1 (el llamado sector de Sommer en la epilepsia del lóbulo temporal), las capas 3, 4 y 5 de la neocorteza (necrosis laminar), principalmente en lóbulos occipitales y frontales, las neuronas de Purkinje y granulares del cerebelo, el globo pálido y la sustancia blanca subcortical, sobre todo las fibras en U, fibras cortico-corticales. Por lo tanto, la topografía de la vulnerabilidad selectiva puede variar según la actividad funcional de las diferentes áreas del encéfalo, a mayor actividad funcional mayor susceptibilidad (Escobar 2005).

Se ha establecido que la vulnerabilidad selectiva con muerte neuronal en la hipoxia por isquemia global se debe a la excitotoxicidad generada por la liberación de glutamato en el líquido extracelular. La muerte encefálica global ocurre cuando el aporte de oxígeno y/o glucosa cae a nivel cero, como ocurre en el caso de paro cardíaco o episodios de hipotensión que excedan de un tiempo crítico. La causa más común es la falta de oxígeno, daño hipóxico-anóxico que puede deberse a cualquier variedad de obstrucción de las vías o paro respiratorios; déficit de oxígeno en el aire como en la intoxicación por monóxido de carbono, o en accidentes anestésicos (Auer y cols. 2007).

Así, el hipocampo es un sitio de predicción clásico para lesión isquémica del tipo de vulnerabilidad selectiva. La región CA1 sufre de daño isquémico mientras que la región CA3 adyacente y la circunvolución dentada son en gran parte resistentes. Este patrón diferencial de daño de CA1 frente a la preservación de CA3 crea una situación ideal para comparar áreas vulnerables y resistentes dentro de una pequeña parte del cerebro (Schmidt y Freund 1991).

1.7. Anatomía del hipocampo

La anatomía de la formación del hipocampo se debe a la descripción que hizo el anatomista italiano Giulio Cesare Aranzio, quien describió por primera vez el aspecto del hipocampo humano dándole nombre de *Hippocampus* (derivado de la palabra griega caballo de mar, por su similitud morfológica; Schultz y cols. 2014).

El hipocampo se deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte del sistema límbico y tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial y la consolidación de la memoria. Anatómicamente consta de un cuerno de Ammón (hipocampo propio) y el giro dentado (separado por la fisura hipocampal); el complejo subicular, formado por el presubiculum, subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal. El cuerno de Ammón está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3 (Hernández y cols. 2015).

El giro dentado forma la parte más medial de la corteza cerebral. La estructura típica en forma de C se encuentra separada ventralmente de CA1 y del subículo por la fisura del hipocampo. La capa celular principal de la circunvolución dentada esta densamente poblada de somatos de células granulares (Schultz y cols. 2014).

El hipocampo se divide en CA1, CA2 y CA3, estos campos tienen esencialmente una capa celular, principalmente piramidales. El sector CA1 contiene células piramidales que cubren la banda dorsal; la transición a CA2 se da cuando las células piramidales se hacen más grandes; al llegar a la curvatura lateral se encuentra CA3. Las células piramidales de la última región desembocan en el hilio del giro dentado, definidas a menudo como CA4 y en otros casos como neuronas hiliares (Schmidt Kastner y Freund 1991).

La superficie que limita con el lumen ventricular está formada por los axones de las células piramidales denominada alveus. Entre ésta y la capa de células piramidales, el estrato oriencial

contiene principalmente dendritas basales de las células piramidales, además de diversos tipos de interneuronas (Schultz y cols. 2014).

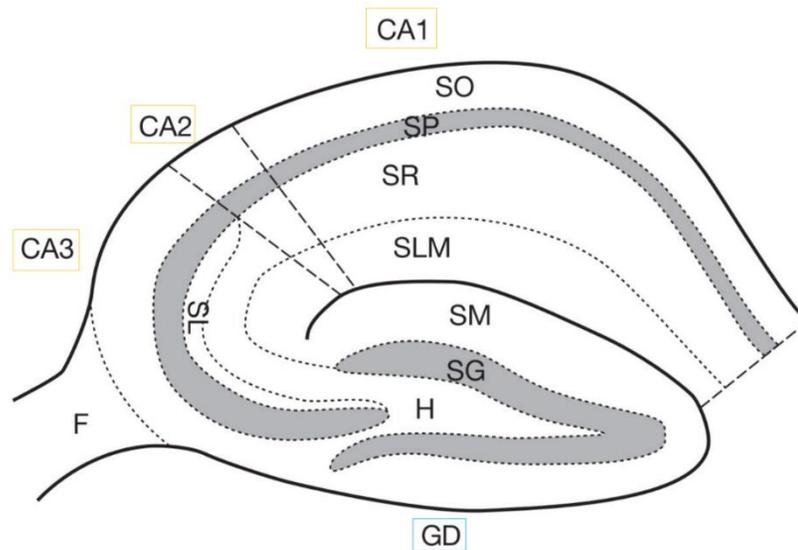


Figura 4: Esquema de la estructura Hipocámpica y laminación. CA: cuerno de Ammón, GD: giro dentado, F: fimbria, H: hilus, SO: estrato oriens, SP: estrato piramidal, SLM: estrato lacunoso-molecular, SL: estrato lucido, SM: estrato molecular, SG: estrato granuloso. Modificado de Li y Pleasure 2013.

1.8. Neuroprotección

En el accidente cerebrovascular isquémico, la neuroprotección es definida como el conjunto de estrategias aplicadas que antagonizan los eventos bioquímicos y moleculares perjudiciales que transcurren durante la cascada isquémica (Campos y cols. 2016).

El objetivo de la neuroprotección farmacológica es limitar el área de la lesión cerebral, bloqueando la cascada isquémica para evitar o retrasar la evolución hacia la muerte celular.

Han sido numerosas las estrategias neuroprotectoras evaluadas tanto en estudios preclínicos como en ensayos clínicos, entre las cuales se encuentran: fármacos que actúan sobre la sinapsis neuronal, como antagonistas de los receptores post sinápticos, moduladores de la activación de este o como inhibidores de la liberación presináptica. También aquellos que actúan como antagonistas de los canales de calcio, con actividad antioxidante, moduladores de la respuesta

inflamatoria, fármacos que actúan sobre los mecanismos de apoptosis celular (Fernández y cols. 2008).

2. ANTECEDENTES

La llegada del siglo XX trajo consigo una serie de estandarización y aplicación de modelos experimentales para la isquemia cerebral, permitiendo avanzar en el estudio de la fisiopatología y en la evaluación de estrategias terapéuticas, con énfasis en el carácter predictivo y la relevancia clínica. Sin embargo, han existido discrepancias entre los resultados experimentales y la situación clínica, lo cual puede derivarse de alguna de las etapas de la investigación preclínica: la selección adecuada del modelo experimental y el método para inducir la isquemia, el método apropiado para evaluar y analizar el daño isquémico, y la interpretación correcta de los resultados (Campos y cols. 2016).

En la búsqueda de terapéuticas más eficaces se ha encontrado que los esteroides neuroactivos pueden ser buenos candidatos, debido a sus efectos neuroprotectores pleiotrópicos relacionados estrechamente con su mecanismo de acción. Los receptores de estrógenos (SERM) y los reguladores selectivos de la actividad estrogénica tisular (STEAR) han demostrado ejercer propiedades neuroprotectoras en diversos modelos in vitro e in vivo (López y cols. 2015).

2.1. Hormonas esteroideas en la neuroprotección

Los esteroides sexuales intervienen en funciones reproductivas y han sido implicados en procesos como la cognición, la plasticidad sináptica, memoria, neurogénesis y neuroprotección. (Liu y cols. 2010). Estas hormonas esteroideas, actúan sobre las neuronas, la sinapsis y las células gliales, además, regulan la supervivencia, la diferenciación y conectividad de grupos neuronales específicos a nivel de cerebro y médula espinal (Veiga y cols. 2004). Su actividad neuroprotectora la ejercen dependiendo de su estructura química, de las concentraciones circulantes o tisulares, del tipo de receptores que intervienen y de los mecanismos de señalización intracelular empleados. A través de modelos animales se han estudiado diversas neuropatologías humanas, en el que se ha visto que los estrógenos actúan como agentes neuroprotectores, promueven la neurogénesis hipocampal, la expresión de factores

neurotróficos y disminuyen la astrogliosis, de tal manera que se confirma la plasticidad del sistema nervioso ante el estímulo estrogénico (De Nicola y cols. 2011).

2.1.1. Síntesis de esteroides

La síntesis de esteroides en el sistema nervioso se lleva a cabo por el cerebro. Este órgano es capaz de sintetizar esteroides a partir del colesterol y metabolizar sus derivados en neuromoduladores (De Nicola y cols. 2011). La existencia de una síntesis local ha llevado a acuñar el término neuroesteroide (Baulieu y Robel 1990). Existe una distinción entre los términos neuroesteroide y esteroide neuroactivo. El primero se sintetiza en el sistema nervioso a partir del colesterol y actúa localmente; un esteroide neuroactivo es aquella hormona o neuroesteroide que actúa sobre el sistema nervioso (Veiga y cols. 2005).

Por otro lado, los efectos biológicos de las hormonas esteroideas son mediadas por los receptores intracelulares específicos de alta afinidad, que posterior a ligarse a la hormona, funcionan como factores de transcripción activados. Sin embargo, los neuroesteroides también pueden actuar directamente en receptores membranales y activar vías de señalización intracelular (González 1999).

La síntesis tiene lugar en las mitocondrias, donde el colesterol libre es sintetizado a partir de la rotura de la cadena lateral, para así convertirse en 5-pregnanolona, sufre la 3β -oxidación, la isomerización e hidroxilación en C17 y C21 para realizarse finalmente la hidroxilación en C11, de nuevo a nivel mitocondrial (Flores y Amado 1997), para convertirse en dehidroepiandrosterona en los oligodendrocitos; en donde genera acciones en el SNC o bien pueden servir como precursores de progesterona y testosterona en el SNC (González 1999).

En diversos estudios se ha encontrado la presencia de enzimas esteroideogénicas funcionales en el SNC, por medio de la medición de la actividad enzimática, de la expresión del ARNm o de la proteína. Estas enzimas sintetizan esteroides a partir del colesterol y metabolizan los esteroides periféricos que alcanzan el sistema nervioso por el torrente sanguíneo, de este modo transforman la testosterona en estradiol o la progesterona en tetrahidroprogesterona (THP). Las principales células esteroideogénicas en el sistema nervioso son las células gliales. En el sistema nervioso periférico, las células de Schwann son la principal fuente de neuroesteroides. Por su

parte, en el sistema nervioso central los oligodendrocitos, astrocitos y neuronas también presentan actividad esteroidogénica (Veiga y cols. 2005).

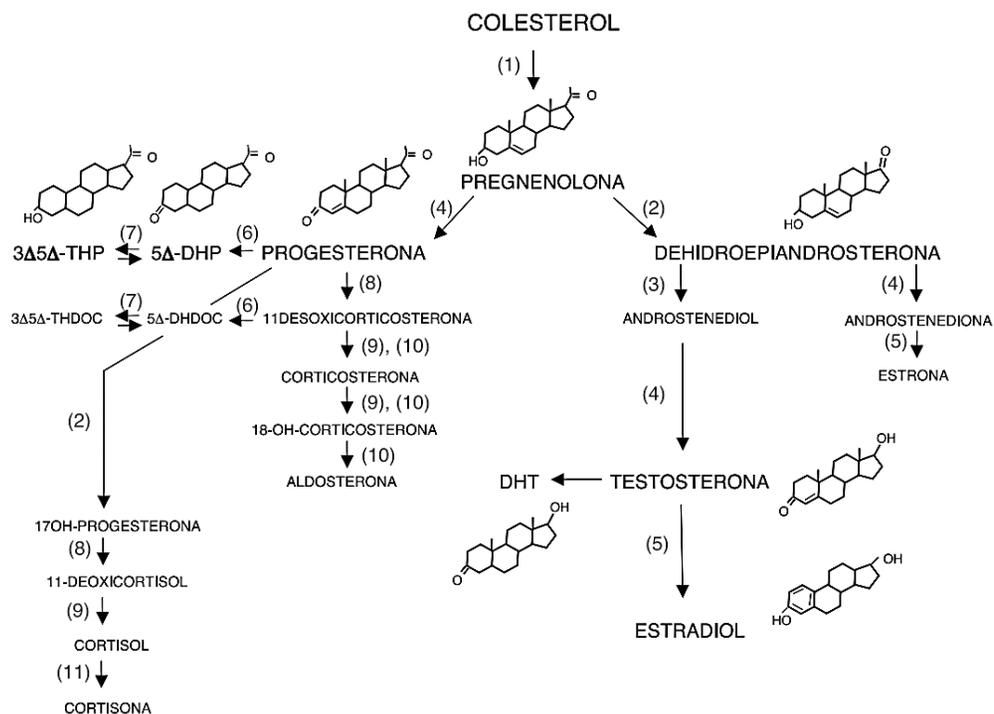


Figura 5. Esquema general de la síntesis de esteroides en el sistema nervioso. Los números entre paréntesis hacen referencia a las enzimas que llevan a cabo la reacción: (1): P450scc; (2): P450c17; (3): 17β-HSD; (4):3β-HSD; (5): P450aro; (6): 5α-reductasa; (7): 3β-HSD; (8): P450c21; (9): P450c11B; (10): P450c11AS; (11): 11β-HSD. Tomado de Veiga y cols. 2005.

