



**Universidad de Oviedo**

**Departamento de Biología Funcional**

**Área de Fisiología**

**Programa de Doctorado “Biología Funcional y Molecular”**

**Efectos neuroprotectores del  $17\beta$ -estradiol y la genisteína frente a la resistencia a la insulina y el daño isquémico asociados al envejecimiento femenino**

**Tesis doctoral**

**Javier Morán Suárez**

**Oviedo, 2014**





**Universidad de Oviedo**

**Departamento de Biología Funcional**

**Área de Fisiología**

**Programa de Doctorado “Biología Funcional y Molecular”**

**Efectos neuroprotectores del 17 $\beta$ -estradiol y la  
genisteína frente a la resistencia a la insulina y el daño  
isquémico asociados al envejecimiento femenino**

**Tesis doctoral**

**Javier Morán Suárez**

**Oviedo, 2014**













## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Efectos neuroprotectores del 17 $\beta$ -estradiol y la genisteína frente a la resistencia a la insulina y el daño isquémico asociados al envejecimiento femenino	Inglés: Neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol and genistein against insulin resistance and ischemic damage associated with female aging

2.- Autor	
Nombre: Javier Morán Suárez	-
Programa de Doctorado: Biología Funcional y Molecular	
Órgano responsable: Biología Funcional	

### RESUMEN (en español)

Los estrógenos son hormonas imprescindibles para el buen funcionamiento de las funciones cerebrales, además de su conocido papel, a nivel hipotalámico, sobre el eje neuroendocrino-reproductor. De este modo, los cambios cíclicos que se producen en sus niveles a lo largo de la vida sexual de la mujer pueden influir en la homeostasis cerebral. No obstante, es en el momento final de este periodo reproductivo cuando más evidente resulta su importancia, ya que la caída en los niveles de estrógenos, inherente a la menopausia, puede dar lugar a la aparición de diversos síntomas y patologías, tales como un incremento de la resistencia central a la acción de la insulina o un aumento en la incidencia de daño isquémico cerebral. A pesar de que la terapia de reemplazamiento hormonal con estrógenos puede resultar efectiva para paliar muchas patologías asociadas al envejecimiento, en ocasiones conlleva de forma implícita la aparición de efectos secundarios no deseados. Esto nos ha llevado a estudiar si los tratamientos con 17 $\beta$ -estradiol o genisteína, una isoflavona presente en ciertos tipos de plantas, podrían ejercer un papel neuroprotector frente a la resistencia a la insulina y el daño isquémico asociados al envejecimiento femenino. Así, mediante el empleo de modelos animales y celulares, en este trabajo observamos que las diferencias en los niveles de estrógenos que existen entre distintas fases del ciclo estral modulan el metabolismo oxidativo cerebral de una forma específica de región. Además, el tratamiento agudo con 17 $\beta$ -estradiol, pero no con genisteína, redujo el impacto negativo del envejecimiento sobre la sensibilidad a la acción de la insulina en el córtex cerebral de ratas hembra. Sin embargo, el hecho de que la genisteína provocara la activación de la proteína quinasa B (Akt), la cual está implicada en múltiples procesos celulares, sugiere la existencia de otros mecanismos implicados en la mediación de los efectos neuroprotectores de este fitoestrógeno durante el envejecimiento femenino. Por último, tanto el 17 $\beta$ -estradiol como la genisteína ejercieron un papel neuroprotector frente a un daño por isquemia/reperfusión recurrente en un estudio *in vitro* realizado con la línea neuronal de hipocampo de ratón HT22. Este efecto protector pareció ser mediado, al menos en parte, por una mejoría del metabolismo oxidativo neuronal, el cual se había visto comprometido como consecuencia del daño isquémico. En conjunto, todo ello apunta a que los estrógenos juegan un papel muy importante en la regulación de diversas patologías a nivel central que pueden tener lugar durante el envejecimiento femenino. A pesar de que la genisteína no haya sido capaz de mimetizar este papel protector del estradiol en todas las patologías estudiadas, los resultados positivos encontrados con este fitoestrógeno, tales como la activación de Akt en el córtex cerebral de ratas hembra viejas y su papel neuroprotector frente al daño isquémico recurrente, son esperanzadores y alientan a la





realización de más estudios, bien sea utilizándolos como monoterapia o en terapias combinadas con otros fitoestrógenos.

### RESUMEN (en Inglés)

Estrogens are essential hormones for the proper performance of brain function, in addition to its known role at the hypothalamic level on the neuroendocrine-reproductive axis. Thus, cyclic changes occurring in their levels throughout woman's sexual life can modulate brain homeostasis. However, it is at the end of the reproductive period when more obvious its importance become, since the decrease of estrogen levels following menopause can lead to several symptoms and pathologies, such as an increase of central insulin resistance or stroke incidence. In spite of the fact that hormone replacement therapy with estrogens can be effective to face many age-related diseases, sometimes it triggers undesired side effects. Taking this into account, we have studied whether treatments with  $17\beta$ -estradiol or genistein, an isoflavone present in several plants, could exert a neuroprotective role against insulin resistance and ischemic damage associated with female aging. Thereby, by using both cellular and animal models, we have shown that the differences in estrogen levels along different stages of the estrous cycle modulate brain oxidative metabolism in a region-specific manner. Moreover, acute treatment with  $17\beta$ -estradiol, but not with genistein, reduced the negative impact of aging on insulin sensitivity at the cerebral cortex of female rats. Nevertheless, the fact that genistein induced protein kinase B (Akt) activation, which is involved in multiple cellular processes, suggests that other possible mechanisms are involved in the neuroprotective effects of this phytoestrogen during female aging. Finally, both acute treatments with  $17\beta$ -estradiol and genistein performed neuroprotective actions against a recurrent ischemic/reperfusion damage in an *in vitro* study carried out with the HT22 neuronal line of mouse hippocampus. This protective effect seemed to be mediated, at least partially, by an improvement of the neuronal oxidative metabolism, which had been compromised due to the ischemic damage. In conclusion, it seems that estrogens play an important role in the regulation of several brain pathologies which can occur during female aging. In spite of the fact that genistein has not been able to mimic this protective role of estradiol in all, the positive results found with this phytoestrogen, such as Akt activation in the cerebral cortex of aged female rats and its neuroprotective role against recurrent ischemic damage, are promising and encourage us to carry out further studies, either by using them as monotherapy or in combination therapies with other phytoestrogens.



*“No te rindas, por favor no cedas. Aunque el frío queme,  
aunque el miedo muerda, aunque el sol se esconda y se calle el viento,  
aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños”*

**Mario Benedetti**





# **AGRADECIMIENTOS**



Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que me ayudaron en la realización de este trabajo, así como a las grandes personas que he conocido durante este largo camino:

A Tino, el director de esta tesis, porque a pesar de no tener el mejor expediente del mundo me acogiste en tu laboratorio sin dudarle y confiaste en mí desde el primer momento.

A la Universidad de Oviedo por permitirme usar sus instalaciones para el desarrollo de mis experimentos y al Gobierno del Principado de Asturias por subvencionar mi formación pre-doctoral.

A Ana por tus correcciones y guía, especialmente en mis primeros pasos. A Pablo, porque a veces de buenas y otras de morros pero siempre me has ayudado y has estado ahí, ejerciendo de post-doc ya desde mucho antes de leer la tesis... y a Fani, por tantos buenos momentos y tantas risas que pasé contigo... *What a disaster Nati!*

A la gente del Dpto. de Biología Funcional que de una forma u otra me ayudasteis o distrajisteis cuando también lo necesitaba... Marcos, Adri, Inés, Jorge, Alina, Fani, Laura, Guillermo, Paulilla, Juan, Carmen, Elena, Edu, Cris, Hugo, Ainhara, Bea, Adriana, Sonia, Álvaro, Manolo, Fueyo, Jose y Trini. Sin olvidarme de Julia, Fer, Clara, Miguelín y Lore que, a pesar de no trabajar en mi departamento, también me ayudasteis en alguna ocasión desinteresadamente.

A ese grupo heterogéneo formado por antropólogos, ecólogos, microbiólogos etc... Anthony, Richi, Anto, Carlinos, Sonia, Axa, Höfer, Isa, Sara, Rafitas, Marina, Dani, Asther, Anais, Mario, Vicky, Celia, Luis...porque esos días que bien sea por dar prácticas o hacer experimentos en los que no podía comer con vosotros... ¡se hacían muchísimo más largos! Además me gustaría incluir también en este grupo a Carlina e Ivi... ¡mis dos microbiólogos favoritos!

A mis directores del TFM Héctor y Neli, por lo mucho que os volcasteis conmigo aquel año a pesar de que sabíais que no quedaría allí a hacer la Tesis...y a mis ex-compis de Psicología Cami, Patri y Berto...como sabéis guardo buenos y malos recuerdos de mi paso por ese laboratorio, pero sin duda... ¡vosotros 3 sois el mejor de todos ellos!

## AGRADECIMIENTOS

---

A la gente que conocí en el Máster de Neurociencias, y en especial a Nuski por aquellas numerosas vueltas a casa en el 106 cargadas de confianzas y risas... y a Eliseo porque eres el fiel reflejo del refrán “hace más el que quiere que el que puede”.

A la Prof. Adriana Maggi y a la Dr.ssa Sara Della Torre por acogerme y guiarme, respectivamente, durante 3 meses inolvidables en el *Milano Molecular Pharmaco-Biotechnology laboratory* de la Universidad de Milán. Y en especial a mis amigos italianos Chiara, Robi, Fede, Rico y Marta... *non so cosa dirvi amici...come sapete sono stato molto felice tra voi quelli 3 mesi, infatti penso a Milano di solito... e, sempre mi succede lo stesso, alla fine sempre siete voi quello che mi viene alla mia mente...mi mancate troppo!*

A mis amigos de siempre David, Abel, Diego, Elsa, Susi, Caro, Dani, Bea...la vida nos hace conocer a nuevas personas y a veces distanciarnos de otras que ya conocemos...pero yo sé perfectamente en quién tengo y tendré un amigo de por vida...

A mis hermanos, digo primos, porque siempre me habéis cuidado e incluso seguís haciéndolo ahora que ya no lo necesito...a Ivanín y Nerea (los peques de la familia...), a mis tíos, a mis abuelos (allá donde estéis...) y en general a toda mi familia, da gusto que podamos llevarnos tan bien entre nosotros...Por supuesto, no podían faltar mis padres...gracias a vosotros soy lo que soy y no sé hasta dónde llegaré...pero haga lo que haga procuraré que siempre os sintáis orgullosos de mí...

A Marta, porque de 15 días en 15 días hemos superado la carrera, varias estancias y ahora el doctorado...porque de 15 días en 15 días... ¡sigas mucho más tiempo a mi lado!

Y, en definitiva, a todos los que de una forma u otra aportasteis vuestro granito de arena para ayudarme a llevar a cabo este trabajo... ¡muchísimas gracias a todos!

# ÍNDICE



<b>Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>Resumen - Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>13</b>
1. Ciclo reproductivo femenino .....	15
1.1. Regulación del ciclo: eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.....	15
1.2. Tipos de ciclo reproductivo: el ciclo estral en la rata.....	16
2. Estrógenos.....	18
2.1. Receptores de estrógenos .....	18
2.2. Mecanismos de acción .....	20
2.3. Funciones de los estrógenos a nivel del sistema nervioso central .....	21
2.3.1. Corteza cerebral .....	22
2.3.2. Hipocampo .....	24
3. Homeostasis de la glucosa y la insulina.....	25
3.1. Cascada de señalización intracelular de la insulina .....	27
4. Envejecimiento femenino y cese de la función ovárica.....	29
4.1. Desequilibrio de la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina.....	30
4.2. Daño cerebral isquémico.....	32
4.2.1. Etiología del ictus: el papel protector de los estrógenos.....	36
4.3. Alternativas a las terapias clásicas de reemplazamiento hormonal: Los fitoestrógenos .....	37
<b>Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>41</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>45</b>
1. Animales .....	47
2. Pruebas neurológicas .....	47
3. Estudio de la influencia de los niveles de estrógenos en distintas fases del ciclo estral sobre el metabolismo oxidativo cerebral .....	49
3.1. Determinación del ciclo estral y diseño experimental .....	49



3.2. Procesamiento del tejido cerebral .....	52
3.3. Tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa.....	52
4. Estudio de los efectos del envejecimiento femenino sobre la homeostasis cerebral y la vía de señalización intracelular de la insulina .....	56
4.1. Diseño experimental.....	56
4.2. Preparación del extracto crudo cerebral y cuantificación de proteína .....	57
4.3. Análisis de Western blot .....	57
4.4. Inmunoprecipitación de proteínas .....	59
4.5. Extracción de membranas plasmáticas .....	60
5. Estudio de un modelo <i>in vitro</i> de daño por isquemia/reperfusión recurrente .....	60
5.1. Cultivo celular .....	60
5.2. Protocolo de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación.....	61
5.3. Ensayo de viabilidad celular .....	62
5.4. Análisis de Western blot .....	62
6. Análisis estadístico .....	65
<b>Resultados .....</b>	<b>67</b>
1. Pruebas neurológicas .....	69
2. Niveles de actividad citocromo c oxidasa en las fases estro y diestro.....	69
3. Niveles de GLUT3 y GLUT4 en los animales jóvenes y viejos.....	71
4. Niveles de CO-1 en los animales jóvenes y viejos .....	73
5. Niveles de ER $\alpha$ 67 y ER $\alpha$ 46 en los animales jóvenes y viejos.....	74
6. Niveles de ER $\beta$ y ratio ER $\alpha$ 67/ER $\beta$ en los animales jóvenes y viejos .....	76
7. Interacción p-IRS1 <sub>tyr612</sub> - p85 $\alpha$ en los animales jóvenes y viejos .....	78
8. Interacción ER $\alpha$ -IRS1 en los animales jóvenes y viejos .....	79
9. Interacción ER $\beta$ -IRS1 en los animales jóvenes y viejos .....	81
10. Interacción ER $\alpha$ -p85 $\alpha$ en los animales jóvenes y viejos .....	82
11. Interacción ER $\beta$ -p85 $\alpha$ en los animales jóvenes y viejos .....	84

