



CONICET



---

I B Y M E

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA NEUROENDÓCRINA  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL –  
CONICET

El fitoestrógeno genisteína como posible terapia neuroprotectora de  
la encefalopatía hipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas  
(SHR)

Tesis de Licenciatura

Autor: Santiago Rubén Ronchetti

Directora: Luciana Pietranera

Año 2021

Buenos Aires, Argentina

# ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	4
<u>PALABRAS CLAVES</u>	5
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	5
<u>INTRODUCCIÓN</u>	6
<u>Hipertensión esencial</u>	6
<u>Ratas SHR</u>	7
<u>Neuroinflamación</u>	8
<u>Astroцитos y astrocitosis</u>	8
<u>Microglía y Microgliosis</u>	9
<u>Hipocampo</u>	11
<u>Estructura del hipocampo</u>	11
<u>Funciones del hipocampo</u>	13
<u>Neuropatología hipocampal en la hipertensión</u>	15
<u>Neurogénesis adulta</u>	15
<u>Deterioro cognitivo asociado a la hipertensión</u>	18
<u>Mecanismos de neuroprotección de los estrógenos</u>	19
<u>Protección asociada a los receptores de estrógenos</u>	20
<u>Rol de los receptores ER</u>	20
<u>Rol del receptor GPER</u>	21
<u>Neuroprotección por estradiol</u>	21
<u>Células involucradas en la neuroprotección</u>	23
<u>Estrógenos y neurogénesis</u>	23
<u>Genisteína</u>	24
<u>ANTECEDENTES</u>	26
<u>Expectativas traslacionales del proyecto investigado en esta tesina de Lic.</u>	27
<u>OBJETIVOS</u>	28
<u>HIPÓTESIS</u>	28
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	29
<u>Modelo experimental</u>	29
<u>Experimento</u>	29
<u>Medición de la presión arterial por método indirecto</u>	30
<u>Inmunohistoquímica de GFAP, DCX e IBA1</u>	30

<u>Tests de comportamiento</u>	32
<u>Novel Object Recognition Test (NOR)</u>	32
<u>Test de laberinto en "Y" (Y-Maze)</u>	33
<u>Análisis estadístico</u>	34
<u>RESULTADOS</u>	34
<u>Efectos de GEN en la presión arterial y en el peso de los tejidos</u>	34
<u>Efectos de GEN sobre las células DCX+</u>	35
<u>Efectos de GEN sobre la inmunoreactividad GFAP+ en el hipocampo</u>	36
<u>Efectos de GEN sobre la inmunoreactividad IBA+ en el hipocampo</u>	38
<u>Novel Object Recognition Test (NOR)</u>	40
<u>Test de laberinto en "Y" (Y-Maze)</u>	41
<u>DISCUSIÓN</u>	42
<u>CONCLUSIONES</u>	45
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	46

## RESUMEN

La hipertensión esencial es una enfermedad de gran prevalencia en la sociedad y de naturaleza poligénica que causa un aumento sostenido en el tiempo de la presión arterial. Los efectos de la hipertensión son muy variados en el cuerpo humano y por eso sus efectos no se ven delimitados a enfermedades y órganos cardiovasculares solamente. Uno de estos órganos blanco es el cerebro, dentro del cual el hipocampo es especialmente vulnerable a los efectos de la enfermedad. La neuropatología hipocampal está asociada a la hipertensión esencial y es una característica descrita de nuestro modelo, la rata espontáneamente hipertensa (SHR). Esta neuropatología está caracterizada por ciertas alteraciones hipocampales como la disminución de la neurogénesis en el giro dentado y el aumento de la reactividad de astrocitos y microglía en todo el hipocampo. Además, la enfermedad está asociada al deterioro cognitivo temprano y es un factor de riesgo para distintos tipos de demencia como la vascular y la asociada a la enfermedad de Alzheimer.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la administración exógena de 17- $\beta$  estradiol logra revertir estas alteraciones pero al mismo tiempo tiene efectos no deseados tanto feminizantes como cancerígenos. Los estrógenos son neuroprotectores para distintos tipos de enfermedades y actúan principalmente a través de la modificación de la expresión génica asociada a los receptores clásicos ER $\alpha$  y ER $\beta$  y el receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER). El receptor ER $\beta$  está relacionado a los efectos sistémicos no deseados mientras que el receptor ER $\beta$  y GPER están relacionados a los efectos neuroprotectores. La genisteína (GEN) es un fitoestrógeno encontrado en la soja que se une a los receptores ER $\beta$  y GPER. Es por esto que pensamos que tiene efectos neuroprotectores y el objetivo de este trabajo fue determinar si el tratamiento con genisteína es capaz de revertir la neurodegeneración producida por la hipertensión sin producir los efectos no deseados que acompañan al 17- $\beta$  estradiol.

Para estudiar el efecto de la genisteína (GEN) se analizaron parámetros hipocampales, sistémicos y cognitivos. Trabajamos con un grupo de ratas macho SHR de 5 meses de edad inyectándolas con una solución de genisteína suspendida en aceite de ricino diariamente por 2 semanas. Además trabajamos con dos grupos control, uno normotenso Wistar-Kyoto (WKY) y otro grupo hipertenso de ratas SHR inyectadas con vehículo. Utilizando inmunohistoquímica determinamos el número de astrocitos GFAP+ en diferentes zonas del hipocampo, la morfología de la microglía IBA1+ en las mismas zonas y el número de progenitores neuronales doblecortina positivos (DCX+) en el GD. Además, registramos el peso de los testículos e hipófisis, la presión arterial media y finalmente se estudió la memoria dependiente de hipocampo a través de dos tests: el test de reconocimiento de objeto novedoso y el test de laberinto en "Y".

La genisteína tuvo efectos neuroprotectores revirtiendo las alteraciones hipocampales causadas por la hipertensión esencial, mejoró la memoria dependiente de hipocampo y redujo parcialmente la presión arterial media en las ratas tratadas. Además, no tuvo efecto feminizante

ni cancerígeno en las ratas tratadas ya que no se modificó el peso de la pituitaria ni el peso de los testículos. Nosotros creemos que este trabajo abre una puerta hacia una nueva posibilidad terapéutica.

## PALABRAS CLAVES

Hipertensión – hipocampo – genisteína – encefalopatía hipertensiva – giro dentado – estradiol

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera utilizar este espacio para agradecer a todas las personas en mi vida que me han acompañado y que me siguen acompañando al día de hoy. Este trabajo no hubiese sido posible sin su apoyo y compañía.

Al Dr. Alejandro Federico de Nicola y a todo el equipo del Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto y abrirme las puertas de su laboratorio con una amabilidad y predisposición extraordinaria. Especialmente a mi directora, la Dra. Luciana Pietranera por su apoyo constante, confianza y paciencia durante todo el proceso de realización de este trabajo.

A mi familia que siempre me apoyó de manera incondicional a lo largo de estos años y en quienes siempre pude sostenerme para salir adelante. Sin su apoyo nada de esto sería posible y no creo que me alcancen las palabras para describir lo agradecido que estoy de tenerlos.

A mis amigos y amigas de siempre, que me han bancado en las buenas y en las malas y por todas las cosas que hemos compartido juntos. A mis amigos y amigos de la facultad, con quienes hemos enfrentado cada instancia de la carrera juntos y hemos logrado salir adelante.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Belgrano, por la formación que me ha otorgado en estos años y a sus docentes no solo por los conocimientos impartidos sino que también por ayudarme a desarrollar mi perspectiva del mundo.

## Introducción

### Hipertensión esencial

La hipertensión esencial o primaria es una enfermedad crónica de origen incierto que causa un aumento sostenido de la presión arterial. Es una enfermedad con una gran incidencia (25-35%) en la población adulta y constituye un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y renales, accidentes cerebrovasculares, la demencia vascular y la demencia asociada a la enfermedad de Alzheimer (Messerli, 2007).

Pese a que no se conocen las causas puntuales de la hipertensión esencial, la epidemiología de la enfermedad ha sido estudiada en gran detalle (Goodfriend, 2009). A partir de esto se han identificado factores de riesgo para la enfermedad como el sobrepeso, la edad (la prevalencia aumenta fuertemente a partir de los 60) y el sexo (menor prevalencia en mujeres premenopausicas, esta tendencia se nivela despues de los 45 años), entre otras.

Los efectos nocivos de la hipertensión no están limitados solamente a patologías graves en casos de pacientes crónicos con hipertensión no tratada. Algunos daños más sutiles se producen en las etapas tempranas de la enfermedad: entre ellos se encuentran la hipertrofia del ventrículo cardíaco izquierdo, la microalbuminuria (señal de daño renal) y el deterioro cognitivo, entre otros (Messerli, 2007).

Con respecto al deterioro cognitivo, numerosos estudios han observado que el rendimiento cognitivo en pacientes hipertensos es deficitario y que estos pacientes tienen una mayor probabilidad de sufrir demencia (Waldstein, 1991; Korf, 2004). Algunos estudios han encontrado que pacientes hipertensos con presión arterial regulada a partir de medicación hipotensora han logrado revertir aunque sea parcialmente este deterioro cognitivo (Cacciatore, 1997; Richards, 2000; Hajjar, 2005; Obisesan, 2008) pero estos resultados se contrastan con otros estudios donde se ha observado que el tratamiento hipotensor no tiene efecto en el rendimiento cognitivo (Messerli, 2007) o que incluso los cambios a nivel encefálico característicos de la neuropatología hipertensiva están presentes tanto en pacientes hipertensos tratados como no tratados (van Dijk, 2004; Raz, 2006; Kraut, 2008). Estos trabajos demuestran no solo una clara relación entre la hipertensión no tratada y el deterioro cognitivo sino que además muestran la importancia de desarrollar nuevas terapias conjuntas que además de mantener controlada la presión arterial puedan proteger al cerebro del deterioro cognitivo y el envejecimiento temprano.

La naturaleza heterogénea de la enfermedad requiere de una mayor integración de los campos científicos que la estudian. Ya que la enfermedad es causada por una combinación de factores genéticos y ambientales, resulta imperativa la concordancia de la investigación clínica, molecular, genética y epidemiológica para identificar combinaciones específicas de los factores mencionados que aumenten la presión arterial y poder así diseñar terapias acorde (Staessen, 2003).

## Ratas SHR

La rata espontáneamente hipertensa (SHR) es un modelo genético de hipertensión esencial ampliamente utilizado para el estudio de enfermedades cardiovasculares. Fue desarrollada a partir de la cría endogámica de ratas Wistar-Kyoto (WKY) que manifestaban un fenotipo hipertenso hasta lograr que un 100% de la progenie presente hipertensión esencial. Los animales son normotensos al nacer y a los 6 meses de vida ya muestran hipertensión sostenida (Okamoto, 1969).

La rata SHR ha sido el modelo más utilizado para el estudio de la hipertensión esencial dadas las similitudes en el desarrollo de la enfermedad en las ratas y en los humanos. Estas similitudes incluyen el desarrollo progresivo de la enfermedad con el paso del tiempo (Doggrell y Brown, 1998), la mayor incidencia de la enfermedad en machos y un aumento en el tono simpático en las etapas tempranas de la enfermedad.

Numerosos estudios han demostrado un aumento en la actividad del sistema renina-angiotensina en el tronco del encéfalo de ratas SHR al igual que un aumento en actividad en las vías de señalización mediadas por el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) (Haspula y Clark, 2017). La activación astrogliar del sistema renina-angiotensina altera significativamente el balance de citoquinas pro y anti inflamatorias en el tronco del encéfalo y produce un aumento significativo de la actividad simpática vasomotora (Haspula, 2018).

Wu (2012) demostró que la activación microglial relacionada a la inflamación sistémica lleva a un aumento de la presencia de estados tisulares inflamatorios y oxidativos que se correlacionaron con el desarrollo de la hipertensión en las ratas SHR. Mientras tanto, los astrocitos, quienes ven aumentada su reactividad en los procesos neuroinflamatorios, son claves en la formación de la barrera hematoencefálica. Esta barrera aumenta su permeabilidad durante la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares a partir de la inflamación vascular y la disfunción endotelial, lo que permite la entrada de angiotensina II presente en la circulación sanguínea (Abbot, 2002).

Los hallazgos típicos en el hipocampo de SHR incluyen degeneración, necrosis y apoptosis neuronal, reducción de la neurogénesis en el giro dentado, aumento de la reactividad astrogliar, una reducción del volumen del hipocampo, un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y una reducción del factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) (Sabbatini, 2002; Pietranera, 2006; Pietranera, 2010).

## Neuroinflamación

La neuroinflamación se refiere a la respuesta inflamatoria del sistema inmune innato ubicada en el sistema nervioso central y en la médula espinal. Esta respuesta del tejido nervioso tiene como principal objetivo eliminar desechos celulares, limitar la infección del tejido por parte de patógenos externos y asistir en la reparación de tejidos dañados (Yang, 2018). Sin embargo, en enfermedades neurológicas crónicas, la persistencia en el tiempo de la neuroinflamación puede causar efectos adversos en el tejido nervioso.

Este proceso se desencadena principalmente a partir de la activación de las principales células inmunes del sistema nervioso (astrocitos y microglías) que se activan en diferentes estados (Schain, 2017). La sobre estimulación de estas vías pro inflamatorias dentro del encéfalo se ha identificado como un factor de riesgo para varias enfermedades neurodegenerativas. El estado pro inflamatorio y las vías neuroinflamatorias pueden ser desencadenadas por distintos factores como los insultos inflamatorios, la edad, el background genético y factores ambientales, entre otros (Shabab, 2016).

El proceso neuroinflamatorio no es un proceso simple sino que depende de la interacción de las distintas células del sistema nervioso central con las variables del ambiente a las que responden de distintas formas. Según Schain (2017) las células gliales pueden adoptar roles pro o anti inflamatorios dependiendo de los escenarios puntuales a las que se enfrentan y la coordinación e interacción entre estas células va a definir el estado final del tejido. En condiciones normales estas células responden de manera organizada a los factores ambientales para mantener la homeostasis y para elaborar una respuesta inmune a amenazas puntuales en el sistema nervioso central (Yang, 2018).

Las funciones pro inflamatorias de las células gliales incluyen la liberación de citoquinas y especies reactivas de oxígeno. Esto puede causar daño en neuronas sanas, disfunción sináptica, pérdida de sinapsis e incluso muerte neuronal. Por lo tanto, un desbalance prolongado entre los factores pro y anti inflamatorios en las células neuroinmunes puede llevar a causar daño tisular en el sistema nervioso central y puede contribuir a los cambios patológicos producidos por varias enfermedades neurodegenerativas (Schain, 2017).

### **Astrocitos y astrogliosis**

Los astrocitos cumplen un rol muy importante en el funcionamiento del sistema nervioso central. Además de controlar el flujo sanguíneo nervioso, mantienen la barrera hematoencefálica, modulan el metabolismo y la excitabilidad neuronal y participan en algunas sinapsis llamadas sinapsis tripartitas (García Segura, 2019). Los astrocitos están involucrados también en la neurogénesis adulta, la sinaptogenesis, la formación de la mielina y en la reparación de tejido nervioso dañado (Sofroniew, 2010).

En condiciones neurodegenerativas o por respuesta a daño o isquemias, los astrocitos adoptan un fenotipo reactivo involucrándose así en la respuesta inflamatoria. Entran en un proceso de cambio morfológico y funcional caracterizado por la sobreexpresión de GFAP (proteína ácida fibrilar de la glia) que es el principal componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto de las nuevas prolongaciones (Silver, 2016). Además, reducen los niveles de glutamato extracelular y liberan factores neurotróficos.

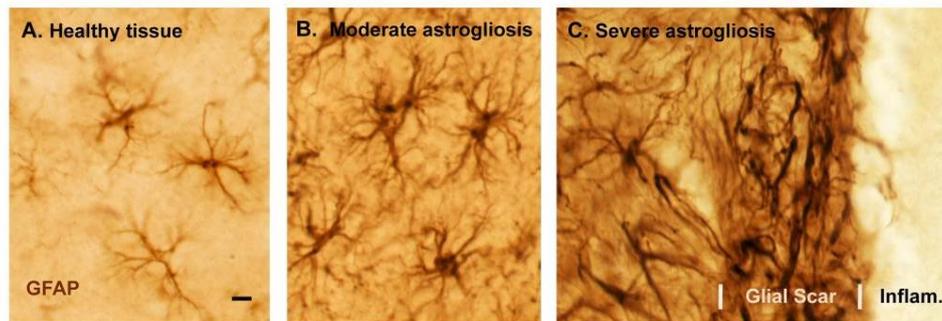


Fig. 1: Niveles de Astroglial reactivación (Sofroniew, 2009)

La astroglial reactivación no es una respuesta de “todo o nada” sino que se trata de un gradiente fino de cambios en la expresión génica y la morfología de los astrocitos. Estos cambios están regulados por mecanismos de señalización tanto inter como intracelulares (Sofroniew, 2009).

Los astrocitos tienen la capacidad de sintetizar moléculas con una gran variedad de funciones y de alterar la expresión de moléculas involucradas en todos los aspectos de la actividad de la célula (Eddleston, 1993). Pueden afectar cambios en su estructura celular, su metabolismo energético, sus vías de señalización intracelular y en las bombas y proteínas transportadoras de su membrana plasmática. La astroglial reactivación es sinónimo de lesión cerebral y el aumento de la expresión de GFAP en astrocitos es una característica típica de las ratas SHR (Tomassoni 2004). Los astrocitos pueden liberar mediadores pro inflamatorios y citoquinas que dañan a las neuronas y atraen a los macrófagos y microglia (Pekny and Nilsson, 2005; Chikanza, 2000).

### **Microglia y microglial reactivación**

Las microglías son los principales actores en la iniciación y la resolución de la respuesta inmune en el SNC. En condiciones de descanso escanean el ambiente tisular y se activan en presencia de patógenos o de células dañadas. Las microglías migran hacia el sitio del daño para restaurar la homeostasis tisular a través de la liberación de moléculas pro y anti inflamatorias y de la fagocitación de agentes infecciosos, debrís celular y células dañadas (García Segura, 2019).

Aunque el objetivo de la activación de la microglía (al igual que en los astrocitos) es el de reparar el tejido dañado, en enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias la microglía puede presentar anomalías funcionales que impidan el desarrollo de la función reparadora e incluso en estos casos pueden contribuir al daño tisular. La microglía al activarse secreta citoquinas, factores neurotróficos, especies reactivas de oxígeno y factores de coagulación.

La morfología y la función microglial están relacionadas íntimamente. Según su morfología, las microglías se han clasificado en tres subtipos distintos: inactivas, activadas y reactivas (Fernández-Arjona, 2017). Las microglías inactivas o de vigilancia están caracterizadas por una morfología ramificada con prolongaciones largas y angostas con un cuerpo celular reducido mientras que las microglías activadas presentan una morfología inflamatoria o fagocítica con un cuerpo celular hinchado y prolongaciones más cortas y anchas. Las microglías reactivas suelen ser chicas y esféricas.