2.2. Neuroprotección por estrógenos

El estrógeno (E) es un esteroide gonadal que ejerce funciones a nivel de SNC más allá de su papel puramente reproductivo. Se ha encontrado que posee gran influencia en el desarrollo y la plasticidad de circuitos cerebrales, actuando sobre dendritas, axones y la sinapsis.

El estrógeno actúa a nivel genómico y no genómico dependiente e independientemente del receptor a estrógenos (RE). Existen dos subtipos de receptores: REα, REβ, estos poseen estructuras muy similares, aunque la distribución y función de estos receptores es distinta en el cuerpo. El REα predomina en mujeres en órganos como el útero, pero también en el hígado, los tejidos adiposos, el músculo esquelético la hipófisis y el hipotálamo, mientras que el REβ está

presente en los ovarios, próstata y en cerebro, teniendo un papel importante de los RE en diversos tejidos (Morán 2014).

Ambos receptores de estrógenos son factores de transcripción que actúan mediante su unión a los receptores alfa y beta ($RE\alpha$, $RE\beta$). Tras su activación, se homodimerizan o heterodimerizan para unirse al ADN sobre sus dominios de unión a ligandos. El dímero RE se transloca al núcleo y se une a los elementos sensibles al estrógeno ubicados en los promotores de los genes sensibles al estrógeno para así regular su transcripción.

En nuevas investigaciones se ha visto que los RE no solo interactúan en la modulación transcripcional directa, sino además interactúan en las vías de transducción de señales como la adenil ciclasa, la fosfoinositol 3-quinasa o la quinasa activada por mitógenos (MAPK).

La realización de estudios en ratas hembra ovariectomizadas ha dejado ver que la eliminación de esteroides gonadales circulantes produce una disminución de la densidad de espinas dendríticas en células piramidales. Sin embargo, cuando los sujetos son tratados con estradiol, el descenso es menor. Por otro lado, puede asociarse que el daño producido a consecuencia de procesos neurodegenerativos puede ser retardado por la acción de los estrógenos (Morán 2014; Dubal y Wise 2002).

En múltiples estudios se ha comprobado que el estradiol es un factor que promueve la supervivencia y diferenciación de diferentes poblaciones neuronales como células hipotalámicas, células de la amígdala o células hipocámpales. Además, se ha demostrado su papel en la protección, ya que protege de la muerte neuronal inducida por multitud de agentes estresantes como los radicales libres, el péptido β -amiloide, y los aminoácidos excitadores glutamato, AMPA, kainato y NMDA (Veiga y cols. 2004).

Se ha estudiado la interacción del estrógeno en la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 beta ($IL-1\beta$), la interleucina 6 ($IL-6$), el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) y el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$) posterior a una lesión cerebral traumática; en este sentido, la dosis de estradiol (1mg/kg) indujo cambios a las 24 horas en la reducción de los niveles de $IL-1\beta$ en el cerebro y un aumento en los niveles de $TGF-\beta$; estos cambios sugieren un mecanismo en el cual la hormona participa en la reducción del edema cerebral (Reza y cols. 2013). En 2011, Etgen y colaboradores realizaron un estudio sobre la eficacia neuroprotectora de estradiol como pretratamiento en el modelo animal de isquemia

cerebral transitoria, sus resultados mostraron una neuroprotección significativa contra el daño inducido por isquemia, bajo un periodo de tratamiento de 14 días de estradiol, en comparación de las ratas isquémicas que tuvieron una pérdida significativa en la región de CA1 del hipocampo.

Otro estudio realizado con el modelo de hipoperfusión cerebral crónica (HCC) mostro que la administración crónica de benzoato de estradiol preservó la población neuronal del segmento CA1 del hipocampo en animales tratados en comparación a los grupos control, además de una mejor ejecución en evaluaciones previas de tareas de memoria y aprendizaje espacial como el laberinto acuático de Morris (Montoya 2016). La relación de los estrógenos hormonales en los diferentes órganos se ha identificado en diversas regiones del cerebro, como el neocórtex, la amígdala y el hipocampo, por lo que es posible que los estrógenos también tienen acción sobre la cognición, el estado de ánimo y otras funciones cerebrales (Martin y cols. 2018).

2.3. Tibolona

La Tibolona (TIB), muestra en su estructura un [(7 α , 17 α)-17-hidroxi-7-metil-19-norpregn-5(10)-en-20-in-3-ona], la cual es relacionada con derivados de la 19-nortestosterona como el noretinodrel y la noretisterona (3-ceto- Δ 5-10 con 2 sustituyentes, un grupo α -metilo en la posición 7, y un 17 α -etilo). La TIB actúa como activador de receptores hormonales específicos dependientes del tejido. Se ha propuesto como regulador tisular selectivo de la actividad estrogénica (STEAR), dado que su activación de los receptores de estrógeno en los tejidos humanos depende de la disponibilidad de enzimas en cada tejido. Además, presenta efectos estrogénicos en el cerebro, tejido óseo y vagina; por otro lado, presenta efectos progestágenos en tejido mamario y endometrio; así como efectos androgénicos en hígado (Del Río y cols. 2020; Pinto y cols. 2017; Reed y Kloosterboer 2004).

2.3.1. Uso clínico

Inicialmente la TIB es utilizado como tratamiento para aliviar los síntomas del climaterio en mujeres posmenopáusicas y también para la prevención de osteoporosis. El uso de este fármaco en el tratamiento del climaterio ha sido utilizado en aproximadamente 90 países, como España,

China y Australia, por mencionar algunos; mientras que su uso de TIB como tratamiento para la osteoporosis está registrado en 45 países (Pinto y cols. 2017).

Los efectos positivos que muestra la TIB lo han hecho atractivo en el estudio clínico de otros padecimientos. Por ejemplo, se ha estudiado ampliamente el efecto que presenta sobre los síntomas vasomotores, la desmineralización ósea, la salud sexual, el estado de ánimo y la cognición. Además, investigaciones realizadas en modelos in vitro y animales han descrito que TIB disminuye la: neuroinflamación, muerte neuronal y modula la gliosis reactiva evitando la neurodegeneración, así como la reducción de radicales libres en modelos de estrés oxidativo; sin embargo, también se ha sugerido que se requieren de una mayor cantidad de ensayos clínicos que sustenten dichos resultados (Del Río y cols. 2020).

2.3.2. Metabolismo de TIB

Tras la ingestión, TIB se metaboliza rápidamente a nivel del tracto gastrointestinal y en el hígado, dando lugar a tres metabolitos principales: a) 3α hidroxitibolona (3α -OH-T), b) 3β hidroxitibolona (3β -OH-T) en las formas sulfatadas e inactivas las cuales tienen propiedades estrogénicas y c) el isómero $\Delta 4$ ($\delta 4$ -TIB), el cual posee propiedades progestágenas y androgénicas. La selectividad de la tibolona depende de la actividad enzimática específica local que haya en el tejido diana (Del Río y cols. 2020).

Los metabolitos estrogénicos α y β son formados por las enzimas aldo-ceto reductasa (AKR): la enzima específica del hígado AKR1C4 produce 3α -OH-T y las enzimas AKR1C1 y AKR1C2, se expresan en las gónadas, las glándulas suprarrenales y el cerebro, produciendo 3β -OH-T.

Los metabolitos α y β son agonistas del receptor de estrógeno (RE) y se unen preferentemente al RE alfa ($RE\alpha$). Por otra parte, mediante la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa, la tibolona se convierte en un $\Delta 4$ -isómero, que activa receptores de progesterona (RP) y andrógenos (RA). Tanto TIB como el isómero $\Delta 4$ exhiben afinidad por los receptores de progesterona (RP) A y B, también por los receptores de andrógenos (RA) sin efectos sobre los RE (Del Río y cols. 2020; Kloosterboer 2004).

La modulación de la actividad estrogénica local se determina por el metabolismo diferencial de TIB en cada tejido. Los metabolitos α y β , son sustratos del sistema sulfotransferasa (SULT)-sulfatasa (STS), en donde la SULT se encarga de catalizar la sulfatación de estos metabolitos,

inactivándolos, y la STS (predomina en endometrio, mama, hígado, ovarios y cerebro), promoverá la hidrolización local, activando a los mismos (Del Río y cols. 2020).

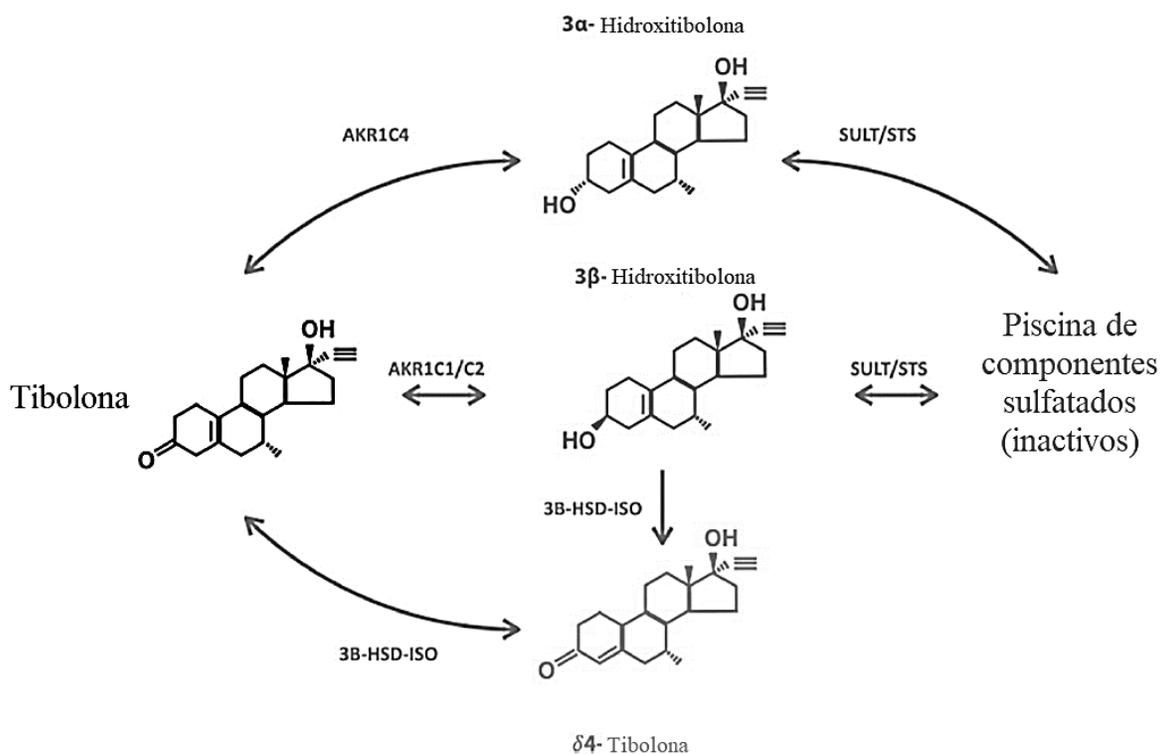


Figura 6. Estructura química de la Tibolona y su metabolismo. 3B-HSD-ISO: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa, AKR: aldo-ceto reductasa, SULT: sulfatasa, STS: sulfotransferasa. Modificado de Del Río y cols. 2020.

Debido a su rápida absorción en el intestino delgado, los niveles plasmáticos de TIB y Δ4-TIB son casi indetectables. Los metabolitos hidroxilados alcanzan su pico entre 60 y 90 minutos, y su vida media plasmática es de unas siete horas; posteriormente se metaboliza en el hígado y no se produce acumulación. La excreción se produce principalmente en forma de metabolitos polares. Una cantidad del compuesto es excretado en la orina, aunque una gran cantidad es eliminada vía biliar y por las heces, siendo la vida media de depuración de 48 horas aproximadamente. Aunque la TIB puede unirse a los tres receptores de hormonas esteroideas, sus efectos son dados principalmente por sus metabolitos debido a la rápida absorción y distribución de TIB tras su ingesta oral (Pinto y cols. 2017; Verheul y cols. 2007).

2.4. Tibolona como candidato neuroprotector

Aunque la TIB es muy utilizada para el tratamiento de los síntomas de la menopausia, hay muy poca información sobre sus efectos neuroprotectores en el cerebro. Se sabe que tiene efectos en el sistema nervioso ya que revierte la pérdida de espinas dendríticas producida por la ovariectomía en células piramidales en la región CA1 del hipocampo de ratas (Beltrán 2015), asociado a ello se le han atribuido efectos ansiolíticos en ratas jóvenes (Aguiar y cols.2006). Además, los efectos de este compuesto sobre la reducción del daño oxidativo en células gliales y reduce el volumen de infarto cerebral al administrarse de manera subcutánea en ratas hembra ovariectomizadas con una isquemia cerebral focalizada (Vergouwer y cols. 2000).

El efecto de la TIB sobre la apoptosis neuronal se ha estudiado a través de la expresión de genes como el Bcl-2, el factor inductor de apoptosis Bax y la proteasa caspasa-3. Un estudio realizado con el modelo de isquemia cerebral mediante la oclusión de la arteria cerebral media izquierda (MCAO), se determinó que la TIB mejoró significativamente la lesión por isquemia-reperusión, sugiriendo que este esteroide sintético puede inhibir la apoptosis y poseer un efecto neuroprotector (Tian y cols. 2009).