12. Fosforilación de Akt <sub>ser473</sub> en los animales jóvenes y viejos.....	85
13. Niveles de GLUT4 en membrana plasmática en los animales jóvenes y viejos...	86
14. Ensayo de viabilidad celular en las células HT22 .....	87
15. Evaluación del procesamiento de PARP-1 en las células HT22 .....	88
16. Evaluación del ratio de LC3 en las células HT22.....	89
17. Niveles de CO-1 en las células HT22 .....	90
18. Niveles de HIF-1 $\alpha$ en las células HT22 .....	91
19. Niveles de los transportadores de glucosa GLUT3 y GLUT1 en las células HT22 .....	92
<b>Discusión.....</b>	<b>95</b>
<b>Conclusiones - Conclusions.....</b>	<b>117</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>123</b>



## **ABREVIATURAS**



**6-OHDA:** 6-hidroxi dopamina

**<sup>18</sup>F-FDG:** 18F-fluorodesoxiglucosa

**ACV:** accidente cerebrovascular

**Akt:** proteína quinasa B

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CA:** cuerno de Ammón

**CAP:** proteína asociada a c-Cb1

**Cb1:** receptor cannabinoide de tipo 1

**CG:** corteza cingulada

**CO:** citocromo c oxidasa

**DAB:** diaminobencidina

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**E:** células expuestas a OGD u OGD/R y tratadas con estradiol

**ECL:** sustrato quimioluminiscente potenciado

**ER:** receptor de estrógenos

**ERE:** elemento de respuesta a esteroides

**FBS:** suero bovino fetal

**FR2:** corteza motora secundaria

**FSH:** hormona folículo estimulante

**G:** células expuestas a OGD u OGD/R y tratadas con genisteína

**GD:** giro dentado

**GLUT:** transportador de glucosa

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas

**GPR30:** receptor 30 unido a proteína G

**HIF:** factor inducible por la hipoxia

**HRE:** elemento de respuesta a hipoxia

## ABREVIATURAS

---

**HRT:** terapia de reemplazamiento hormonal

**I/R:** isquemia/reperfusión

**IGF1-R:** receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1

**IL:** infralímbico

**IR:** receptor de insulina

**IRS:** sustrato del receptor de insulina

**JC:** animales jóvenes control

**JE:** animales jóvenes ovariectomizados y tratados con estradiol

**JG1:** animales jóvenes ovariectomizados y tratados con dosis baja de genisteína

**JG2:** animales jóvenes ovariectomizados y tratados con dosis alta de genisteína

**JV:** animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo

**LC3:** cadena ligera 3 de la proteína asociada a los microtúbulos 1A/1B

**LH:** hormona luteinizante

**MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógenos

**mPFC:** corteza prefrontal medial

**MTT:** *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium*

**N:** células cultivadas en medio completo y normoxia

**OGD:** privación de oxígeno y glucosa

**OGD/R:** privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación

**p85 $\alpha$ :** subunidad reguladora de PI3K

**p110 $\alpha$ :** subunidad catalítica de PI3K

**PARP:** polimerasa poli (ADP-ribosa)

**PBS:** tampón fosfato salino

**PBS-T:** tampón fosfato salino con Tween-20

**PDK1/2:** quinasas dependientes de PIP3

**PET:** tomografía por emisión de positrones

**PFC:** corteza prefrontal

**PH:** prolil hidroxilasa

**PI3K:** quinasa del fosfatidilinositol

**PIP2:** fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

**PIP3:** fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

**PL:** prelímico

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**PVDF:** polifluoruro de vinilideno

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SDS:** dodecil de sulfato sódico

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil de sulfato sódico

**SERMs:** moduladores selectivos del receptor de estrógenos

**SIRT1:** sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD

**SNC:** sistema nervioso central

**TBS-T:** buffer Tris salino con Tween-20

**TC10:** miembro de la familia Rho de GTPasas

**V:** células expuestas a OGD u OGD/R y tratadas con vehículo

**VC:** animales viejos control

**VE:** animales viejos ovariectomizados y tratados con estradiol

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

**VG1:** animales viejos ovariectomizados y tratados con dosis baja de genisteína

**VG2:** animales viejos ovariectomizados y tratados con dosis alta de genisteína

**VV:** animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo





## **RESUMEN - ABSTRACT**



Los estrógenos son hormonas imprescindibles para el buen funcionamiento de las funciones cerebrales, además de su conocido papel, a nivel hipotalámico, sobre el eje neuroendocrino-reproductor. De este modo, los cambios cíclicos que se producen en sus niveles a lo largo de la vida sexual de la mujer pueden influir en la homeostasis cerebral. No obstante, es en el momento final de este periodo reproductivo cuando más evidente resulta su importancia, ya que la caída en los niveles de estrógenos, inherente a la menopausia, puede dar lugar a la aparición de diversos síntomas y patologías, tales como un incremento de la resistencia central a la acción de la insulina o un aumento en la incidencia de daño isquémico cerebral. A pesar de que la terapia de reemplazamiento hormonal con estrógenos puede resultar efectiva para paliar muchas patologías asociadas al envejecimiento, en ocasiones conlleva de forma implícita la aparición de efectos secundarios no deseados. Esto nos ha llevado a estudiar si los tratamientos con 17 $\beta$ -estradiol o genisteína, una isoflavona presente en ciertos tipos de plantas, podrían ejercer un papel neuroprotector frente a la resistencia a la insulina y el daño isquémico asociados al envejecimiento femenino. Así, mediante el empleo de modelos animales y celulares, en este trabajo observamos que las diferencias en los niveles de estrógenos que existen entre distintas fases del ciclo estral modulan el metabolismo oxidativo cerebral de una forma específica de región. Además, el tratamiento agudo con 17 $\beta$ -estradiol, pero no con genisteína, redujo el impacto negativo del envejecimiento sobre la sensibilidad a la acción de la insulina en el córtex cerebral de ratas hembra. Sin embargo, el hecho de que la genisteína provocara la activación de la proteína quinasa B (Akt), la cual está implicada en múltiples procesos celulares, sugiere la existencia de otros mecanismos implicados en la mediación de los efectos neuroprotectores de este fitoestrógeno durante el envejecimiento femenino. Por último, tanto el 17 $\beta$ -estradiol como la genisteína ejercieron un papel neuroprotector frente a un daño por isquemia/reperfusión recurrente en un estudio *in vitro* realizado con la línea neuronal de hipocampo de ratón HT22. Este efecto protector pareció ser mediado, al menos en parte, por una mejoría del metabolismo oxidativo neuronal, el cual se había visto comprometido como consecuencia del daño isquémico. En conjunto, todo ello apunta a que los estrógenos juegan un papel muy importante en la regulación de diversas patologías a nivel central que pueden tener lugar durante el envejecimiento femenino. A pesar de que la genisteína no haya sido capaz de mimetizar este papel protector del estradiol en todas las patologías estudiadas, los resultados positivos encontrados con este fitoestrógeno, tales como la activación de Akt en el córtex cerebral de ratas hembra

## **RESUMEN - ABSTRACT**

---

viejas y su papel neuroprotector frente al daño isquémico recurrente, son esperanzadores y alientan a la realización de más estudios, bien sea utilizándolos como monoterapia o en terapias combinadas con otros fitoestrógenos.

Estrogens are essential hormones for the proper performance of brain function, in addition to its known role at the hypothalamic level on the neuroendocrine-reproductive axis. Thus, cyclic changes occurring in their levels throughout woman's sexual life can modulate brain homeostasis. However, it is at the end of the reproductive period when more obvious its importance become, since the decrease of estrogen levels following menopause can lead to several symptoms and pathologies, such as an increase of central insulin resistance or stroke incidence. In spite of the fact that hormone replacement therapy with estrogens can be effective to face many age-related diseases, sometimes it triggers undesired side effects. Taking this into account, we have studied whether treatments with  $17\beta$ -estradiol or genistein, an isoflavone present in several plants, could exert a neuroprotective role against insulin resistance and ischemic damage associated with female aging. Thereby, by using both cellular and animal models, we have shown that the differences in estrogen levels along different stages of the estrous cycle modulate brain oxidative metabolism in a region-specific manner. Moreover, acute treatment with  $17\beta$ -estradiol, but not with genistein, reduced the negative impact of aging on insulin sensitivity at the cerebral cortex of female rats. Nevertheless, the fact that genistein induced protein kinase B (Akt) activation, which is involved in multiple cellular processes, suggests that other possible mechanisms are involved in the neuroprotective effects of this phytoestrogen during female aging. Finally, both acute treatments with  $17\beta$ -estradiol and genistein performed neuroprotective actions against a recurrent ischemic/reperfusion damage in an *in vitro* study carried out with the HT22 neuronal line of mouse hippocampus. This protective effect seemed to be mediated, at least partially, by an improvement of the neuronal oxidative metabolism, which had been compromised due to the ischemic damage. In conclusion, it seems that estrogens play an important role in the regulation of several brain pathologies which can occur during female aging. In spite of the fact that genistein has not been able to mimic this protective role of estradiol in all, the positive results found with this phytoestrogen, such as Akt activation in the cerebral cortex of aged female rats and its neuroprotective role against recurrent ischemic damage, are promising and encourage us to carry out further studies, either by using them as monotherapy or in combination therapies with other phytoestrogens.



# **INTRODUCCIÓN**





### 1. Ciclo reproductivo femenino

La actividad sexual de la mayor parte de las hembras de los mamíferos depende de la repetición de un ciclo reproductivo. Dicho ciclo se define como el conjunto de acontecimientos fisiológicos que se producen en el sistema reproductor femenino a intervalos de tiempo cíclicos, debido a variaciones en los niveles hormonales, y que concluyen con la capacidad de reproducirse (1).

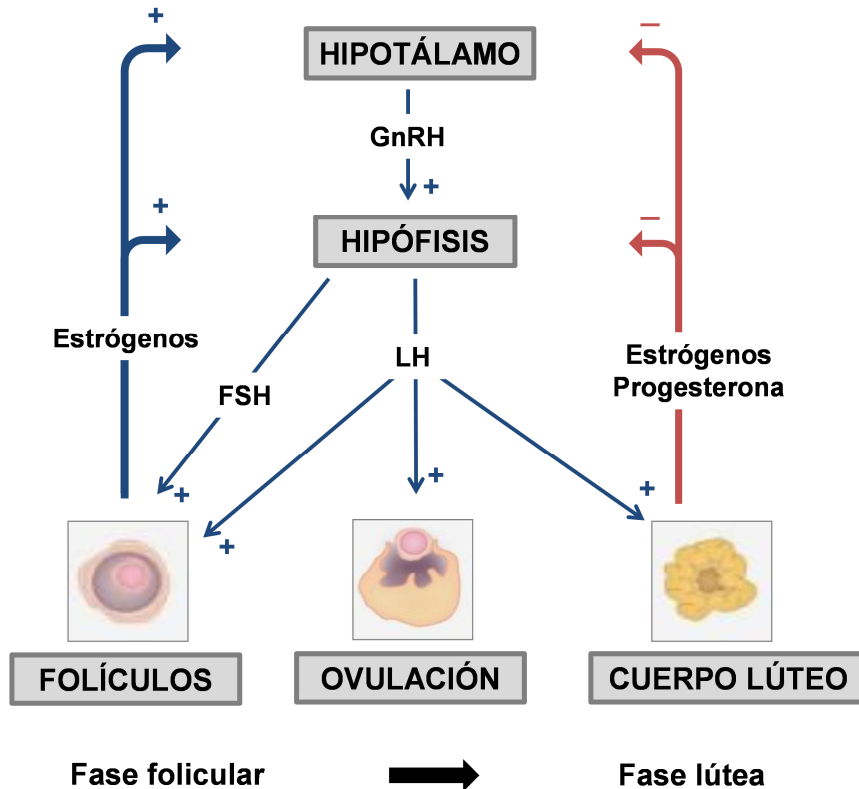
El ciclo reproductivo no puede considerarse como un hecho aislado, sino que depende de varios tejidos u órganos. En este sentido, el hipotálamo, la hipófisis y el tejido sexual son los responsables de la naturaleza repetitiva del ciclo, considerado en sí mismo como una integración neuroendocrina (2).

#### 1.1. Regulación del ciclo: eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

El ciclo reproductivo femenino está regulado por el “eje Neuroendocrino Reproductor”, que está constituido por tres sistemas perfectamente integrados: hipotálamo, adenohipófisis y ovario (1).

El hipotálamo sintetiza y secreta de forma pulsátil la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que, a través del sistema porta hipofisario, alcanza a la adenohipófisis, donde promueve la secreción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), las cuales son liberadas a la circulación para, posteriormente, llevar a cabo sus acciones sobre el ovario (3). Las hormonas FSH y LH desencadenan el desarrollo de una serie de folículos dentro del ovario que comienzan a secretar estrógenos, los cuales a su vez retroalimentan el eje mediante un *feedback* positivo sobre hipotálamo e hipófisis, que da lugar al pico pre-ovulatorio de LH (4). La LH desencadena la ovulación de los ovocitos maduros, la luteinización de las células de la teca y de la granulosa y la formación del cuerpo lúteo (5).