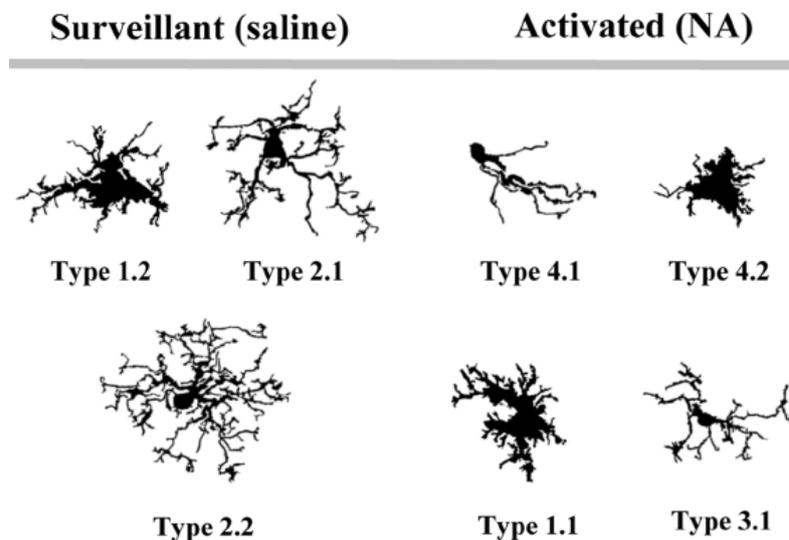


Fig. 2: Morfología de microglia (Fernández-Arjona, 2017)

En condiciones normales, predomina el fenotipo inactivo aunque no se encuentran inactivas sino que escanean constantemente el tejido.

Desde el punto de vista inflamatorio, se pueden distinguir dos fenotipos microgliales: el “tipo M1” y el “tipo M2” (Orihuela, 2016). El tipo M1 corresponde a un fenotipo proinflamatorio donde predomina la secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  y se relaciona con los daños producidos por los procesos neuroinflamatorios. El tipo M2 en cambio, corresponde a un fenotipo antiinflamatorio donde predomina la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  y se relaciona con la remoción de desechos celulares y la reparación tisular.

## Hipocampo

### Estructura

El hipocampo es una estructura cerebral de gran importancia y una de las principales estructuras del sistema límbico. Tiene una estructura pareada con dos mitades especulares en cada hemisferio cerebral y se encuentra en la línea media de la corteza cerebral donde ésta se repliega sobre si misma en el lóbulo temporal medial (Nieuwenhuys, 2009).

Las regiones del hipocampo que se pueden destacar son el giro dentado y el asta de Ammon o *Cornus ammonis* (CA) que a su vez se divide en tres campos (CA1-CA3) según el tamaño y densidad de las neuronas piramidales que los componen (Pinel, 2000). El campo CA1 se caracteriza por su capa de neuronas (Kahle, 2018) piramidales pequeñas mientras que CA2 presenta una capa más estrecha y densa de neuronas piramidales grandes. La región CA3 también exhibe una capa de piramidales grandes pero de menor densidad.

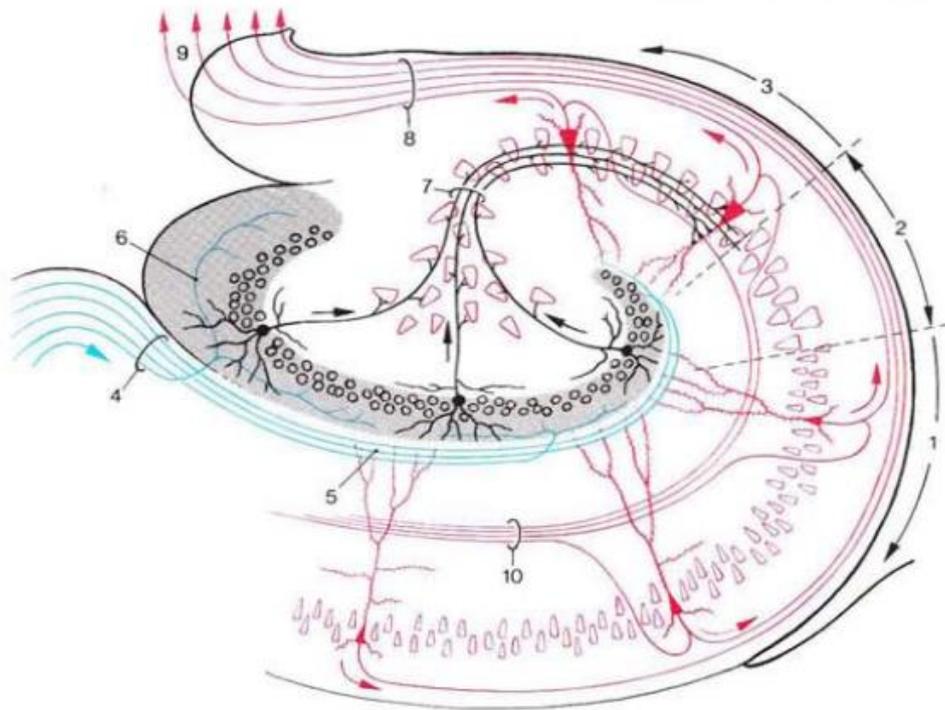


Fig. 3: Formación del hipocampo: 1-3: regiones CA1-3; 4: tracto perforante; 6: neuronas granulares; 7: fibras musgosas; 8: alveus; 9: fimbria; 10: fibras colaterales de Schaffer. (Kahle, 2018)

Tanto el giro dentado como el *Cornus ammonis* son regiones corticales estratificadas (Puelles, 2008). El giro dentado puede dividirse a su vez en tres capas:

1. Capa molecular superficial: escasas interneuronas, en su tercio interno abundan aferencias de asociación y comisurales mientras que en sus tercios externos llegan aferentes de la corteza entorrinal medial y lateral.
2. Capa granular: distintas interneuronas entremezcladas con abundantes neuronas granulares cuyas espinas dendríticas entran a la capa molecular donde se ramifican extensamente.
3. Capa polimórfica: interneuronas más grandes, que conectan entre si diversas partes del giro dentado a lo largo del eje. Esta capa recibe importante aferencias modulatorias del septum, el locus cerúleus, los núcleos de rafe y del núcleo tuberomamilar. La aferencia dopaminérgica que recibe del área tegmental ventral es más dispersa y afecta a todas las capas.

El asta de Ammon o *Cornu Ammonis* está compuesto principalmente por somas de neuronas piramidales y se encuentra subdividido en tres estratos según las partes del árbol dendrítico a la que lleguen las aferencias (Puelles, 2008). La zona donde se ubican las dendritas apicales de estas neuronas se conoce como *stratum radiatum* mientras que la parte donde se encuentran las terminales se conoce como *stratum lacunosum* o *moleculare*. Las dendritas basales en cambio se ramifican en el *stratum oriens*. Este estrato cubre sin límite claro a la sustancia blanca subyacente denominada *alveus*, la cual está formada por los axones de las neuronas piramidales.

Inmediatamente después del sector CA1, se puede observar el *subiculum*, la principal estructura de salida del hipocampo. Es una estructura de tres capas similar a la región CA con las neuronas piramidales como principal componente. Sus proyecciones se dirigen hacia varias estructuras subcorticales como el hipotálamo, el *nucleus accumbens* y el tálamo.

Las distintas subregiones paralelas del hipocampo se conectan a través de un circuito cooperativo del cual participan sus neuronas: el circuito intrínseco del hipocampo (Puelles, 2008). Este circuito es trisináptico, glutamatérgico y unidireccional. Este circuito se conecta con la corteza entorrinal ya que las neuronas piramidales del cortex entorrinal envían axones a las dendritas de las células granulares del giro dentado. Estas células granulares a su vez hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas piramidales de CA3 a través de las llamadas fibras musgosas y las piramidales de CA3 emiten proyecciones hacia las neuronas de CA1 y CA2. Las células piramidales de CA1 se conectan a su vez con las piramidales del subiculo y estas finalmente envían proyecciones axonales hacia la corteza entorrinal, cerrando así el circuito interno.

Las neuronas presentes en este circuito son glutamatérgicas, la regulación de este circuito es a través de interneuronas gabaérgicas que controlan la entrada y la salida de información y modulan la actividad de las neuronas granulares y piramidales del hipocampo.

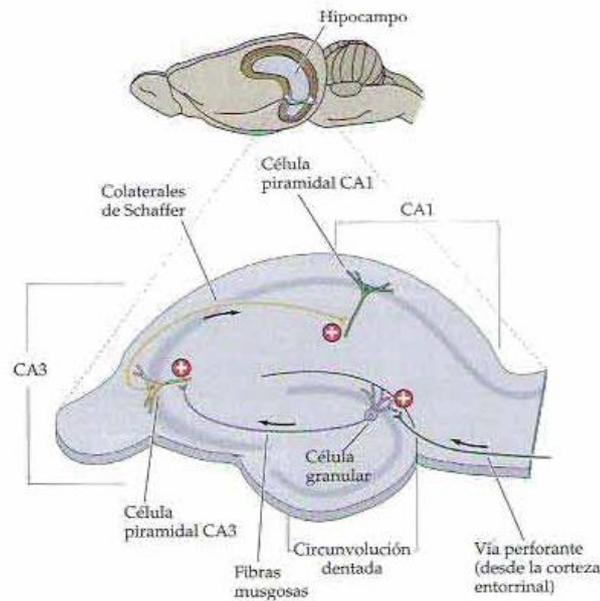


Fig.4: Circuito intrínseco del hipocampo. (Purves, 2007)

## Función

El sistema límbico es un circuito de estructuras de la línea media que rodean al tálamo y participa de la regulación de las conductas motivadas: la lucha, la huida, la ingesta y la reproducción (Kahle, 2018). Este sistema es muy importante para la regulación de la respuesta emocional y conductual, en la reactividad individualizada frente a estímulos sensitivos y en las funciones de memoria integradas.

El hipocampo es un órgano de integración con un rol determinante en la vida emocional y las funciones endócrinas de las personas. Su función dentro del sistema límbico parece estar vinculada a la facultad de valorar las experiencias para poder seleccionar el contenido que se va a grabar en la memoria a largo plazo (Puelles, 2008). Además, tiene una función neuroendocrina muy importante ya que ejerce un rol inhibitorio sobre el hipotálamo lo cual repercute en el funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (Eje HPA).

El hipocampo interviene también en procesos asociados al aprendizaje espacial y a la consolidación del aprendizaje en la memoria. Estos dos procesos cognitivos son vitales para los seres vivos porque les permiten adaptarse a sus entornos. Existen tres tipos de memoria distintas: la memoria de trabajo, la memoria implícita y la memoria explícita. El hipocampo está relacionado críticamente a una de ellas, la memoria explícita o declarativa (Purves, 2007)

El circuito trisináptico es el circuito de procesamiento de la memoria declarativa. Este circuito permite relacionar diferentes aferencias sensitivas pertenecientes a distintos estímulos gracias al alto grado de interconexión que hay entre las neuronas piramidales del hipocampo (Zhang, 2013).

La importancia del hipocampo en la memoria se conoce desde que Scoville y Milner (1957) describieron la amnesia anterógrada grave y la amnesia retrógrada parcial de un paciente a quien se le había destruido quirúrgicamente el hipocampo por un tratamiento contra la epilepsia. Otros estudios han demostrado que la corteza parahipocámpal se activa durante la presentación de escenas espaciales o durante la memorización de objetos relacionados a lugares específicos (Churchwell, 2010).

La participación del hipocampo en la memoria explícita también puede estudiarse a través de la memoria espacial, la cual consiste en distintos mecanismos de recuperación, almacenamiento y codificación de información sobre espacios, rutas y ubicación espacial (Burgess, 2002). Experimentos de esta índole han demostrado que las lesiones hipocámpales afectan negativamente la adquisición y retención del aprendizaje espacial (Astur, 2005) y que las afecciones en el aprendizaje espacial son proporcionales con el volumen de tejido dañado (Strange, 2014). O'Keefe (1971) logró identificar neuronas denominadas "de lugar" en el hipocampo de la rata. Estas células tienen una alta tasa de disparo en los momentos en los que las ratas reconocen lugares específicos que fueron previamente explorados.

Estas evidencias dejan en claro que el hipocampo juega un rol clave en el aprendizaje espacial y que participa en la consolidación de la memoria a corto plazo para generar recuerdos a largo plazo.

La memoria de trabajo es un sistema de almacenamiento y manipulación simultánea de información en el corto plazo necesario para la realización de operaciones cognitivas complejas como la comprensión del lenguaje, el aprendizaje y el razonamiento (Baddeley, 1992). Se cree que la corteza prefrontal es la estructura cerebral donde se almacena y se desarrolla la memoria de trabajo (Zanto, 2011). El hipocampo en cambio, es una estructura involucrada en la integración de los variados componentes de los recuerdos. El procesamiento no ocurre de forma aislada sino que involucra redes complejas y muy interconectadas que incluye distintas áreas cerebrales. El hipocampo no almacena recuerdos sino que codifica y recupera información de distintas áreas de la corteza cerebral. Cuando esta información almacenada en la corteza prefrontal se activa, pasa a formar parte de la memoria de trabajo.

## Neuropatología hipocampal en la hipertensión

La neuropatología hipocampal está asociada a la hipertensión esencial y es una característica descrita de nuestro modelo, la rata SHR. Esta neuropatología está caracterizada por ciertas alteraciones hipocampales como la disminución de la neurogénesis en el giro dentado, el aumento de la reactividad de los astrocitos (astrogliosis) y la microglía (microgliosis) en todo el hipocampo y un aumento de la degeneración, necrosis y apoptosis neuronal (Pietranera, 2016).

La encefalopatía hipertensiva se caracteriza además por el aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , Cox-2, un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la inducción de la desmielinización axónica (Kaiser, 2014; Correa, 2020).

El hipocampo es altamente vulnerable a los efectos de la hipertensión y sus alteraciones son muy comunes en pacientes de edad avanzada. Estos pacientes presentan elevada incidencia de la reducción del volumen hipocampal y un aumento del riesgo de demencia (Wiseman, 2004). Además, se pueden observar la atrofia y la reducción en cantidad de espinas dendríticas y disfunción mitocondrial (Brocca 2013, Pietranera 2015).

En estos casos se puede decir que el hipocampo muestra un claro ambiente pro inflamatorio causado por la astrogliosis y la microgliosis, un aumento del nivel de estrés oxidativo, un nivel alto de expresión y activación del receptor de mineralocorticoides (MR) y una expresión prevalente de citoquinas proinflamatorias (Brocca 2019, Dinh 2016).

### **Neurogénesis adulta**

En los vertebrados exceptuando a los mamíferos, la neurogénesis adulta es un proceso relativamente común que incluso puede ser abundante. En anfibios, reptiles y peces se puede observar la presencia de múltiples centros neurogénicos que durante toda la vida mantienen su capacidad proliferativa. En mamíferos en cambio, la gran mayoría del cerebro adulto no tiene esta capacidad neurogénica y esta se limita a solamente dos regiones del cerebro.

La neurogénesis hipocampal adulta es un proceso complejo que consiste en la generación de neuronas granulares nuevas en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Estas neuronas se convierten en células granulares maduras que van a modular la formación de los circuitos hipocampales. Este proceso se da casi exclusivamente en el giro dentado, ya que la única otra zona del cerebro que hace neurogénesis es la zona subventricular donde nacen las nuevas interneuronas que migran hacia el bulbo olfatorio (Bhat, 2017).

La neurogénesis adulta cobra gran importancia porque está involucrada en varios procesos cognitivos, sobre todo en distintos tipos de memorias dependientes de hipocampo (Shih, 2016). Además, se cree que los astrocitos aledaños cumplen un rol importante en el desarrollo del proceso al promover la diferenciación de los precursores neuronales.

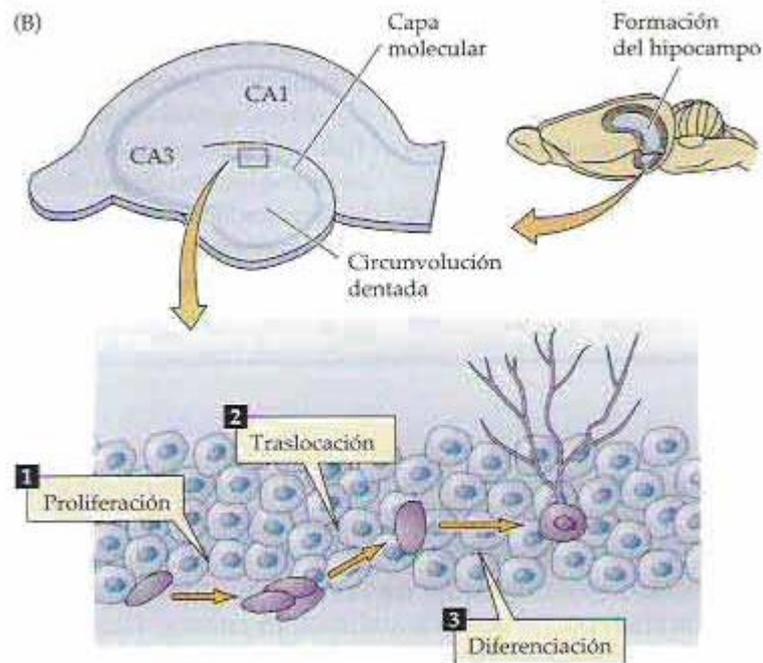


Fig. 5: Neurogénesis hipocámpica (Purves 2004 (Nieuwenhuys, 2009) –3era edición-)

El proceso puede dividirse en cuatro fases: 1) la fase de célula precursora, 2) la fase de supervivencia temprana, 3) la fase de maduración postmitótica y 4) la fase de supervivencia tardía. La fase de célula precursora se caracteriza por la expansión del pool celular de posibles futuras neuronas. La fase de supervivencia temprana marca la salida de la célula que va a seguir diferenciándose del ciclo celular mientras que el resto de los precursores que no avanzan se eliminan. En la fase de maduración postmitótica se establecen conexiones funcionales a partir del crecimiento del axón y las dendritas, formando así nuevas sinapsis. Finalmente, la fase de supervivencia tardía representa el periodo de coordinación para lograr la integración definitiva de la nueva célula granular (Kempermann, 2015). Teniendo en cuenta la morfología celular y las proteínas marcadoras se pueden distinguir seis estadios por los cuales pasan los precursores neuronales (Fig. 6)

G. Kempermann et al.

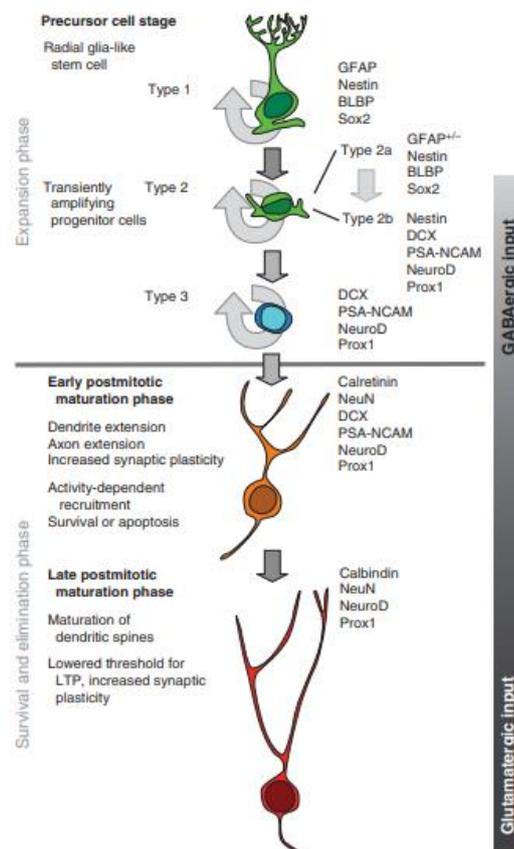


Figura 6: Etapas de la Neurogénesis Adulta (Kempermann, 2015)

Para identificar las células que intervienen en este proceso, se pueden marcar con bromodesoxiuridina (BrdU), un nucleótido sintético que se une a la timidina en células mitóticamente activas. También pueden utilizarse marcadores inmunohistoquímicos como Ki67, marcador de proliferación celular. Sin embargo, estos procesos no se consideran marcadores de neurogénesis porque ambas moléculas intervienen antes de la diferenciación de las células madres en neuronas y es necesario en estos casos colocalizar posteriormente a BrdU o a Ki67 con algún marcador neuronal específico para marcar la neurogénesis.