En un análisis realizado en cultivos de astrocitos, se mostró que la administración de TIB significativamente moduló genes asociados a la inflamación como IL6, IL-1 β , además de atenuar la expresión de genes como TERT y TERC los cuales fueron inducidos por el ácido palmítico (González y cols. 2019). Por otra parte, el efecto de la tibolona sobre la gliosis reactiva en la corteza cerebral, posterior a una lesión por apuñalamiento, en modelos animales, reguló la homeostasis ya que hubo una reducción en la pérdida neuronal próxima a la herida (Crespo y cols. 2018).

La exposición a ozono (O₃) ha sido un modelo para evaluar los efectos neuroprotectores de TIB,. Así la exposición a O₃ induce el incremento de especies reactivas de oxígeno, oxidación y peroxidación de biomoléculas con la pérdida de proteínas y daño o muerte celular (Pinto y cols. 2014). Por ejemplo, un estudio realizado por Farfán y cols. (2014) en ratas macho expuestas a concentraciones de ozono, revelaron un efecto neuroprotector de la administración crónica con TIB sobre el daño neuronal del sistema nervioso central, previniendo los déficits de memoria previniendo el estrés oxidativo. Además, Pinto y cols. (2014), analizaron el efecto de la TIB sobre la peroxidación de lípidos, proteínas y muerte neuronal, encontrando que ese

tratamiento en la región CA3 del hipocampo, mejoró la memoria y la prevención de alteraciones motoras en animales expuestos a ozono.

Por otro lado, la participación de la proteína Tau sobre diversas enfermedades neurodegenerativas también ha sido explorado. Así, en un estudio realizado para comprobar el pretratamiento de TIB sobre la fosforilación de proteínas inducida por la Tau, en ratas macho Wistar expuestas a ozono durante 15, 30 y 60 días de exposición y 7, 15, 30 y 60 días de TIB 1 mg/kg antes de la exposición al ozono (O₃). Se encontró que los efectos de la exposición a O₃ fueron prevenidos por el tratamiento a largo plazo (15 días) con TIB (Pinto y cols. 2018).

Coyoy y cols. (2020) evaluaron los efectos de TIB sobre diversos parámetros metabólicos y la expresión de receptores de hormonas sexuales en el SNC usando como modelo de estudio ratas ovariectomizadas, alimentadas con una dieta hipercalórica. Los resultados mostraron un aumento del peso corporal de los animales, acompañado de elevación en sus niveles de triglicéridos y colesterol. Adicionalmente, la TIB actuó como modulador selectivo de los receptores de hormonas sexuales (RE, RP y RA), y también sobre los receptores que modulan el metabolismo de la glucosa (IR, IGF-1), lo que sugiere que este esteroide podría ejercer sus efectos estrogénicos, progestágenos y androgénicos de forma específica para cada tejido.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios sobre los efectos neuroprotectores del estradiol en diferentes neuropatologías han mostrado resultados prometedores. Se ha sugerido que la TIB al tener alta afinidad de unión por los RP y los RE, disminuye el porcentaje del infarto cerebral en el modelo de isquemia cerebral media, pudiendo sustituir a los estrógenos ya que muestra un mejor desempeño como agente neuroprotector. Por esta razón, estudiar el efecto neuroprotector de la TIB en el modelo de isquemia cerebral global aguda en la rata, podría ser una mejor alternativa en el tratamiento que el estradiol.

4. HIPÓTESIS

La tibolona produce mayor neuroprotección que el estradiol en neuronas de la región CA1, CA2 y CA3 del hipocampo de la rata ante un episodio de isquemia cerebral global aguda.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar el efecto neuroprotector de la TIB, ante el daño producido por la isquemia cerebral global aguda en neuronas piramidales del hipocampo de la rata..

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el posible efecto neuroprotector de la TIB en las neuronas piramidales de la región CA1, CA2 y CA3 del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas.
2. Evaluar el efecto inducido con el tratamiento de TIB en comparación con el efecto producido con estradiol sobre la neuroprotección de las neuronas piramidales de la región CA1, CA2 y CA3 del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas.

6. METODOLOGÍA

6.1. Animales

Se utilizaron un total de 24 ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso de 350 a 400 gr, de la colonia del Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV-. Los animales fueron mantenidos en un cuarto con condiciones controladas a una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un ciclo invertido de luz- oscuridad (14:10, la luz se apaga a las 10:00h). Los animales fueron alimentados con nutricubos Purina (Purina, México) y agua a libre acceso. El manejo de los animales y los procedimientos experimentales se apegaron a los protocolos de la ley mexicana de protección animal (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, publicada en 2001).

6.2. Cirugías

Todos los animales fueron sometidos al modelo de isquemia cerebral global de acuerdo con la metodología propuesta por Pulsinelli y Brierley (1979). Este modelo consiste en la oclusión de

las cuatro arterias principales: las 2 arterias vertebrales y las 2 arterias carótidas comunes en dos diferentes etapas en distintos días. La primera etapa consistió en la electrocauterización permanente de las arterias vertebrales. Para tal propósito, y con previa asepsia, se colocó al animal en posición decúbito ventral, realizando una incisión sobre la línea media dorsal a la altura del occipital y directamente sobre las dos primeras vértebras cervicales. La piel, el músculo cutáneo y los músculos paraespinales fueron disecados y retraídos lateralmente hasta exponer los agujeros alares del primer segmento cervical (atlas). Con ayuda de un lápiz de electrocauterio se cauterizaron las dos arterias vertebrales, finalmente los tejidos se reacomodaron y la incisión se cerró en un solo plano.

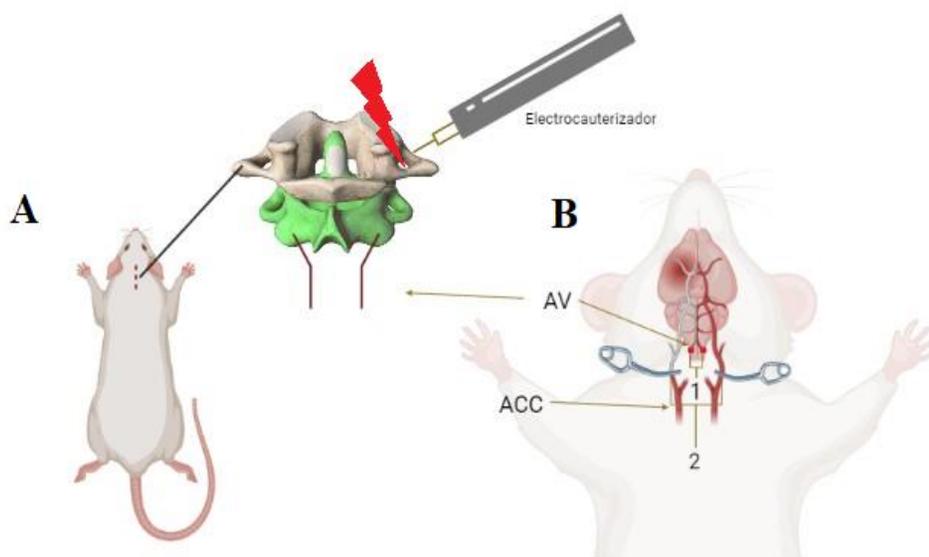


Figura 7. Diagrama de la anatomía vascular de ratas sometidas al método para inducir isquemia global. (A) La electrocauterización permanente de las arterias vertebrales (1) y la posición de los clips quirúrgicos en las arterias carótidas comunes (2) en un modelo de oclusión de cuatro vasos (4-VO). La isquemia global transitoria se induce en un proceso de dos etapas. El día 1, se electrocauterizan las arterias vertebrales (1). Este procedimiento no bloquea el flujo sanguíneo cerebral, pero impide la circulación colateral hacia el cerebro anterior durante el pinzamiento de la arteria carótida el día 2. (B) Veinticuatro o cuarenta y ocho horas después de la coagulación de las arterias vertebrales, se induce una isquemia global transitoria mediante la oclusión de las arterias carótidas comunes (2) durante 15 minutos, seguida de una reperusión. Las ratas del grupo sham se someten a la electrocauterización de las arterias vertebrales y a

todos los demás procedimientos quirúrgicos, excepto la oclusión de la arteria carótida (adaptado de Etgen y cols. 2011).

Previo a la inducción de la isquemia se realizó la segunda cirugía preparatoria, la cual consistió en la exposición de las arterias carótidas. La técnica consistió en colocar al animal en posición decúbito dorsal, realizando una incisión en la línea media ventral exponiendo las dos arterias carótidas comunes (derecha e izquierda). Cuidadosamente fue separada la arteria del nervio vago. Una vez liberado el vaso sanguíneo, este fue sujetado a una sutura tipo nylon no absorbible de forma bilateral. Posteriormente se realizó una sutura en la piel con puntos simples continuos, para que se realizara de 24 o 48 hrs la isquemia, la cual fue importante asegurarse que produjo de manera transitoria.

6.3. Inducción a la isquemia

Para este procedimiento se retiró la sutura de la incisión localizada en la línea media ventral a la altura del cuello e inmediatamente se ocluyeron las arterias con clips quirúrgicos durante 15 minutos, bajo anestesia inhalada de sevoflurano al 60%. La isquemia ocurrió mientras que el animal salía de la anestesia. Si la pérdida del reflejo de enderezamiento y un estado de inconsciencia persistió por al menos 20 minutos, después del inicio de la reperfusión, el animal cumplía con el requisito principal para ser incluido en el estudio. Además, se consideraron en el criterio de inclusión, las manifestaciones clínicas de los signos patognomónicos de la isquemia como la erección del pelo y movimientos involuntarios de acicalamiento, pedaleo, extensión de miembros superiores e inferiores, entre otros. Posteriormente, los animales fueron mantenidos en cajas individuales de plexiglás hasta su recuperación.

6.4. Tratamientos

Los animales fueron asignados aleatoriamente en 4 grupos: Grupo 1, sham (n=6); Grupo 2, isquémico sin Tx (n=6); Grupo 3, isquémico con Tx de tibolona (n=6); y Grupo 4, isquémico con Tx de estradiol (n=6). El desarrollo de la metodología del estudio se llevó a cabo idénticamente para el total de los individuos correspondiente a las cirugías preparatorias. Sin

embargo, la inducción a la isquemia fue omitida para los animales que conforman el grupo Sham. Los días siguientes al evento isquémico, los individuos fueron manipulados únicamente para la administración de los tratamientos y del vehículo, hasta su sacrificio.

6.5. Diseño experimental

6.5.1. Experimento 1

Efecto de la administración de TIB sobre el daño producido a las neuronas piramidales de la región CA1, CA2 y CA3 del hipocampo por isquemia cerebral global aguda en ratas.

El protocolo para este experimento consistió en la inducción de la isquemia cerebral global aguda, como previamente fue descrito. El tratamiento con TIB (1 mg/kg) se basó en el trabajo publicado por Beltrán y cols. (2015), en donde se administró vía i.p., una y seis horas posteriores a la isquemia y cada veinticuatro horas s.c. durante 7 días hasta el día del sacrificio.

6.5.2. Experimento 2

Efecto de la administración de estradiol en relación con la efectividad del tratamiento con TIB sobre el daño producido en neuronas piramidales de la región CA1, CA2 y CA3 del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas.

El protocolo experimental consistió en la inducción de la isquemia cerebral global aguda. El estradiol (4mg/kg; Etgen y cols. 2011) fue administrado una y seis horas posteriores a la isquemia vía i.p., y cada veinticuatro horas s.c. durante 7 días.

6.6. Evaluación histológica

6.6.1. Perfusión

Una vez transcurridos 7 días post-isquemia, los animales fueron perfundidos mediante un lavado con solución de buffer de fosfatos con un pH de 7.5 por 20 minutos. Posteriormente, se fijó el tejido con formaldehído al 10% durante 20 minutos, para extraer al cerebro para que fuera crioprotectado con soluciones de sacarosa de 10%, 20% y 30%, por 24 hrs en cada solución y previos a ser sometidos al proceso de histología.

6.6.2. Tinción

Una vez transcurrido el tiempo de crioprotección se llevó a cabo el procesamiento del tejido, para realizar cortes coronales de 16 μm de grosor con un criostato marca Leica a nivel de la formación hipocampal., Cada corte fue montando en laminillas preparadas con grenetina y posterior teñidas con la técnica de violeta de cresilo.

La tinción consistió en la colocación de las canastas con las laminillas en distintas soluciones, por ejemplo, primero fueron sumergidas en alcohol al 100%, sucesivamente en alcohol al 96%, alcohol al 70% y alcohol al 50%, cada uno por dos minutos, seguido por tres subsecuentes enjuagues con agua, para ser colocados en violeta de cresilo por dos minutos. Posteriormente las laminillas fueron sumergidas en alcohol al 96%, al 100% y nuevamente alcohol al 100% por 5 segundos cada proceso. Finalmente, las muestras fueron sumergidas en xilol por dos minutos para que se les agregara resina para ser cubiertas con un portaobjetos para que el tejido fuera protegido y mantuviera en buenas condiciones.

Los conteos de poblaciones neuronales se analizaron a través de un microscopio óptico de la marca Leica a través de la toma de fotografías a un aumento de 5x y 40x y de la delimitación del área en $1000\mu\text{m}^2$ a una escala de 100 μm con el fin de determinar la sobrevivencia de las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo; este procedimiento se realizó de manera bilateral en tres secciones del hipocampo por cada animal, y de esta manera se determinaron los efectos de la isquemia cerebral global aguda en las diferentes condiciones experimentales (Moralí y cols. 2011).