Posteriormente, las hormonas ováricas secretadas por el cuerpo lúteo, estrógenos y progesterona, ejercen un efecto de retroalimentación negativa inhibiendo la secreción de GnRH a nivel hipotalámico y de FSH y LH a nivel hipofisario (2) (*Figura 1*). Finalmente, el cuerpo lúteo degenera y las hormonas secretadas por el mismo disminuyen, dejando de ejercer esta acción inhibitoria y originando el inicio de un nuevo ciclo ovárico (2).



**Figura 1.** Esquema que muestra la regulación del ciclo ovárico por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. GnRH=hormona liberadora de gonadotropinas; FSH=hormona folículo estimulante; LH=hormona luteinizante.

## 1.2. Tipos de ciclo reproductivo: el ciclo estral en la rata

Los cambios endocrinos regulares, o ciclos, controlan la reproducción sexual de muchas especies de mamíferos. Sin embargo, existen distintos tipos de ciclos hormonales femeninos, específicos de especie, que pueden regular la reproducción. Entre ellos, destacan:

- **Ciclo menstrual:** característico de primates y humanos. Tiene una duración aproximada de 28 días, en los que se distinguen la fase folicular y luteínica (4).
- **Ciclo del estro:** característico de roedores, en los que tiene una duración de 4-5 días. En él se distinguen las fases de diestro, proestro, estro y metaestro (6).

Centrándonos en el ciclo estral, éste supone una serie de cambios tanto en el sistema reproductor como en los niveles de hormonas esteroideas circulantes. En él se pueden distinguir cuatro fases con características distintas: *diestro*, *proestro*, *estro* y *metaestro* (Tabla 1). Como modelo animal, la rata presenta una gran ventaja a la hora de analizar fenómenos endocrinos, ya que el ciclo se completa en 4-5 días, siendo posible, por tanto, el análisis repetido de estos periodos sin una demora excesiva. Este ciclo sólo se da en animales sexualmente maduros, estando ausente, por tanto, en los animales que aún no hayan alcanzado la madurez sexual, que sean viejos o que hayan sufrido ovariectomía.

En cuanto a los elementos que participan en el control del ciclo estral, el  $17\beta$ -estradiol, principal estrógeno secretado por el ovario, constituye uno de los factores básicos implicados en dicha regulación (2). Así, se ha demostrado que esta hormona aumenta la actividad espontánea del músculo uterino, favorece el desarrollo de los conductos finos de las glándulas mamarias y también interviene en el desarrollo y conservación del conducto genital (7).

**Tabla 1.** Características principales de cada fase del ciclo estral en rata.

ESTADIOS	DURACIÓN	CARACTERÍSTICAS	TIPOS CELULARES EN EPITELIO VAGINAL
<b>Diestro</b>	6 horas	Folículo de varios tamaños. El cuerpo lúteo continúa creciendo.	Muy pocas células y sin una forma definida.
<b>Proestro</b>	60 horas	El folículo tiene un crecimiento rápido y el cuerpo lúteo se encuentra en fase de regeneración.	Células nucleadas, que en ocasiones aparecen formando ramificaciones.
<b>Estro</b>	20 horas	Las células germinales sufren su maduración. Copulación.	Células escamadas.
<b>Metaestro</b>	8 horas	Ovulación. Folículos muy pequeños.	Abundante presencia de leucocitos que invaden el epitelio vaginal, acompañados de células nucleadas y mucus.

### 2. Estrógenos

Los estrógenos son hormonas sexuales sintetizadas principalmente en los ovarios (1). Aunque en menor cantidad, también se sintetizan en la corteza suprarrenal y el tejido adiposo, así como en la placenta durante el embarazo (2). Su síntesis tiene lugar a partir del colesterol y, en menor medida, acetil-CoA (2). Se pueden distinguir distintos tipos de estrógenos en el plasma, tales como el estriol, la estrona y el 17 $\beta$ -estradiol, siendo este último el principal estrógeno secretado como mencionamos anteriormente. Puesto que son hormonas esteroideas, los estrógenos son transportados en sangre unidos a albúmina y globulinas hasta alcanzar los tejidos diana, donde llevarán a cabo sus acciones fisiológicas. De este modo, tras la interacción específica con su receptor, pueden llevar a cabo acciones lentas o genómicas que suponen la regulación de la transcripción génica de determinados genes que se encuentran bajo su control. Además, los estrógenos también pueden ejercer acciones rápidas o no genómicas que, como veremos más adelante, abarcan distintas vías de actuación. En cuanto a su degradación, el hígado conjuga los estrógenos para formar glucurónidos y sulfatos, siendo estos productos posteriormente excretados por la bilis y la orina (2).

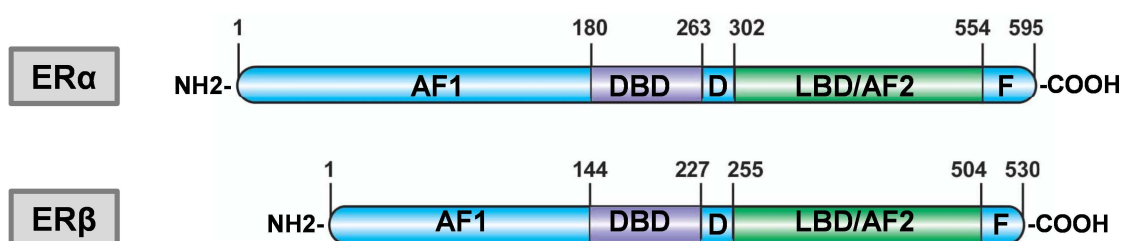
A nivel funcional, estas hormonas llevan a cabo numerosas acciones, entre las que destacan: su importante papel en el crecimiento y diferenciación de los órganos sexuales (4), el mantenimiento de la materia ósea (8), la protección vascular (9) y la modulación del funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) (10).

#### 2.1. Receptores de estrógenos

Los receptores de estrógenos (ERs) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormona esteroidea-tiroidea (11). En ellos se pueden distinguir varios dominios que difieren funcionalmente: el dominio amino-terminal de interacción con otras proteínas y activación de la transcripción (AF1), el dominio de unión al ADN (DBD), el dominio carboxilo-terminal de unión al ligando y transactivación (LBD/AF2), el dominio que contiene la señal de localización nuclear (D) y, finalmente, el dominio encargado de modular la actividad del receptor (F) (12) (*Figura 2*).

Existen dos subtipos del receptor de estrógenos que están codificados por genes distintos y son conocidos como ER $\alpha$  y ER $\beta$  (13). Estos subtipos presentan una elevada

homología en el dominio de unión al ADN. Sin embargo, en los dominios restantes presentan una elevada variabilidad (14,15), lo que implica una distinta afinidad por el ligando (16) y la generación de efectos diversos, incluso opuestos, en función del tipo celular o del tejido en el que se encuentran (17). De hecho, ambos subtipos de ERs se expresan en distinta abundancia en varios tejidos y tipos celulares, lo que también contribuye a la posibilidad de que existan distintos genes bajo el control de cada subtipo dependiendo del tipo celular, así como modelos de acción que podrían incluir cooperación o bien competición entre ER $\alpha$  y ER $\beta$  (12).



**Figura 2.** Esquema de los dominios funcionales de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ). Modificado de Lanzino y cols. (12).

En general, los receptores de estrógenos pueden unir gran variedad de ligandos, bien sean agonistas, antagonistas o los conocidos como moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs), que son un conjunto de moléculas que pueden actuar como agonistas o antagonistas del ER en función del tipo tisular (18). Tras ser activados por su ligando, ambos subtipos del ER forman un dímero con conformaciones diversas según el tipo de compuesto, originando la base estructural para la especificidad de ligando (19).

La genómica ha permitido la identificación de variantes de procesamiento alternativo o *splicing* del receptor de estrógenos. Respecto a ER $\alpha$ , la primera isoforma descrita es aquella que posee un peso molecular de 67kDa (ER $\alpha$ 67) (20). Cabe destacar también la existencia de otras isoformas acortadas, generadas por codones de inicio situados internamente en la secuencia génica, tales como la variante de *splicing* de 46kDa (ER $\alpha$ 46), que carece de la región AF-1 del extremo amino terminal (21), o la isoforma de 36kDa (ER $\alpha$ 36), que carece de los dominios de activación de la

transcripción, por lo que su papel biológico está íntimamente ligado al desarrollo de señales rápidas a nivel citoplasmático (22). En relación a ER $\beta$ , existe más controversia en cuanto a las distintas formas de *splicing*, lo que conlleva un desconocimiento mayor de su papel sobre la función celular.

### 2.2. Mecanismos de acción

Los estrógenos pueden llevar a cabo sus funciones mediante los mecanismos de acción conocidos como “clásicos”, “genómicos” o “lentos”, o bien mediante acciones denominadas por contraposición “no clásicas”, “no genómicas” o “rápidas”:

- Genómicos: Fueron los primeros en ser descubiertos. Su importancia reside en su capacidad para regular la expresión génica a través de receptores específicos situados en las proximidades del núcleo. El complejo esteroide-receptor entra en el núcleo y reconoce secuencias génicas específicas asociadas a la región promotora de genes regulados por estrógenos, a las que se une mediante el dominio de unión al ADN. Estas secuencias se conocen como elementos de respuesta a esteroides (ERE) (23). A continuación, el complejo se ve expuesto a la acción de elementos remodeladores y modificadores de la cromatina, los cuales descompactan la cromatina facilitando el reclutamiento de la maquinaria de transcripción de forma coordinada, originando así el inicio de la transcripción de los genes regulados por estrógenos (12).
- No genómicos: Estas acciones fueron descritas con posterioridad a los mecanismos genómicos, dando explicación a aquellos efectos de los estrógenos que ocurrían en intervalos de tiempo demasiado cortos como para ser originados por la modificación de la transcripción génica. Pueden generarse a partir de ERs localizados tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma. Existen diferentes teorías acerca del origen de estos ERs, defendiendo algunos autores la posibilidad de que estos ERs se encuentren anclados a la cara interna de la membrana plasmática mediante proteínas de la caveola (24,25), así como en otros compartimentos no-caveola de la membrana (26). Sin embargo, basándose en la similitud estructural que existe entre ambas poblaciones de ERs (27), la teoría más aceptada hoy en día es que los receptores localizados en la membrana son la misma proteína que el receptor nuclear, el cual es transportado a las

proximidades de la membrana mediante mecanismos post-traduccionales, como la palmitoilación (28,29). Independientemente de cuál sea el origen de estos ERs, los estrógenos pueden, a través de ellos, actuar sobre la membrana, alterando su permeabilidad para precursores o modificando el funcionamiento de sus receptores (30). También pueden alterar la excitabilidad celular (31,32), participar en la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (33) y de la quinasa de fosfatidilinositol (PI3K) (34), o en la modulación de receptores acoplados a proteínas G (35). Así mismo, también intervienen en la modulación del flujo de calcio y en la generación de nucleótidos cíclicos (33).

### **2.3. Funciones de los estrógenos a nivel del sistema nervioso central**

Los estrógenos tienen más funciones a nivel central además de las puramente reproductivas a través del hipotálamo. En este sentido, se sabe que ejercen una gran influencia en el desarrollo y en la plasticidad de circuitos del SNC, actuando sobre dendritas, axones y sinapsis (36). Por ejemplo, se ha observado que la eliminación de esteroides gonadales circulantes mediante ovariectomía en ratas hembra adultas produce una profunda disminución de la densidad de espinas dendríticas en las células piramidales del hipocampo. Sin embargo, cuando las ratas ovariectomizadas son tratadas con estradiol, este descenso es mucho menor (37). Además, se sabe que el cerebro es uno de los órganos que más sufre con la caída de estrógenos motivada por la menopausia, tanto natural como quirúrgica. Los daños producidos a consecuencia de los procesos neurodegenerativos en la demencia pueden ser retardados por la acción de los estrógenos (38), dejando entrever su potencial neuroprotector. En este sentido, los estrógenos son capaces de prevenir la muerte neuronal en modelos de daño cerebral (39) y mejorar procesos inflamatorios (40). Además, son capaces de ejercer efectos beneficiosos en modelos de enfermedad de Parkinson, por ejemplo mejorando ciertas alteraciones bioquímicas y conductuales inducidas por inyección estriatal de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) en ratas hembra ovariectomizadas (41), y de proteger a las neuronas frente al daño oxidativo y la toxicidad  $\beta$ -amiloide, principal motivo subyacente a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (42).



Por otro lado, diversos estudios han demostrado la relación entre las hormonas esteroideas y el metabolismo cerebral mediante distintos parámetros, tales como consumo de oxígeno (43), captación de análogos de la glucosa (44) o tomografía por emisión de positrones (PET) (45). Así, se ha comprobado que los estrógenos pueden influir en el metabolismo cerebral, bien sea modificando la estructura o la función de varios componentes de la cadena de transporte de electrones (46,47). En concreto, se ha visto que pueden modular la actividad de enzimas mitocondriales clave implicados en la respiración celular y en el metabolismo oxidativo (46-48). En este sentido, la citocromo c oxidasa (CO) es un enzima de la membrana mitocondrial interna que cataliza el último paso de la cadena de transporte de electrones, permitiendo en último lugar la producción de energía celular en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa. Su papel crítico en el metabolismo energético, así como la dependencia del cerebro del metabolismo aeróbico para obtener energía, hacen que la CO sea considerada como un marcador endógeno fiable de actividad cerebral (49).