Debido a la expresión casi exclusiva de doblecortina (DCX) en el desarrollo de los precursores neuronales, esta proteína se utiliza como un marcador para la neurogénesis. Es una proteína asociada a microtúbulos, expresada por las células precursoras neuronales y neuronas inmaduras en estructuras corticales embrionarias y adultas. Las células precursoras neuronales comienzan a expresar DCX, mientras que se dividen activamente, y sus células hijas siguen expresando DCX durante 2-3 semanas a medida que las células maduran hasta convertirse en neuronas. Es por esto que se puede decir que la DCX si es un marcador de neurogénesis a diferencia de BrdU y Ki67.

## Deterioro cognitivo asociado a la hipertensión

Como ya se mencionó anteriormente, la hipertensión es un factor de riesgo para el deterioro cognitivo temprano. El deterioro cognitivo puede definirse como la disminución transitoria y progresiva de las operaciones cognitivas complejas como el razonamiento, la comprensión del lenguaje, la memoria, la capacidad de planificación y el aprendizaje, entre otras. En pacientes hipertensos crónicos, este deterioro se ve acompañado de evidencias morfológicas de remodelación de la pared de la microvasculatura, desmielinización, isquemia, edema citotóxico y atrofia del hipocampo y del lóbulo temporal.

La relación entre la hipertensión y el deterioro cognitivo se conoce hace tiempo. Battersby (1993) encontró una diferencia importante en rendimiento cognitivo entre pacientes hipertensos y normotensos de una edad promedio de 63 años. Mori en 1995 demostró que ratas jóvenes (3/4 meses) SHR tardaron más tiempo en aprender un laberinto radial que los controles normotensos y que entre ratas de edad avanzada (16/17 meses) el grupo hipertenso tuvo un menor rendimiento en el aprendizaje de tareas que los controles WKY. Al mismo tiempo, Launer (1995) publicó un estudio donde se sometió en 1991 a un test cognitivo a pacientes cuyas presiones arteriales fueron medidas en los años 60 y encontró una relación entre la presión sistólica en la mediana edad y la reducción de las capacidades cognitivas en la edad avanzada.

Este deterioro en las operaciones cognitivas dependientes del hipocampo se ha observado en distintos modelos animales para la hipertensión: tanto en ratas SHR (Togashi 1982, Sabbatini 2002) como en ratones con hipertensión inducida por angiotensina II (Duchemin 2013, Foulquier 2018) y también en ratones con hipertensión inducida por el método 2K1C (“2 kidneys, 1 clip”) (Shih, 2016).

Algunos estudios han demostrado la importancia de la neurogénesis adulta en los procesos cognitivos dependientes de hipocampo (Akers, 2014; Kitamura, 2009). Además, Aimone (2009) ha demostrado que las nuevas neuronas granulares del giro dentado que se producen durante la neurogénesis modulan la potenciación a largo plazo de los circuitos hipocampales.

Existe cierto debate sobre si la hipertensión afecta la neurogénesis adulta en el hipocampo. Distintos estudios han dado resultados contradictorios ya que Perfilieva (2001) encontró que el ritmo de proliferación de precursores neuronales era mayor en ratas SHR que en su control normotenso de ratas Sprague Dawley (SD) y Kronenberg (2007) encontró una mayor cantidad de células mitóticas y neuronas inmaduras en el hipocampo de las ratas SHR que en su control de ratas WKY. En contraposición a esto, tanto Hwang (2008) como Shih (2016) y Pietranera (2008; 2010) han encontrado que la hipertensión reduce la neurogénesis adulta en el hipocampo. Estas contradicciones podrían llegar a explicarse por la gran variedad genética que existe entre ratas SHR de distintos laboratorios después de décadas de reproducirse por métodos convencionales en sus respectivos bioterios (Meneses, 1998).

## Mecanismos de neuroprotección de los estrógenos

En un principio se pensaba que las hormonas sexuales solamente actuaban a nivel del SNC ejerciendo efectos asociados a la reproducción y el comportamiento sexual. Sin embargo, han surgido evidencias de que los estrógenos poseen acciones relacionadas a la neuroprotección y a la regeneración de tejido nervioso debidas a la modulación de la expresión génica y de distintas vías de señalización intracelulares (Kuiper, 1997).

Los estrógenos fueron las primeras hormonas consideradas neuroprotectoras, habiéndose empleado para retardar o impedir los cambios de memoria y la neurodegeneración asociados al envejecimiento, el stroke y la enfermedad de Alzheimer (McEwen, 2001). El efecto protector de los estrógenos se ha podido observar en procesos inflamatorios, traumáticos, isquémicos, neurodegenerativos e incluso cognitivos. Hoy en día existe un consenso unánime de que los estrógenos tienen efectos neuroprotectores en el hipocampo.

Los estrógenos pueden, a través de sus receptores clásicos (ERs), actuar sobre la membrana, alterando su permeabilidad para precursores o modificando el funcionamiento de los mismos receptores (McEwen, 1981). También pueden alterar la excitabilidad celular (Kelly, 1977; Nabekura, 1986), participar en la activación de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Kelly, 2001) y de la quinasa de fosfatidilinositol (PI3K) (Castoria, 2001), o en la modulación de receptores acoplados a proteína G (Kelly, 1999). Así mismo, también intervienen en la modulación del flujo de calcio y en la generación de nucleótidos cíclicos (Klinge, 2008). Pueden modular la actividad de enzimas mitocondriales clave implicados en la respiración celular y en el metabolismo oxidativo (Luine, 1974).

Los estrógenos también pueden influir en tareas de aprendizaje y memoria relacionadas con la corteza cerebral y el hipocampo. Se ha observado que el tratamiento con estrógenos en ratas hembras ovariectomizadas mejora la adquisición en el laberinto radial (Daniel 1999) y en el laberinto en T (Fader, 1998). Tanto en corteza cerebral como en el hipocampo presentan una alta densidad de ERs (Montague, 2008; Shughrue, 1997) y juegan un papel indispensable en procesos cognitivos de gran importancia como el aprendizaje y la memoria (Conejo, 2007; Jo, 2007).

En el hipocampo, los estrógenos pueden inducir un aumento en el número de sinapsis en botones sinápticos múltiples entre neuronas que previamente no estaban conectadas (Yankova, 2001). Se ha observado también que los estrógenos y los progestágenos regulan la sinaptogénesis en el hipocampo durante el ciclo estral de la rata, lo que conlleva consecuencias funcionales que incluyen cambios en la neurotransmisión y en la memoria (McEwen, 2001).

## **Protección asociada a los receptores de estrógeno (ERs y GPER)**

### **Rol de los receptores ER**

La acción del estradiol en el cerebro está relacionada a la activación de distintos mecanismos de señalización complementarios, de los cuales el mejor caracterizado es la regulación de la transcripción de genes a través de los receptores intracelulares clásicos (ERs).

Los receptores ER clásicos se llaman así porque fueron los primeros en ser descubiertos y se pueden dividir en ER $\alpha$  y ER $\beta$ . ER $\alpha$  es codificado por el gen ESR1 en el cromosoma 6 y ER $\beta$  por el gen ESR2 en el cromosoma 14 (Green, 1986; Greene, 1986). Ambos receptores tienen estructuras similares con un dominio de unión al ligando y un dominio de unión a ADN.

El estradiol se une al dominio de unión al ligando e induce la activación y la homodimerización o heterodimerización del ER. Luego, el ER se une a elementos respondedores de estrógeno (EREs) en la región promotora de los genes específicos a través del dominio de unión a ADN, dando como resultado el reclutamiento de activadores y represores transcripcionales (Shang, 2000). Los ERs también pueden regular la transcripción actuando como factores en sitios no-EREs, como los sitios de la proteína activadora AP1 (Safe and Kim, 2008).

Además los receptores clásicos tienen dos dominios de activación, que les permiten ser regulados por las quinasas activadas por las vías de señalización de varios factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) (Ma, 1994; Mendez and Garcia-Segura, 2006). Los ERs también pueden asociarse a la membrana plasmática donde activan diferentes cascadas de señalización (Ramirez, 2009).

El estradiol es capaz de mediar sus efectos neuroprotectores a partir de la regulación de las células gliales con efectos antiinflamatorios (Dhandapani & Brann, 2007). Los ERs están considerados como un punto de convergencia para la señalización de estradiol y de otros factores neuroprotectores.

La caracterización fenotípica de ratones knock-out deficientes en ya sea la expresión de ER $\alpha$  o ER $\beta$  ha revelado diferencias entre las funciones fisiológicas de los dos subtipos de receptores. ER $\alpha$  tiene un efecto más profundo en el desarrollo y la función de la glándula mamaria y el útero; y en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y esquelética. Este subtipo estaría involucrado en los efectos cancerígenos y feminizantes del estradiol (Shumaker, 2003). ER $\beta$ , sin embargo, tiene efectos más pronunciados sobre el sistema nervioso central y sobre las condiciones de hiperproliferación celular (Kuiper, 1997). Ambos receptores tienen un papel importante en el desarrollo y la función de los ovarios; y en la protección del sistema cardiovascular (Nilsson, 2011).

Existen fármacos moduladores selectivos de los receptores de estrógeno o SERMs con la finalidad de ejercer efectos agonistas del estradiol a nivel cerebral pero evitar los efectos antagonistas en tejidos periféricos. Esto sugiere el posible potencial terapéutico de los SERMs en algunas de estas patologías (Dutertre & Smith, 2000; Arevalo, 2015)

### **Rol del receptor GPER**

El receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER) es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G ubicado en la membrana plasmática y el retículo endoplásmico tanto de las células del giro dentado y las regiones CA1 y CA3 del hipocampo como en otras partes del sistema nervioso central y de otros tejidos periféricos. (Prossnitz, 2008; Brailoiu, 2007). La acción neuroprotectora de GPER en la encefalopatía hipertensiva de las ratas SHR es similar a la acción protectora del 17- $\beta$  estradiol (Correa, 2020).

Entre los efectos observados se puede destacar el potencial neuroprotector y antiinflamatorio de GPER. La activación de este receptor reduce la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, aumenta la neuritogénesis, estimula la liberación de BDNF y regula la actividad de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y la vía de señalización de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), lo que a su vez permite la interacción con la señalización de otras moléculas neuroprotectoras (Ruiz, 2013; Briz, 2015; Lu, 2016).

Además, GPER regula el tono vasomotor, retrasa el desarrollo de la hipertensión (Meyer, 2011), desempeña una función protectora en el sistema cardiovascular de ratas SHR (De Francesco, 2013) y mejora la supervivencia neuronal después de accidentes isquémicos (Kosaka, 2012). También se ha descrito su rol en parámetros comportamentales regulando la ansiedad y el desarrollo de la memoria espacial (Hammond, 2009; Kim, 2016).

### **Neuroprotección por estradiol**

El estradiol es una hormona esteroidea que se sintetiza a partir de la conversión de colesterol en pregnenolona en la mitocondria y finaliza con la conversión de testosterona en estradiol en una reacción catalizada por la enzima aromatasa (Gillies, 2014). Esta hormona se produce principalmente en el ovario y sus niveles en sangre varían tanto en el desarrollo, la pubertad, el ciclo estral y la menopausia. Algunos tejidos tienen la capacidad de sintetizar el estradiol de manera local, entre ellos el tejido óseo, el adiposo y el nervioso.

El cerebro expresa las enzimas necesarias para la esteroidogénesis, entre ellas la enzima aromatasa. Esta enzima se ha encontrado en el hipocampo de ratones, ratas, peces, aves, monos y humanos (Yague, 2008). Parece altamente activa en el hipocampo, ya que en ratones el contenido de 17 $\beta$ -estradiol en este tejido es seis veces mayor que en el plasma (Hojo, 2009). La inmunoreactividad de aromatasa se ha localizado en el pericario neuronal, dendritas, procesos axonales y en botones terminales (Naftolin, 1996).

El papel de la aromatasa en el hipocampo involucra la plasticidad, el desarrollo sináptico y la regulación positiva de la neurogénesis (Rune, 2006). Estudios recientes han demostrado que la inhibición de la actividad de la aromatasa con letrozol disminuye la proliferación celular y aumenta la apoptosis celular en el hipocampo (Fester, 2006).

El estradiol se sintetiza en el encéfalo de mamíferos adultos de ambos sexos donde, en condiciones fisiológicas, regula distintos procesos neurológicos como los comportamientos

agresivos y reproductores, la cognición, el procesamiento del dolor, la neurogénesis adulta y la plasticidad sináptica (Amantea, 2005). Además contribuye al mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso y tiene efectos neuroprotectores en casos de enfermedades neurodegenerativas y lesiones cerebrales (Arevalo, 2015).

Tanto los receptores clásicos como los no clásicos participan en las acciones neuroprotectoras del estradiol. ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER desencadenan mecanismos neuroprotectores paralelos en el cerebro, incluyendo la activación de quinasas reguladas por señal extracelular (ERK1-ERK2 también conocidas como MAPK3-MAPK1) y la cascada de señalización de PI3K (Tang, 2014). ER $\alpha$  y ER $\beta$  median el aumento de la expresión de BLC-2 inducido por estradiol en neuronas hipocámpales (Zhao, 2004). Así a través de varios mecanismos redundantes el estradiol previene la apoptosis en el cerebro

Los mecanismos neuroprotectores de los ERs también implican la interacción con las vías de protección inducidas por otros factores neuroprotectores. Entre estos factores se encuentra el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). BDNF es un factor neuroprotector en trastornos neurodegenerativos y afectivos. Contribuye a las acciones homeostáticas y neuroprotectoras de estradiol en el hipocampo, cooperando con las acciones de la hormona en la plasticidad sináptica, la neurogénesis y la cognición (Jover-Mengual, 2007). El estradiol incrementa la fosforilación del elemento respondedor de AMPc (la proteína CREB), la expresión del gen de BDNF y la fosforilación del receptor de BDNF, TRKB, en la región CA1 del hipocampo y en otras regiones del cerebro. Esta acción del estradiol está mediada, en parte, por las vías de ERK1-ERK2 y PI3K (Pietranera, 2010; Yang, 2010). Los estrógenos también aumentan la liberación de BDNF en el giro dentado del hipocampo, una de las zonas neurogénicas del cerebro adulto. La expresión de este factor neurotrófico está disminuida en la hipertensión e isquemia (Hennigan, 2009). La evidencia acumulada sugiere que la expresión de BDNF y la hipertensión están negativamente relacionadas.

El control central de la presión arterial está regulado por diferentes factores, entre ellos los de origen endócrino. Los estrógenos disminuyen la presión arterial, favoreciendo a agentes vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), el péptido natriurético atrial y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); mientras que los mecanismos hipertensivos incluyendo el sistema renina-angiotensina central y la actividad del sistema nervioso simpático son regulados negativamente (Belo, 2004). Esta regulación selectiva explica la reducción de la presión arterial y la atenuación del daño causado por la isquemia y accidente cerebrovascular en presencia de estrógenos.

Otro factor neuroprotector es IGF1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1). IGF 1 es una hormona neuroprotectora y un factor local que contribuye a mantener la homeostasis, incluyendo la regulación de la plasticidad y la función cerebral (Fernandez and Torres-Aleman, 2012). Las acciones protectoras de estradiol e IGF1 tienen muchos puntos en común. Ambos factores interactúan en la regulación de la supervivencia neuronal, neuritogénesis, la

neurogénesis adulta, homeostasis del colesterol en el cerebro, el metabolismo de la glucosa, la neuroprotección y la cognición (Azcoitia, 1999; Jover-Mengual, 2007).

El papel de los ERs en la activación de mecanismos neuroprotectores ha llevado a los investigadores a evaluar la potencia neuroprotectora de diferentes ligandos de ER, como los moduladores selectivos de ER (SERMs). Los SERMs pueden unirse al dominio de unión a ligando de los ERs y actúan como agonistas o antagonistas dependiendo del tejido. Se utilizan clínicamente ligandos sintéticos que tienen algunas ventajas sobre el estradiol como moléculas neuroprotectoras. El uso de estradiol como un neuroprotector está limitado por sus efectos feminizantes y por su posible papel en cánceres ER+ (Arevalo, 2015).

### **Células involucradas en la neuroprotección**

Los mecanismos de señalización neuroprotectores mediados por estradiol se activan en diversos tipos de células en el cerebro. El estradiol actúa sobre células gliales y endoteliales para mantener la función de la unidad neurovascular, regula la respuesta inflamatoria de los astrocitos y microglia para controlar la neuroinflamación y actúa en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos para mantener la función y las propiedades de propagación de los circuitos neuronales (Johann and Beyer, 2013).

Las células gliales expresan los ERs, incluyendo ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER (Arevalo, 2015). La lesión cerebral induce tanto la síntesis de estradiol en astrocitos reactivos como la expresión de ERs en estas células (García-Ovejero, 2002). Esto sugiere que los astrocitos pueden desempeñar un papel importante en las acciones neuroprotectoras de estradiol. Los ERs en las células gliales activan varios mecanismos neuroprotectores en respuesta a estradiol, incluyendo la liberación de factores que tienen efectos tróficos sobre las neuronas y otros tipos de células y el control de la neuroinflamación, edema y los niveles de glutamato extracelular. Además, ER $\alpha$  y ER $\beta$  están implicados en las acciones antiinflamatorias de estradiol sobre la microglía y astrocitos (Liu, 2005; Vegeto, 2003)

### **Estrógenos y neurogénesis**

Funcionalmente, los estrógenos desempeñan un papel importante en el hipocampo relacionado con los comportamientos asociados al sistema límbico, el aprendizaje y la memoria. Una forma en que los estrógenos modulan estos procesos es por aumento de la neurogénesis: la proliferación, migración y diferenciación de nuevas neuronas en el giro dentado de animales adultos (Kempermann, 2002).

De las etapas de la neurogénesis adulta, se ha informado que los estrógenos aumentan la proliferación celular (Tanapat, 2005), mientras que progenitores neuronales etiquetados con DCX también son estimulados por el tratamiento con estrógenos en animales viejos (Saravia, 2007). El efecto sobre la neurogénesis parece mediado en parte por los ERs, ya que el ARNm

de ER $\alpha$  y ER $\beta$  se encuentran en el 80% de las células que proliferan en el giro dentado que expresan Ki67, y en una importante proporción de células que muestran un fenotipo más maduro (Pietranera, 2015).

Además de la protección asociada a los receptores clásicos, se ha demostrado que la activación del receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER) a través de un agonista específico (G1) aumenta la cantidad de precursores neuronales DCX+ en el giro dentado de ratas SHR (Correa, 2020).

## Genisteína

A partir de las complicaciones que acompañan al uso sistémico de hormonas como terapia neuroprotectora por sus consecuencias endócrinas y por los riesgos mencionados anteriormente es necesario desarrollar estrategias terapéuticas alternativas para un posible tratamiento neuroprotector (Veiga, 2005). La terapia convencional ha buscado en los últimos años profundizar la búsqueda de compuestos que puedan imitar los efectos beneficiosos de los estrógenos sin provocar los efectos no deseados asociados a su uso. En esta línea, existe un interés creciente en el estudio de terapias basadas en fitoestrógenos como las isoflavonas, siendo la genisteína el compuesto de mayor promesa dentro de este grupo (Bhathena, 2002).

La genisteína es un fitoestrógeno que se encuentra en la soja y que posee una similitud estructural con el 17 $\beta$ -estradiol, lo que posibilita su unión a los receptores de estrógenos y el desencadenamiento de efectos estrogénicos y antiestrogénicos (Kuiper, 1998; Baker, 2000). De hecho, la genisteína está considerada como un SERM natural ya que tiene la capacidad de actuar como agonista o antagonista de ERs dependiendo del tejido (Beck, 2005). A pesar de que pueden unirse tanto a ER $\alpha$  como a ER $\beta$ , parecen tener mayor afinidad por ER $\beta$  (Kuiper, 1997). La genisteína también se une al GPER y no posee efectos feminizantes en machos (Thomas and Dong, 2006).