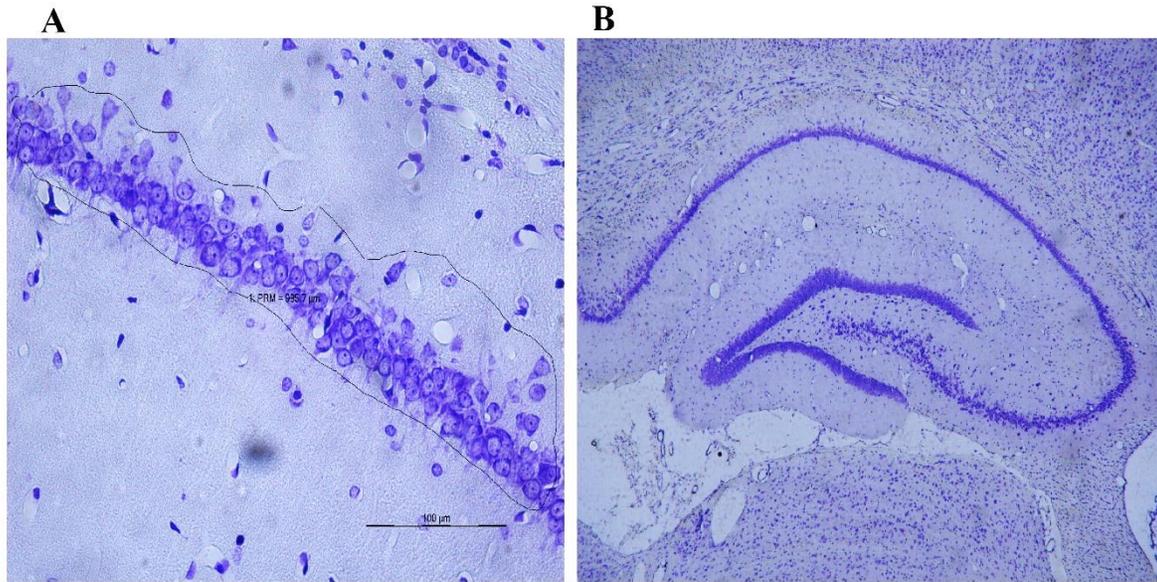


Figura 8. *Microscopia del hipocampo teñido con violeta de cresilo.* (A) Región CA1 con delimitación del área a contar. Escala 100 μ , con aumento de 40x; (B) formación hipocampal. Escala 100 μ , con aumento de 5x.

6.6.3. Plan de análisis

Los resultados se analizaron inicialmente a través de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos; seguida por una prueba T de Student para determinar las diferencias entre los grupos experimentales contra su grupo control correspondiente. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si la probabilidad fue $p < 0.05$ y se expresaron como la media más el error estándar.

7. RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de la administración de TIB sobre el daño producido a las neuronas piramidales de la región CA1, CA2 y CA3 del hipocampo por isquemia cerebral global aguda en ratas.

Los resultados obtenidos en el primer experimento muestran que la inducción del evento isquémico en los animales produjo una disminución significativa en la población de células piramidales de la región CA1 del hipocampo ($p < 0.001$), comparado con el grupo control (Figura 10). Por su parte, cuando se administró TIB a animales que habían sido sometidos a un evento isquémico, se indujo la sobrevivencia de una cantidad importante de neuronas piramidales ($p < 0.001$) en relación con el grupo isquémico control. Es importante señalar que no se presentó una importante recuperación como la sobrevivencia observada por el grupo control.

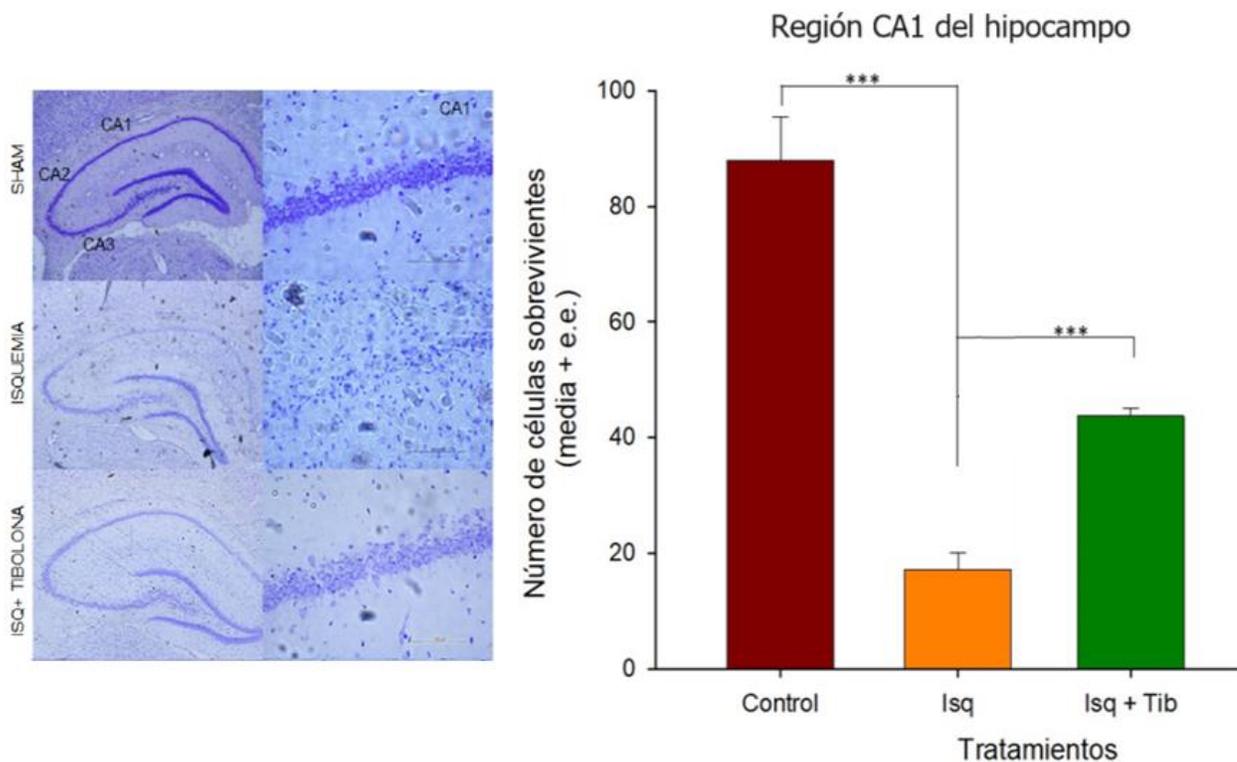


Figura 9. Efecto de la administración de 1mg/kg de TIB, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico. Conteo de células piramidales en $1000\mu\text{m}^2$ de la región CA1 del hipocampo. $***p \leq 0.001$.

La figura 11 muestra el número de células piramidales en la región CA2 del hipocampo después de un evento isquémico. La isquemia cerebral global no produjo ningún cambio en la población de células piramidales de la región CA2; en consecuencia, la administración de TIB no produjo un efecto neuroprotector significativo en esta área en comparación con el grupo isquémico.

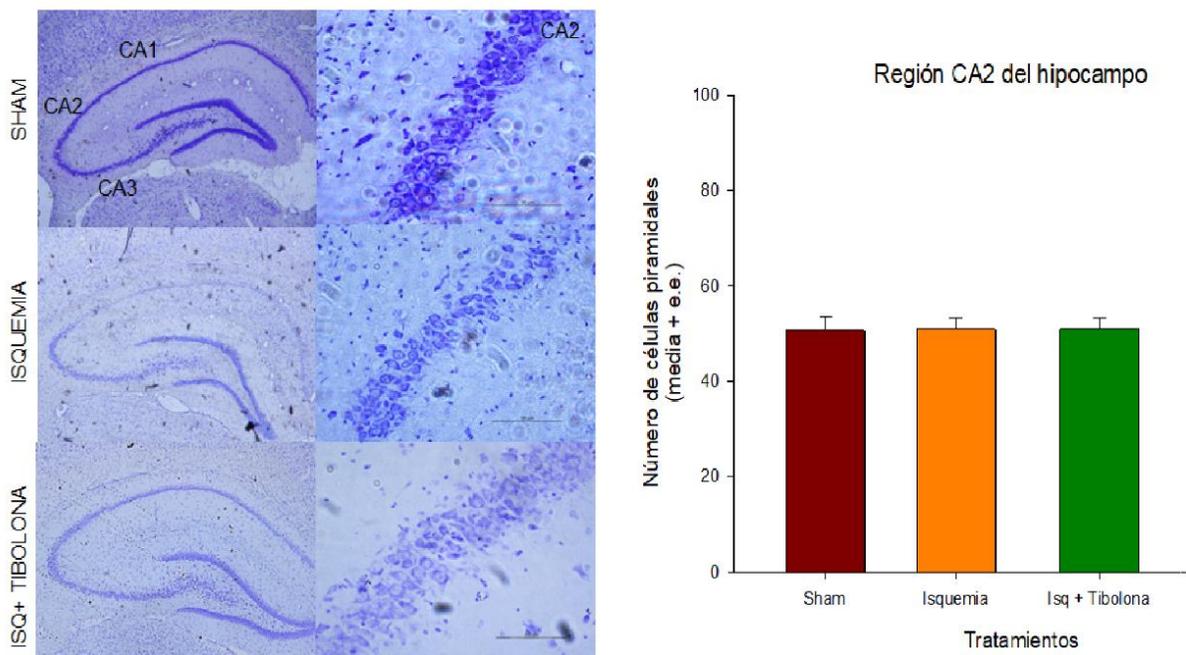


Figura 10. Efecto de la administración de 1mg/kg de TIB, sobre el número de células piramidales de la región CA2 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico. Conteo de células piramidales en 1000 μ m² de la región CA2 del hipocampo.

La figura 12 muestra el número de células piramidales en la región CA3 del hipocampo después de un evento isquémico. Como se puede observar, al igual que en la región CA2, el efecto isquémico no provocó ningún cambio en la población de las células de esta región del hipocampo, por lo que no se aprecia un cambio inducido por la administración de TIB.

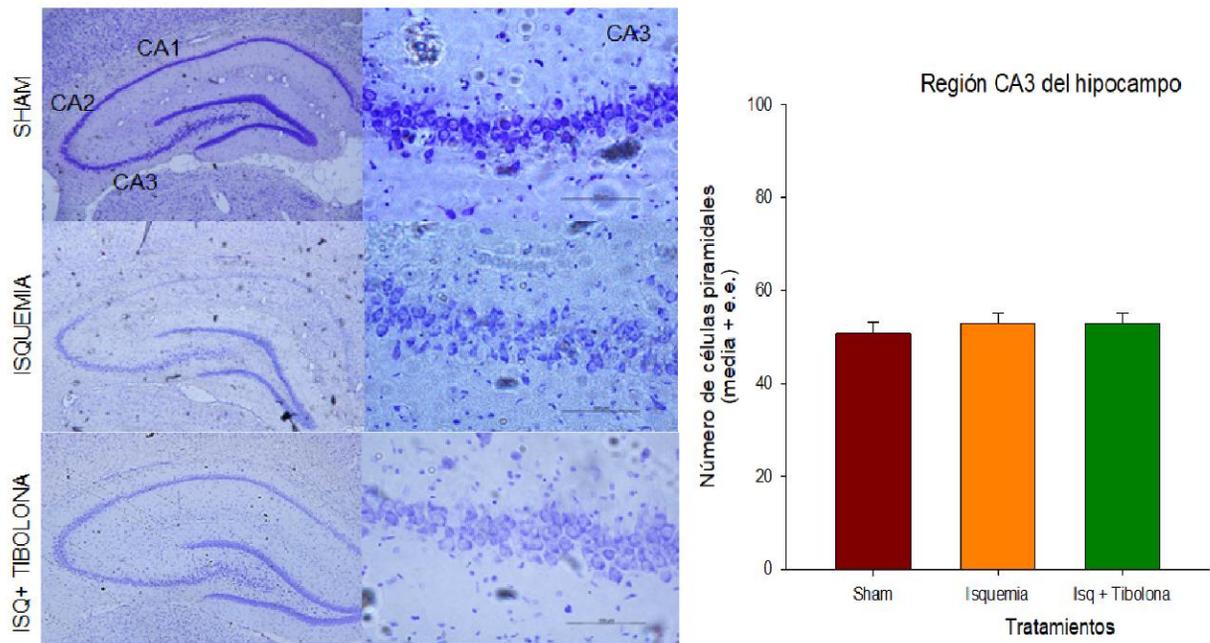


Figura 11. Efecto de la administración de 1mg/kg de TIB, sobre el número de células piramidales de la región CA3 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico. Conteo de células piramidales en 1000 μ m² de la región CA3 del hipocampo.

Experimento 2. Efecto de la administración de estradiol en relación con la efectividad del tratamiento con TIB sobre el daño producido en neuronas piramidales de la región CA1, CA2 y CA3 del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas.

Los resultados obtenidos en el primer experimento muestran que la inducción del evento isquémico en los animales produjo una disminución significativa en la población de células piramidales de la región CA1 del hipocampo ($p \leq 0.01$), Con respecto al grupo control (Figura 13). Por otro lado, cuando se administró estradiol al grupo que había sido sometido a isquemia cerebral, la sobrevivencia de las células piramidales de la región CA1 fue superior al del grupo isquémico con una significancia de $p \leq 0.01$.