Los estrógenos también influyen en tareas de aprendizaje y memoria relacionadas con la corteza cerebral y el hipocampo. Por ejemplo, se ha observado que el tratamiento con estrógenos en ratas hembra ovariectomizadas mejora la adquisición en el laberinto radial (50) y en el laberinto en T (51). En la misma línea, también se ha comprobado que la caída de estrógenos tras la menopausia puede comprometer la función cortical, pudiendo ser revertida por tratamiento hormonal exógeno (52). Cabe destacar que ambas regiones, corteza cerebral e hipocampo, presentan una alta densidad de ERs (10,53,54) y juegan un papel indispensable en procesos cognitivos clave, tales como aprendizaje y memoria (55,56).

### **2.3.1. Corteza cerebral**

La corteza cerebral o neocorteza está considerada como una de las regiones cerebrales con una mayor dependencia funcional del estradiol (57). Esta idea se ha visto respaldada por estudios de inmunofluorescencia que evidenciaron la presencia de receptores intracelulares estrogénicos ER $\alpha$  y ER $\beta$  en esta región (54,58), así como por hallazgos previos realizados por otros autores que mostraron que las espinas dendríticas del córtex cerebral son moduladas cíclicamente durante el ciclo estral (52).

Desde la antigüedad, a la corteza cerebral se le ha atribuido un papel fundamental en la función motora (59). Sin embargo, hoy en día también es conocida su implicación en la percepción, audición, visión, lenguaje, control de emociones, aprendizaje y memoria (60). La corteza cerebral se corresponde con la parte superficial del cerebro. En humanos, primates y otras especies se caracteriza por poseer numerosos pliegues o circunvoluciones separados por hendiduras denominadas surcos y cisuras. Estructuralmente, la corteza se puede dividir en distintas áreas siguiendo estos surcos y cisuras, tales como la corteza temporal, parietal, occipital y frontal (4). Dentro del lóbulo frontal se encuentra la corteza prefrontal (PFC) (60), que a su vez se divide en corteza prefrontal medial (mPFC) y dorsolateral. La mPFC consta de varias regiones en base a un criterio citoarquitectónico (61), distinguiéndose así la corteza prefrontal ventromedial, que comprende las regiones infralímbica (IL) y prelímbica (PL), y la corteza prefrontal dorsomedial, que abarca la corteza cingulada (CG) y la corteza motora secundaria (FR2). Han sido halladas diferencias de conectividad en estas regiones (62), implicando, por tanto, también diferencias funcionales.

De entre las funciones de la corteza prefrontal, destaca su importante papel en la memoria de trabajo, atención, iniciación de la respuesta, dirección del control autónomo y emoción (63). Algunos estudios se han centrado en los efectos que producen las terapias de reemplazamiento hormonal (HRT) sobre la función cortical deteriorada por ovariectomía. Así, se ha descubierto que el tratamiento exógeno con estradiol mejora la función cortical, bien sea mediante el incremento de la densidad de espinas dendríticas (52), o mediante la preservación de la morfología mitocondrial presináptica, que se correlaciona con una mejora de la memoria de trabajo (64).

Por otro lado, algunos estudios también han demostrado que la corteza prefrontal recibe conexiones de estructuras subcorticales como el hipocampo (65-67) (*Figura 3*). Esta vía fue descrita por primera vez en la rata por Swanson en 1981 (67), quien observó inervaciones directas desde el hipocampo hacia la región infralímbica de la corteza prefrontal. Posteriormente, se descubrió que esta vía también inerva la región prelímbica (68,69). Concretamente, las fibras procedentes del hipocampo penetran en primer lugar en el área infralímbica y finalmente alcanzan el área prelímbica de la corteza prefrontal (66).



de Ammón (CA) y el giro dentado (GD). El cuerno de Ammón está formado principalmente por una gran capa de células piramidales, en la que se pueden establecer cuatro divisiones citoarquitectónicas según el tamaño, forma y distribución de las neuronas: CA1, CA2 y CA3 en la rata, hallándose además la región CA4 en el ser humano. Por su parte, el giro dentado está formado por neuronas granulares (74). Además, el hipocampo también se puede dividir en las regiones dorsal y ventral, poseyendo ambas las distintas áreas del cuerno de Ammón y el giro dentado. Sin embargo, dada la extensión del hipocampo y las diferentes proyecciones que reciben sus zonas dorsal y ventral, algunos autores sugieren que ambas regiones pueden diferenciarse funcionalmente (75,76). En este sentido, la distribución de los receptores de estrógenos en el hipocampo parece no ser homogénea, ya que estudios inmunocitoquímicos para ER $\alpha$  nuclear han mostrado mayor densidad de éste en el hipocampo ventral que en la zona dorsal (10). En la misma línea, técnicas de autorradiografía con <sup>125</sup>I-estradiol para marcar a los ERs, evidenciaron sitios potenciales de actuación de estrógenos en células piramidales hipocampales, particularmente en la región ventral del hipocampo (38). Además, estudios de radioinmunocitoquímica han encontrado también diferencias en cuanto a los efectos llevados a cabo por los estrógenos, teniendo una mayor actuación sobre las sinapsis del hipocampo ventral que dorsal (77).

### **3. Homeostasis de la glucosa y la insulina**

La homeostasis de la glucosa es un proceso complejo que implica la comunicación entre varios tejidos (78). En condiciones de ayuno, los niveles de glucosa en sangre se mantienen bajos, al igual que los niveles de insulina. Sin embargo, al mismo tiempo se encuentran elevados los niveles de hormonas como el glucagón, la adrenalina y los corticoesteroides, promoviendo la producción de glucosa hepática. Por el contrario, en estado postprandial los niveles de glucosa en sangre aumentan, lo que conlleva la secreción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas. La insulina es la única hormona capaz de disminuir la concentración de glucosa en sangre gracias a que estimula la captación de glucosa por los tejidos, inhibiendo a la vez la glucogenolisis y la gluconeogénesis a nivel hepático (79).

La captación de glucosa por los tejidos tiene lugar gracias a los transportadores de glucosa (GLUTs), los cuales permiten el transporte facilitado de glucosa a través de la membrana plasmática de las células. Hasta la fecha han sido identificados hasta trece miembros distintos de la familia de los GLUTs en los mamíferos (80). Cada uno de los transportadores de glucosa posee distintas afinidades para glucosa y otras hexosas como la fructosa. Por ejemplo, GLUT1, GLUT3 y GLUT4 tienen alta afinidad por la glucosa, permitiendo el transporte de la misma a alta tasa bajo condiciones fisiológicas normales (81,82).

Teniendo en cuenta que la glucosa es la principal fuente de energía en el cerebro (83), la expresión de estos GLUTs es un determinante crítico para la correcta captación de glucosa a nivel central. En concreto, GLUT3 está ampliamente distribuido por el SNC y es, junto a GLUT1, el principal responsable de la captación y utilización de glucosa en el cerebro (84,85). Al contrario que GLUT1 y GLUT3, GLUT4 es un transportador de glucosa dependiente de insulina, sin embargo, también ha sido hallado en el tejido cerebral (57,86). Su exclusiva localización en sitios muy específicos podría indicar su implicación en tareas altamente especializadas en el SNC (85), y sugerir que en el cerebro también tiene lugar la captación de glucosa estimulada por insulina (86). GLUT4 se encuentra casi completamente secuestrado en compartimentos intracelulares en condiciones basales, siendo translocado a la membrana plasmática celular en respuesta a la acción de la insulina (87).

Como mencionamos anteriormente, la insulina juega un papel fundamental en la regulación de la concentración de glucosa en sangre. Se trata de una hormona anabólica y anticatabólica esencial para el correcto crecimiento y desarrollo de los tejidos, así como para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (88). Esta hormona peptídica es sintetizada y secretada principalmente por las células  $\beta$ -pancreáticas de los islotes de Langerhans, y su gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 (89). Aún no se conocen al completo los mecanismos que regulan su síntesis, aunque se considera que la glucosa es el principal regulador de la misma (90), sin embargo, otros nutrientes como los ácidos grasos también intervienen en este proceso (91).

Para ejercer su efecto regulador sobre la homeostasis de la glucosa, la insulina tiene como principales tejidos diana al hígado, al músculo y al tejido adiposo. A nivel hepático, destaca su acción inhibitoria sobre la gluconeogénesis y la glucogenolisis (79),

lo que conduce a un descenso en la producción de glucosa. En los tejidos muscular y adiposo, la insulina incrementa la tasa de captación de glucosa a través del transportador de glucosa dependiente de insulina (GLUT4), estimulando la entrada de glucosa desde el plasma hacia el interior celular (92). Sin embargo, también han sido identificados receptores de insulina (IRs) en células sanguíneas, intestinales y gonadales (93,94), lo que sugiere que los efectos de la insulina podrían ir más allá de sus órganos diana clásicos. En esta línea, durante un largo tiempo se ha considerado al cerebro como un órgano insensible a la acción de la insulina. No obstante, tanto la insulina como los IRs fueron encontrados a lo largo del tejido cerebral (95), sugiriendo la implicación de la insulina en la fisiología y patofisiología del cerebro (96).

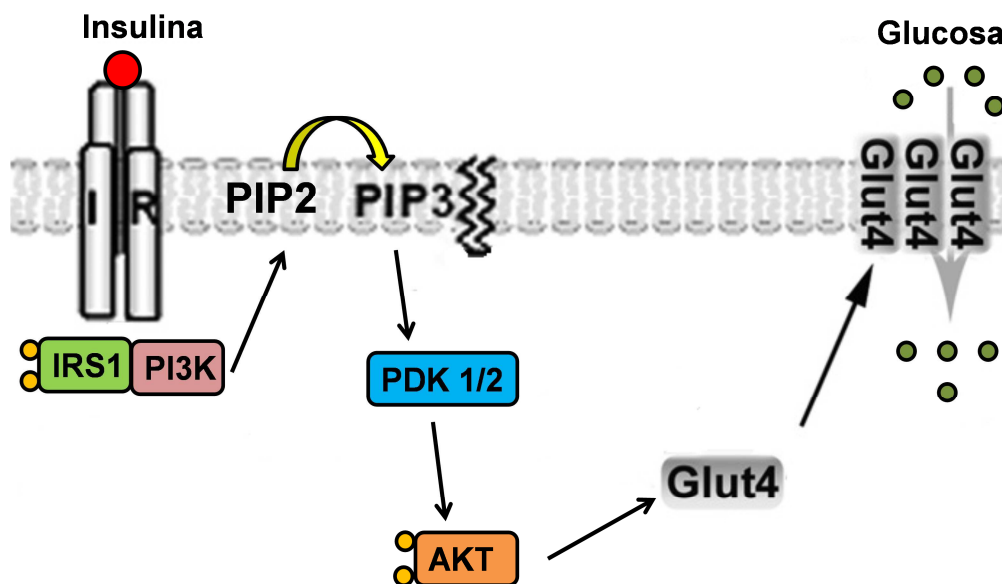
### **3.1. Cascada de señalización intracelular de la insulina**

Al igual que ocurre en los tejidos periféricos, la señalización de la insulina a nivel del SNC también está mediada por interacciones proteína a proteína. Como toda hormona peptídica, la insulina comienza su mecanismo de acción mediante la unión específica a su receptor de membrana (97), el cual pertenece a la familia de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (98). La unión de la insulina produce la activación mediante autofosforilación del IR que, una vez activado, es capaz de reconocer y fosforilar varias proteínas adaptadoras, entre las que destacan la familia de sustratos del receptor de insulina (IRS), siendo el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) la mejor caracterizada (57). En este punto, las vías principales que surgen a partir de las proteínas IRS son la vía de la quinasa del fosfatidilinositol (PI3K) (99) y la vía de la proteína asociada a c-Cb1/receptor cannabinoide de tipo 1/miembro de la familia Rho de GTPasas (CAP/Cb1/TC10) (100), que están implicadas en las acciones metabólicas de la insulina. Así mismo, a partir de aquí también nace la vía de las MAPK, relacionada con las acciones mitogénicas de la hormona (101).

Centrándonos en la vía de PI3K, éste es un enzima formado por una subunidad reguladora (p85 $\alpha$ ) que posee dominios SH2 mediante los que puede unirse a IRS1, y una subunidad catalítica (p110 $\alpha$ ) con actividad lípido serín quinasa (102). En condiciones basales, p85 $\alpha$  estabiliza a p110 $\alpha$  y la mantiene con bajos niveles de actividad (103). Sin embargo, el estímulo de la insulina hace que p85 $\alpha$  se una a IRS1, lo que provoca la eliminación de la inhibición ejercida sobre p110 $\alpha$  y el reclutamiento de

## INTRODUCCIÓN

PI3K desde el citosol hacia la membrana plasmática (104). Una vez en la membrana, PI3K cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), originando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) (105). A continuación, el PIP<sub>3</sub> activa a las quinasas dependientes de PIP<sub>3</sub> (PDK1/2), que son serín/treonín quinasas que a su vez fosforilan y activan a la proteína quinasa B (Akt) (106). Esta activación de Akt sucede gracias a la fosforilación del residuo de serina 473 y, una vez activada, Akt está implicada en la translocación del transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT4) desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática, facilitando así la captación de glucosa por las células (107,108) (Figura 4). En estado basal, GLUT4 circula lentamente entre la membrana plasmática y los compartimentos intracelulares en los que se almacena, tales como el sistema endosómico, elementos túbulo-vesiculares citoplásmicos y la red trans-Golgi (109). Sin embargo, la unión de la insulina al IR aumenta la tasa de exocitosis del transportador, al mismo tiempo que disminuye su internalización mediante endocitosis, lo que conduce a un incremento neto de los niveles de GLUT4 en la membrana plasmática y al consiguiente aumento de la glucosa captada hacia el interior celular (110).