Entre los efectos protectores de la genisteína se puede destacar su actividad antioxidante (Qian, 2012), sus propiedades anticarcinogénicas (Barnes, 1995) y cardioprotectoras (Park, 2005), así como su papel en la homeostasis de lípidos y carbohidratos (Kreijkamp-Kaspers, 2004). Las isoflavonas de la soja también parecen tener un papel protector relacionado con el metabolismo de la glucosa y la insulina (Wagner, 1997). Las isoflavonas pueden actuar sobre el metabolismo de la glucosa, bien sea regulando la liberación de insulina en las células  $\beta$  del páncreas o regulando los mecanismos de transporte de la glucosa desde la luz intestinal (Bhathena, 2002).

En cuanto a sus efectos sobre el sistema nervioso, los fitoestrógenos parecen tener un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Se ha comprobado que pueden actuar como agonistas o antagonistas (Patisaul, 2002) de los ERs, afectando al aprendizaje y a

la memoria o alterando la expresión de proteínas implicadas en la protección neuronal y en la inflamación (Lund, 2001).

Además, gracias a su efecto inhibitor sobre ciertas enzimas, como las proteínas tirosin quinasas (Akiyama, 1987), pueden alterar eventos de fosforilación, los cuales pueden estar asociados con la modulación de la plasticidad sináptica (Sweatt, 2001). También se ha demostrado que la genisteína puede conferir neuroprotección gracias a sus propiedades antioxidantes, atenuando el estrés oxidativo en situaciones de neurodegeneración inducida por ovariectomía (Huang, 2010), así como después de daño isquémico en el hipocampo de la rata.

Estudios en células en cultivo describen que la genisteína aumenta la producción de BDNF en astrocitos y neuronas hipocampales, disminuye la activación inflamatoria de células microgliales y astrocitos expuestos a la proteína  $\beta$ -amiloide (Valles, 2010) y protege neuronas expuestas a estrés oxidativo y citoquinas (Qian, 2015). In vivo la genisteína protege neuronas hipocampales de la excitotoxicidad (Azcoitia, 2006), disminuye la actividad de la acetilcolinesterasa favoreciendo la memoria y la disminución de movimientos anormales en un modelo de la enfermedad de Huntington (Menze, 2015), posee efectos antiinflamatorios centrales en modelos de isquemia cerebral y envejecimiento (Wang, 2020) aumenta la densidad de espinas dendríticas de la corteza somatosensorial y de las neuronas hipocampales mejorando el aprendizaje espacial en ratas viejas (Pisani, 2012, Wang, 2014), mejora la actividad serotoninérgica en el hipocampo en modelos de depresión y stress post-traumático (Lee, 2020) y mejora los déficits cognitivos y la neuropatología en corteza e hipocampo bajando la neuroinflamación en modelos de enfermedad metabólica neurodegenerativa, Alzheimer y diabetes tipo II (Malinowska et al., 2010; Li et al., 2020; Petry, 2021).

## Antecedentes

Nuestro laboratorio ha realizado contribuciones que apoyan el efecto neuroprotector de los estrógenos en el hipocampo. Desde hace 15 años estudiamos las alteraciones del SNC en la encefalopatía hipertensiva utilizando el modelo de la SHR. En nuestro laboratorio hemos demostrado que:

- La presión arterial basal fue de 180,4 +/- 4,7 mmHg en ratas SHR y 118 +/- 3,2 mmHg en ratas Wistar-Kyoto (WKY). En ambos grupos se redujo la presión arterial media después de un tratamiento con estradiol aunque las SHR continuaron siendo moderadamente hipertensas (Pietranera, 2006)
- Los animales genéticamente hipertensos SHR poseen alteraciones en el cerebro que incluyen: disminución de neurogénesis en el GD del hipocampo, aumento del número de astrocitos que expresan GFAP, disminución del número de neuronas en el hilio del GD (Pietranera, 2006)
- En las ratas SHR se registró una disminución en la neurogénesis tanto en comparación con las ratas WKY y esta situación se revirtió con el tratamiento con 17- $\beta$  estradiol (Pietranera, 2008). La población de precursores neuronales DCX+ fue un 50% menor en las ratas SHR que en las ratas WKY antes del tratamiento con estradiol (Pietranera, 2010).
- El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol disminuyó la astrogliosis GFAP+ en distintas regiones del hipocampo (Pietranera, 2008).
- La expresión de BDNF fue menor en el hipocampo de las ratas SHR y el tratamiento con estradiol aumenta los niveles a valores similares a los de las ratas WKY (Pietranera, 2010).
- En ratas WKY se observó un árbol dendrítico bien desarrollado en contraste con el perfil atrófico de las ratas SHR en la región CA1 del hipocampo. El tratamiento con estradiol aumentó significativamente la densidad de espinas dendríticas apicales y basales en ratas SHR en comparación con las ratas tratadas (Brocca, 2013).
- El 17- $\alpha$  estradiol, un compuesto no feminizante con baja afinidad por ER tiene efectos neuroprotectores en células de neuroblastoma y neuronas dopaminérgicas expuestas a tóxicos (Pietranera, 2014). Este compuesto no se une a los receptores clásicos de estrógeno sino que actúa a través de la inhibición de la peroxidasa lipídica y el daño oxidativo. Se pudo observar un aumento de la neurogénesis y de BDNF y una disminución de la astrogliosis GFAP+. El tratamiento con 17 $\alpha$ -estradiol no modificó la tensión arterial de las ratas SHR.
- El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol no está libre de efectos secundarios en útero, vagina y glándulas mamarias en las mujeres y no es posible utilizarlo en hombres por su efecto feminizante (Pietranera, 2015)

- Ambos receptores clásicos ER $\alpha$  y ER $\beta$  están involucrados en los mecanismos protectores del estradiol (Pietranera, 2016).
- Un tratamiento con G1, un agonista del receptor GPER, aumentó la neurogénesis adulta, disminuyó la astrogliosis GFAP+ y favoreció un cambio fenotípico en la microglía de una morfología de tipo M1 (proinflamatoria) a una morfología tipo M2 (antiinflamatoria) en ratas SHR tratadas (Correa, 2020). Además, se incrementaron los niveles del factor antiinflamatorio TGF $\beta$  y se redujo la expresión de los factores proinflamatorios IL1 $\beta$  y COX2 en el hipocampo.

### **Expectativas traslacionales del proyecto investigado en esta tesina de Licenciatura**

La medicina traslacional tiene la intención de aplicar el conocimiento biomédico básico a la práctica clínica y aportar nuevas opciones terapéuticas. Dentro de este contexto, lo aprendido a partir de modelos animales podría alentar el uso de intervenciones farmacológicas adicionales para la encefalopatía hipertensiva. Los estrógenos controlan eventos reproductivos y no reproductivos en el cerebro; y se han empleado con éxito para prevenir o atenuar las anomalías funcionales neuroquímicas y cerebrales, en modelos de diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento, neuroinflamación, derrame cerebral e isquemia. Otras aplicaciones de la neuroprotección debida a los estrógenos pueden incluir enfermedades psiquiátricas, trastornos del estado de ánimo, y el deterioro cognitivo leve.

A pesar de que la administración exógena de estradiol logra revertir muchas de las alteraciones hipocampales asociadas a la hipertensión, los efectos no deseados del tratamiento con 17- $\beta$  estradiol a nivel sistémico obligan a buscar nuevas opciones terapéuticas que los eviten.

## Objetivos generales y específicos

Teniendo en cuenta los efectos neuroprotectores del estradiol sobre la encefalopatía hipocampal asociada a la hipertensión, resulta imperativo desarrollar posible alternativas terapéuticas que logren proteger al encéfalo sin causar daño a nivel sistémico. La genisteína surge como una de estas posibles alternativas para revertir las alteraciones hipocampales y el deterioro cognitivo observado en la rata espontáneamente hipertensa (SHR).

### **Objetivo General**

Estudiar los efectos de la genisteína sobre la encefalopatía hipocampal asociada a la hipertensión esencial.

### **Objetivos Específicos**

- a. Caracterizar la encefalopatía hipocampal y la disfunción cognitiva en las ratas espontáneamente hipertensas.
- b. Estudiar el efecto de la genisteína sobre el deterioro cognitivo en las ratas SHR.
- c. Estudiar los efectos de la genisteína sobre las alteraciones hipocampales asociadas a la hipertensión en las ratas SHR tratadas.

## Hipótesis

Estudios previos han demostrado que la administración exógena de estradiol logra revertir las alteraciones hipocampales asociadas a la hipertensión pero al mismo tiempo presenta efectos no deseados a nivel sistémico tanto feminizantes como cancerígenos. Estos efectos no deseados están asociados al receptor  $ER\alpha$  mientras que los efectos neuroprotectores están asociados a los receptores  $ER\beta$  y el receptor de membrana GPER. La genisteína es un fitoestrógeno que se une al receptor  $ER\beta$  y a GPER y por esto se cree que tiene efectos neuroprotectores y se está evaluando actualmente como una posible terapia para distintas enfermedades neurodegenerativas. Nuestra hipótesis de trabajo plantea que la genisteína tendrá efectos neuroprotectores similares a los del estradiol sobre la encefalopatía hipertensiva sin producir los efectos no deseados a nivel sistémico asociados a este.

## Materiales y Métodos

### Modelo experimental

Se utilizaron ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR) y Wistar-Kyoto (WKY) normotensas de 5 meses de edad, criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME). Se utilizaron ratas macho porque las hembras SHR muestran niveles más bajos de la presión arterial (por debajo de 150 mm Hg) y además para evitar las variaciones de los niveles endógenos de estradiol que ocurre en el ciclo estral las hembras

Los animales se mantuvieron a temperatura constante (22°C) y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con libre acceso al alimento y al agua corriente filtrada. Para realizar los experimentos, se procedió según las normas establecidas por el National Institute of Health de EEUU para el cuidado y uso de animales de laboratorio; así mismo, estos fueron aprobados por el comité de ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental y el CICUAL de la Facultad de Medicina, UBA.

### Experimento

Para evaluar el efecto de GEN la inyectamos ratas SHR y controles WKY con una dosis de 10 mg/kg disuelta en 5% de DMSO en aceite vegetal por vía subcutánea todos los días durante 2 semanas. Se usó una dosis y un esquema de tratamiento que ha demostrado tener efectos neuroprotectores en varios otros sistemas (Azcoitia, 2006; Qian, 2012). Vale la pena aclarar que la GEN, en las dosis y tiempo estipulados, no posee efectos secundarios sistémicos adversos, ni posee efectos feminizantes en machos y además inhibe la progresión y previene el cáncer de próstata (Kang, 2016; Zhang, 2016).

Se utilizaron tres grupos experimentales: animales controles normotensos WKY, animales SHR y animales SHR tratados con GEN. Las ratas normotensas no recibieron tratamiento debido a que en trabajos previos (Pietranera, 2008), no se encontraron efectos del 17 $\beta$ -estradiol en el cerebro de ratas macho intactas WKY. Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron anestesiados con isoflurano y sacrificados; los cerebros fueron procesados según el parámetro a medir. Además se registró la tensión arterial y el peso de los testículos y la hipófisis para analizar posibles efectos secundarios del tratamiento.

## Medición de la presión arterial por un método indirecto

La tensión arterial fue medida por un método no invasivo en la cola (tail cuff), utilizando un equipo CODA Monitor de Kent Scientific Corporation. El método consiste en la colocación de un primer manguito cerca de la base de la cola que obstruye el flujo sanguíneo y de un segundo manguito ubicado en forma más distal que permite registrar los cambios en el volumen sanguíneo de la arteria de la cola, a través de un sensor que percibe los valores de cambios de presión sanguínea. Las mediciones fueron registradas siempre en el mismo momento del día para evitar variaciones por influencias del ritmo circadiano, en una sala aislada de ruidos y a una temperatura aproximada de 25-30 °C. Además los animales se colocaron en cepos apoyados sobre una plataforma térmica, alrededor de 10 a 15 minutos previos a la colocación del manguito y durante todo el proceso de medición, a fin de lograr mantener constante la temperatura de los animales. Fue necesario el registro de la tensión arterial bajo control térmico para obtener una dilatación óptima de la arteria caudal, lo cual permitió obtener una buena señal en el aparato empleado.

## Inmunohistoquímica para GFAP, DCX e IBA1

Para estudiar por inmunohistoquímica la expresión de las proteínas GFAP, DCX e IBA1, se utilizaron 3 grupos de ratas: WKY, SHR y SHR-GEN. Luego de ser anestesiadas, las ratas fueron perfundidas por vía transcardíaca con solución salina 0,9% seguida de paraformaldehído (PFA) al 3% en buffer fosfato, pH: 7,4. Los cerebros fueron incubados durante una noche en PFA 3%; después se transfirieron a una solución de Tris salina (TBS), pH: 7,4, y se realizaron cortes coronales de 50 µm utilizando un vibrátomo, procesándolos para inmunohistoquímica por el método de "free-floating". Las secciones se trataron durante 45 minutos con una solución de metanol (50%) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5%) en TBS para bloquear la actividad de peroxidasa endógena. Luego fueron incubadas con:

1. un anticuerpo policlonal anti DCX hecho en cabra (1:250, sc-8066, Santa Cruz), para marcar progenitores neurales
2. un anticuerpo policlonal anti GFAP hecho en conejo (1:1000, G-9269, Sigma), para teñir astrocitos quiescentes y reactivos
3. un anticuerpo policlonal anti IBA1 hecho en conejo (1:1000, Wako Cat # 019-19741)

Los anticuerpos fueron diluidos en Triton X-100 TBS 0,5%, suero de cabra o conejo 1% durante 24 hs a 4°C. Luego de incubar con el anticuerpo primario, las secciones se expusieron a un segundo anticuerpo anti conejo IgG biotinilado hecho en cabra o a un anticuerpo anti cabra IgG biotinilado hecho en conejo (1:200, Vector, Burlingame, CA, USA); y se procesaron de acuerdo a las instrucciones del kit Vectastain ABC (Vector, Burlingame, CA, USA). La reacción inmunohistoquímica se reveló mediante 3, 3'-

diaminobenzidina (DAB) preparada en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01%. La tinción no específica se evaluó con la omisión de los anticuerpos primarios. Para que sea consistente la inmunotinción, las secciones de diferentes grupos experimentales fueron teñidas simultáneamente.

Para contar las células DCX+, fueron analizadas una cada ocho secciones coronales a lo largo de toda la extensión retrocaudal del giro dentado (laminas 26-40 del atlas Paxinos and Watson (Watson, 1996)). La capa de células granulares interna tanto de las hojas superior e inferior del giro dentado fueron analizadas y el número de células DCX+ fueron estimadas de acuerdo a Howard and Reed (Reid, 1998) y a trabajos previos del laboratorio (Pietranera, 2010). El número de células contadas DCX+ se multiplicó por 8 para estimar el número total en el giro dentado. Así, cada animal individual (n = 6 por grupo) contribuye un único valor generado por la adición de todas las secciones recogidas del mismo animal. Para evaluar si las diferencias en el volumen del giro dentado podrían afectar el número total de células DCX+ estimadas, se midió el volumen del giro dentado usando el método de Cavalieri (Schmitz and Hof, 2005); aunque no se obtuvieron diferencias dentro de los grupos (ratas WKY:  $9.71 \pm 1.12 \text{ mm}^3$ ; SHR:  $9.05 \pm 0.33 \text{ mm}^3$ ; NS). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (E.S) de células DCX+ en el giro dentado.

Para el análisis del número de los astrocitos GFAP+ se utilizó el programa Optimas de análisis de imágenes computarizado (Optimas Bioscan, Edmonton, WA, USA). El número de astrocitos se contó manualmente después de la determinación del umbral de escala de grises y la sustracción del fondo (background), en seis secciones anatómicamente coincidentes en el stratum radiatum de la región CA1 y en el hilio del giro dentado. Las imágenes digitalizadas de las secciones de tejido se procesaron simultáneamente bajo idénticas condiciones lumínicas, de longitud de onda y umbral de escala de grises. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  E.S de células GFAP+marcadas/mm<sup>3</sup>.

Para el análisis del número total y de la morfología de la microglía IBA1 se utilizó el programa Optimas de análisis de imágenes computarizado (Optimas Bioscan, Edmonton, WA, USA). El número de células IBA1+ se contó a mano en un área previamente medida del stratum radiatum en la región CA1 del *Cornus Ammonis* y el hilio del giro dentado en cortes coronales seriados usando un método esterológico de (Schmitz and Hof, 2005). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  E.S de células IBA1+ marcadas/mm<sup>3</sup>. Las células IBA+ fueron sometidas a un análisis morfológico y fueron clasificadas en dos fenotipos: ramificadas y activadas. Las células ramificadas mostraron un soma pequeño y prolongaciones largas y finas. Las células activadas en cambio, mostraron un soma agrandado con prolongaciones más cortas y anchas. (Torres-Platas, 2014).

## Tests de comportamiento

Para evaluar la disfunción cognitiva en las ratas SHR y evaluar la posibilidad de que el tratamiento pueda revertirla se llevaron a cabo dos pruebas que evalúan la memoria dependiente de hipocampo en roedores: El test de objeto novedoso (NOR) y el test de laberinto en Y.

### **NOR**

Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural de los roedores a explorar nuevos objetos y compararlos con otros que les son familiares. Consiste en exponer a las ratas a un campo abierto en días consecutivos donde se introducen una serie de objetos que se espera que explore y recuerde.

La prueba se realizó en un campo abierto que se situó en una habitación homogéneamente iluminada y con objetos de similar textura, color y tamaño, pero de distinta forma. En una primera fase de habituación, se colocó al animal en el campo abierto sin ningún objeto y se dejó transcurrir un tiempo variable (10 minutos) para que se familiarice con el entorno. A las 24 horas se realizó el entrenamiento, para lo cual se colocaron dos objetos idénticos (objetos A) en distintas posiciones (posición 1 y posición 2) y se dejó al animal en el interior de la caja durante 8 minutos, en los que se contabilizó el tiempo de exploración (T). En la siguiente fase (24 horas después) se dejó un objeto A (objeto familiar) y se colocó en la otra posición un objeto nuevo (objeto B) y se midió el tiempo de exploración de cada objeto de la misma forma que el día anterior. En cada uno de los ensayos, se situó al animal en el centro del campo abierto y se grabó cada sesión con ayuda de una videocámara digital.

Se midió el tiempo de exploración, que se define como el período durante el cual el animal olisquea o toca el objeto con las patas delanteras a una distancia menor o igual a 1 cm. Se anotó el tiempo de exploración de los objetos familiar (TA) y nuevo (TB). Se obtuvo un índice de discriminación que indica el porcentaje de exploración del objeto nuevo sobre el tiempo total de exploración. El resultado esperado es que las ratas con alguna alteración en la función cognitiva exploren el mismo tiempo el objeto familiar y el nuevo ya que le parecerán igualmente novedosos y no habrá diferencia entre los tiempos de exploración (Gresack, 2007; Zhao, 2012).

### **Y-maze**

El test de laberinto en Y de alternancia espontánea es una prueba de comportamiento para evaluar la memoria de trabajo espacial y se basa en la tendencia de los roedores a explorar nuevos ambientes. Consiste en una plataforma con forma de letra Y rodeada por paredes lo suficientemente altas para que no pueda salir el animal. Cada brazo se identifica con una letra A, B y C, son exactamente iguales y cada uno forma con los otros un ángulo de 120°. El roedor es depositado en el centro de los brazos y se lo deja explorar libremente los tres brazos durante 10 minutos. (Sarnyai, 2000).