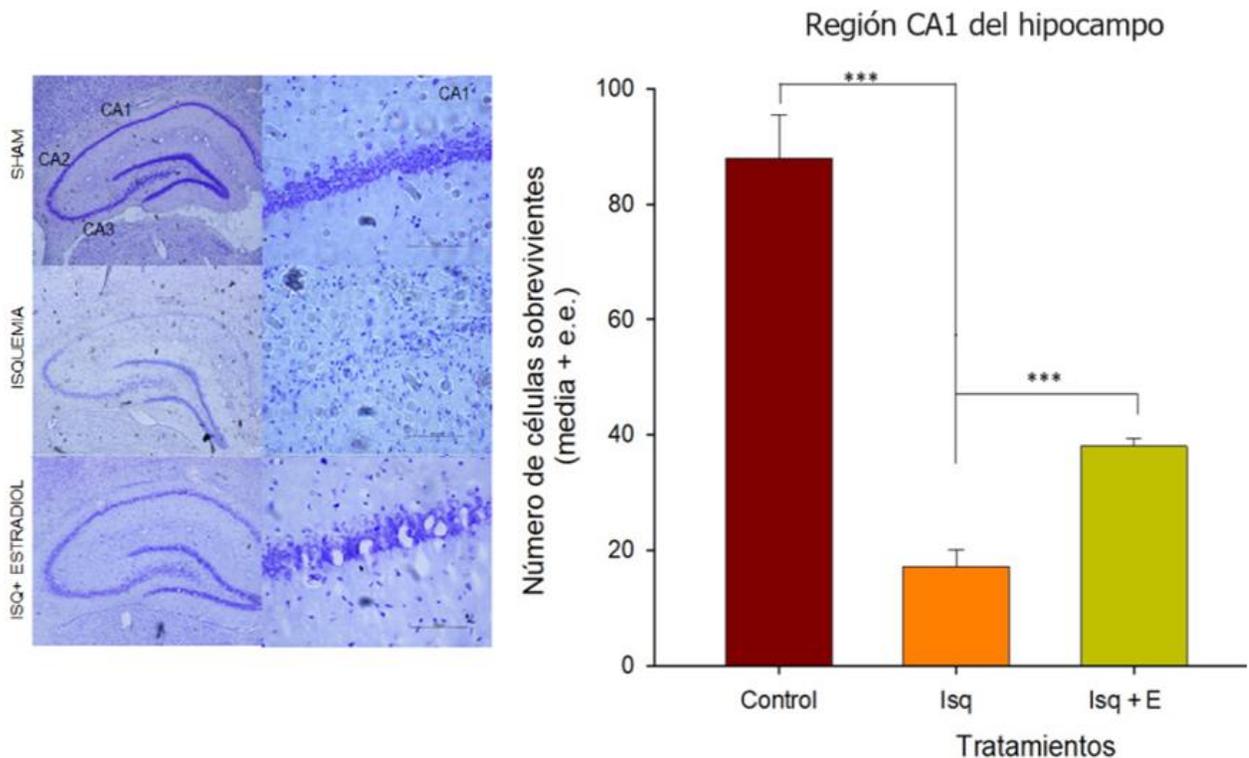


Figura 12. Efecto de la administración de 4mg/kg de estradiol, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico. Conteo de células piramidales en 1000 μ m² de la región CA1 del hipocampo. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Por otro lado, la figura 14 muestra el número de células piramidales en la región CA2 del hipocampo después de un evento isquémico. Esta figura muestra que el evento isquémico no produjo ningún efecto sobre esta región del hipocampo y por consiguiente el tratamiento con estradiol tampoco muestra un cambio en el número de células de esta región.

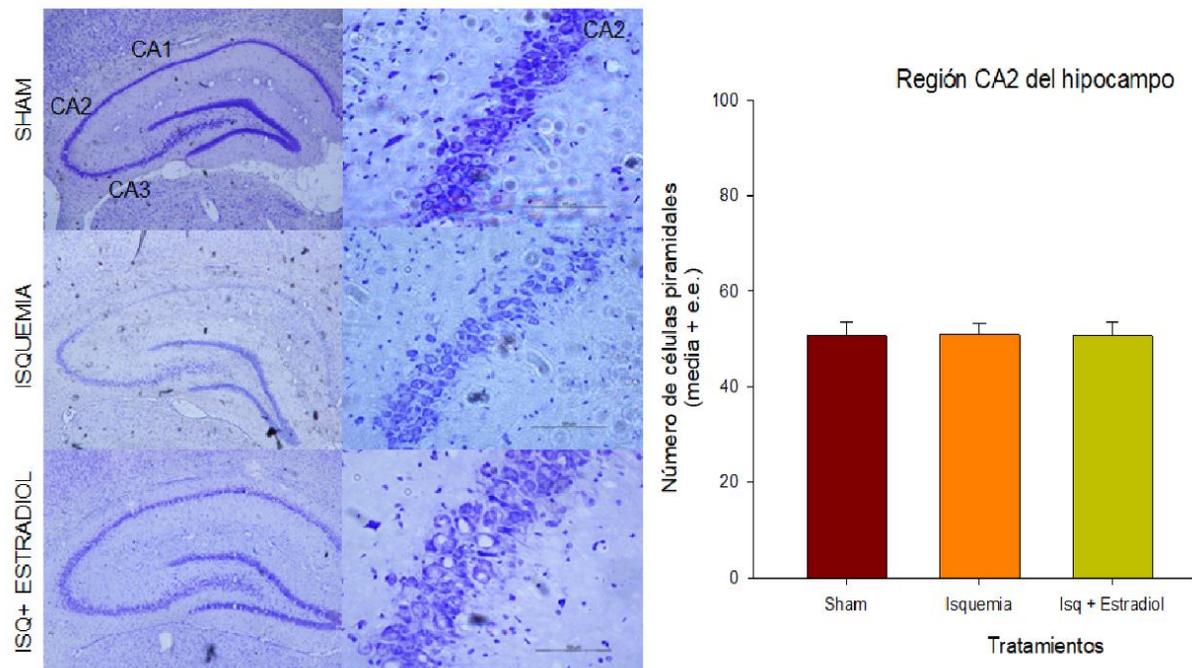


Figura 13. Efecto de la administración de 4mg/kg de estradiol, sobre el número de células piramidales de la región CA2 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico. Conteo de células piramidales en 1000 μ m² de la región CA2 del hipocampo.

La figura 15 muestra el número de células piramidales en la región CA3 del hipocampo después de un evento isquémico. Esta figura muestra que el evento isquémico no produjo ningún efecto sobre esta región del hipocampo y por consiguiente el tratamiento con estradiol tampoco muestra un cambio en el número de células de esta región.

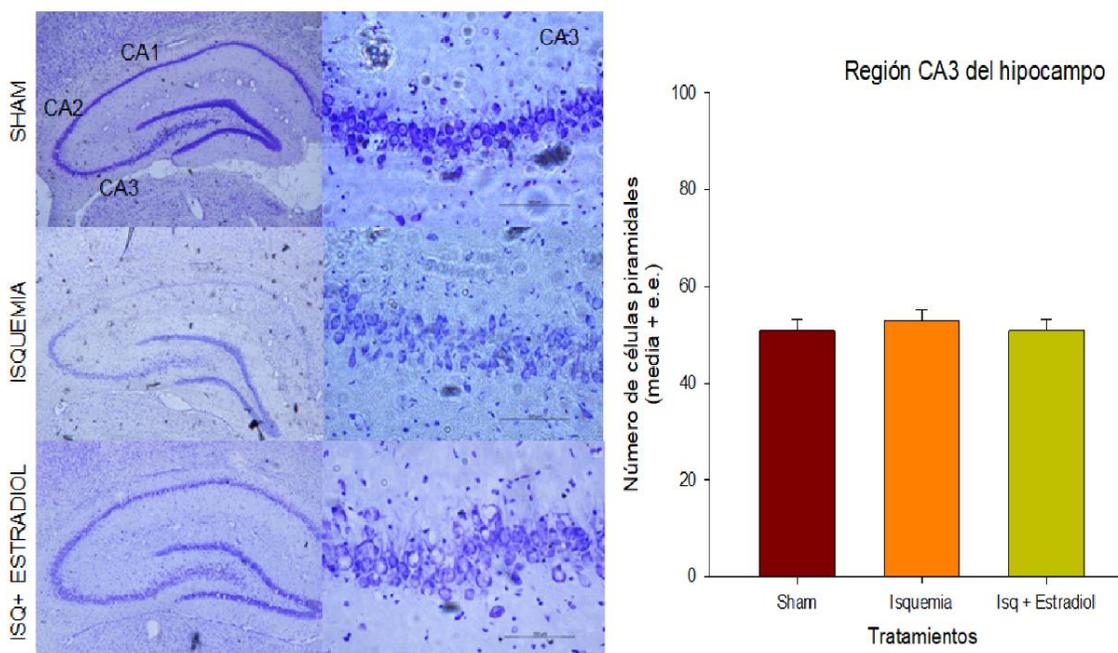


Figura 14. Efecto de la administración de 4mg/kg de estradiol, sobre el número de células piramidales de la región CA3 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico. Conteo de células piramidales en 1000 μ m² de la región CA3 del hipocampo.

Finalmente, la figura 16 muestra los resultados obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales, control, isquémicos, isquémicos con tratamiento de estradiol e isquémicos con tratamiento de tibolona. El análisis de varianza mostró que existe una diferencia significativa en los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos ($p < 0.001$). Como se puede apreciar en

la figura, el grupo control tiene un conteo de aproximadamente 90 células por área (barra roja); sin embargo, en el grupo que fue sometido al evento isquémico el conteo se vio reducido dramáticamente a un promedio de 17 células por campo ($p < 0.001$ vs control; barra naranja). Por su parte los tratamientos con estradiol (barra verde claro) y tibolona (barra verde oscuro) mantuvieron la sobrevivencia de las células piramidales de esta región en relación con el grupo isquémico ($p < 0.001$), aunque no llegó lo suficientemente alta como el grupo control. Por otra parte, es interesante señalar que al comparar la sobrevivencia de las neuronas en la región CA1 del grupo isquémico tratado con estradiol contra la sobrevivencia del grupo isquémico tratado con tibolona se pudo determinar que existe un incremento en la sobrevivencia de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo del grupo tratado con tibolona ($p < 0.05$).

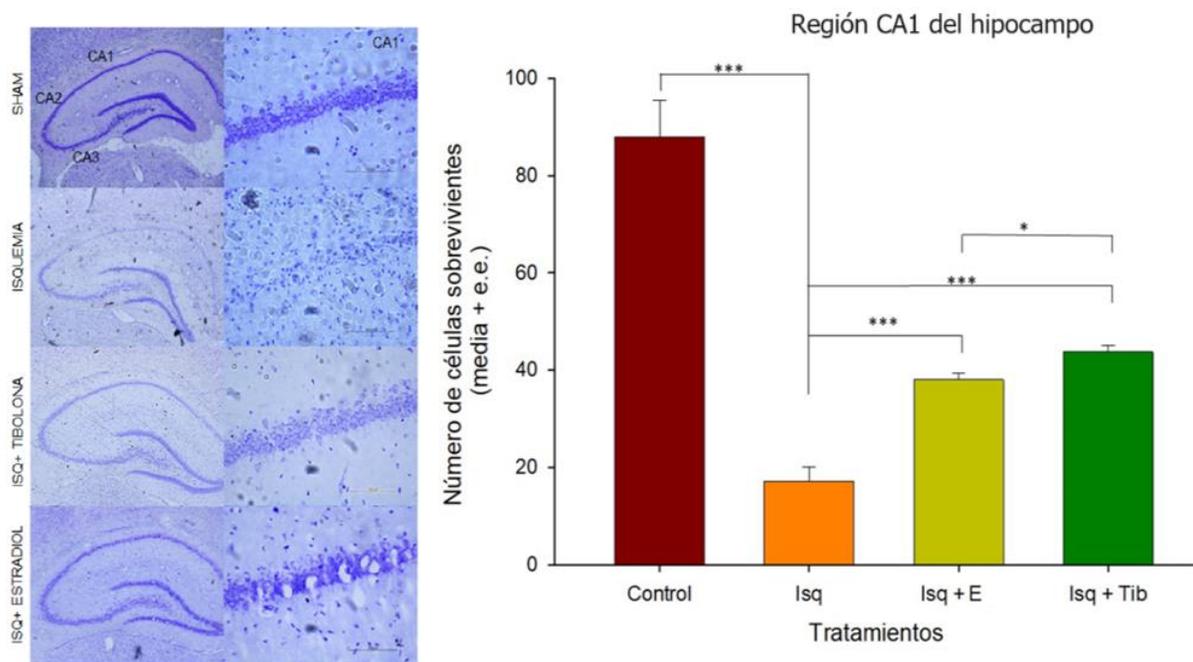


Figura 15. Efecto de la administración de 4mg/kg de estradiol y 1mg/kg de TIB, sobre el número de células piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas macho posterior a un evento isquémico. Conteo de células piramidales en 1000µm² de la región CA1 del hipocampo. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

8. DISCUSIÓN

Con el propósito de encontrar terapias eficaces para tratar las lesiones de traumatismo cerebral, se han probado un gran número de compuestos en los que se ha encontrado que los esteroides neuroactivos; tales como estrógenos y progestágenos, han mostrado ser importantes candidatos neuroprotectores debido a su mecanismo de acción en modelos tanto *in vivo* como en *in vitro*, (López y cols. 2015).