**Figura 4.** Representación de la vía de señalización intracelular de la insulina. IR=receptor de insulina; IRS1=sustrato del receptor de insulina 1; PI3K=quinasa del fosfatidilinositol; PIP<sub>2</sub>=fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PIP<sub>3</sub>=fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PDK1/2=quinasa dependiente de PIP<sub>3</sub>; AKT=proteína quinasa B; GLUT4=transportador de glucosa 4. Modificado de Ren y cols. (111).

Por último, se cree que la insulina y los IRs pueden tener más funciones en el cerebro a parte de su papel metabólico relacionado con la regulación de la captación de glucosa. Por ejemplo, también están implicados en la regulación central de la homeostasis corporal, en la modulación de la plasticidad sináptica, en la supervivencia neuronal o en el aprendizaje y la memoria (112-114).

#### 4. Envejecimiento femenino y cese de la función ovárica

El envejecimiento se define como la acumulación progresiva de cambios con el tiempo que reducen la capacidad del individuo para enfrentarse a situaciones de estrés, disminuyendo así sus posibilidades de supervivencia (115). En 1982, Strehler (116) definió los cuatro pilares básicos del proceso de envejecimiento, según los cuales éste es un fenómeno:

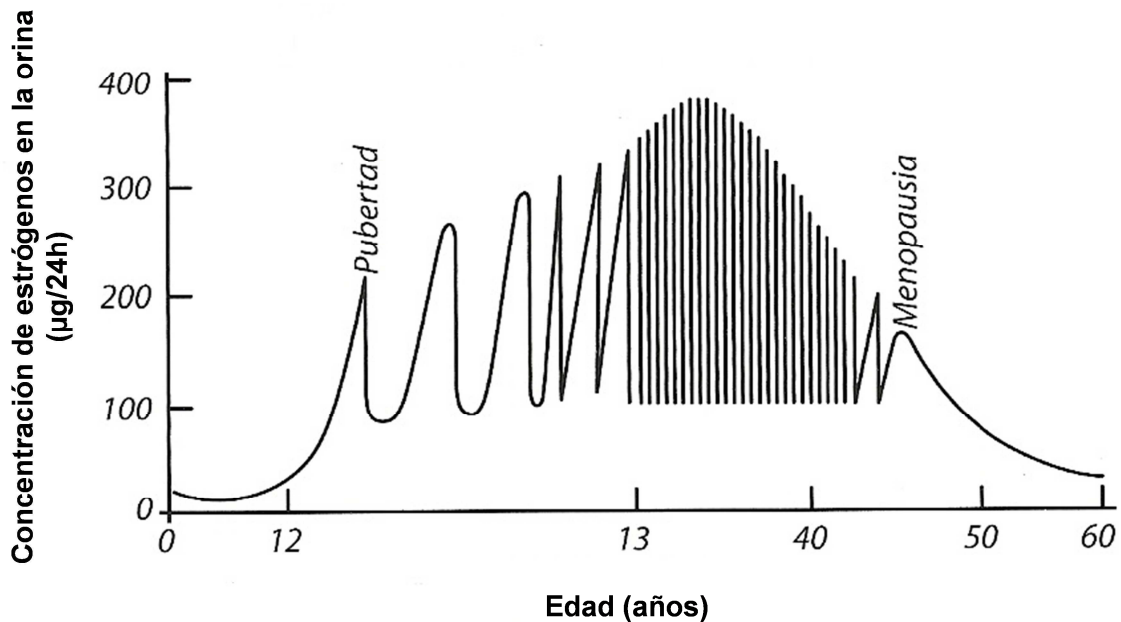
- Universal: los fenómenos asociados al proceso de envejecimiento deben darse, en menor o mayor medida, en todos los individuos de una especie.
- Intrínseco: las causas que lo provocan deben ser de origen endógeno, es decir, no depender de factores externos.
- Progresivo: los cambios que conducen al envejecimiento deben suceder de manera paulatina a lo largo de la vida.
- Deletéreo: un determinado fenómeno sólo se considerará parte del proceso de envejecimiento si es dañino.

En las mujeres, el envejecimiento conlleva un periodo durante el cual se producen importantes alteraciones endocrinas, somáticas y psicológicas, y que culmina finalmente con la aparición de la menopausia. La menopausia es el cese permanente de las menstruaciones como consecuencia de una pérdida irreversible de determinadas funciones ováricas, incluyendo la ovulación y la producción de estrógenos (1) (*Figura 5*). La edad media de la menopausia se sitúa en torno a los 51 años (4,117), aunque puede variar debido tanto a factores genéticos (118) como ambientales (117).

Asociados a la disminución de la producción estrogénica que se produce durante la menopausia, pueden aparecer distintos síntomas, tales como inestabilidad vasomotora, sofocos, alteraciones metabólicas y atrofia urogenital (1). Así mismo, tanto el envejecimiento *per se* como la deficiencia estrogénica aumentan el riesgo de padecer



osteoporosis, enfermedades cardio- y cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas asociadas a déficit cognitivo (4).



**Figura 5.** Secreción de estrógenos durante la vida sexual de la mujer. Modificado de Guyton y Hall (2).

### 4.1. Desequilibrio de la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina

El envejecimiento se caracteriza por la pérdida de la capacidad para mantener estable el medio interno del individuo (pérdida de la homeostasis), lo que conduce a una alteración de las funciones metabólicas (119). El mantenimiento de los niveles sanguíneos de glucosa dentro de unos límites fisiológicos es imprescindible para el desarrollo de la vida, ya que constituye uno de los principales sustratos energéticos del organismo (120). Debido a su alta dependencia del consumo de glucosa, el cerebro es uno de los órganos que más sufre con este decaimiento metabólico, tanto en roedores (121) como en humanos (122). De hecho, estudios de PET utilizando radiofármacos como la  $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG), han mostrado un descenso del consumo cerebral de glucosa en ratas hembra asociado no sólo al envejecimiento, sino también a la ovariectomía temprana (120). Estos datos parecen indicar que el decaimiento de los niveles hormonales inherente a la menopausia también influye en el desequilibrio de la homeostasis cerebral.

Dado que la insulina es la principal hormona que regula el metabolismo de los hidratos de carbono, la disminución en la sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina, inherente al fenómeno de envejecimiento, puede ser considerada como el sello de este empeoramiento metabólico (123). Esta resistencia de los tejidos a la acción de la insulina ha sido contrastada tanto en humanos como en roedores (124-126), y se define como un estado en el que las células diana fracasan en su respuesta a los niveles normales circulantes de insulina, lo que provoca una incapacidad de la hormona para mantener la homeostasis de carbohidratos y lípidos (127). Sin embargo, debido a que la insulina es una hormona multifuncional, el fenómeno de resistencia a la insulina no sólo afecta a la regulación de la homeostasis energética, sino que se trata de un síndrome complejo que afecta a diferentes tejidos con diversas consecuencias patológicas (128). Esta circunstancia puede condicionar la calidad de vida de las mujeres postmenopáusicas, ya que hay evidencias que muestran que la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia asociada están en la base de varias enfermedades relacionadas con la edad, tales como diabetes mellitus tipo II (129), patologías cardio-circulatorias (130) o enfermedades neurodegenerativas (131). Adicionalmente, se piensa que la resistencia a la acción de la insulina es la causa principal del desarrollo del síndrome metabólico, que se caracteriza por dislipidemia, hipertensión y obesidad visceral (132), y que se ha convertido en un importante problema de salud en nuestros días.

Existe un amplio debate acerca de los mecanismos mediante los cuales el envejecimiento disminuye la sensibilidad a la acción de la insulina. Algunos autores defienden que se debe al incremento en la captación de ácidos grasos y a una alteración en su almacenaje (133). Sin embargo, otros autores señalan a los altos niveles de leptina (134) y al aumento del estrés oxidativo (135) como posibles causas. Así mismo, parece que en las mujeres la caída de estrógenos durante la menopausia también influye notablemente en la disminución tanto de la sensibilidad a la insulina como de la captación de glucosa estimulada por esta hormona (136). Esta idea se deriva de varios estudios que demuestran el efecto regulador que pueden ejercer las hormonas sexuales sobre el estado de sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, se ha observado que variaciones en los niveles plasmáticos de esteroides sexuales durante el ciclo ovárico, la gestación o la menopausia, se corresponden con variaciones en la sensibilidad a la acción de la insulina de los tejidos diana (124,137,138). En la misma línea, experimentos de anclaje euglicémico hiperinsulinémico para cuantificar la sensibilidad

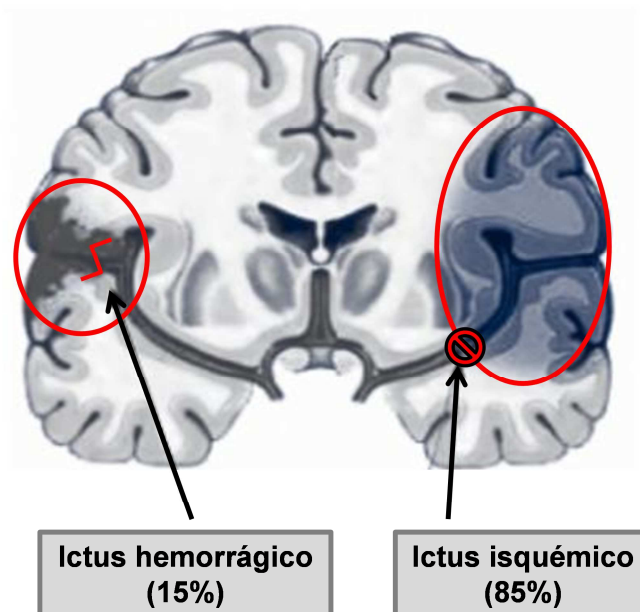
general a la acción de la insulina, también han encontrado un incremento de la resistencia a la acción de esta hormona después de ovariectomía que, sin embargo, disminuye en respuesta al tratamiento exógeno con estradiol, el cual restituye nuevamente una sensibilidad normal a la acción de la insulina (123).

La resistencia a la acción de la insulina no puede ser considerada únicamente como una alteración sistémica uniforme, sino que más bien se cree que existe además un componente específico de tejido (139). En este sentido, se han postulado varias explicaciones posibles al descenso de la sensibilidad a la insulina inherente al proceso de envejecimiento a nivel central. Por una parte, dado que no se ha encontrado síntesis significativa de insulina en el SNC (140), se cree que los transcritos de esta hormona hallados en neuronas acceden al cerebro a través de un sistema de transporte saturable basado en receptor que les permite atravesar la barrera hematoencefálica (141). Sin embargo, este sistema de transporte podría deteriorarse debido a la hiperglucemia asociada al envejecimiento (142), sugiriendo que al menos parte de la resistencia central a la insulina podría ser causada por un deterioro en el sistema de transporte que permite la entrada de insulina en el cerebro (141). Por otro lado, cada vez cobra más fuerza la teoría que propone posibles alteraciones en algunos pasos de la ruta de señalización intracelular de esta hormona para explicar el aumento de la resistencia central a la insulina (57). En este sentido, existen varios trabajos que demuestran los efectos neuroprotectores de los estrógenos en el SNC (143-145), los cuales podrían ser mediados, entre otras rutas, a través de la vía de señalización de PI3K (144). Además, el tratamiento con estradiol podría modificar algunos pasos de la cascada de señalización intracelular de la insulina (57), así como la utilización de glucosa en el cerebro (44,146), lo que deja entrever el posible efecto regulador de los estrógenos en cuanto a la sensibilidad a la insulina también en el SNC.

### **4.2. Daño cerebral isquémico**

El accidente cerebrovascular (ACV) o ictus consiste en un daño neurológico debido a una reducción importante del flujo sanguíneo cerebral. En la mayoría de los casos se debe a una interrupción súbita e inmediata del flujo sanguíneo por oclusión de alguna de las arterias que irrigan la masa encefálica como consecuencia de la formación de coágulos o placas de aterosclerosis, lo que se conoce como “ictus isquémico”. De

manera menos frecuente, también puede darse por la rotura de un vaso sanguíneo intracerebral o de las envolturas cerebrales, denominándose en este caso “ictus hemorrágico” (147) (*Figura 6*).



**Figura 6.** Esquema de ambos tipos de ictus y su incidencia. Modificado de Sabín y Vallejo (147).

En cuanto a su incidencia, el ictus es una de las principales causas de muerte en todo el mundo (148) y, lo que es aún más preocupante, se estima que el número de casos será incluso superior en las próximas décadas (149), debido principalmente al estilo de vida de la sociedad moderna. La falta de aporte de oxígeno y nutrientes que se produce durante un daño isquémico conduce a la necrosis y a la muerte celular por apoptosis (150-152). La necrosis es un proceso de muerte celular generalmente rápido como consecuencia de un evento patológico. En cambio, la apoptosis generalmente constituye una forma de muerte celular más lenta como resultado de la activación de un programa determinado genéticamente para mantener la homeostasis del organismo. Sin embargo, la apoptosis también puede jugar un papel importante en condiciones patológicas, como por ejemplo en el daño cerebral isquémico para eliminar las células dañadas de una forma ordenada sin inducir una excesiva respuesta inflamatoria (153). La reperusión que sigue al período de hipoxia en un daño isquémico es crítica para la supervivencia del tejido, pero también puede contribuir al daño generado debido al

mantenimiento de una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de una elevada respuesta inflamatoria (154). Durante el daño provocado por la isquemia/reperfusión (I/R), se produce un fallo en el sistema de transporte activo de iones y, en consecuencia, un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que conduce al deterioro y a la muerte celular (154). Además, se produce un malfuncionamiento de la cadena de transporte de electrones que provoca una producción excesiva de ROS, lo que puede conducir a la muerte celular a través de la privación de energía o la apoptosis desencadenada por las propias ROS (155). De hecho, se conoce que estas ROS generadas durante la I/R inducen la fragmentación del ADN, lo que lleva a la sobreactivación del enzima nuclear polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP), siendo PARP-1 el primer miembro descubierto de esta familia de polimerasas (154). Esta proteína está implicada en tareas de reparación del ADN en respuesta al estrés ambiental (156). Su sobreactivación resulta en un rápido descenso de su sustrato, el  $\text{NAD}^+$ . La resíntesis de este  $\text{NAD}^+$  requiere ATP y, por tanto, supone una excesiva demanda del metabolismo energético que finalmente puede conducir a la muerte celular (154). Es conocido que las caspasas 3 y 7 pueden generar la escisión e inactivación de PARP durante el proceso de apoptosis (157), en un intento de proteger el almacenaje de estos sustratos energéticos contra este uso excesivo llevado a cabo por PARP en esta situación, dejando así la suficiente energía para finalizar correctamente el proceso apoptótico (158). Por este motivo, la escisión de PARP suele utilizarse como un marcador de células que sufren apoptosis (159).