La rata explora en su totalidad el lugar desconocido, de tal forma que debería visitar los tres brazos del laberinto siguiendo un orden que le permita explorar todos ellos con una misma frecuencia. Si el ratón visita uno de los brazos, deberá memorizar su localización para poder explorar después a los otros dos que le quedan. Con el transcurso del tiempo los animales sin deterioro cognitivo deberían tener una tendencia a entrar menos al brazo recientemente visitado que los animales con deterioro.

Por lo tanto se registró durante 10 minutos el orden en el que las ratas entraron a cada brazo (A, B o C) para calcular las alternancias y el número total de entradas. Se consideró una entrada cuando las cuatro patas de la rata entren en el brazo. Una alternancia se considera cuando la rata entra a tres diferentes brazos consecutivamente. Se calculó el porcentaje de alternancia con la siguiente ecuación:  $\text{alternancias} * 100 / n - 2$  siendo n el total de entradas. Si una rata logra un porcentaje de alternancia mayor a 50% esto indica una memoria de trabajo funcional (Baratz, 2010; Sierksma, 2014; Wu, 2014).

## Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (E.S). Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba post-hoc de Newman-Keuls, para determinar las diferencias entre los grupos. El N para el análisis fue el número de animales. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism 5 GraphPad (San Diego, CA, EE.UU.), tomando como criterio un valor de  $p < 0,05$  para la significancia estadística.

## Resultados

En este estudio se analizaron los efectos de la genisteína (GEN), que es un agonista para los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER, sobre la encefalopatía hipertensiva de la rata espontáneamente hipertensa (SHR); utilizando como control normotenso a la rata Wistar-Kyoto (WKY).

### Efectos de GEN en la presión arterial y en el peso de los tejidos

En la tabla x se muestran los efectos de GEN sobre la presión arterial, el peso de los testículos y de la hipófisis.

La presión medida en los animales SHR fue superior a 190 mm Hg ( $p < 0,001$  vs ratas WKY), tal como observamos habitualmente en nuestra colonia. Se observó una reducción parcial de la presión arterial media en las ratas tratadas con GEN ( $p < 0,05$  vs ratas SHR sin tratar).

No se observaron diferencias significativas en el peso de los testículos entre las ratas SHR no tratadas y las ratas SHR tratadas con GEN y las WKY. Con respecto al peso de la hipófisis, tampoco se observó un efecto en el peso de la misma en los tres grupos estudiados.

GRUPO	PESO HIPÓFISIS (mg)	PESO TESTÍCULOS (g)	PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (mmHg)
WKY	9.444 +/- 0.71	1.32 +/- 0.03	111.4 +/- 4.63
SHR	11.98 +/- 0.61	1.54 +/- 0.03	192.2 +/- 4.31***
SHR+GEN	12.14 +/- 0.47	1.55 +/- 0.03	176.7 +/- 5.02*

Tabla 1: Efectos de GEN en el peso de distintos tejidos y la presión arterial media (PAM) de las ratas Wistar Kyoto (WKY) y las espontáneamente hipertensas (SHR). Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguido del post test Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$  vs SHR, \*\*\*  $p < 0,001$  vs WKY.

### Efectos de GEN sobre las células DCX+.

La doblecortina (DCX) es una proteína asociada a microtúbulos, expresada por las células precursoras neuronales y neuronas inmaduras en estructuras corticales embrionarias y adultas. Las células precursoras neuronales comienzan a expresar DCX, mientras que se dividen activamente, y sus células hijas siguen expresando DCX durante 2-3 semanas a medida que las células maduran hasta convertirse en neuronas (Kempermann, 2015).

A continuación medimos el número de células DCX+ en la capa de células granulares interna tanto de las hojas superior e inferior del giro dentado del hipocampo (Fig. 7).

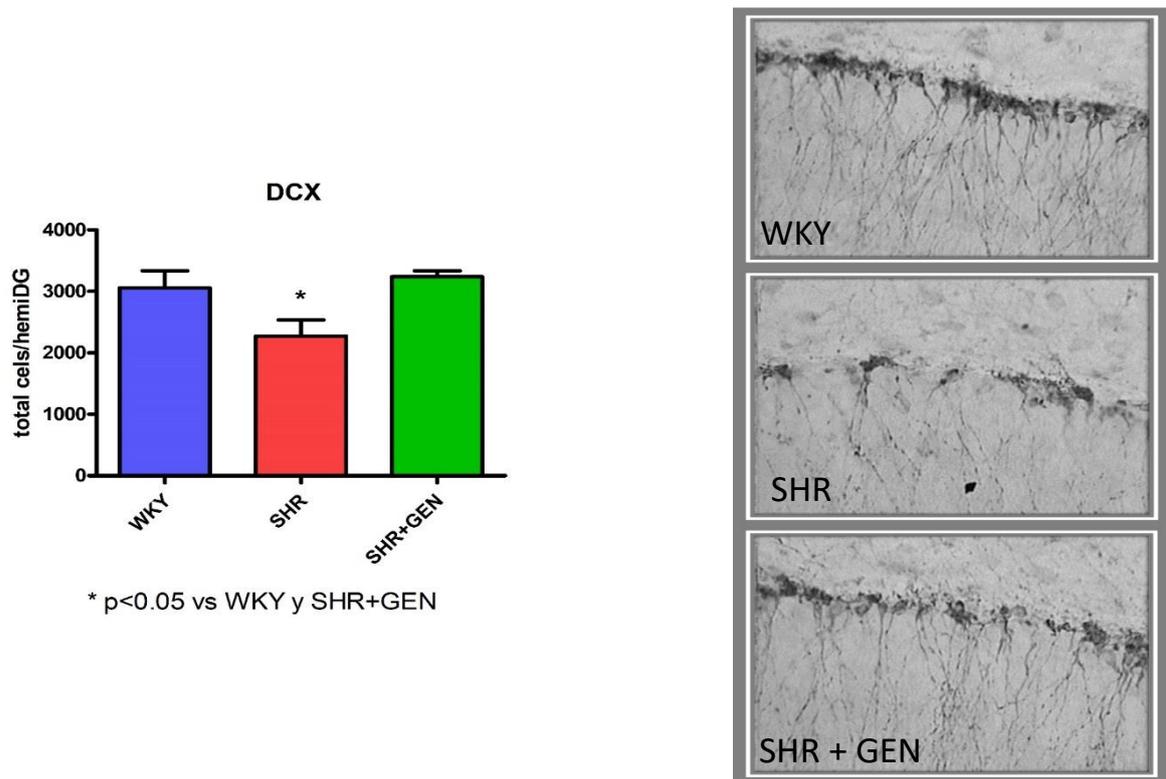
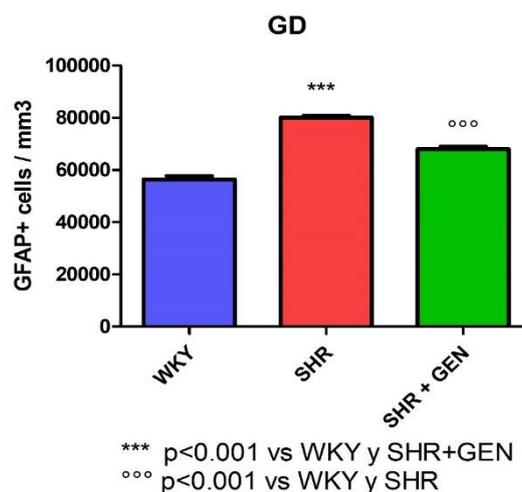


Figura 7: Efecto de GEN en el número de células DCX+ en la capa de células granulares interna del giro dentado. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguido del post test Newman-Keuls. \* p<0,05. Las microfotografías ilustran el menor número de células DCX+ en SHR, comparadas con WKY y SHR tratadas con GEN. Magnificación: 400x.

### Efectos de GEN sobre la inmunoreactividad GFAP+ en el hipocampo.

Una de las características de las ratas SHR es la presencia de astrogliosis con una fuerte expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que se atenúa después del tratamiento con  $17\beta$ -estradiol (Pietranera, 2011). Para determinar la posibilidad de que este efecto se vea también con GEN, se determinó el número de astrocitos GFAP+/mm<sup>3</sup> en el *stratum radiatum* debajo de la región CA1 del *Cornus Ammonis* y en el hilio del giro dentado del hipocampo. Las figuras 8 y 9 muestran la presencia de una astrogliosis pronunciada en las dos áreas examinadas en las ratas SHR no tratadas con respecto a los otros grupos examinados aunque en distintos grados.

En el giro dentado, el tratamiento con GEN produjo un efecto negativo sobre la astrogliosis, llevando el número de astrocitos GFAP+/mm<sup>3</sup> a niveles inferiores en las ratas tratadas ( $p < 0,001$  vs ratas SHR) aunque el número de astrocitos GFAP+/mm<sup>3</sup> se mantuvo superior al de las ratas WKY ( $p < 0,001$  vs ratas WKY). El efecto inhibitorio de GEN fue significativo tanto en la región CA1 como en el giro dentado ( $p < 0,01$  o menos vs ratas SHR). En resumen, GEN disminuye la astrogliosis GFAP+ en el giro dentado de manera significativa pero no logra revertir la situación de manera total ya que no llega a los niveles de los controles normotensos WKY.



WKY



SHR

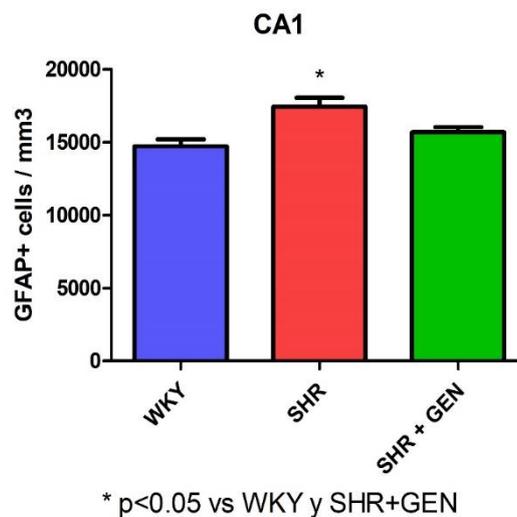


SHR + GEN

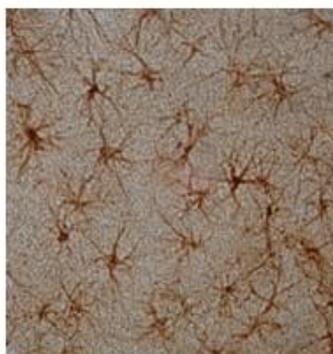
Figura 8: Efectos de GEN en el número de astrocitos GFAP+ en el giro dentado del hipocampo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguido del post test Newman-Keuls. \*\*\*  $p < 0,001$ , °°°  $p < 0.001$ . Las

microfotografías ilustran la densidad normal de astrocitos en el giro dentado de WKY, astrogliosis en SHR y la disminución de la astrogliosis en las SHR tratadas con GEN. Magnificación: 400x

En la región CA1 del *Cornus Ammonis* se observó una astrogliosis pronunciada en las ratas SHR no tratadas ( $p < 0,05$  vs WKY y ratas SHR tratadas con GEN). El tratamiento con GEN produjo una baja en la astrogliosis de las ratas SHR tratadas llevando el número de astrocitos GFAP+/mm<sup>3</sup> al nivel de las ratas WKY.



WKY



SHR



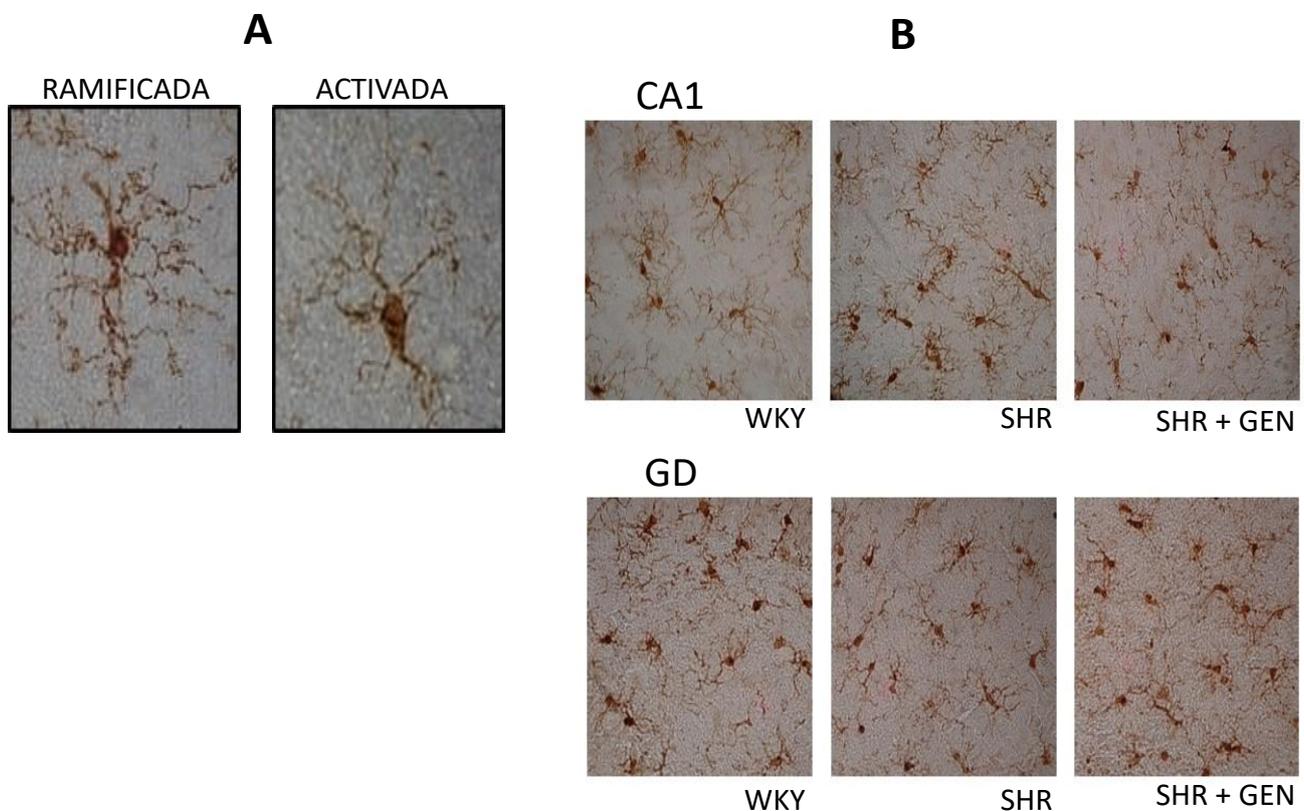
SHR + GEN

Figura 9: Efecto de GEN en el número de astrocitos GFAP+ en la región CA1 del hipocampo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguido del post test Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$ . Las microfotografías ilustran la densidad normal de astrocitos en la región CA1 de WKY, astrogliosis en SHR y la disminución de la astrogliosis en las SHR tratadas con GEN. Magnificación: 400x.

### Efectos de GEN sobre la inmunoreactividad IBA1+ en el hipocampo

Para analizar la morfología y la cantidad de microglías presentes en la región CA1 del Cornus Ammonis y en el giro dentado del hipocampo se realizó una inmunohistoquímica IBA1+. IBA1 se conoce como la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 y se expresa exclusivamente en microglía y macrófagos, por lo que se utiliza habitualmente como marcador de microglía (Chan 2017). La morfología ramificada con soma pequeño es característica de las microglías de vigilancia o reposo mientras que las microglías de soma grande y prolongaciones cortas son características de las microglías de morfología activada (Streit, 2000). En la figura 10A se puede observar imágenes de los dos tipos de morfología analizadas, la ramificada y la activada.

No se observó una diferencia significativa entre los tres grupos estudiados en cuanto al número total de microglías en la región CA1 del Cornus Ammonis ni en el giro dentado del hipocampo. Sin embargo, se observó una gran diferencia en la distribución de los fenotipos en ambas regiones hipocampales. La morfología activada fue muy prevalente en las ratas SHR en comparación con los controles WKY ( $p < 0,001$  vs WKY) en ambas regiones mientras que la morfología ramificada fue prevalente en las ratas WKY ( $p < 0,001$  vs SHR). El tratamiento con GEN logró revertir esta situación a niveles similares a los de los controles normotensos como puede evidenciarse en la Figura 10B, 10C y 10D.



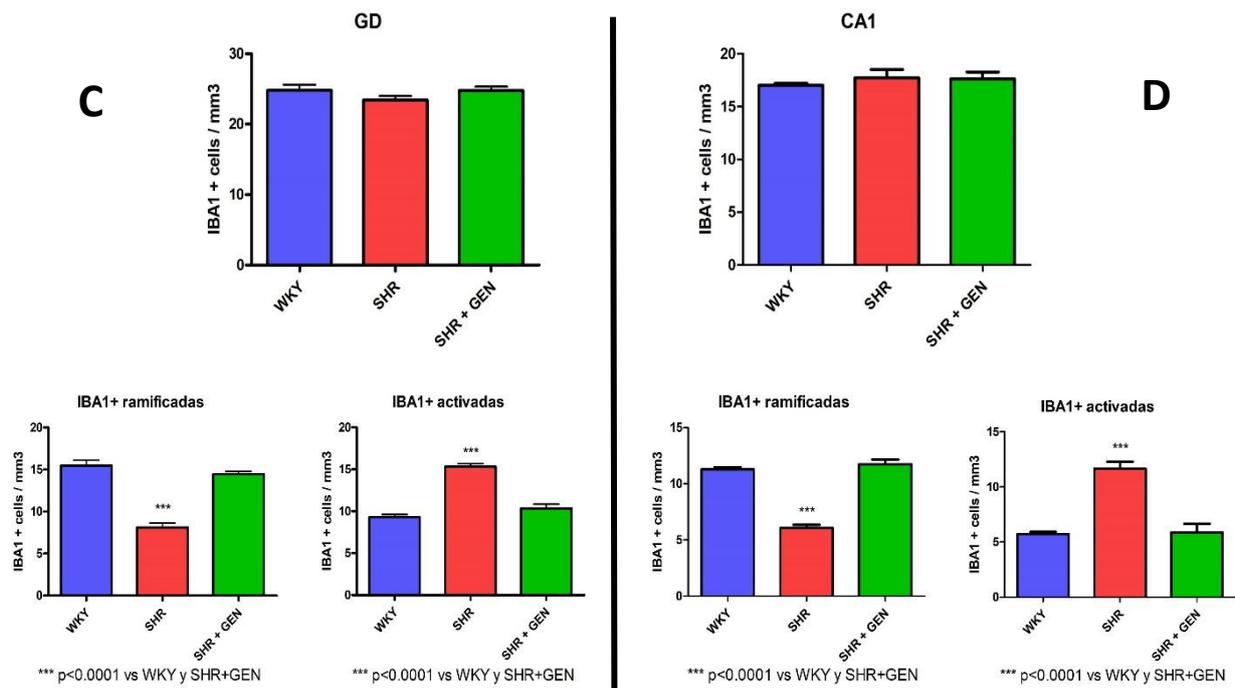


Figura 10: Efecto de GEN sobre la inmunoreactividad y la morfología de células IBA1+ en la región CA1 del Cornu Ammonis y el giro dentado del hipocampo. A: Morfología de los dos fenotipos morfológicos determinados. B: Microfotografía ilustrando los distintos tipos de microglía y la densidad de estas en la región CA1 del Cornu Ammonis y el giro dentado del hipocampo. C y D: Cuantificación estereológica de la cantidad y distribución fenotípica de las microglías presentes en la región CA1 del Cornu Ammonis y el giro dentado del hipocampo. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguido del post test Newman-Keuls. \*\*\*p<0,001. Magnificación 400x

### Novel Object Recognition Test (NOR)

El novel object recognition test o NOR evalúa la capacidad de la rata de reconocer un objeto nuevo en un ambiente controlado. Al no usar refuerzos positivos ni negativos, el test se sustenta en la curiosidad natural de los roedores y su interés por los objetos nuevos (Antunes, 2012). La prueba se desarrolló en tres etapas: la fase de habituación, la fase de familiarización o entrenamiento y finalmente la fase de testeo.