La progesterona y el estradiol tienen efectos neuroprotectores, activando vías de supervivencia e inhibiendo las cascadas proapoptóticas (Barreto y cols. 2021). También desempeñan un papel en la neuroprotección y la neurotrofia del cerebro, afectando la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica y el aprendizaje y la memoria (Kapur y Joshi 2021). Los efectos de estas hormonas son similares a los del factor neurotrófico BDNF (Guenoun 2020). Se ha demostrado que la acción de la progesterona ejerce sus efectos neuroprotectores en diversos trastornos neurológicos, mediados por la activación de los receptores de progesterona, incluidos los PR intracelulares, PGRMC1 y mPR (Pang y Thomas 2023; Mokhtari y cols. 2023). Los mecanismos neuroprotectores de la progesterona implican la modulación de las respuestas inflamatorias, la mejora de la homeostasis energética, la reducción del estrés oxidativo, la preservación de la función mitocondrial, la estimulación de factores neurotróficos y la inhibición de las vías de muerte celular (Sayeed y cols. 2007; Pang y Thomas 2023), también en la regulación de receptores GABAA y en la plasticidad sináptica (Ghoumari y cols. 2020). Además, los efectos neuroprotectores de la progesterona pueden estar mediados por su metabolito, la alopregnanolona (De Nicola y cols. 2022). La identificación de microARN específicos que regulan la expresión de la progesterona y sus receptores podría mejorar aún más la comprensión y utilización del potencial neuroprotector de la progesterona en el tratamiento de trastornos neurológicos (Sitruk y cols. 2021).

Por otra parte, el mecanismo neuroprotector del estradiol involucra vías clásicas y no clásicas, con receptores ubicados en la membrana plasmática y una rápida estimulación de cascadas de señalización intracelular (Barreto y cols. 2021). El estrógeno puede influir en los niveles de neurotransmisores, el flujo sanguíneo cerebral y los niveles de proteínas de crecimiento asociadas con el crecimiento axonal (Maioli y cols. 2021). También puede reducir los efectos neurotóxicos de la beta amiloide (Prakapenka y Korol 2021). Las acciones neuroprotectoras del

estradiol implican la regulación de eventos celulares como los niveles de calcio intracelular, la función mitocondrial, la autofagia y la apoptosis (Azcoitia y cols. 2019).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la TIB al igual que el estradiol son agentes que ejercen importantes efectos neuroprotectores; sin embargo, al comparar el efecto de la neuroprotección de ambos esteroides, TIB ejerce una mayor sobrevivencia de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo que el estradiol, después de un evento isquémico. Se podría especular que el hecho que la TIB haya mostrado un mejor efecto neuroprotector que el estradiol, pudiera deberse a que posee propiedades estrogénicas, progestágenas y androgénicas a través de sus tres metabolitos: 3α , 3β hidroxitibolona y el isómero $\Delta 4$ los cuales muestran mayor afinidad a los receptores de esas hormonas esteroideas por lo tanto ejerciendo amplios efectos en el organismo (Verheul y cols. 2007). Tanto la 3α -hidroxitibolona como el isómero $\Delta 4$ han demostrado afinidad por receptores estrogénicos, lo que podría tener implicaciones en la neuroprotección (Luine 2014). Se ha demostrado que la tibolona y sus metabolitos ejercen actividad agonista a través de los receptores de estrógeno en las células gliales, lo que sugiere su potencial papel neuroprotector (Guzmán y cols. 2007). La activación de estos receptores podría contribuir a los efectos neuroprotectores observados.

La TIB actualmente es utilizada en tratamientos de remplazo hormonal, así como en la prevención de la osteoporosis (Pinto Almazán y cols. 2017). Las investigaciones realizadas en modelos animales de estrés oxidativo e isquemia señalan que la administración de TIB modula la neurodegeneración y la neuroinflamación (Del Río y cols. 2020). El proceso neurodegenerativo del evento isquémico genera una serie de cambios bioquímicos, estructurales y funcionales que culminan en muerte neuronal. El hipocampo es una de las áreas del cerebro más vulnerable ante una lesión isquémica, el cual está constituida por tres subregiones: CA1, CA2 y CA3, donde CA1 es más susceptible de daño isquémico; mientras que las otras dos regiones son en parte más resistentes (Schmidt y Freund 1991). La región CA1 del hipocampo es conocida por ser altamente susceptible al daño isquémico, lo cual se evidencia por la rápida degeneración neuronal y la disfunción sináptica en comparación con las regiones CA2 y CA3 (Kirino 1982). Diversos estudios han señalado que la región CA1 exhibe niveles más bajos de expresión de genes relacionados con la supervivencia celular y la respuesta al estrés, como el gen Bcl-2, en comparación con las regiones CA2 y CA3 (Schmidt y Freund 1991). Además, la

falta de expresión significativa de factores neuroprotectores, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), puede contribuir a la vulnerabilidad de la CA1 (Zhu y cols. 2004). Así mismo, la irrigación sanguínea también juega un papel crucial. La región CA1 está asociada con una microcirculación menos robusta en comparación con las regiones CA2 y CA3, lo que resulta en un suministro sanguíneo menos efectivo y en una mayor susceptibilidad al daño isquémico (Tamamura y cols. 1981). Además, las diferencias en los mecanismos de plasticidad sináptica entre las regiones CA1, CA2 y CA3 podrían influir en la respuesta al daño isquémico. La región CA1 exhibe una mayor dependencia de la plasticidad a largo plazo, la cual es más vulnerable a los cambios patológicos inducidos por la isquemia (Abraham y Robins 2005).

Al realizar el análisis histológico de las muestras obtenidas de corte cerebral a través de un microscopio óptico y determinar las características y sobrevivencia de las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 por medio de un conteo neuronal de manera bilateral, las tres secciones del hipocampo, se les analizó los efectos de la isquemia cerebral global aguda en las dos condiciones experimentales establecidas. En el estudio del efecto de la administración de TIB sobre el daño producido a las neuronas piramidales de las regiones CA1, y no en las áreas CA2 y CA3 del hipocampo, se encontró que la dosis de 1mg/kg en ratas macho previamente sometidas a un proceso isquémico, se produjo una mayor neuroprotección en el hipocampo comparado con el grupo que recibió estradiol a la dosis de 4mg/kg.

Los resultados expuestos en este trabajo concuerdan con lo descrito por Sayeed y cols. (2007) e Ishrat y cols. (2010), quienes reportaron que TIB mitiga la respuesta inflamatoria y reduce el estrés oxidativo en el hipocampo, lo que contribuye a la supervivencia neuronal, especialmente en la región CA1. Estos hallazgos sugieren que la tibolona puede tener mayores efectos neuroprotectores en comparación con otros tratamientos, lo que la convierte en una opción prometedora para la neuroprotección en mujeres peri y posmenopáusicas (Pinto Almazán y cols. 2017).

Asimismo, el efecto de TIB sobre la apoptosis neural estudiado mediante el modelo de la oclusión de la arteria cerebral media en ratas macho reporta una disminución en la expresión de genes como el factor inductor de apoptosis Bax y la proteasa caspasa-3 sugiriendo una acción neuroprotectora e inhibitoria de apoptosis por el esteroide (Tian y cols. 2009).

La TIB se produce a nivel celular durante la apoptosis mediante la conversión de sus metabolitos activos. Los tres principales metabolitos activos de la tibolona son el isómero $\Delta 4$ y los metabolitos hidroxilo 3α y 3β . Estos metabolitos se producen mediante la isomerización del doble enlace en la posición C5/10 a la posición C4/5 y la hidroxilación en la posición C3, respectivamente (Tian 2010). Se ha demostrado que la tibolona y sus metabolitos se unen a los receptores de estrógeno, progestágeno y andrógenos, y los metabolitos hidroxilo se unen sólo al receptor de estrógeno (Gompel y cols. 1997). Esto sugiere que la producción de tibolona a nivel celular durante la apoptosis implica la interacción de sus metabolitos con estos receptores, lo que potencialmente influye en el proceso apoptótico (Gökaslan y cols. 2003).

Lo reportado por Beltrán (2015) también apoya esta idea, ya que ellos evaluaron los efectos de la administración de TIB a razón de 1mg/kg en la pérdida de espinas dendríticas posterior a una ovariectomía; sus resultados sugieren que la TIB revierte la poda de espinas en la región CA1 del hipocampo bajo dicha condición experimental. Aunque los estudios reportados sobre los efectos neuroprotectores de TIB en el cerebro son limitados, todos sugieren un efecto prometedor en la neuroprotección celular de las neuronas piramidales; como se muestran en los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Por otra parte, la administración de BE a una dosis de 4mg/kg en ratas macho previamente sometidas a un proceso isquémico, produjo neuroprotección en el hipocampo. Su acción farmacológica se reflejó en la conservación de neuronas piramidales pertenecientes a la región hipocámpal CA1. Estos resultados no son particularmente novedosos, ya que Etgen y cols. (2011) determinaron que la administración de esta hormona induce una sobrevivencia importante de células piramidales en la región CA1 con una dosis de 4mg/kg en ratas hembra ovariectomizadas y sometidas a isquemia cerebral global.

Los receptores de estrógeno (RE) desempeñan un papel crucial en la neuroprotección. Se ha demostrado que tanto $ER\alpha$ como $ER\beta$ participan en la mediación de los efectos protectores de los estrógenos contra el daño neuronal (Han y cols. 2015; Petrovska y cols. 2022). Se ha descubierto que la activación del $ER\alpha$ protege las neuronas dopaminérgicas y activa las vías de señalización asociadas con la supervivencia neuronal (Bourque y cols. 2015). $ER\beta$ también ha sido implicado en la neuroprotección estrogénica, particularmente en la regulación de la transcripción genética y la señalización rápida de membrana (Lan y cols. 2014). Además, se ha

identificado una variante de ER- α , ER- α 36, como mediador de la neuroprotección de los estrógenos contra la toxicidad oxidativa. Se ha demostrado que las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2, mediadas por ER- α 36, están implicadas en la neuroprotección de los estrógenos (Marín y cols. 2012).

Los datos reportados en la bibliografía comparado con los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las distintas regiones del hipocampo poseen susceptibilidades distintas frente al daño provocado por el evento isquémico. Los resultados del análisis de muerte celular exponen que ocurre un mayor daño en la región CA1 del hipocampo que en las otras áreas hipocampales tales como CA2 y CA3, en las que el daño es mínimo y en ocasiones imperceptible.

Nuestros resultados también concuerdan con los reportados por Wass y Lanier (1996), quienes argumentan que durante el evento isquémico ocurre un déficit en el aporte de glucosa y oxígeno, lo que vulnera a las células piramidales, y siendo la región CA1 del hipocampo la que se ve mayormente al parecer a que en esta área existe una cantidad mayor de aferencias glutamatérgicas, el cual se ha propuesto como un neurotransmisor activador (que las células al ser expuestas por un periodo de tiempo determinado, provocan la destrucción neuronal) y a la demanda de grandes cantidades de oxígeno y glucosa. En este sentido la privación de oxígeno y glucosa, al ser ampliamente estimulada por glutamato en la región CA1, se vuelve más susceptible que las otras porciones del hipocampo. En el caso de los animales sometidos a isquemia cerebral global, el análisis histológico mostró una pérdida en la integridad de la membrana celular, una sobre activación de la microglía como respuesta de una neuroinflamación severa y un conteo celular mínimo.

Así, el efecto neuroprotector de ambos esteroides fue significativo en comparación con sus respectivos grupos isquémicos. Así mismo, el esteroide sintético TIB produce un potencial neuroprotector más sobresaliente que el reportado con el de Estradiol y que el que encontramos en este trabajo. Estos resultados sugieren que el efecto puede deberse a que TIB posee afinidad de unión a distintos receptores celulares como estrogénicos y progestágenos, a través de sus tres metabolitos secretados: 3 α y 3 β hidroxitibolona y el isómero Δ 4-tibolona. Finalmente es interesante señalar que, aunque TIB puede unirse a los receptores de esteroides, sus efectos son dados a partir de sus metabolitos, los cuales poseen una rápida absorción y distribución

(Verheul y cols. 2007). Por tanto, es posible que la TIB tenga una ventaja frente al estradiol, ya que esta última hormona sólo tiene afinidad de unión hacia sus receptores ER α y ER β .

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir lo siguiente:

- 1.- La administración de tibolona produjo un efecto neuroprotector en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas macho.
- 2.- La administración de estradiol produjo un efecto neuroprotector significativo en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas macho.
- 3.- La administración de tibolona produjo un efecto neuroprotector mayor que el tratamiento de Estradiol en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo después de un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas macho.

10. PERSPECTIVAS

El presente estudio presenta los resultados de la investigación sobre el efecto neuroprotector de TIB y estradiol en respuesta a un episodio de isquemia cerebral global. Se destaca el efecto neuroprotector de TIB, especialmente en neuropatologías que han sido escasamente exploradas en términos de la intervención de este fármaco. A pesar de su uso extendido en la práctica clínica para tratar a mujeres en procesos menopáusicos, aún se carece de suficientes descubrimientos en el ámbito de la neuroprotección.