Por otro lado, ante la situación de hipoxia y escasez de nutrientes que se produce durante un ictus, las células necesitan activar sistemas de supervivencia que les permitan sobreponerse a estas condiciones extremadamente adversas. En este marco, los factores inducibles por la hipoxia (HIFs) juegan un papel muy importante. Dentro de la familia de los HIF, HIF-1 es un factor de transcripción altamente conservado que constituye un heterodímero compuesto por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (160). La expresión de HIF-1 $\beta$  es constitutiva, mientras que la expresión y la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  están negativamente reguladas por los niveles de oxígeno (161). En una situación de normoxia, las subunidades  $\alpha$  de HIF son hidroxiladas en residuos de prolina por prolin hidroxilasas (PHs), permitiendo así su reconocimiento y ubiquitinación por ubiquitín ligasas, que las etiquetan para su posterior degradación por el proteasoma (162). Sin embargo, en condiciones hipóxicas las HIF prolin hidroxilasas son inhibidas, ya que

necesitan el oxígeno para llevar a cabo su acción (163). Por lo tanto, el heterodímero se estabiliza en condiciones de baja concentración de oxígeno y es translocado al núcleo donde se une a elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en las regiones promotoras e induce la transcripción de varios genes que contrarrestan los efectos de la hipoxia (161). De este modo, varias proteínas tales como la eritropoyetina, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), algunos transportadores de glucosa y varios enzimas glucolíticos están bajo el control de HIF-1 (164). Mediante la regulación de estas proteínas las células tratan de adaptarse a la situación de baja disponibilidad de oxígeno.

Al mismo tiempo, ante una situación de daño isquémico se pueden activar mecanismos de autofagia (165,166). La autofagia es un proceso altamente conservado que permite a las células reciclar el contenido citoplasmático. Por ello, participa en la regulación de múltiples procesos celulares, incluyendo supervivencia ante una situación de estrés (167). Aunque el término autofagia se utiliza en general para hablar de la macroautofagia, hay que tener en cuenta que existen también otros tipos de autofagia, tales como la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas o la crinofagia. No obstante, el mecanismo más conocido de todos ellos es el de la macroautofagia, la cual consiste en la digestión de componentes citoplasmáticos mediante un proceso de proteólisis dentro de estructuras de doble membrana, denominadas autofagosomas, que a continuación se fusionan con un lisosoma que digiere el contenido por hidrólisis (168). La compleja maquinaria molecular responsable de la macroautofagia, de aquí en adelante referida simplemente como autofagia, conduce a la lipidación de la cadena ligera 3 de la proteína asociada a los microtúbulos 1A/1B (LC3) (167). Durante la formación de las membranas del autofagosoma, la LC3 citosólica (LC3-I) es conjugada con fosfatidiletanolamina dando lugar a la forma lipidada de LC3 (LC3-II), que constituye un elemento específico de la membrana autofagosomal (169), y cuyo incremento se corresponde con un aumento de la actividad autofágica (170). Además, existen otros marcadores moleculares del proceso de autofagia, tales como p62 (171) y beclin-1 (172), aunque su mecanismo de actuación es menos conocido. Mediante este proceso, las células inmersas en un estado de utilización de mínima energía debido a condiciones desfavorables, obtienen fuentes de energía alternativas y pueden eliminar proteínas alteradas o desechos moleculares (173). Así, la activación de la autofagia resulta en un incremento en la disponibilidad de nutrientes dentro del citoplasma en

condiciones de estrés nutricional. No obstante, hay evidencias que apuntan a que un exceso de la actividad autofágica podría conducir también a la muerte celular (174).

### **4.2.1. Etiología del ictus: el papel protector de los estrógenos**

Existen varios factores de riesgo a tener en cuenta en la patología del daño isquémico cerebral, de entre ellos caben destacar: la edad, la raza/etnia, el sexo, la hipertensión, el tabaquismo y el alcoholismo (147). Atendiendo a las diferencias por sexo, las mujeres tienen una menor probabilidad de sufrir un ictus que los hombres hasta la llegada de la menopausia (175). Sin embargo, a lo largo de la vejez se invierte esta incidencia, siendo las mujeres más propensas que los hombres a padecer un ACV (176). Este incremento marcado en la mujer, que coincide con la disminución de la producción de estrógenos durante la menopausia, ha llevado a muchos investigadores a centrarse en los efectos beneficiosos potenciales de esta hormona para reducir el daño cerebral isquémico. Siguiendo esta línea, algunos estudios con roedores han demostrado que la protección contra el daño cerebral isquémico y su baja mortalidad asociada en ratas hembra intactas, desaparecen después de una ovariectomía, pudiendo ser nuevamente revertidas con reemplazamiento estrogénico (177). Así mismo, el reemplazamiento con dosis fisiológicas de estradiol promueve neuroprotección en ratas ovariectomizadas expuestas a un daño isquémico, a través de una mejoría en la capacidad de vasodilación y un aumento en la tasa de flujo sanguíneo cerebral (9).

Complementando los estudios anteriormente mencionados, también se cree que los estrógenos pueden mediar neuroprotección en situaciones de ictus por otras vías, por ejemplo regulando directamente la transcripción de moléculas pro- y anti-apoptóticas a través de los ERs clásicos (178), así como bloqueando vías apoptóticas y promoviendo la supervivencia celular mediante efectos rápidos, como la activación de la cascada de PI3K/Akt (179). Además, también se ha comprobado que los estrógenos pueden conferir neuroprotección mediante una reducción de la excitotoxicidad (180) o bien a través de factores de crecimiento, como por ejemplo mediante la interacción con el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1-R) (181). Por otro lado, también se ha observado que el tratamiento con estrógenos en ratas hembra ovariectomizadas sometidas a un daño isquémico, mejoraba algunas funciones

cognitivas, tales como pruebas de memoria de trabajo espacial y de memoria visual (182).

Por último, hay muchas evidencias en la literatura acerca de los efectos del tratamiento con estrógenos, administrados tanto pre- como post-isquemia, sobre distintos mecanismos dañados a consecuencia del ictus. Sin embargo, cabe tener en cuenta que en ocasiones los ictus pueden repetirse y presentarse como recurrentes, especialmente poco tiempo después de haberse producido el primero (147,183). En este sentido, el tratamiento con estrógenos parece no reducir la frecuencia de aparición de un segundo ictus (184), aunque poco se sabe acerca de si los estrógenos administrados tras un primer daño isquémico podrían proteger frente al deterioro ocasionado por ictus posteriores.

### **4.3. Alternativas a las terapias clásicas de reemplazamiento hormonal: Los fitoestrógenos**

Es un hecho contrastado que la esperanza de vida ha aumentado en las últimas décadas gracias a la mejora del sistema sanitario y la alimentación, especialmente en los países desarrollados. Sin embargo, esta situación conlleva que las mujeres pasen más de un tercio de sus vidas en una situación post-menopáusica (185), lo que ha llevado a la medicina moderna a centrarse en el desarrollo de terapias que ayuden a paliar las consecuencias derivadas del estado hipoestrogénico característico de la menopausia. En este sentido, como se ha argumentado anteriormente, la terapia de reemplazamiento clásica, compuesta por estrógenos en monoterapia o bien asociados a la progesterona, resulta efectiva para paliar muchas de las consecuencias inherentes a la menopausia. Sin embargo, a medio y largo plazo el tratamiento con estrógenos puede actuar en ocasiones como promotor del cáncer de mama (186,187), de hiperplasia y cáncer endometrial (4), así como de tromboembolismo venoso (188), aceptándose en estos momentos su prescripción sólo en casos de síntomas que alteren la calidad de vida de la paciente, a la dosis mínima efectiva y durante el tiempo más corto posible. Al mismo tiempo, la dosis, la vía de administración y el tipo de estrógenos utilizados parecen determinar tanto la eficacia como los riesgos de la terapia, por lo que la cuestión más importante que se plantea antes de la prescripción de una HRT es si ésta es realmente una herramienta imprescindible contra las inexorables consecuencias del envejecimiento femenino de

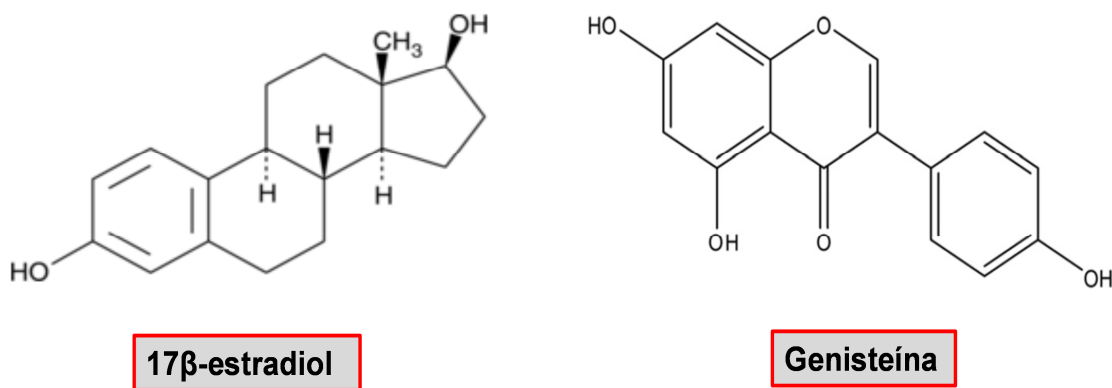


## INTRODUCCIÓN

---

acuerdo al ratio ventajas/riesgo (124). Otro factor a tener en cuenta debe ser la “personalización” de la terapia, ya que cada mujer tiene unos síntomas y riesgos específicos. Por tanto, las dosis utilizadas deben ser individualizadas para cada mujer y de acuerdo con la duración del tratamiento (4).

Teniendo en cuenta los riesgos asociados que conlleva la terapia convencional, en los últimos años se ha profundizado en la búsqueda de compuestos que pudieran imitar los efectos beneficiosos de los estrógenos sin provocar los efectos no deseados que conlleva su uso. En esta línea, existe un interés creciente en el estudio de terapias basadas en fitoestrógenos, tales como los lignanos, los cumestanos o las isoflavonas, siendo la genisteína uno de los representantes más importantes de este último grupo (189). Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos derivados de plantas como la alfalfa, el trébol o la soja, que poseen una similitud estructural con el  $17\beta$ -estradiol (Figura 7), lo que les dota de la capacidad para unirse a los receptores de estrógenos y desencadenar efectos estrogénicos o antiestrogénicos (190). De hecho, los fitoestrógenos están considerados como SERMs naturales (191), debido a que son capaces de actuar como agonistas o antagonistas del ER dependiendo del tejido (18).



**Figura 7.** Estructura molecular del  $17\beta$ -estradiol y de la genisteína. Modificado de Quian y cols. (192).

En cuanto a su mecanismo de acción, los fitoestrógenos pueden actuar como un competidor débil del  $17\beta$ -estradiol para unirse a los ERs y desencadenar sus acciones (193,194). A pesar de que pueden unirse tanto a ER $\alpha$  como a ER $\beta$ , parecen tener mayor afinidad por ER $\beta$  (195). No obstante, los fitoestrógenos también pueden llevar a cabo sus efectos biológicos a través de mecanismos no mediados por ERs. Por ejemplo,

inhibiendo la actividad de varios enzimas, incluyendo proteínas tirosín quinasas (196). Además, también pueden producir la inhibición de DNA topoisomerasas (197), las cuales están implicadas en mecanismos de señalización celular y eventos nucleares como la diferenciación y la proliferación celular (189).