La fase de habituación consiste en familiarizar al animal con el campo donde se realiza el test para descartar distracciones relacionadas a este en las siguientes fases. Pasadas las 24 horas, se vuelve a someter al animal al mismo campo que en lugar de estar vacío contiene ahora dos objetos iguales. En esta etapa de entrenamiento se expone al animal a dos objetos iguales (uno de estos será el objeto viejo en la última etapa) y se mide el tiempo de exploración de cada uno para verificar que los objetos fueron explorados. Finalmente, se procede al día siguiente a la fase de testeo donde se mide el tiempo de exploración de ambos objetos y se calcula el índice de discriminación que se calcula dividiendo el tiempo de exploración del objeto novedoso por el tiempo de exploración total.

En la Figura 11 se puede observar el tiempo de exploración de los distintos grupos analizados evidenciado por los índices de discriminación de cada uno. Se observó que las ratas SHR tuvieron un índice de discriminación menor al de las ratas WKY ( $p < 0,05$ ) y cercano a 0,5, lo cual indicaría que exploraron ambos objetos por igual ya que no recordaban el objeto al que ya habían sido expuestas en la fase de entrenamiento. El tratamiento con GEN logró revertir esta situación por lo cual parecería ser efectivo a la hora de tratar este tipo de deterioro cognitivo.

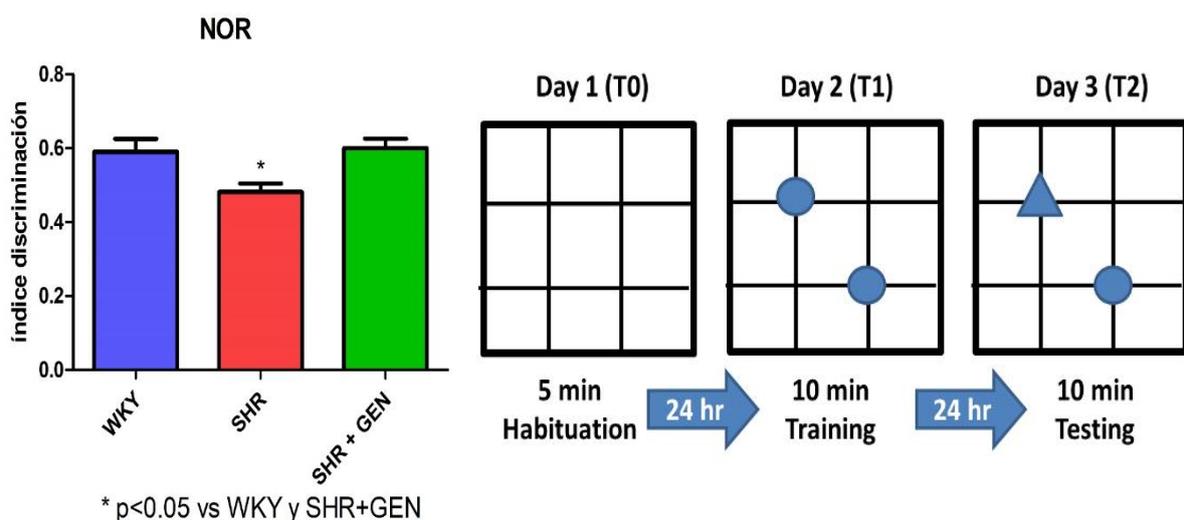


Figura 11: Efecto de GEN en los tiempos del objeto novedoso en los distintos grupos analizados. Gráfica del desarrollo del novel object recognition test (NOR) (Lueptow, 2017).

## Y-MAZE

El test de laberinto en Y de alternancia espontánea es una prueba de comportamiento que evalúa la memoria espacial en roedores. El test evalúa la memoria de trabajo espacial y se basa en la tendencia de los roedores a explorar nuevos ambientes. Consiste en colocar a la rata en el centro de un laberinto de tres brazos iguales equidistantes entre sí ( $120^\circ$  entre cada brazo) y se deja al animal explorar el laberinto libremente. Se toma nota de la secuencia de exploración de la rata y se tiene en cuenta la cantidad de alternancias de estas exploraciones. Se supone que la rata va a explorar el brazo que no visita hace más tiempo y una falta de alternancia en la exploración está relacionada a un mal desempeño cognitivo.

No se observaron diferencias significativas en el desempeño de los tres grupos estudiados en esta prueba. Sin embargo, se pudo observar una leve tendencia hacia un mejor rendimiento en las ratas WKY en comparación con las ratas SHR y una leve mejora en el rendimiento de las ratas SHR tratadas con GEN. Creemos que esta tendencia, utilizando un n mayor y resolviendo algunas distracciones ambientales, podría resolverse sin problemas.

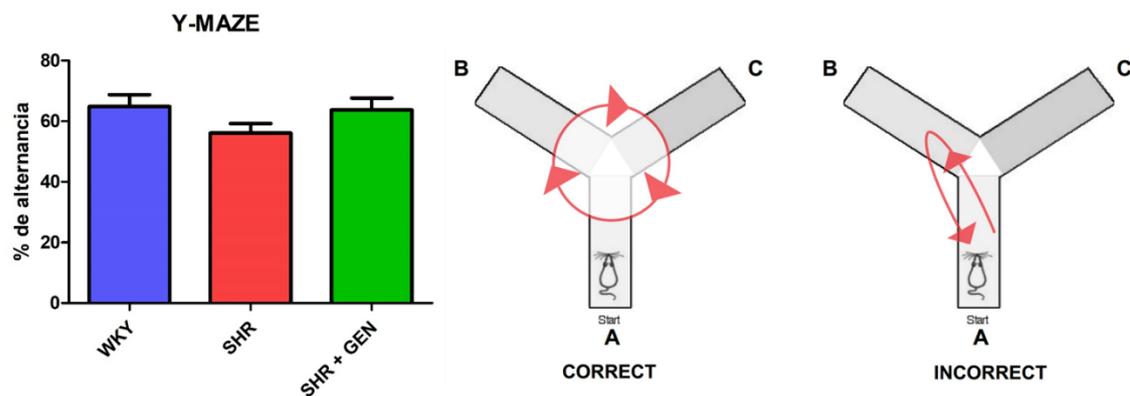


Figura 12: Efecto de GEN en la cantidad de alternancias en la prueba del laberinto en Y en los distintos grupos analizados. Gráfica del desarrollo del test de laberinto en Y (Momeni, 2015).

## Discusión

En este trabajo, se evaluó la posibilidad de que el fitoestrógeno genisteína posea efectos neuroprotectores similares a los del estradiol en el hipocampo de ratas hipertensas. Como ya se mencionó en la introducción, estudios previos han demostrado que ciertas alteraciones hipocampales asociadas a la hipertensión esencial están bien descritas en las ratas SHR, un modelo experimental habitualmente empleado en los estudios de hipertensión (Pietranera, 2006). Esta neuropatología está caracterizada por ciertas alteraciones hipocampales como la disminución de la neurogénesis y el aumento de la reactividad de astrocitos y microglía en todo el hipocampo. El tratamiento con  $17\beta$ -estradiol normaliza estos parámetros alterados pero al mismo tiempo tiene efectos no deseados tanto feminizantes como cancerígenos.

La genisteína es un fitoestrógeno encontrado en la soja que posee una similitud estructural con el  $17\beta$ -estradiol, lo que posibilita su unión a los receptores de estrógenos y el desencadenamiento de efectos estrogénicos y antiestrogénicos (Kuiper, 1998). A pesar de que pueden unirse tanto a  $ER\alpha$  como a  $ER\beta$ , tiene una mayor afinidad por  $ER\beta$  (Kuiper, 1997) y también se une al GPER (Thomas and Dong, 2006). La genisteína tiene efectos neuroprotectores (Azcoitia, 2006; Qian, 2012; Li, 2020; Petry, 2021; Menze, 2015), anti-inflamatorios y beneficiosos para el comportamiento. Es por esto que creemos que podría tener efectos neuroprotectores en la encefalopatía hipertensiva sin producir los efectos no deseados que produce la administración exógena de estradiol.

Nuestros resultados demostraron que la genisteína no tuvo efectos feminizantes sobre las ratas tratadas ya que no modificó el peso de la pituitaria ni el peso de los testículos de las ratas tratadas con genisteína. Además, pudimos observar un efecto hipotensor parcial de la genisteína ya que logró disminuir parcialmente la presión arterial media de las ratas SHR tratadas. Estos efectos pueden explicarse por la mayor afinidad de la genisteína por el receptor clásico  $ER\beta$ , el cual está asociado a los efectos neuroprotectores del  $17\beta$ -estradiol. La reducción de la presión arterial se puede deber a la presencia de  $ER\beta$  en las células del endotelio.

Asumimos que estos cambios se produjeron después de la unión de genisteína a los receptores mencionados anteriormente. Además de los receptores clásicos, la genisteína se une al receptor de membrana acoplado a proteína G (GPER), el cual es altamente expresado en el corazón de las ratas SHR, en el que produce efectos hipotensores y cardiotrópicos (De Francesco, 2013).

Entre los parámetros hipocampales alterados de las ratas SHR se encuentra la reducción de la neurogénesis. Esto es relevante ya que las ratas SHR sufren deterioro cognitivo y son consideradas como un modelo de envejecimiento del cerebro (Paglieri, 2008). En condiciones normales los estrógenos son factores estimulantes de la neurogénesis hipocampal (Lee and Son, 2009) y ambos receptores clásicos se localizan en los progenitores neuronales en el

hipocampo (Isgor and Watson, 2005). También se ha descrito la participación de ER $\beta$  en muchos de los efectos del 17 $\beta$ -estradiol en el cerebro adulto, incluyendo la estimulación de la neurogénesis (Handa, 2012). En nuestro laboratorio demostramos que ambos receptores clásicos ER $\alpha$  y ER $\beta$  están involucrados en los mecanismos protectores del estradiol utilizando agonistas específicos administrados de manera sistémica (Pietranera, 2016). Demostramos que el ER $\beta$  está involucrado en el aumento de la neurogénesis y en la disminución de la astrogliosis (Pietranera, 2016). Recientemente demostramos que el receptor de membrana GPER también está involucrado en las acciones neuroprotectoras del estradiol en la SHR logrando revertir la reducción de la neurogenesis (Correa, 2020)

La astrogliosis es sinónimo de lesión cerebral y el aumento de la expresión de GFAP en astrocitos es un hallazgo típico de la encefalopatía hipertensiva en el cerebro de las ratas SHR (Tomassoni, 2004). En este trabajo se observó un aumento de la densidad de astrocitos GFAP+ tanto en la region CA1 del *Cornus Ammonis* como en el giro dentado del hipocampo de las ratas SHR. Morfológicamente, los astrocitos GFAP+ de estas regiones mostraron un aumento de tamaño del cuerpo celular y procesos celulares más gruesos en las ratas SHR en comparación con las células de menor tamaño y prolongaciones más finas observados en las ratas WKY. El perfil de astrocitos más reactivos indica una respuesta de estas células gliales a sufrimiento neuronal, evidenciado por el menor número de células DCX+ en el giro dentado y la pérdida de neuronas piramidales como resultado de la apoptosis o necrosis en las SHR (Brocca, 2013). El tratamiento con genisteina redujo la cantidad de astrocitos GFAP+ en todo el hipocampo, siendo esta reversión total en la región CA1 pero solamente parcial en el giro dentado. Esta inhibición puede estar relacionada al mecanismo neuroprotector de los estrógenos, mediado por la unión del complejo ER a un elemento respondedor a estrógenos en el gen de la GFAP (Rozovsky, 2002). De esta forma, los estrógenos podrían evitar la liberación de mediadores pro inflamatorios y citoquinas que dañan las neuronas y atraen a los macrófagos y microglía (Sofroniew, 2009). Sin embargo, el tratamiento con G1, agonista del GPER también atenúa la astrogliosis en el hipocampo de SHR (Correa, 2020). Nuestros resultados sugieren que, en el cerebro de SHR, la unión de genisteina tanto a receptores clásicos como de membrana puede inhibir la astrogliosis GFAP+.

En cuanto a la microglía, se pudo observar un cambio claro en la distribución de fenotipos tanto en la región CA1 como en el giro dentado de las ratas SHR. La reactividad microglial se puede discernir estudiando la distribución del fenotipo morfológico de las microglías presentes en las distintas regiones del hipocampo (Correa, 2020). En este contexto, la morfología ramificada con soma pequeño es característica de las microglías de vigilancia o reposo mientras que las microglías de soma grande y prolongaciones cortas y anchas son características de las microglías de morfología activada (Streit, 2000; Ekdahl, 2012; Torres-Platas, 2014). En nuestro trabajo, la morfología activada fue muy prevalente en las ratas SHR mientras que el fenotipo ramificado fue prevalente en los controles normotensos WKY. Estos resultados muestran un

cambio de fenotipo microglial en las ratas hipertensas que se revierte claramente con el tratamiento de genisteína tanto en CA1 como en el giro dentado del hipocampo.

Las microglías tienen un rol protagónico en los procesos inflamatorios. Durante la activación las microglías pueden adquirir dos fenotipos: uno proinflamatorio en el que se liberan factores y citoquinas proinflamatorios que son perjudiciales para las neuronas y los procesos neurogénicos y otro fenotipo antiinflamatorio en el que se liberan factores reparadores y citoquinas antiinflamatorias (Vallieres, 2002; Kuzumaki, 2010; Mathieu, 2010; Kiyota, 2012). Estudios previos de nuestro laboratorio (Correa, 2020) han demostrado que la activación del receptor de estrógenos GPER disminuye el ambiente inflamatorio característico del hipocampo de ratas SHR al revertir los fenotipos microgliales, reducir la liberación de factores proinflamatorios y aumentar la liberación de factores antiinflamatorios como TGF $\beta$ . Nuestros resultados apoyan la idea que la genisteína produce este mismo cambio en el fenotipo inflamatorio de las microglías al unirse al receptor GPER pero para poder confirmarlo es necesario analizar los niveles de factores pro y anti inflamatorios presentes en el hipocampo de las ratas estudiadas. Estos estudios todavía se encuentran en desarrollo por las demoras producidas por el contexto de pandemia que nos obligó a posponer casi todos los experimentos diagramados durante el 2020, pero es probable que los llevemos a cabo en el año 2021.

El deterioro cognitivo y el envejecimiento cerebral temprano son características descritas de la encefalopatía hipertensiva en ratas SHR (Paglieri, 2008). La hipertensión en si es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de la demencia, al igual que otras enfermedades neurodegenerativas (Korf, 2004). La relación entre la hipertensión y el deterioro cognitivo ha cobrado especial importancia en los últimos años a causa del aumento general y sostenido del promedio de vida de la población mundial. Este aumento se ve acompañado de la necesidad de buscar factores predictores del deterioro cognitivo para poder intervenir de manera temprana y retrasar la aparición del mismo. En este contexto, resulta imperioso el desarrollo de terapias nuevas que no solo procuren mantener controlada la presión arterial sino que también procuren revertir la encefalopatía hipertensiva para evitar el deterioro cognitivo asociado a ella.

El hipocampo es importante en la formación de la memoria de reconocimiento de objetos tanto en humanos como en animales (Lyon, 2012; Zhang, 2012; Barker, 2011) y es especialmente vulnerable a los efectos de la hipertensión. Para analizar el rendimiento cognitivo de las ratas SHR y las ratas WKY se llevaron a cabo dos experimentos que evalúan la memoria dependiente de hipocampo en roedores: el test de laberinto en "Y" (y-maze) y el test de reconocimiento de objeto novedoso (NOR).

El NOR tiene dos grandes ventajas: en primer lugar es un test relativamente simple y ameno para los animales ya que no requiere de un entrenamiento complejo ni estímulos negativos que puedan aumentar el estrés al que se somete a los animales (que a su vez tiene un impacto negativo sobre los procesos de aprendizaje y memoria (Park, 2001; Duncko, 2009)) y además es un test que no requiere de demasiado tiempo, lo que permite testear a varios animales al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones ambientales. El test de laberinto en Y al igual que

el NOR no requiere entrenamiento previo, ni refuerzos o castigos. Se considera que esta tarea tiene un componente de memoria de trabajo ya que los animales tienen que mantener en línea que brazos visitaron previamente para explorar aquellos brazos que aún no hayan explorado (Conrad, 2010).

Nuestros resultados muestran que el tratamiento de ratas SHR con genisteína pudo no solo revertir la disminución de la neurogénesis y el aumento de la reactividad astrocitaria y microglial sino que también tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento cognitivo de las ratas tratadas. En cuanto al NOR, se observó una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre las ratas SHR y las ratas WKY que fue revertida por el tratamiento con genisteína. En cuanto al laberinto en "Y", se pudo observar una tendencia hacia la mejora del rendimiento en esta prueba de las ratas WKY y las ratas SHR tratadas con genisteína en comparación con los controles hipertensos SHR pero esta diferencia no llegó a ser significativa. Creemos que este test se vio comprometido en algún punto por la excitabilidad y sensibilidad de las ratas SHR, lo cual dificulta su entrenamiento y afecta claramente el rendimiento de las ratas en esta prueba. Es necesario repetir estos experimentos para poder trabajar con un número de individuos mayor y poder despejar estas dudas.

## Conclusión

En conjunto nuestros resultados muestran que el tratamiento con genisteína fue capaz de ejercer efectos neuroprotectores en el hipocampo de los animales SHR similares a los producidos por el 17- $\beta$  estradiol: aumentó la neurogénesis en el GD, atenuó la astrogliosis y revirtió el fenotipo microglial hacia un perfil más similar a los animales normotensos. Además, tuvo efectos beneficiosos sobre el déficit cognitivo presente en los animales hipertensos mejorando parámetros de memoria dependiente de hipocampo en el test de reconocimiento de objeto novedoso a niveles similares a los de los animales normotensos. Estos efectos beneficiosos además se dieron en un contexto en el cual no se observaron efectos adversos como consecuencia del tratamiento, lo que podría conducir hacia alguna alternativa terapéutica nueva y es por eso que los efectos de la genisteína se deben continuar estudiando en detalle ya que podría resultar beneficiosa también en el tratamiento de otras enfermedades.

En conclusión, el estudio de estos mecanismos relacionados con la hipertensión en un modelo animal podría en un futuro permitir extrapolar estos resultados a la clínica humana y proponer un tratamiento coadyuvante para esta enfermedad que se enfoque en el tratamiento de la neuropatología de la hipertensión arterial.