Este estudio abre paso a nuevos estudios de ciencia básica y clínica que permitan establecer un protocolo farmacológico y/o terapéutico realmente eficaz en la prevención y el daño de enfermedades cerebrovasculares. Es importante conocer más sobre los procesos celulares, moleculares, la farmacodinámica y la farmacocinética.

11. REFERENCIAS

- Abraham, W. C., & Robins, A. (2005). Memory retention—the synaptic stability versus plasticity dilemma. *Trends in neurosciences*, 28(2), 73-78.
- Aguiar RB, Dickel OE, Cunha RW, Monserrat JM, Barros DM, Martínez PE. (2006), Estradiol valerate and tibolone: effects on memory. *Pharmacol Biochem Behav.* 85(4): p. 689-96.
- Alcaraz Zubeldia, M., & Ríos Castañeda, C. (2004). Isquemia Cerebral. En D. J. Moctezuma, *Temas selectos de neurociencias III* (pág. 384).
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L., Donnan, G., & Hennerici, M. (2009). Classification of Stroke Subtypes. *Cerebrovascular Diseases*, 27: 493-501.
- Angosto, M. C. (2003). PREMIO NOBEL DE FISIOLOGÍA Y MEDICINA 2002 APOPTOSIS. In *Anales de la Real Academia de Doctores* (Vol. 7, No. 1, pp. 97-120). Real Academia de Doctores de España.
- Arango DC, Escobar BM, Cardona GGP y Pimienta JH. 2004. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev. Neurol.* 39 (2): 156- 165.
- Ashe P y Berry M. 2003. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27: 199-214.
- Auer RN, Dunn JF, Sutherland GR. 2007. Hypoxia and related conditions. In: DI Graham, PL Lantos Greenfield's *Neuropathology*. 7th Edition. 5: 233-80.
- Ávila Saldivar MN, Ordoñez AE, Ramírez HR. 2012. Enfermedad vascular cerebral: incidencia y factores de riesgo en el Hospital General La Perla. *Med Int Mex.* 28 (4): 342-344.
- Azcoitia, I., Barreto, GE y García-Segura, LM (2019). Mecanismos moleculares y eventos celulares implicados en las acciones neuroprotectoras del estradiol. *Análisis de las diferencias de sexo. Fronteras en neuroendocrinología* , 55 , 100787.
- Barreto, GE, McGovern, AJ y García-Segura, LM (2021). Papel de la neuroglobina en las acciones neuroprotectoras del estradiol y los compuestos estrogénicos. *Celdas* , 10 (8), 1907.
- Baulieu, EE y Robel, P. (1990). Neuroesteroides: ¿una nueva función cerebral?. *La Revista de bioquímica de esteroides y biología molecular*, 37 (3), 395-403.

- Bejot Y, Benatru I, Rouaud O, Fromont A, Besancenot JP, Moreau T y Giroud M. 2007. Epidemiology of stroke in Europe: geographic and environmental differences. *J Neurol Sci.* 262: 85-88.
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernández G y Ginsberg MD. 1999. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: Neurological and histological validation. *Brain Res.* 833: 181-90.
- Beltrán Campos, V. Díaz-Ruiz, A., Padilla-Gómez, E., Aguilar Zavala, H., Ríos, C., Díaz Cintra, S. (2015), Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus. *Neurology*, 30 (7): 401-406.
- Boise LH y Thompson CB. 1997. Bcl-xL can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci.* 94:3759-3764.
- Bourque, M., Morissette, M. y Di Paolo, T. (2015). La neuroprotección en ratones tratados con parkinsoniano mediante la activación del receptor de estrógeno α requiere el receptor de estrógeno 1 acoplado a proteína G. *Neuropharmacology* 95 , 343-352.
- Brierley JB.1976. Cerebral hypoxia. In W. Blackwood and J. A. N. Corsellis. *Greenfield's Neuropathology*, 3rd Ed, Edward Arnold, London. 41-85.
- Brott T y Bogousslavsky J. 2000. Treatment of acute ischemic stroke. *N Eng J Med.* 343: 710-22.
- Cabrera Rayo, A., Martínez Olazo, O., Laguna Hernández, G., Juárez Ocaña, R., Rosas Barrientos, V., Loria Castellanos, J., . . . Rumbo Nava, U. (2008). Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. *Medicina Interna de México*, 24 (2); 98-103.
- Campos Mojena Marín Prida J Piniella Matamoros B, Pardo Andreu, Pentón Rol G.2016. Isquemia Cerebral: mecanismos fisiopatológicos y oportunidades terapéuticas. *Revista de ciencias farmacéuticas y alimentarias.* Vol. 2, Núm. 1
- Candelario, J. E. (2009). Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for development of novel neurotherapeutics. *Current investig drugs*, 10: 644-54.
- Cantú Brito, C., Ruiz Sandoval, J. L., Chiquete, E., Arauz, A., León Jiménez, C., Murillo Bonilla, L. M., . . . Grupo RENAMEVASC. (2011). Factores de riesgo, causas y pronóstico de

los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: RENAMEVASC. *Revista Mexicana de neurociencia*, 12 (5): 224-234.

Cassiani Miranda, C. A., & Borrero Varona, M. T. (2013). Isquemia cerebral experimental y sus aplicaciones en la investigación en neurociencias. *Revista Salud Uninorte*, 29(3), 430-440.

Céspedes AE, Arango CA y Cardona GP. 2013. Análisis comparativo de marcadores de lesión en modelos de isquemia cerebral focal y global en ratas. *Biomédica*. 33: 292-306.

Coyoy Salgado, A., Segura, J., Gallardo, J., Estrada, N., Camacho, I., Guerra, C. (2020). Tibolone regulates systemic metabolism and the expression of sex hormone receptors in the central nervous system of ovariectomized rats fed with high- fat and high-fructose diet. Elsevier. *Brain Research*. 147096.

Crespo-Castrillo, A., Yanguas-Casás, N., Arevalo, MA, Azcoitia, I., Barreto, GE, & García-Segura, LM (2018). El esteroide sintético tibolona disminuye la gliosis reactiva y la muerte neuronal en la corteza cerebral de ratones hembra después de una herida por arma blanca. *Neurobiología molecular*, 55 (11), 8651-8667.

De Nicola, A. F., Beauquis, J., Coronel, M. F., Garay, L. I., González Deniselle, M. C., González, S. L., ... & Roig, P. (2011). Desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en esteroides neuroactivos y neuroesteroides para el tratamiento de neuropatologías experimentales.

De Nicola, AF, Meyer, M., Garay, L., Kruse, MS, Schumacher, M., Guennoun, R. y González Deniselle, MC (2022). Efectos neuroprotectores de la progesterona y la alopregnanolona en el modelo de ratón wobbler de esclerosis lateral amiotrófica. *Neurobiología Celular y Molecular* , 42 (1), 23-40.

Del Río, J., Molina, S., Lanussa, O., García Segura, L., Barreto, G. (2020). La tibolona como terapia hormonal y agente neuroprotector. *Rev. Endocrinología y Metabolismo*. Vol. 31, No. 10.

Díez-Tejedor, E., Del Brutto, O., Álvarez- Sabin, J., Muñoz, M., & Abiusi, G. (2001). Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. *Rev. Neurol*, 33:455- 464.

Dubal, DB y Wise, PM (2002). Estrógeno y neuroprotección: de las observaciones clínicas a los mecanismos moleculares. *Diálogos en neurociencia clínica*.

- Durukan, A., & Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*, 87: 179- 197.
- Escobar A. 2005. Muerte encefálica: fisiopatología y neuropatología. *Rev. Mex Neuroci*. 6(4): 327-335).
- Etgen, AM, Jover-Mengual, T. y Zukin, RS (2011). Acciones neuroprotectoras del estradiol y nuevos análogos de estrógenos en la isquemia: implicaciones traslacionales. *Fronteras en neuroendocrinología*, 32 (3), 336-352.
- Farfán García, E., Castillo, M., Almazán, R., Arancibia, R., Gallerdo, J., Araiza, C. (2014). Tibolone Prevents oxidation and Ameliorates Cholinergic Deficit Induced by Ozone Exposure in the Male Rat Hippocampus. *Neurochem Res*. 39: 1776- 1786.
- Fernández Gómez, F. J., Hernández, F., Argandoña, L., Galindo, M. F., Segura, T., & Jordan, J. (2008). Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *Neurología*, 47 (5): 253-260.
- Flórez, J., & JA, A. (1997). Esteroides corticales y antiinflamatorios esteroideos. *Farmacología humana*, 3ra ed. Barcelona: Masson, 901-15.
- Fluri F, Schuhmann MK y Kleinschnitz C. 2015. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Desing, Development and Therapy* 9: 3445-3454.
- García-Segura LM, Azcoitia I, Doncarlos LL. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*. 63(1):29-60.
- Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Rottger C y Kluge A. 2004. Complications and pitfalls in rat stroke models for middle cerebral artery occlusion: A comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke*. 35: 2372-7.
- Ghoumari, AM, Abi Ghanem, C., Asbelaoui, N., Schumacher, M. y Hussain, R. (2020). Funciones de la progesterona, la testosterona y sus receptores nucleares en la mielinización y remielinización del sistema nervioso central. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 21 (9), 3163.
- Ginsberg, M. (2003). Aventuras en la fisiopatología de la isquemia cerebral: penumbra, expresión genética, neuroprotección: la conferencia de 2002 de Thomas Willis. *Accidente cerebrovascular*, 34 (1) 214-223.

- Ginsberg MD y Busto R. 1989. Rodent Models of Cerebral Ischemia. *Stroke*. 20(12): 1627-1642.
- Go, A.S., D. Mozaffarian, V.L. Roger, E.J. Benjamin, J.D. Berry, M.J. Blaha, S. Dai, E.S. Ford, C.S. Fox, S. Franco, H.J. Fullerton, C. Gillespie, S.M. Hailpern, J.A. Heit, V.J. Howard, M.D. Huffman, S.E. Judd, B.M. Kissela, S.J. Kittner, D.T. Lackland, J.H. Lichtman, L.D. Lisabeth, R.H. Mackey, D.J. Magid, G.M. Marcus, A. Marelli, D.B. Matchar, D.K. McGuire, E.R. Mohler, 3rd, C.S. Moy, M.E. Mussolino, R.W. Neumar, G. Nichol, D.K. Pandey, N.P. Paynter, M.J. Reeves, P.D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T.N. Turan, S.S. Virani, N.D. Wong, D. Woo, M.B. Turner (2014), "Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association", *Circulation*, 129, e28-e292.
- Gökaslan, H., Öktem, Ö., Durmusoglu, F., & Eren, F. (2003). Apoptosis in the endometrium of postmenopausal women receiving tibolone. *Gynecologic and obstetric investigation*, 56(3), 124-127.
- Gompel, A., Kandouz, M., Sirotnachkova, M., Lomber, A., Thevenin, D., Mimourr, M. y Poitout, P. (1997). El efecto de la tibolona sobre la proliferación, diferenciación y apoptosis en células mamarias normales. *Endocrinología Ginecológica*, 11 (sup1), 77-79.
- González, G. F. (1999). Neuroendocrinología. *Revista Peruana de Endocrinología y Metabolismo*, 4(2), 57-82.
- Gonzales Piña, R., & Landinez Martínez, D. (2016). Epidemiología, etiología y clasificación de la enfermedad vascular cerebral. *Archivos de medicina (Manizales)*, vol.16 no.2 2339-3874.
- Gonzales Giraldo, Y., Forero, D., Echeverria, V., García, L., Barreto, G. (2019). La tibolona atenúa la respuesta inflamatoria del ácido palmítico y preserva el potencial de la membrana mitocondrial en las células astrocíticas a través del receptor de estrógenos beta. *Endocrinología molecular y celular*.
- Graham, S.H., J. Chen (2001), "Programmed cell death in cerebral ischemia", *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 99-109.
- Guennoun, R. (2020). Progesterone in the brain: hormone, neurosteroid and neuroprotectant. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5271.

Guevara García, M., Rodríguez, R., Álvarez León, A., Riaño Montalvo, A., & Rodríguez, P. D. (2004). Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica. *Revista cubana de medicina*, v.43, no. 4.

Guzmán, CB, Zhao, C., Deighton-Collins, S., Kleerekoper, M., Benjamins, JA y Skafar, DF (2007). Actividad agonista de los metabolitos 3-hidroxi de la tibolona a través del receptor de estrógeno en el ratón N20. 1 Línea celular de oligodendrocitos y astrocitos humanos normales. *Revista de neuroendocrinología*, 19 (12), 958-965.

Han, S., Zhao, B., Pan, X., Song, Z., Liu, J., Gong, Y. y Wang, M. (2015). La variante del receptor de estrógeno ER- α 36 participa en la neuroprotección de los estrógenos contra la toxicidad oxidativa. *Neurociencia*, 310, 224-241.

Hernández, J. D. O., Aguilar, E. J., & García, F. G. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*, 21-28.

Hen Gartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407:770-776.

Ishrat, T., Sayeed, I., Atif, F., Hua, F., & Stein, D. G. (2010). Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Experimental neurology*, 226(1), 183-190.

Kapur, J. y Joshi, S. (2021). La progesterona modula la excitabilidad neuronal de forma bidireccional. *Cartas de neurociencia*, 744, 135619.

Kirino, T. (1982). Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain research*, 239(1), 57-69.

Klosterboer, H.J. (2004), Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas*, 2004. 48 Suppl 1: p. S30-40.

Kroemer G, Zamzami N y Susin SA. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*. 18:44-51.