Desde hace varios años existen evidencias que sugieren que las isoflavonas podrían tener un papel positivo frente a los síntomas derivados de la menopausia. Por ejemplo, en un estudio realizado con mujeres japonesas se ha visto que los síntomas vasomotores asociados al déficit de estrógenos presentaban una frecuencia menor, lo que se asoció con la dieta realizada en los países orientales. De hecho, se comprobó que las mujeres post-menopáusicas japonesas que realizaban una dieta tradicional, mostraban unos niveles de fitoestrógenos en la orina entre 100 y 1000 veces más elevados que los que se excretaban en la orina de mujeres americanas o finlandesas con las dietas propias de estas latitudes (198). En esa dieta existía una proporción mayor de derivados de la soja con cierta actividad estrogénica. En los alimentos, las isoflavonas suelen encontrarse en sus formas glicosiladas, como la genistina. Estas formas son menos activas que sus formas libres y para ejercer su acción biológica necesitan la acción de la flora bacteriana del intestino, que las hidrolizan liberando la forma aglicona activa, la genisteína (189). Debido a su potencial estrogénico, las isoflavonas se han perfilado como un agente importante en el mantenimiento de un estatus saludable. Entre sus efectos protectores, destacan su actividad antioxidante (192), sus propiedades anticarcinogénicas (199) y cardioprotectoras (200), así como su papel en la regulación de la homeostasis de lípidos y carbohidratos (201,202). Al igual que los estrógenos, las isoflavonas de soja también parecen tener un papel protector relacionado con el metabolismo de la glucosa y la insulina. Como muestra, estudios en primates ovariectomizados y en roedores mostraron un efecto positivo de las proteínas de soja de la dieta en la sensibilidad periférica a la acción de la insulina y en la tolerancia a la glucosa (202,203). Son varios los mecanismos descritos por los que las isoflavonas pueden actuar sobre el metabolismo de la glucosa, bien sea regulando la liberación de insulina en las células  $\beta$  del páncreas, actuando sobre el aclaramiento de la insulina en el hígado o regulando los mecanismos de transporte de la glucosa desde la luz intestinal (189).

Centrándonos en sus efectos sobre el sistema nervioso, los fitoestrógenos también parecen tener un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis

cerebral. De este modo, se ha comprobado que pueden actuar como agonistas (204) o antagonistas (205) del ER, afectando al aprendizaje y a la memoria o alterando la expresión de proteínas implicadas en la protección neuronal y en la inflamación (206). Además, gracias a su efecto inhibitor sobre ciertas enzimas, como las proteínas tirosín quinasa (196), pueden alterar eventos de fosforilación, los cuales pueden estar asociados con la modulación de la plasticidad sináptica (207). Finalmente, 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 (208), así como después de daño isquémico (209) en el hipocampo de rata. En este sentido, no sólo las propiedades antioxidantes, sino también su efecto sobre la función circulatoria (149) y sus acciones antiapoptóticas (210), sitúan a la genisteína como un posible tratamiento frente al ictus isquémico.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Los estrógenos son hormonas imprescindibles para el buen funcionamiento de las funciones cerebrales, además de su conocido papel, a nivel hipotalámico, sobre el eje neuroendocrino-reproductor. Así, los cambios cíclicos que se producen en sus niveles durante la vida sexual de la mujer pueden influir en la homeostasis cerebral. Sin embargo, es en el momento final de este periodo reproductivo cuando más evidente resulta su importancia, ya que la caída en los niveles de estrógenos inherente a la menopausia puede dar lugar a la aparición de diversos síntomas y patologías. Esto invita al estudio de los mecanismos moleculares que subyacen en tales causas, así como a la búsqueda de posibles tratamientos tanto con estrógenos como con análogos que puedan generar menos efectos secundarios no deseados que estas hormonas.

En base a lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo nos planteamos como **hipótesis** si el  $17\beta$ -estradiol y la genisteína pueden ejercer un papel neuroprotector durante el envejecimiento femenino, a través de la mejoría de la homeostasis cerebral y de la cascada de señalización intracelular de la insulina, así como confiriendo protección frente a un daño isquémico recurrente.

Para ello, nos hemos planteado los siguientes **objetivos**:

1. Estudiar la influencia de las diferencias en los niveles de estrógenos, que existen entre distintas fases del ciclo estral, sobre el metabolismo oxidativo en la corteza prefrontal e hipocampo de ratas hembra adultas.
2. Evaluar si los tratamientos agudos con  $17\beta$ -estradiol o genisteína son capaces de mejorar la homeostasis cortical y los pasos clave de la vía de señalización intracelular de la insulina en la corteza cerebral de ratas hembra viejas.
3. Comprobar si los tratamientos agudos con  $17\beta$ -estradiol o genisteína ejercen un papel neuroprotector frente a un daño por isquemia/reperfusión recurrente en un estudio *in vitro* con la línea neuronal de hipocampo de ratón HT22.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**





### 1. Animales

Para estudiar la influencia de los niveles de estrógenos en distintas fases del ciclo estral sobre el metabolismo oxidativo cerebral, se emplearon 16 ratas hembra adultas de la cepa Wistar, con peso comprendido entre 225-275g.

Por otro lado, para estudiar los efectos del envejecimiento femenino, así como de los tratamientos con estradiol o genisteína, sobre diferentes aspectos de la homeostasis cerebral y de la vía de señalización intracelular de la insulina, se utilizaron 50 ratas hembra de la cepa Wistar con peso comprendido entre 130-150g (6-8 semanas de edad, grupo joven, J) y 500-600g (90-96 semanas, grupo viejo, V).

En ambos casos, los animales fueron suministrados por el Bioterio de la Universidad de Oviedo. Los sujetos fueron expuestos durante todo el experimento a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (periodo de luz: 08:00-20:00h), temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad absoluta de  $65\pm 5\%$ , y acceso a comida y bebida *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Oviedo. El uso y la manipulación de los animales se realizaron en todo momento de acuerdo con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE) y la legislación española (R.D. 53/2013) en cuidado y uso de animales de experimentación.

### 2. Pruebas neurológicas

Los animales fueron en primer lugar manipulados durante aproximadamente 5-10 minutos. Posteriormente, fueron sometidos a una batería de pruebas neurológicas para descartar alguna posible alteración.

La batería de pruebas mencionada comenzó con la evaluación de la abducción de las patas traseras. Para ello se sujetó a la rata con sus cuatro patas orientadas hacia el suelo y se soltó al animal desde una altura de unos 30 cm, colocando en la base una superficie acolchada para amortiguar la caída. En condiciones normales la rata balancea su cuerpo para caer sobre sus cuatro patas. En caso de existir alguna alteración, el animal se balancearía exageradamente durante el descenso y, como consecuencia, la distancia entre sus patas traseras se haría mayor.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Posteriormente se evaluó el asimiento, sujetando a la rata en una posición vertical y poniendo en contacto sus patas delanteras con un alambre o varilla fina en posición horizontal. Se observó la fuerza con la que el animal se agarra a la barra intentando separarlo del alambre.

El reflejo de extensión se estudió mediante las dos siguientes pruebas: en la primera de ellas se suspendió verticalmente a la rata, acercando sus patas traseras a la superficie de una mesa. El animal extiende sus patas para soportar el peso de su cuerpo tan pronto como éstas rocen la superficie. La segunda prueba consistió en coger al animal y acercar su cabeza a la superficie de una mesa; la rata tiende a extender rápidamente sus patas delanteras hacia la mesa.

Dos pruebas adicionales permitieron evaluar el reflejo de flexión. En una de ellas, se elevó a la rata sujetándola por la piel colgante del cuello y se pellizcaron las patas con una pinza. La rata retira su pata inmediatamente, manteniéndose la flexión brevemente. La otra prueba consistió en colocar al animal sobre el extremo de una mesa, dejando una de sus patas traseras fuera de la superficie; éste la flexiona y la apoya sobre la mesa.

Por otro lado, también se estudió la respuesta vestibular/auditiva. Para ello, se soltó al animal boca arriba desde una altura de 30 cm al suelo, colocando, como se explicó anteriormente, una superficie acolchada para amortiguar el impacto. La rata hace uso de su cola para girar el cuerpo durante la bajada y caer sobre sus cuatro patas. Adicionalmente, también se colocó a la rata en una plataforma y, cuando el animal dejó de moverse, se aplicó un estímulo auditivo fuerte (aplauso). La rata reacciona con una extensión súbita de los miembros posteriores, flexión de las patas anteriores y arqueado del cuerpo; asimismo, cierra los ojos y baja las orejas.

A continuación, se estudió la sacudida de la cabeza (*head shaking*). Para ello, se aplicó un soplo de aire cerca de uno de los oídos de la rata mediante un tubo de goma. El animal responde con una agitación brusca de la cabeza según el eje antero-posterior de su cuerpo.

Dos pruebas más permitieron evaluar la respuesta geotáctica negativa. Primero, se situó al animal en posición descendente sobre una plataforma inclinada 30°. El

animal gira 180° para subir por la rampa. En segundo lugar, se colocó a la rata en una barra horizontal y se evaluó su habilidad para mantenerse sobre ella.

Por último, se comprobó el reflejo de enderezamiento. Cuando se coloca a la rata boca arriba en una superficie plana, aprisionando su zona ventral, ésta inmediatamente intenta girarse y volver a colocarse sobre sus cuatro patas.

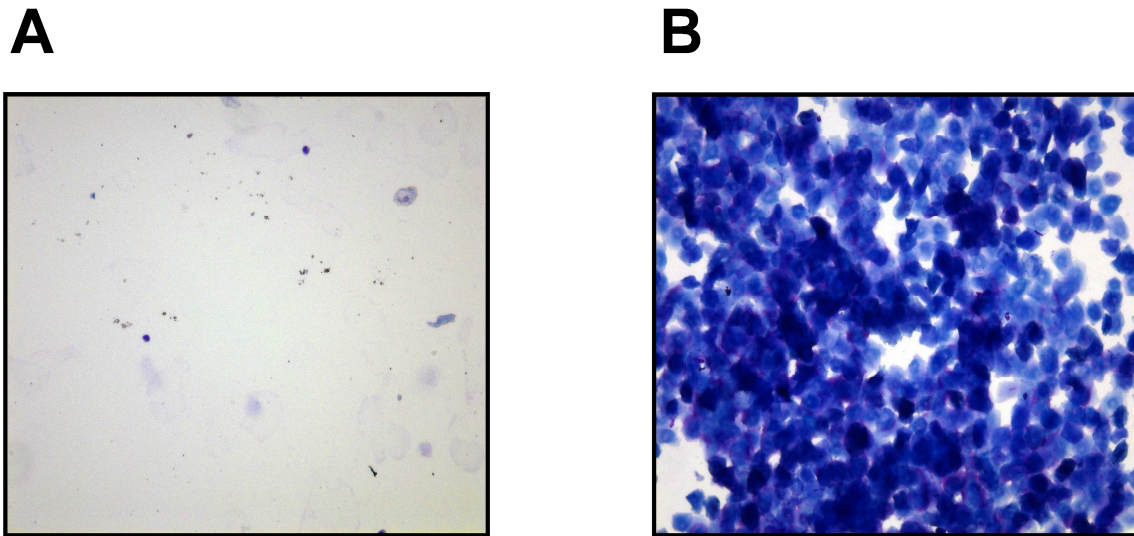
### **3. Estudio de la influencia de los niveles de estrógenos en distintas fases del ciclo estral sobre el metabolismo oxidativo cerebral**

#### **3.1. Determinación del ciclo estral y diseño experimental**

El análisis de las distintas fases del ciclo estral se inició una semana después de haberse realizado las citadas pruebas neurológicas, para asegurarnos de que éstas no influían en los niveles de actividad de los animales y evitar así un posible sesgo en los resultados. Para diferenciar las distintas fases del ciclo estral se realizaron frotis vaginales. La observación de la población celular del epitelio vaginal es el método más eficaz para identificar los distintos estadios del ciclo, ya que las poblaciones de distintos tipos celulares están controladas por los niveles de hormonas sexuales circulantes.

Para realizar los frotis vaginales se utilizó una solución salina (NaCl 0,9% p/v). Posteriormente, las células del epitelio vaginal se observaron a 10X al microscopio óptico (modelo BH-2, Olympus, Tokio, Japón). Se tomaron muestras una vez al día, entre las 11:00-12:00 horas.

El patrón seguido para la identificación de cada fase del ciclo estral fue el siguiente: se considera diestro cuando el frotis presenta muy pocas células y sin una forma definida (*Figura 8A*). La fase de proestro viene determinada por la presencia de células nucleadas, que en ocasiones aparecen formando ramificaciones. En la fase de estro sólo aparecen células escamadas sin núcleo (*Figura 8B*). Por último, la fase de metaestro se identifica gracias a la abundante presencia de leucocitos que invaden el epitelio vaginal, acompañados de células nucleadas y mucus.



**Figura 8.** Fotografías de las células del epitelio vaginal características de la fase de diestro (A), donde se observan muy pocas células y sin una forma definida, y de la fase de estró (B), donde se observan células escamadas sin núcleo.

En el presente estudio utilizamos 2 grupos distintos de hembras, aquellas que se encontraban en la fase de estró (n=8) y diestro (n=8). Seleccionamos estas dos fases del ciclo puesto que difieren en los niveles de estrógenos circulantes, siendo más elevados en la fase diestro. Al mismo tiempo, en dichas fases sólo hay niveles circulantes significativos de estrógenos, estando el resto de hormonas sexuales en niveles mínimos (*Figura 9*). Estas características las convierte en las fases ideales para estudiar fenómenos relacionados con la variación de estrógenos en ratas intactas, ya que nos permiten asignar los resultados observados a la diferencia en los niveles de estrógenos con mayor certeza que comparando ninguna otra fase del ciclo.