## Bibliografía

- Abbott, N. J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*, 200(6), 629-638.
- Aimone, J. B., Wiles, J., & Gage, F. H. (2009). Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron*, 61(2), 187-202.
- Akers, K. G., Martinez-Canabal, A., Restivo, L., Yiu, A. P., De Cristofaro, A., Hsiang, H. L., Wheeler, A. L., Guskjolen, A., Niibori, Y., Shoji, H., Ohira, K., Richards, B. A., Miyakawa, T., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2014). Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science*, 344(6184), 598-602.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., & Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 262(12), 5592-5595.
- Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G., & Corasaniti, M. T. (2005). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res*, 52(2), 119-132.
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, 13(2), 93-110.
- Arevalo, M. A., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci*, 16(1), 17-29.
- Astur, R. S., St Germain, S. A., Baker, E. K., Calhoun, V., Pearlson, G. D., & Constable, R. T. (2005). fMRI hippocampal activity during a virtual radial arm maze. *Appl Psychophysiol Biofeedback*, 30(3), 307-317.
- Azcoitia, I., Barreto, G. E., & Garcia-Segura, L. M. (2019). Molecular mechanisms and cellular events involved in the neuroprotective actions of estradiol. Analysis of sex differences. *Front Neuroendocrinol*, 55, 100787.
- Azcoitia, I., Moreno, A., Carrero, P., Palacios, S., & Garcia-Segura, L. M. (2006). Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in the rat brain. *Gynecol Endocrinol*, 22(2), 63-69.
- Azcoitia, I., Sierra, A., & Garcia-Segura, L. M. (1999). Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *J Neurosci Res*, 58(6), 815-822.
- Baddeley, A. (1992). Working memory. *Science*, 255(5044), 556-559.
- Baker, V. L., Leitman, D., & Jaffe, R. B. (2000). Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. *Obstet Gynecol Surv*, 55(7 Suppl 2), S21-47.
- Baratz, R., Rubovitch, V., Frenk, H., & Pick, C. G. (2010). The influence of alcohol on behavioral recovery after mTBI in mice. *J Neurotrauma*, 27(3), 555-563.
- Barker, G. R., & Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *J Neurosci*, 31(29), 10721-10731.
- Barnes, S. (1995). Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*, 125(3 Suppl), 777S-783S.
- Battersby, C., Hartley, K., Fletcher, A. E., Markowe, H. J., Brown, R. G., Styles, W., Carne, S., Jamieson, T., Koppel, I., & Fraser, S. (1993). Cognitive function in hypertension: a community based study. *J Hum Hypertens*, 7(2), 117-123.
- Beck, V., Rohr, U., & Jungbauer, A. (2005). Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 94(5), 499-518.
- Belo, N. O., Silva-Barra, J., Carnio, E. C., Antunes-Rodrigues, J., Gutkowska, J., & Dos Reis, A. M. (2004). Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept*, 117(1), 53-60.
- Bhat, K. M. (2017). Post-guidance signaling by extracellular matrix-associated Slit/Slit-N maintains fasciculation and position of axon tracts in the nerve cord. *PLoS Genet*, 13(11), e1007094.
- Bhathena, S. J., & Velasquez, M. T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr*, 76(6), 1191-1201.
- Brailoiu, E., Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Mizuo, K., Sklar, L. A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., & Dun, N. J. (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol*, 193(2), 311-321.
- Briz, V., Liu, Y., Zhu, G., Bi, X., & Baudry, M. (2015). A novel form of synaptic plasticity in field CA3 of hippocampus requires GPER1 activation and BDNF release. *J Cell Biol*, 210(7), 1225-1237.
- Brocca, M. E., Pietranera, L., Beauquis, J., & De Nicola, A. F. (2013). Estradiol increases dendritic length and spine density in CA1 neurons of the hippocampus of spontaneously hypertensive rats: a Golgi impregnation study. *Exp Neurol*, 247, 158-164.
- Brocca, M. E., Pietranera, L., de Kloet, E. R., & De Nicola, A. F. (2019). Mineralocorticoid Receptors, Neuroinflammation and Hypertensive Encephalopathy. *Cell Mol Neurobiol*, 39(4), 483-492.
- Burgess, N. (2002). The hippocampus, space, and viewpoints in episodic memory. *Q J Exp Psychol A*, 55(4), 1057-1080.
- Cacciatore, F., Abete, P., Ferrara, N., Paolisso, G., Amato, L., Canonico, S., Maggi, S., Varricchio, M., & Rengo, F. (1997). The role of blood pressure in cognitive impairment in an elderly population. *Osservatorio Geriatrico Campano Group. J Hypertens*, 15(2), 135-142.
- Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R.,

- Varricchio, L., Barone, M. V., & Auricchio, F. (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J*, 20(21), 6050-6059.
- Chan, C. K., Tan, L. T., Andy, S. N., Kamarudin, M. N. A., Goh, B. H., & Kadir, H. A. (2017). Anti-neuroinflammatory Activity of. *Front Pharmacol*, 8, 397.
- Chikanza, I. C., Petrou, P., & Chrousos, G. (2000). Perturbations of arginine vasopressin secretion during inflammatory stress. Pathophysiologic implications. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 825-834.
- Churchwell, J. C., Morris, A. M., Musso, N. D., & Kesner, R. P. (2010). Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. *Neurobiol Learn Mem*, 93(3), 415-421.
- Conejo, N. M., González-Pardo, H., López, M., Cantora, R., & Arias, J. L. (2007). Induction of c-Fos expression in the mammillary bodies, anterior thalamus and dorsal hippocampus after fear conditioning. *Brain Res Bull*, 74(1-3), 172-177.
- Conrad, C. D. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(5), 742-755.
- Correa, J., Ronchetti, S., Labombarda, F., De Nicola, A. F., & Pietranera, L. (2020). Activation of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Increases Neurogenesis and Ameliorates Neuroinflammation in the Hippocampus of Male Spontaneously Hypertensive Rats. *Cell Mol Neurobiol*, 40(5), 711-723.
- Daniel, J. M., Roberts, S. L., & Dohanich, G. P. (1999). Effects of ovarian hormones and environment on radial maze and water maze performance of female rats. *Physiol Behav*, 66(1), 11-20.
- De Francesco, E. M., Angelone, T., Pasqua, T., Pupo, M., Cerra, M. C., & Maggiolini, M. (2013). GPER mediates cardioprotective effects in spontaneously hypertensive rat hearts. *PLoS One*, 8(8), e69322.
- Dhandapani, K. M., & Brann, D. W. (2007). Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol*, 42(1-2), 70-75.
- Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G., & Chrissobolis, S. (2016). Cell-specific mineralocorticoid receptors: future therapeutic targets for stroke? *Neural Regen Res*, 11(8), 1230-1231.
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*, 139 Suppl 2, 136-153.
- Doggell, S. A., & Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*, 39(1), 89-105.
- Duchemin, S., Belanger, E., Wu, R., Ferland, G., & Girouard, H. (2013). Chronic perfusion of angiotensin II causes cognitive dysfunctions and anxiety in mice. *Physiol Behav*, 109, 63-68.
- Duncko, R., Johnson, L., Merikangas, K., & Grillon, C. (2009). Working memory performance after acute exposure to the cold pressor stress in healthy volunteers. *Neurobiol Learn Mem*, 91(4), 377-381.
- Dutertre, M., & Smith, C. L. (2000). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *J Pharmacol Exp Ther*, 295(2), 431-437.
- Eddleston, M., de la Torre, J. C., Oldstone, M. B., Loskutoff, D. J., Edgington, T. S., & Mackman, N. (1993). Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis. *J Clin Invest*, 92(1), 349-358.
- Ekdahl, C. T. (2012). Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol*, 3, 41.
- Fader, A. J., Hendricson, A. W., & Dohanich, G. P. (1998). Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnesic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiol Learn Mem*, 69(3), 225-240.
- Fernandez, A. M., & Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci*, 13(4), 225-239.
- Fernández-Arjona, M. D. M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci*, 11, 235.
- Fester, L., Ribeiro-Gouveia, V., Prange-Kiel, J., von Schassen, C., Böttner, M., Jarry, H., & Rune, G. M. (2006). Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem*, 97(4), 1136-1144.
- Fisher, J. P., & Paton, J. F. (2012). The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *J Hum Hypertens*, 26(8), 463-475.
- Folkow, B., Hallbäck-Nordlander, M., Martner, J., & Nordborg, C. (1982). Influence of amygdala lesions on cardiovascular responses to alerting stimuli, on behaviour and on blood pressure development in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*, 116(2), 133-139.
- Foulquier, S., Namsolleck, P., Van Hagen, B. T., Milanova, I., Post, M. J., Blankesteyn, W. M., Rutten, B. P., Prickaerts, J., Van Oostenbrugge, R. J., & Unger, T. (2018). Hypertension-induced cognitive impairment: insights from prolonged angiotensin II infusion in mice. *Hypertens Res*, 41(10), 817-827.
- García-Ovejero, D., Veiga, S., García-Segura, L. M., & DonCarlos, L. L. (2002). Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol*, 450(3), 256-271.
- Gillies, G. E., Virdee, K., McArthur, S., & Dalley, J. W. (2014). Sex-dependent diversity in ventral tegmental dopaminergic neurons and developmental programming: A molecular, cellular and behavioral analysis. *Neuroscience*, 282, 69-85.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., & Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320(6058), 134-139.
- Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., & Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231(4742), 1150-1154.

- Gresack, J. E., Kerr, K. M., & Frick, K. M. (2007). Life-long environmental enrichment differentially affects the mnemonic response to estrogen in young, middle-aged, and aged female mice. *Neurobiol Learn Mem*, 88(4), 393-408.
- Hajjar, I., Catoe, H., Sixta, S., Boland, R., Johnson, D., Hirth, V., Wieland, D., & Eleazer, P. (2005). Cross-sectional and longitudinal association between antihypertensive medications and cognitive impairment in an elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 60(1), 67-73.
- Hammond, R., Mauk, R., Ninaci, D., Nelson, D., & Gibbs, R. B. (2009). Chronic treatment with estrogen receptor agonists restores acquisition of a spatial learning task in young ovariectomized rats. *Horm Behav*, 56(3), 309-314.
- Handa, R. J., Ogawa, S., Wang, J. M., & Herbison, A. E. (2012). Roles for oestrogen receptor  $\beta$  in adult brain function. *J Neuroendocrinol*, 24(1), 160-173.
- Haspula, D., & Clark, M. A. (2017). MAPK activation patterns of AT1R and CB1R in SHR versus Wistar astrocytes: Evidence of CB1R hypofunction and crosstalk between AT1R and CB1R. *Cell Signal*, 40, 81-90.
- Haspula, D., & Clark, M. A. (2018). Neuroinflammation and sympathetic overactivity: Mechanisms and implications in hypertension. *Auton Neurosci*, 210, 10-17.
- Hennigan, A., Callaghan, C. K., Kealy, J., Rouine, J., & Kelly, A. M. (2009). Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav Brain Res*, 197(2), 371-377.
- Hojo, Y., Higo, S., Ishii, H., Ooishi, Y., Mukai, H., Murakami, G., Kominami, T., Kimoto, T., Honma, S., Poirier, D., & Kawato, S. (2009). Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology*, 150(11), 5106-5112.
- Hwang, Y. H., Seo, J. G., Lee, H. W., Park, S. P., & Suh, C. K. (2008). Early neurological deterioration following intravenous recombinant tissue plasminogen activator therapy in patients with acute lacunar stroke. *Cerebrovasc Dis*, 26(4), 355-359.
- Isgor, C., & Watson, S. J. (2005). Estrogen receptor alpha and beta mRNA expressions by proliferating and differentiating cells in the adult rat dentate gyrus and subventricular zone. *Neuroscience*, 134(3), 847-856.
- Jennings, J. R., & Zanzara, Y. (2009). Is the brain the essential in hypertension? *Neuroimage*, 47(3), 914-921.
- Jo, Y. S., Park, E. H., Kim, I. H., Park, S. K., Kim, H., Kim, H. T., & Choi, J. S. (2007). The medial prefrontal cortex is involved in spatial memory retrieval under partial-cue conditions. *J Neurosci*, 27(49), 13567-13578.
- Johann, S., & Beyer, C. (2013). Neuroprotection by gonadal steroid hormones in acute brain damage requires cooperation with astroglia and microglia. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 137, 71-81.
- Jover-Mengual, T., Zukin, R. S., & Etgen, A. M. (2007). MAPK signaling is critical to estradiol protection of CA1 neurons in global ischemia. *Endocrinology*, 148(3), 1131-1143.
- Kaiser, D., Weise, G., Möller, K., Scheibe, J., Pösel, C., Baasch, S., Gawlitza, M., Lobsien, D., Diederich, K., Minnerup, J., Kranz, A., Boltze, J., & Wagner, D. C. (2014). Spontaneous white matter damage, cognitive decline and neuroinflammation in middle-aged hypertensive rats: an animal model of early-stage cerebral small vessel disease. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 169.
- Kang, N. H., Shin, H. C., Oh, S., Lee, K. H., Lee, Y. B., & Choi, K. C. (2016). Soy milk digestion extract inhibits progression of prostate cancer cell growth via regulation of prostate cancer-specific antigen and cell cycle-regulatory genes in human LNCaP cancer cells. *Mol Med Rep*, 14(2), 1809-1816.
- Kelly, M. J., Lagrange, A. H., Wagner, E. J., & Rønnekleiv, O. K. (1999). Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids*, 64(1-2), 64-75.
- Kelly, M. J., & Wagner, E. J. (1999). Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 10(9), 369-374.
- Kelly, P. H., & Moore, K. E. (1977). Mesolimbic dopamine neurons: effects of 6-hydroxydopamine-induced destruction and receptor blockade on drug-induced rotation of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 55(1), 35-41.
- Kelly, P. J., Hedley-Whyte, E. T., Primavera, J., He, J., & Gonzalez, R. G. (2001). Diffusion MRI in ischemic stroke compared to pathologically verified infarction. *Neurology*, 56(7), 914-920.
- Kempermann, G. (2002). Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 22(3), 635-638.
- Kempermann, G. (2015a). Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(2), a018986.
- Kempermann, G. (2015b). Astrocytes, Makers of New Neurons. *Neuron*, 88(5), 850-851.
- Kahle. (2018). *ATLAS DE ANATOMÍA con Correlación Clínica*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Kim, J. I., Jeon, S. G., Kim, K. A., Kim, Y. J., Song, E. J., Choi, J., Ahn, K. J., Kim, C. J., Chung, H. Y., Moon, M., & Chung, H. (2016). The pharmacological stimulation of Nurr1 improves cognitive functions via enhancement of adult hippocampal neurogenesis. *Stem Cell Res*, 17(3), 534-543.
- Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H., & Inokuchi, K. (2009). Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell*, 139(4), 814-827.
- Kiyota, T., Ingraham, K. L., Swan, R. J., Jacobsen, M. T., Andrews, S. J., & Ikezu, T. (2012). AAV

- serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther*, 19(7), 724-733.
- Klinge, C. M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J Cell Biochem*, 105(6), 1342-1351.
- Korf, E. S., Wahlund, L. O., Visser, P. J., & Scheltens, P. (2004). Medial temporal lobe atrophy on MRI predicts dementia in patients with mild cognitive impairment. *Neurology*, 63(1), 94-100.
- Korf, E. S., White, L. R., Scheltens, P., & Launer, L. J. (2004a). Midlife blood pressure and the risk of hippocampal atrophy: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension*, 44(1), 29-34.
- Korner, P., Bobik, A., Oddie, C., & Friberg, P. (1993). Sympathoadrenal system is critical for structural changes in genetic hypertension. *Hypertension*, 22(2), 243-252.
- Kosaka, Y., Quillinan, N., Bond, C., Traystman, R., Hurn, P., & Herson, P. (2012). GPER1/GPR30 activation improves neuronal survival following global cerebral ischemia induced by cardiac arrest in mice. *Transl Stroke Res*, 3(4), 500-507.
- Kraut, M. A., Beason-Held, L. L., Elkins, W. D., & Resnick, S. M. (2008). The impact of magnetic resonance imaging-detected white matter hyperintensities on longitudinal changes in regional cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(1), 190-197.
- Kreijkamp-Kaspers, S., Kok, L., Grobbee, D. E., de Haan, E. H., Aleman, A., Lampe, J. W., & van der Schouw, Y. T. (2004). Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA*, 292(1), 65-74.
- Kronenberg, G., Lippoldt, A., & Kempermann, G. (2007). Two genetic rat models of arterial hypertension show different mechanisms by which adult hippocampal neurogenesis is increased. *Dev Neurosci*, 29(1-2), 124-133.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3), 863-870.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., & Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252-4263.
- Kuiper, G. G., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., & Gustafsson, J. A. (1998). The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 19(4), 253-286.
- Kuzumaki, N., Ikegami, D., Imai, S., Narita, M., Tamura, R., Yajima, M., Suzuki, A., Miyashita, K., Niikura, K., Takeshima, H., Ando, T., Ushijima, T., & Suzuki, T. (2010). Enhanced IL-1beta production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. *Synapse*, 64(9), 721-728.
- Launer, L. J., Masaki, K., Petrovitch, H., Foley, D., & Havlik, R. J. (1995). The association between midlife blood pressure levels and late-life cognitive function. The Honolulu-Asia Aging Study. *JAMA*, 274(23), 1846-1851.
- Lee, B., Choi, G. M., Shim, I., & Lee, H. (2020). Genistein Prevents Single Prolonged Stress-Induced Cognitive Impairment in a Post-Traumatic Stress Disorder Rat Model via Activation of the Serotonergic System. *J Med Food*, 23(5), 476-484.
- Lee, E., & Son, H. (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep*, 42(5), 239-244.
- Li, K., Hong, S., Lin, S., & Chen, K. (2020). Genistein inhibits the proliferation, migration and invasion of the squamous cell carcinoma cells via inhibition of MEK/ERK and JNK signalling pathways. *J BUON*, 25(2), 1172-1177.
- Lis, C. G., & Gaviria, M. (1997). Vascular dementia, hypertension, and the brain. *Neurol Res*, 19(5), 471-480.
- Liu, J., Carr, S., Rinaldi, K., & Chandler, W. (2005). Screening estrogenic oxidized by-products by combining ER binding and ultrafiltration. *Environ Toxicol Pharmacol*, 20(2), 269-278.
- Lu, J., & Wang, D. (2016). Advances in endovascular therapy for ischemic cerebrovascular diseases. *Chronic Dis Transl Med*, 2(3), 135-139.
- Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*(126).
- Luine, V. N., Khylichevskaya, R. I., & McEwen, B. S. (1974). Oestrogen effects on brain and pituitary enzyme activities. *J Neurochem*, 23(5), 925-934.
- Lund, T. D., West, T. W., Tian, L. Y., Bu, L. H., Simmons, D. L., Setchell, K. D., Adlercreutz, H., & Lephart, E. D. (2001). Visual spatial memory is enhanced in female rats (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens. *BMC Neurosci*, 2, 20.
- Lyon, L., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2012). Spontaneous object recognition and its relevance to schizophrenia: a review of findings from pharmacological, genetic, lesion and developmental rodent models. *Psychopharmacology (Berl)*, 220(4), 647-672.
- Ma, Z. Q., Santagati, S., Patrone, C., Pollio, G., Vegeto, E., & Maggi, A. (1994). Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *Mol Endocrinol*, 8(7), 910-918.
- Malinowska, M., Wilkinson, F. L., Langford-Smith, K. J., Langford-Smith, A., Brown, J. R., Crawford, B. E., Vanier, M. T., Gryniewicz, G., Wynn, R. F., Wraith, J. E., Wegrzyn, G., & Bigger, B. W. (2010). Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative

- metabolic disease. *PLoS One*, 5(12), e14192.
- Maning, J., Negussie, S., Clark, M. A., & Lymperopoulos, A. (2017). Biased agonism/antagonism at the AngII-AT1 receptor: Implications for adrenal aldosterone production and cardiovascular therapy. *Pharmacol Res*, 125(Pt A), 14-20.
  - Mathieu, P., Battista, D., Depino, A., Roca, V., Graciarena, M., & Pitossi, F. (2010). The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *J Neurochem*, 112(6), 1368-1385.
  - McEwen, B. S. (1981). Neural gonadal steroid actions. *Science*, 211(4488), 1303-1311.
  - McEwen, B. S. (2001). Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* (1985), 91(6), 2785-2801.
  - Mendez, P., & Garcia-Segura, L. M. (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells. *Endocrinology*, 147(6), 3027-3039.
  - Meneses, A., & Hong, E. (1998). Spontaneously hypertensive rats: a potential model to identify drugs for treatment of learning disorders. *Hypertension*, 31(4), 968-972.
  - Menze, E. T., Esmat, A., Tadros, M. G., Abdel-Naim, A. B., & Khalifa, A. E. (2015). Genistein improves 3-NPA-induced memory impairment in ovariectomized rats: impact of its antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase modulatory properties. *PLoS One*, 10(2), e0117223.
  - Messerli, F. H., Williams, B., & Ritz, E. (2007). Essential hypertension. *Lancet*, 370(9587), 591-603.
  - Meyer, M. R., Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascul Pharmacol*, 55(1-3), 17-25.
  - MILLER, N. E. (1957). Experiments on motivation. Studies combining psychological, physiological, and pharmacological techniques. *Science*, 126(3286), 1271-1278.
  - Momeni, S., Segerström, L., & Roman, E. (2015). Supplier-dependent differences in intermittent voluntary alcohol intake and response to naltrexone in Wistar rats. *Front Neurosci*, 9, 424.
  - Montague, D., Weickert, C. S., Tomaskovic-Crook, E., Rothmond, D. A., Kleinman, J. E., & Rubinow, D. R. (2008). Oestrogen receptor alpha localisation in the prefrontal cortex of three mammalian species. *J Neuroendocrinol*, 20(7), 893-903.
  - Mori, S., Kato, M., & Fujishima, M. (1995). Impaired maze learning and cerebral glucose utilization in aged hypertensive rats. *Hypertension*, 25(4 Pt 1), 545-553.
  - Mowry, F. E., & Biancardi, V. C. (2019). Neuroinflammation in hypertension: the renin-angiotensin system versus pro-resolution pathways. *Pharmacol Res*, 144, 279-291.
  - Nabekura, J., Oomura, Y., Minami, T., Mizuno, Y., & Fukuda, A. (1986). Mechanism of the rapid effect of 17 beta-estradiol on medial amygdala neurons. *Science*, 233(4760), 226-228.
  - Naftolin, F., Horvath, T. L., Jakab, R. L., Leranthy, C., Harada, N., & Balthazart, J. (1996). Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinology*, 63(2), 149-155.
  - Naftolin, F., Mor, G., Horvath, T. L., Luquin, S., Fajer, A. B., Kohen, F., & Garcia-Segura, L. M. (1996). Synaptic remodeling in the arcuate nucleus during the estrous cycle is induced by estrogen and precedes the preovulatory gonadotropin surge. *Endocrinology*, 137(12), 5576-5580.
  - Negussie, S., Lymperopoulos, A., & Clark, M. A. (2019). Role of  $\beta$ arrestin1 in AT. *J Neurochem*, 148(1), 46-62.
  - Nieuwenhuys. (2009). *El Sistema Nervioso Central Humano*. Tomo 2. Buenos Aires: Medica Panamericana.
  - Nilsson, B. O., Olde, B., & Leeb-Lundberg, L. M. (2011). G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. *Br J Pharmacol*, 163(6), 1131-1139.
  - O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 34(1), 171-175.
  - Obisesan, T. O. (2009). Hypertension and cognitive function. *Clin Geriatr Med*, 25(2), 259-288.
  - Obisesan, T. O., Obisesan, O. A., Martins, S., Alamgir, L., Bond, V., Maxwell, C., & Gillum, R. F. (2008). High blood pressure, hypertension, and high pulse pressure are associated with poorer cognitive function in persons aged 60 and older: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Geriatr Soc*, 56(3), 501-509.
  - Okamoto, K. (1969). Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol*, 7, 227-270.
  - Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173(4), 649-665.
  - Paglieri, C., Bisbocci, D., Caserta, M., Rabbia, F., Bertello, C., Canadè, A., & Veglio, F. (2008). Hypertension and cognitive function. *Clin Exp Hypertens*, 30(8), 701-710.
  - Park, C. R., Campbell, A. M., & Diamond, D. M. (2001). Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. *Biol Psychiatry*, 50(12), 994-1004.
  - Park, D., Huang, T., & Frishman, W. H. (2005). Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiol Rev*, 13(1), 13-17.
  - Patisaul, H. B., Melby, M., Whitten, P. L., & Young, L. J. (2002). Genistein affects ER beta but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology*, 143(6), 2189-2197.
  - Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427-434.
  - Perfilieva, E., Risedal, A., Nyberg, J., Johansson, B. B., & Eriksson, P. S. (2001). Gender and strain influence on neurogenesis in dentate gyrus of young rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(3), 211-217.
  - Petry, F. D. S., Hoppe, J. B., Klein, C. P., Dos Santos, B. G., Hözer, R. M., Bifi, F., Matté, C., Salbego, C.

- G., & Trindade, V. M. T. (2021). Genistein attenuates amyloid-beta-induced cognitive impairment in rats by modulation of hippocampal synaptotoxicity and hyperphosphorylation of Tau. *J Nutr Biochem*, 87, 108525.
- Pietranera, L., Bellini, M. J., Arévalo, M. A., Goya, R., Brocca, M. E., Garcia-Segura, L. M., & De Nicola, A. F. (2011). Increased aromatase expression in the hippocampus of spontaneously hypertensive rats: effects of estradiol administration. *Neuroscience*, 174, 151-159.
- Pietranera, L., Brocca, M. E., Roig, P., Lima, A., Garcia-Segura, L. M., & De Nicola, A. F. (2014). 17 $\alpha$ -Oestradiol-induced neuroprotection in the brain of spontaneously hypertensive rats. *J Neuroendocrinol*, 26(5), 310-320.
- Pietranera, L., Brocca, M. E., Roig, P., Lima, A., Garcia-Segura, L. M., & De Nicola, A. F. (2015). Estrogens are neuroprotective factors for hypertensive encephalopathy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 146, 15-25.
- Pietranera, L., Correa, J., Brocca, M. E., Roig, P., Lima, A., Di Giorgio, N., Garcia-Segura, L. M., & De Nicola, A. F. (2016). Selective Oestrogen Receptor Agonists Rescued Hippocampus Parameters in Male Spontaneously Hypertensive Rats. *J Neuroendocrinol*, 28(10).
- Pietranera, L., Lima, A., Roig, P., & De Nicola, A. F. (2010). Involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in oestradiol neuroprotection of the hippocampus of hypertensive rats. *J Neuroendocrinol*, 22(10), 1082-1092.
- Pietranera, L., Saravia, F., Gonzalez Deniselle, M. C., Roig, P., Lima, A., & De Nicola, A. F. (2006). Abnormalities of the hippocampus are similar in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats and spontaneously hypertensive rats. *J Neuroendocrinol*, 18(6), 466-474.
- Pietranera, L., Saravia, F. E., Roig, P., Lima, A., & De Nicola, A. F. (2008). Protective effects of estradiol in the brain of rats with genetic or mineralocorticoid-induced hypertension. *Psychoneuroendocrinology*, 33(3), 270-281.
- Pineda, J. (2000). *Biopsicología*. Madrid: Prentice Hall.
- Pisani, S. L., Neese, S. L., Doerge, D. R., Helferich, W. G., Schantz, S. L., & Korol, D. L. (2012). Acute genistein treatment mimics the effects of estradiol by enhancing place learning and impairing response learning in young adult female rats. *Horm Behav*, 62(4), 491-499.
- Prossnitz, E. R., Oprea, T. I., Sklar, L. A., & Arterburn, J. B. (2008). The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 109(3-5), 350-353.
- Puellas, L. P. (2008). *Neuroanatomía*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Purves, D. (2007). *Neurociencia*. Editorial Médica Panamericana.
- Qian, Y., Cao, L., Guan, T., Chen, L., Xin, H., Li, Y., Zheng, R., & Yu, D. (2015). Protection by genistein on cortical neurons against oxidative stress injury via inhibition of NF-kappaB, JNK and ERK signaling pathway. *Pharm Biol*, 53(8), 1124-1132.
- Qian, Y., Guan, T., Huang, M., Cao, L., Li, Y., Cheng, H., Jin, H., & Yu, D. (2012). Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF-kB activation in a cerebral ischemia mouse model. *Neurochem Int*, 60(8), 759-767.
- Ramírez, O. A., Vidal, R. L., Tello, J. A., Vargas, K. J., Kindler, S., Härtel, S., & Couve, A. (2009). Dendritic assembly of heteromeric gamma-aminobutyric acid type B receptor subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 284(19), 13077-13085.
- Raz, N., & Rodrigue, K. M. (2006). Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev*, 30(6), 730-748.
- REID, C. V. H. M. G. (1998). "Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy." Oxford: BIOS.
- Richards, S. S., Emsley, C. L., Roberts, J., Murray, M. D., Hall, K., Gao, S., & Hendrie, H. C. (2000). The association between vascular risk factor-mediating medications and cognition and dementia diagnosis in a community-based sample of African-Americans. *J Am Geriatr Soc*, 48(9), 1035-1041.
- Rozovsky, I., Wei, M., Stone, D. J., Zanjani, H., Anderson, C. P., Morgan, T. E., & Finch, C. E. (2002). Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endocrinology*, 143(2), 636-646.
- Ruiz, A. J., & Kullmann, D. M. (2012). Ionotropic receptors at hippocampal mossy fibers: roles in axonal excitability, synaptic transmission, and plasticity. *Front Neural Circuits*, 6, 112.
- Rune, G. M., Lohse, C., Prange-Kiel, J., Fester, L., & Frotscher, M. (2006). Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Res*, 31(2), 145-155.
- Sabbatini, M., Catalani, A., Consoli, C., Marletta, N., Tomassoni, D., & Avola, R. (2002). The hippocampus in spontaneously hypertensive rats: an animal model of vascular dementia? *Mech Ageing Dev*, 123(5), 547-559.
- Safe, S., & Kim, K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*, 41(5), 263-275.
- Saravia, F., Beauquis, J., Pietranera, L., & De Nicola, A. F. (2007). Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology*, 32(5), 480-492.
- Sarnyai, Z., Sibille, E. L., Pavlides, C., Fenster, R. J., McEwen, B. S., & Toth, M. (2000). Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14731-14736.
- Schain, M., & Kreisl, W. C. (2017). Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17(3), 25.
- Schmitz, C., & Hof, P. R. (2005). Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130(4), 813-

831.

- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci*, 127(7), 624-633.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A., & Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, 103(6), 843-852.
- Shih, Y. H., Tsai, S. F., Huang, S. H., Chiang, Y. T., Hughes, M. W., Wu, S. Y., Lee, C. W., Yang, T. T., & Kuo, Y. M. (2016). Hypertension impairs hippocampus-related adult neurogenesis, CA1 neuron dendritic arborization and long-term memory. *Neuroscience*, 322, 346-357.
- Shughrue, P., Scrimo, P., Lane, M., Askew, R., & Merchenthaler, I. (1997). The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology*, 138(12), 5649-5652.
- Shumaker, S. A., Legault, C., Rapp, S. R., Thal, L., Wallace, R. B., Ockene, J. K., Hendrix, S. L., Jones, B. N., Assaf, A. R., Jackson, R. D., Kotchen, J. M., Wassertheil-Smoller, S., Wactawski-Wende, J., & Investigators, W. (2003). Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 289(20), 2651-2662.
- Sierksma, A. S., van den Hove, D. L., Pfau, F., Philippens, M., Bruno, O., Fedele, E., Ricciarelli, R., Steinbusch, H. W., Vanmierlo, T., & Prickaerts, J. (2014). Improvement of spatial memory function in APPswe/PS1dE9 mice after chronic inhibition of phosphodiesterase type 4D. *Neuropharmacology*, 77, 120-130.
- Silver, J. (2016). The glial scar is more than just astrocytes. *Exp Neurol*, 286, 147-149.
- Singh, M., Singh, A. K., Pandey, P., Chandra, S., Singh, K. A., & Gambhir, I. S. (2016). Molecular genetics of essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 38(3), 268-277.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32(12), 638-647.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1), 7-35.
- Staessen, J. A., Wang, J., Bianchi, G., & Birkenhäger, W. H. (2003). Essential hypertension. *Lancet*, 361(9369), 1629-1641.
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*, 15(10), 655-669.
- Streit, W. J., Hurley, S. D., McGraw, T. S., & Semple-Rowland, S. L. (2000). Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J Neurosci Res*, 61(1), 10-20.
- Sweatt, J. D. (2011). Neuroscience. Creating stable memories. *Science*, 331(6019), 869-870.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., & Gould, E. (2005). Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol*, 481(3), 252-265.
- Tang, H., Zhang, Q., Yang, L., Dong, Y., Khan, M., Yang, F., Brann, D. W., & Wang, R. (2014). GPR30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol*, 387(1-2), 52-58.
- Thomas, P., & Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102(1-5), 175-179.
- Togashi, H., Minami, M., Bando, Y., Koike, Y., Shimamura, K., & Saito, H. (1982). Effects of clonidine and guanfacine on drinking and ambulation in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 17(3), 519-522.
- Tomassoni, D., Avola, R., Di Tullio, M. A., Sabbatini, M., Vitaioli, L., & Amenta, F. (2004a). Increased expression of glial fibrillary acidic protein in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, 26(4), 335-350.
- Tomassoni, D., Avola, R., Di Tullio, M. A., Sabbatini, M., Vitaioli, L., & Amenta, F. (2004b). Increased expression of glial fibrillary acidic protein in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, 26(4), 335-350.
- Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., Giros, B., & Mechawar, N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation*, 11, 12.
- Uddin, M. M., Mahmood, A. S. M. H., Ibrahim, M. M. H., & Briski, K. P. (2019). Sex-dimorphic estrogen receptor regulation of ventromedial hypothalamic nucleus glucoregulatory neuron adrenergic receptor expression in hypoglycemic male and female rats. *Brain Res*, 1720, 146311.
- Uddin, M. S., Al Mamun, A., Kabir, M. T., Jakaria, M., Mathew, B., Barreto, G. E., & Ashraf, G. M. (2019). Nootropic and Anti-Alzheimer's Actions of Medicinal Plants: Molecular Insight into Therapeutic Potential to Alleviate Alzheimer's Neuropathology. *Mol Neurobiol*, 56(7), 4925-4944.
- Uddin, M. S., & Kabir, M. T. (2019). Emerging Signal Regulating Potential of Genistein Against Alzheimer's Disease: A Promising Molecule of Interest. *Front Cell Dev Biol*, 7, 197.
- Valles, S. L., Dolz-Gaiton, P., Gambini, J., Borrás, C., Lloret, A., Pallardo, F. V., & Viña, J. (2010). Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Res*, 1312, 138-144.
- Vallières, L., Campbell, I. L., Gage, F. H., & Sawchenko, P. E. (2002). Reduced hippocampal

- neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*, 22(2), 486-492.
- van Dijk, E. J., Breteler, M. M., Schmidt, R., Berger, K., Nilsson, L. G., Oudkerk, M., Pajak, A., Sans, S., de Ridder, M., Dufouil, C., Fuhrer, R., Giampaoli, S., Launer, L. J., Hofman, A., & Consortium, C. (2004). The association between blood pressure, hypertension, and cerebral white matter lesions: cardiovascular determinants of dementia study. *Hypertension*, 44(5), 625-630.
- Vegeto, E., Belcredito, S., Eteri, S., Ghisletti, S., Brusadelli, A., Meda, C., Krust, A., Dupont, S., Ciana, P., Chambon, P., & Maggi, A. (2003). Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16), 9614-9619.
- Veiga, S., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2005). Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. *Neuroreport*, 16(14), 1599-1603.
- Wagner, J. D., Cefalu, W. T., Anthony, M. S., Litwak, K. N., Zhang, L., & Clarkson, T. B. (1997). Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factors and decrease aortic cholesteryl ester content in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Metabolism*, 46(6), 698-705.
- Waldstein, S. R., Manuck, S. B., Ryan, C. M., & Muldoon, M. F. (1991). Neuropsychological correlates of hypertension: review and methodologic considerations. *Psychol Bull*, 110(3), 451-468.
- Wang, T. J., Chen, J. R., Wang, W. J., Wang, Y. J., & Tseng, G. F. (2014). Genistein partly eases aging and estropause-induced primary cortical neuronal changes in rats. *PLoS One*, 9(2), e89819.
- Wang, Y. X., Xia, Z. H., Jiang, X., Li, L. X., Wang, H. G., An, D., & Liu, Y. Q. (2020). Genistein inhibits amyloid peptide 25-35-induced neuronal death by modulating estrogen receptors, choline acetyltransferase and glutamate receptors. *Arch Biochem Biophys*, 693, 108561.
- Watson, G. P. C. (1996). "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates." San Diego: Academic Press.
- Wiseman, R. M., Saxby, B. K., Burton, E. J., Barber, R., Ford, G. A., & O'Brien, J. T. (2004). Hippocampal atrophy, whole brain volume, and white matter lesions in older hypertensive subjects. *Neurology*, 63(10), 1892-1897.
- Wu, C. J., Wang, L., Li, X., Wang, C. X., Ma, J. P., & Xia, X. S. (2012). [Impact of adding folic acid, vitamin B(12) and probucol to standard antihypertensive medication on plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine levels of essential hypertension patients]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 40(12), 1003-1008.
- Wu, J., Stoica, B. A., Luo, T., Sabirzhanov, B., Zhao, Z., Guancia, K., Nayar, S. K., Foss, C. A., Pomper, M. G., & Faden, A. I. (2014). Isolated spinal cord contusion in rats induces chronic brain neuroinflammation, neurodegeneration, and cognitive impairment. Involvement of cell cycle activation. *Cell Cycle*, 13(15), 2446-2458.
- Yague, J. G., Garcia-Segura, L. M., & Azcoitia, I. (2009). Selective transcriptional regulation of aromatase gene by vitamin D, dexamethasone, and mifepristone in human glioma cells. *Endocrine*, 35(2), 252-261.
- Yang, Q. Q., & Zhou, J. W. (2019). Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia*, 67(6), 1017-1035.
- Yang, Z. Z., Wu, D. W., Ma, H. B., Fei, J. X., & Zhao, Y. L. (2018). Effects on the Behavior and Neuroimmunity of Pulsed Microwaves with Different Peak Densities. *Biomed Environ Sci*, 31(12), 893-897.
- Yankova, M., Hart, S. A., & Woolley, C. S. (2001). Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6), 3525-3530.
- Zanto, T. P., Rubens, M. T., Thangavel, A., & Gazzaley, A. (2011). Causal role of the prefrontal cortex in top-down modulation of visual processing and working memory. *Nat Neurosci*, 14(5), 656-661.
- Zhang, L., Dai, W., Zhang, X., Gong, Z., & Jin, G. (2013). Mannotriose regulates learning and memory signal transduction in the hippocampus. *Neural Regen Res*, 8(32), 3020-3026.
- Zhang, Q., Feng, H., Qluwakemi, B., Wang, J., Yao, S., Cheng, G., Xu, H., Qiu, H., Zhu, L., & Yuan, M. (2017). Phytoestrogens and risk of prostate cancer: an updated meta-analysis of epidemiologic studies. *Int J Food Sci Nutr*, 68(1), 28-42.
- Zhang, Y., Verhaeghen, P., & Cerella, J. (2012). Working memory at work: how the updating process alters the nature of working memory transfer. *Acta Psychol (Amst)*, 139(1), 77-83.
- Zhao, L., Wu, T. W., & Brinton, R. D. (2004). Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res*, 1010(1-2), 22-34.
- Zhao, L. M., Jin, H. S., Liu, J., Skaar, T. C., Ipe, J., Lv, W., Flockhart, D. A., & Cushman, M. (2016). A new Suzuki synthesis of triphenylethylenes that inhibit aromatase and bind to estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Bioorg Med Chem*, 24(21), 5400-5409.
- Zhao, Y. N., Wang, F., Fan, Y. X., Ping, G. F., Yang, J. Y., & Wu, C. F. (2013). Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behav Brain Res*, 236(1), 270-282.