Lan, YL, Zhao, J. y Li, S. (2014). Efecto neuroprotector de los receptores de estrógeno contra la neurotoxicidad inducida por glutamato. *Ciencias Neurológicas* , 35 , 1657-1662.

Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K y Winn HR. 2009. Rodent stroke model guidelines for t Hippocampus. *Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections. Comprehensive Developmental Neuroscience*. 2: 331-340.

Longa ZE, Weinstein PR, Carlson S y Cummins R. 1988. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 20: 84-91.

López Arguello, J. U. (2003). Actualidades en la encefalopatía hipóxico- isquémica. Plasticidad y restauración neurológica, 133-138.

López Rodríguez, B., Ávila, M., Vega, N., Capani, F., Gonzales, J., García, L., Barreto, G. (2015). Neuroprotección por compuestos estrogénicos exógenos tras un traumatismo de Lesión Cerebral. Chapter 6.

Luine VN. (2014). Estradiol and cognitive function: Past, present and future. *Horm Behav*. 66(4):602-618.

Madl C y Holzer M. 2004. Brain Function after Resuscitation from Cardiac Arrest. *Current Opinion in Critical Care*. 10(3): 213-217.

Maioli, S., Leander, K., Nilsson, P. y Nalvarte, I. (2021). Los receptores de estrógeno y el envejecimiento del cerebro. *Ensayos de Bioquímica* , 65 (6), 913-925.

Marín, R., Marrero-Alonso, J., Fernández, C., Cury, D. y Díaz, M. (2012). Receptores de estrógeno en complejos de señalización de balsas lipídicas para neuroprotección. *Fronteras en Biociencia-Élite* , 4 (4), 1420-1433.

Martin Jiménez, C., Gaitán Vaca, DM, Areiza, N., Echeverria, V., Ashraf, GM, González, J., Sahebkar, A., García, L., Barreto, GE. (2019). Los astrocitos median las acciones protectoras de los compuestos estrogénicos después de una lesión cerebral traumática. *Neuroendocrinología*, 108 (2), 142-160.

Mehta SL, Manhas N y Raghubir R. 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 54: 34-66.

Mies, G., S. Ishimaru, Y. Xie, K. Seo, K.A. Hossmann (1991), "Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat", *J Cereb Blood Flow Metab*, 11, 753-761.

Mokhtari, S., Sistani Karampour, N., Shams, MH, Dehpour, AR y Hasanvand, A. (2023). Evaluación protectora de la progesterona y su receptor en la neuropatía diabética experimental: efectos antioxidantes y antiinflamatorios. *Farmacología clínica y fundamental*, 37 (2), 287-295.

Montoya Fraga, N. (2016). Evaluación morfológica y funcional de los efectos neuroprotectores del estradiol contra el daño cerebral inducido por hipoperfusión cerebral crónica, en ratas.

Moralí, G., P. Montes, L. Hernández-Morales, T. Monfil, C. Espinosa-García, M. Cervantes (2011), "Neuroprotective effects of progesterone and allopregnanolone on long-term cognitive outcome after global cerebral ischemia", *Restor Neurol Neurosci*, 29, 1-15.

Morán Suárez (2014). Efectos neuroprotectores de 17B estradiol y la genisteína frente a la resistencia a la insulina y el daño isquémico asociados al envejecimiento femenino. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

Neumar, R. W. (2000). Mecanismos moleculares de la lesión neuronal isquémica. Elsevier, 483-503.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Pérez Iglesias, S., Maurenza Gonzales, G., AbiResk, L. N., & Romero Gonzales, V. M. (1998). Enfermedad cerebrovascular. factores de riesgo en un área de salud. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, vol.14, no.2.

Petrovska, S., Dejanova, B., Mancevska, S. y Gligorovska, JP (2022). EL MECANISMO DE NEUROPROTECCIÓN DEL ESTRÓGENO. *Revista de Ciencias Morfológicas* , 5 (3), 104-108.

Pinto-Almazán, R., Rivas-Arancibia, S., Farfán-García, ED, Rodríguez-Martínez, E., & Guerra-Araiza, C. (2014). Efectos neuroprotectores de la tibolona contra el estrés oxidativo inducido por la exposición al ozono. *Rev. Neurol*, 58 (10), 441-448.

Pinto Almazán, R., Segura Uribe, J., Farfán, E., Guerra, C. (2017). Efectos de la Tibolona en el Sistema Nervioso Central: Enfoques clínicos y experimentales. *Rev. BioMed*. Pag. 9.

Pinto-Almazán, R., Segura-Uribe, JJ, Soriano-Ursúa, MA, Farfán-García, ED, Gallardo, JM, & Guerra-Araiza, C. (2018). Efecto del pretratamiento con tibolona sobre quinasas y fosfatasa que regulan la expresión y fosforilación de Tau en el hipocampo de ratas expuestas a ozono. *Investigación de regeneración neuronal*, 13 (3), 440.

Prakapenka, AV y Korol, DL (2021). El estradiol regula selectivamente los sustratos metabólicos en los sistemas de memoria en modelos de menopausia. *Climatérico* , 24 (4), 366-372.

Pulsinelli WA. 1985. Selective Neuronal Vulnerability: Morphological and Molecular Characteristics. *Prog Brain Res*. 63: 29-37.

Pulsinelli WA y Brierley JB. 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 10: 267-72.

Pulsinelli WA, Buchan AM. 1998. The four-vessel occlusion rat model: Method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*. 19: 913-4.

Reed, MJ y Kloosterboer, HJ (2004). Tibolona: un regulador selectivo de la actividad estrogénica tisular (STEAR). *Maturitas*, 48, 4-6.

Reza Sarkaki, A., Haddad, M., Soltani, Z., Shahrokni, N., Mahmoodi, M. (2013). Time- and Dose-Dependent Neuroprotective Effects of Sex Steroid Hormones on Inflammatory Cytokines after a Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. 30:47-54.

Roberts, L., C. Counsell (1998), "Assessment of clinical outcomes in acute stroke trials", *Stroke*, t y Freund TF. 1991. Selective vulnerability of the hippocampus brain ischemia. *Neuroscience*. 40(3): 599-636.

Sayed, I., Wali, B., & Stein, D. G. (2007). Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Restorative neurology and neuroscience*, 25(2), 151-159.

Sicard KM y Fisher M. (2009). Animal models of focal brain ischemia. *Exp Transl Stroke Med*.1: 7.

Sitruk-Ware, R., Bonsack, B., Brinton, R., Schumacher, M., Kumar, N., Lee, JY, ... y Borlongan, CV (2021). Progresos en terapias basadas en progestinas para trastornos neurológicos. *Reseñas de neurociencia y biocomportamiento* , 122 , 38-65.

Spada PC, Fernández DA y Villanueva JH. 2003. Stroke isquémico agudo: evaluación y tratamiento. *Rev Fed Arg Cardiol*. 32: 534- 540.

Schmidt-Kastner, R., & Freund, T. F. (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, 40(3), 599-636.

Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). *Anatomy of the Hippocampal Formation. The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 6–17. doi:10.1159/000360925

Tamura, A., Graham, DI, McCulloch, J. y Teasdale, GM (1981). Isquemia cerebral focal en rata: 1. Descripción de la técnica y consecuencias neuropatológicas tempranas tras la oclusión de la arteria cerebral media. *Revista de metabolismo y flujo sanguíneo cerebral*, 1 (1), 53-60.

Tian Wenyan, Zhang Hongyi, Su Likai y Shen Wenzeng (2009), Effect of tibolone on neuronal apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion in rats, *Journal of Second Military Medical University*, 30 (7), 790-792.

Tian Wenyan (2010). Efectos de la tibolona sobre la apoptosis de las neuronas después de una lesión por isquemia-reperusión cerebral en ratas. *Revista Académica de la Segunda Universidad Médica Militar*, 790-792.

Traystman RJ. 2003. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J.* 44:85-95.

Veiga, S., García-Segura, L. M., & Azcoitia, I. (2004). The neuroprotective properties of sex steroids and neurosteroids| Propiedades neuroprotectoras de los esteroides sexuales y los neuroesteroides.

Veiga, S., García-Segura, L. M., & Azcoitia, I. (2005). Neurosteroids and sex steroids in the central nervous system| Neuroesteroides y esteroides sexuales en el sistema nervioso central.

Vergouwen, M.D., R.E. Anderson, and F.B. Meyer (2000), Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 878(1-2): p. 88-97.

Verheul, HA, Blok, LJ, Burger, CW, Hanifi-Moghaddam, P. y Kloosterboer, HJ (2007). Niveles de tibolona y estradiol y sus metabolitos no sulfatados y sulfatados en suero, miometrio y vagina de mujeres posmenopáusicas después de un tratamiento de 21 días con tibolona, estradiol o estradiol más acetato de medroxiprogesterona. *Ciencias de la reproducción*, 14 (2), 160-168.

Wang J, Lei B, Popp S, Meng F, Cottrell JE y Kass IS. 2007. Sevoflurane immediate preconditioning alters hypoxic membrane potential changes in rat hippocampal slices and improves recovery of CA1 pyramidal cells after hypoxia and global cerebral ischemia. *Neuroscience*. 145: 1097- 1107.

Wass CT, Lanier WL. 1996. Glucose modulation of ischemic brain injury: review and clinical recommendations. *Mayo Clin Proc.* 71: 8-9.

Won SJ, Kim DY y Gwag BJ. 2002. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol.* 35: 67-86.

Yoshino T, Kishi H, Nagata T y Tsukada K. 2001. Differential involvement of p38 MAP kinase pathway and Bax translocation in the mitochondria-mediated cell death in TCR- and dexamethasone-stimulated thymocytes. *Eur J Immunol.* 31:2702-2708.

Yuan J. 2009 Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis*. 14: 469–77.

Zao LA, González F y Coral J. 2008. Tratamiento actual del ataque cerebrovascular isquémico (ACV) agudo. *Univ. Med. Bogota*. 49 (4): 467- 498.

Zhu, D. Y., Lau, L., Liu, S. H., Wei, J. S., & Lu, Y. M. (2004). Activation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(25), 9453-9457.

Zola-Morgan S, Squire LR y Amaral DG. 1986. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*. 6: 2950-2967.

12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Abreviatura	Significado
17β-E₂	17 beta estradiol
3α-OH-T	3 alfa hidroxitibolona
3β-OH-T	3 beta hidroxitibolona
4VO	Oclusión de los 4 vasos
Δ4-TIB	Delta 4 tibolona
ACV	Accidente cerebrovascular
AIT	Accidente isquémico transitorio
AKR	Aldo ceto reductasa
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
Apaf1	Factor de activación de la peptidasa apoptótica 1
AR	Receptor de andrógenos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
CA	Cuerno de Ammón
Ca	Calcio
ECV	Enfermedad Cerebrovascular

ER	Receptor de estrógenos
F	Fimbria
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
GD	Giro dentado
H	Hilus
HCC	Hipoperfusión cerebral crónica
HIC	Hemorragia intracerebral
HSA	Hemorragia subaracnoidea
IAPs	Proteína inhibidora de la apoptosis
IL	Interleucinas
K	Potasio
MAPK	Quinasa activada por mitógenos
MCAO	Oclusión de la arteria cerebral media
Na	Sodio
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PR	Receptor de progesterona
RE	Receptor de estrógenos
SERM	Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SG	Estrato granuloso
SL	Estrato lucido
SLM	Estrato lacunoso molecular
SM	Estrato molecular
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SO	Estrato oriens
SP	Estrato piramidal
STEAR	Regulador tisular selectivo de la actividad estrogénica
STS	Sulfatasa
SULT	Sulfatransferasa

TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
THP	Tetrahidroprogesterona
TIB	Tibolona
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tx.	Tratamiento

13. PUBLICACIONES

Presentación de Cartel: La tibolona neuroprotege ante un evento isquémico en el modelo de isquemia cerebral global aguda. Presentado en el LXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A. C.
Mesa Directiva 2021-2023
Presidente
Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez
Vicepresidente
Dra. Margarita Martínez Gómez
Secretario
Dr. Francisco Castelán
Tesorero
Dr. José Everardo Avelino Cruz

Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas
Presidente
Dr. Luis Sobrevia
Secretario General
Dr. Ernesto Alejandro Aiello

LXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas
Congreso Internacional 2022 de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas
Certificate of Presentation
to
Solis-Pérez, Vania Itzel; González-Flores, Oscar; Montes Narváez, Omar; Morali, Gabriela; García Juárez, Marcos.
By the Organizing Committee of the LXV National Congress of the Mexican Society of Physiological Sciences (SMCF) and the 2022 Meeting of the Latin American Association of Physiological Sciences (ALACF)
for the presentation entitled
La tibolona neuroprotege ante un evento isquémico en el modelo de isquemia cerebral global aguda
Puebla, Pue., (Mexico), October 7, 2022
Dra. Carmen Cortés
SMCF
President
Dr. Luis Sobrevia
ALACF
President

Presentación en seminario



Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



CONSTANCIA

A Vania Itzel Solís Pérez
Estudiante de Maestría en Ciencias Biológicas

Por impartir el seminario
**"Efecto neuroprotector de la tibolona ante un evento isquémico en el
modelo de isquemia cerebral global aguda en ratas"**

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"
TLAXCALA, TLAX., A 09 DE MARZO DE 2023



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO
COORD. GENERAL DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma: ISO 9001-2015- NMX-CC-9001-IMNC-2015



PCB/23-01/009-rsl