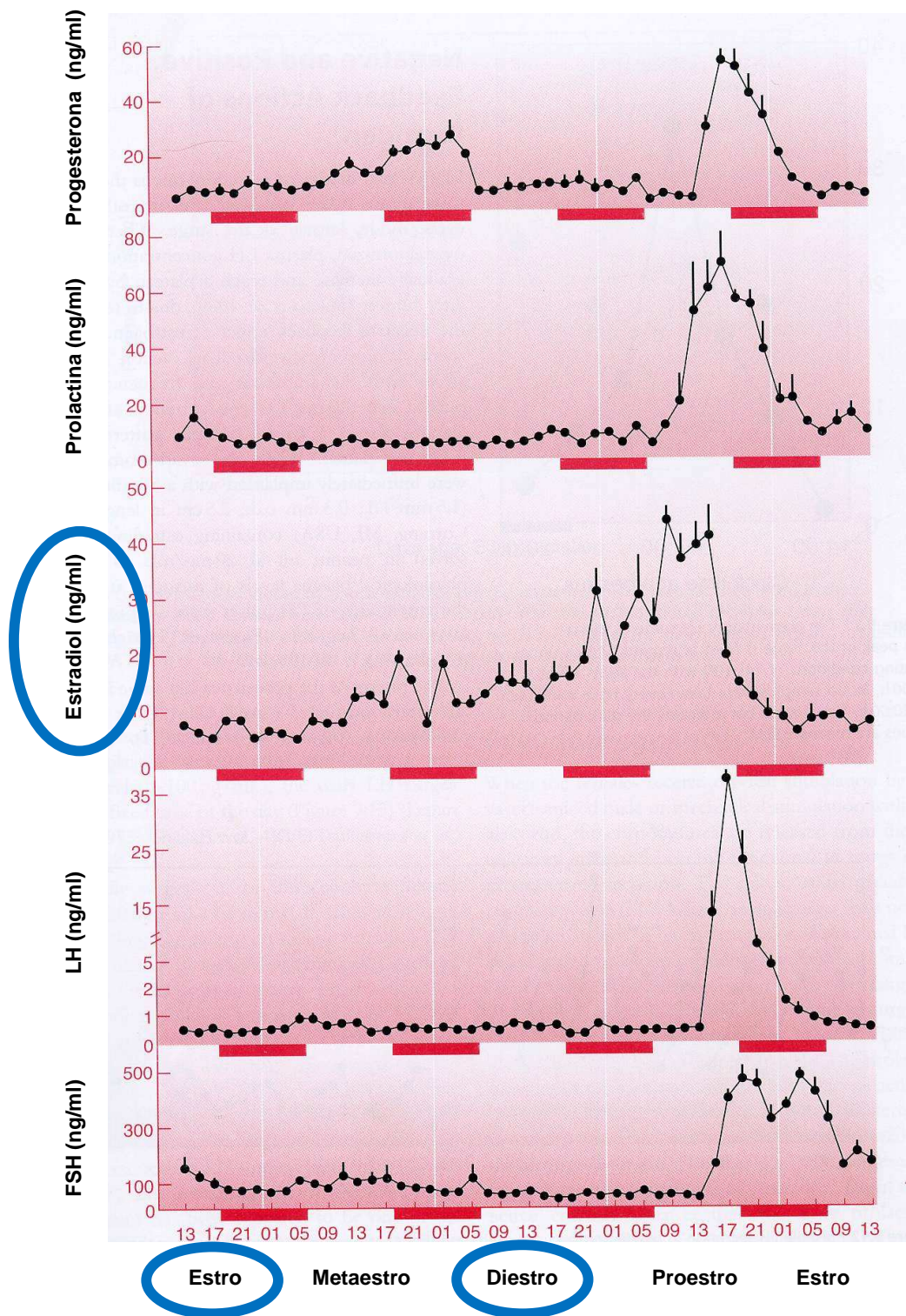


Figura 9. Perfil hormonal a lo largo del ciclo estral en rata. Modificado de Maeda y cols. (211).

### 3.2. Procesamiento del tejido cerebral

Cuando las hembras se encontraban en la fase del ciclo deseada fueron sacrificadas por decapitación, dentro del rango horario comprendido entre las 11:00-12:00 horas. Sus cerebros fueron rápidamente extraídos y los encéfalos se congelaron por inmersión en isopentano (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Francia) a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos, y se conservaron en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los cerebros fueron embebidos en un gel crioprotector (OCT Compound, Miles, EEUU) y se realizaron secciones coronales de  $30\mu\text{m}$  de espesor utilizando un criostato (modelo HM-505E, Microm, Heidelberg, Alemania), que fueron montadas en portaobjetos y conservadas a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizadas para llevar a cabo la tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa. Para realizar un muestreo completo y sistemático de las distintas áreas cerebrales, se seleccionaron las regiones a analizar utilizando el atlas histológico de Paxinos y Watson (212).

### 3.3. Tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa

El procedimiento seguido fue el descrito por Wong-Riley (213), con las modificaciones propuestas por Gonzalez-Lima y Jones (214). Con el fin de corregir las posibles variaciones de tinción entre los distintos baños de incubación, se incluyeron en cada set junto a las muestras una serie de secciones coronales de diferentes grosores (10, 30, 50 y  $70\mu\text{m}$ ) obtenidas de homogeneizados cerebrales de rata, que fueron utilizados como estándares. Los portaobjetos fueron fijados durante 5 minutos por inmersión en tampón fosfato (0,1M, pH 7,6) con sacarosa (10% p/v) y glutaraldehído (0,5% v/v). A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con tampón fosfato (0,1M, pH 7,6) con sacarosa (10% p/v). Posteriormente, se aumentó la sensibilidad de la reacción de tinción mediante incubación durante 4 minutos en tampón TRIS-HCL (50mM, pH 7,6) con dimetilsulfóxido (DMSO) (0,5% v/v), trizma base (0,6% p/v), sacarosa (10% p/v) y cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) (0,03% p/v). Las secciones fueron nuevamente lavadas con tampón fosfato (0,1M, pH 7,6) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y en agitación en la solución de tinción compuesta por tampón fosfato (0,1M, pH 7,6) con citocromo c ( $7,5 \times 10^{-3}$  % p/v), catalasa ( $2 \times 10^{-3}$  % p/v), sacarosa (5% p/v), DMSO (0,25% v/v) y diaminobencidina (DAB) (0,05% p/v). La DAB actúa como un cromógeno que, tras haber sido oxidada por la citocromo c oxidasa endógena, se fija a la membrana



mitocondrial. Esta incubación se llevó a cabo en oscuridad, ya que la presencia de luz da lugar a una tinción inespecífica consecuencia de la oxidación espontánea de la DAB. La reacción se detuvo por fijación del tejido en tampón fosfato (0,1M) con sacarosa (10% p/v) y formaldehído (4% p/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas en una cadena creciente de alcoholes (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) durante 5 minutos en cada uno, inmersas en xileno durante 10 minutos, y montadas con Entellán (Merck, Darmstadt, Alemania) mediante la colocación de un cubreobjetos para su conservación en medio hidrófobo.

La tinción histoquímica de la citocromo c oxidasa fue analizada mediante densitometría óptica, utilizando un sistema de análisis de imágenes informatizado (MCID Core Interfocus, Linton, Inglaterra), compuesto por una lámpara de alta precisión, una cámara digital y un ordenador con software específico para el análisis de imágenes. Cada región cerebral fue cuantificada bilateralmente. La densidad óptica media de cada región fue hallada tras medir 3 secciones consecutivas en cada sujeto, dentro de las cuales se realizaron 4 medidas no solapantes. Por tanto, doce muestras fueron tomadas por hemisferio para cada animal, hallándose finalmente la media para obtener un valor por región para cada animal. Las regiones de estudio fueron:

- Corteza prefrontal (PFC): área infralímbica (IL), área prelímbica (PL), corteza cingulada (CG) y corteza motora secundaria (FR2) (*Figura 10A*).
- Hipocampo dorsal y ventral: áreas del cuerno de Ammón 1 (CA1) y 3 (CA3) y giro dentado (GD) (*Figuras 10B y 10C*).

La distancia en mm de las regiones desde el punto Bregma fue: +3,24mm para la PFC, -3,36mm para el hipocampo dorsal y -4,80mm para el hipocampo ventral. La corteza prefrontal y el hipocampo fueron las regiones escogidas en nuestro trabajo por su implicación en funciones cerebrales básicas como el aprendizaje y la memoria (215,216), así como por la amplia presencia de ERs existente en ambas regiones (10,53). Además, se ha realizado una distinción entre la región dorsal y ventral del hipocampo, ya que se han encontrado diferencias, tanto en la distribución de los ERs (38) como en los efectos de los estrógenos (77) entre ambas zonas.

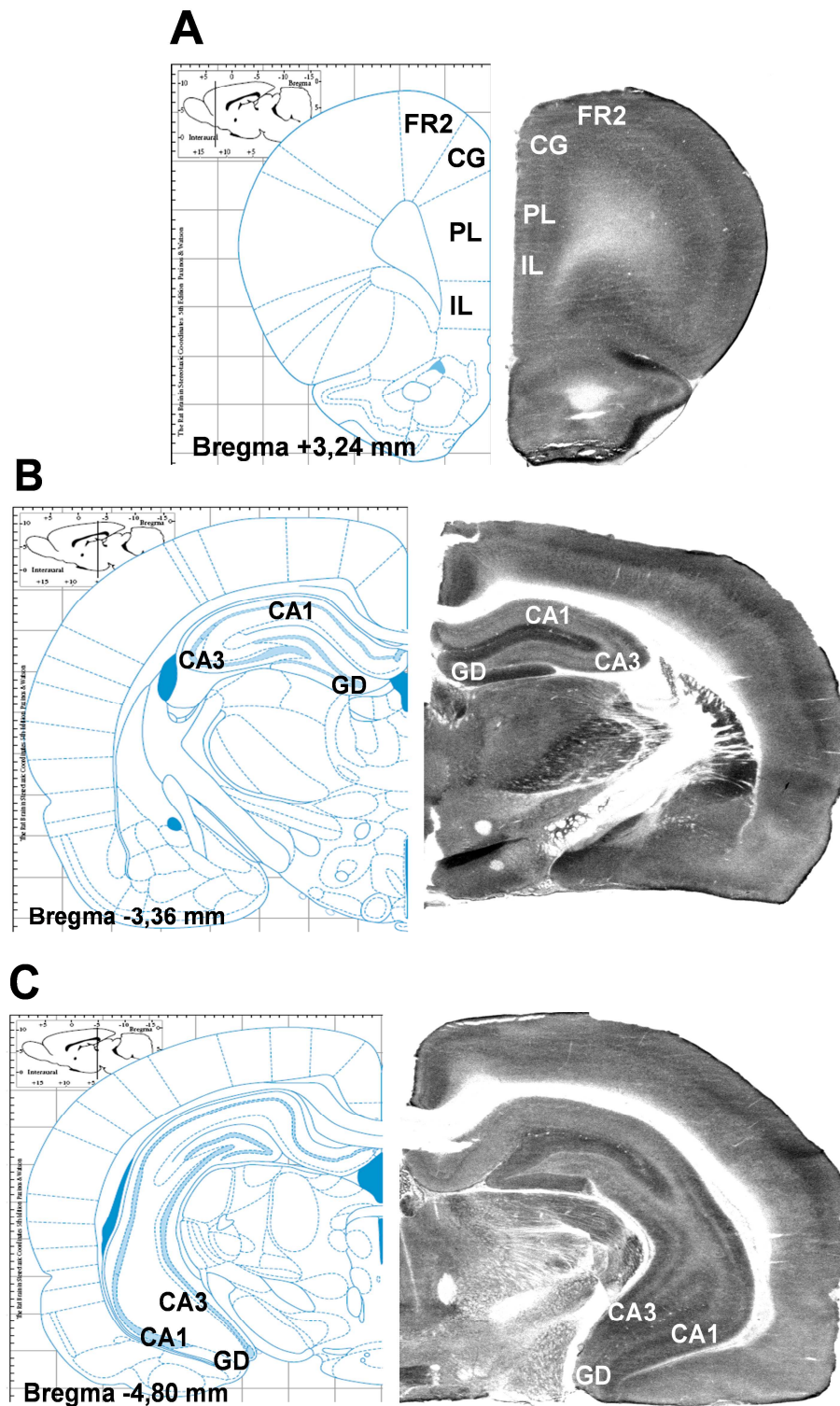
Para poder realizar comparaciones entre los distintos baños de tinción, se realizaron curvas de regresión entre los distintos espesores de los estándares y la



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

actividad citocromo c oxidasa en cada set de muestras. Finalmente, la densidad óptica media medida en cada región cerebral fue convertida en unidades de actividad citocromo c oxidasa ( $\mu\text{mol}$  de citocromo c oxidado/minuto/g de tejido húmedo), utilizando para ello la curva de regresión anteriormente calculada en cada baño de incubación.



**Figura 10.** Regiones cerebrales analizadas (derecha) y su representación esquemática correspondiente (izquierda) del Atlas histológico de Paxinos y Watson (212). A: Corteza prefrontal. B: Hipocampo dorsal. C: Hipocampo ventral. En la esquina superior izquierda se muestra el cerebro esquematizado de rata y en la esquina inferior izquierda la distancia al punto Bregma a la que fue realizado el corte. IL=infralímbico; PL=prelímico; CG=corteza cingulada; FR2=corteza motora secundaria; CA1 y CA3=cuerno de Ammón 1 y 3, respectivamente; GD=giro dentado.

### **4. Estudio de los efectos del envejecimiento femenino sobre la homeostasis cerebral y la vía de señalización intracelular de la insulina**

#### **4.1. Diseño experimental**

Las ratas fueron ovariectomizadas al comienzo de la madurez sexual en el caso de los animales jóvenes y al final del período reproductivo en el caso de los animales viejos. La madurez sexual en las ratas jóvenes fue identificada por la presencia de ciclos estrales normales, mientras que los animales viejos mostraron una fase diestro persistente en lugar de ciclos estrales repetitivos, caracterizando así el final del período reproductivo. La ovariectomía fue llevada a cabo a través de una incisión en la línea media abdominal bajo ligera anestesia por inhalación de halotano. Tanto los animales jóvenes (J) como los viejos (V) fueron divididos al azar en cinco grupos para cada edad (n=5 por grupo): animales ovariectomizados inyectados con 17 $\beta$ -estradiol (1,4 $\mu$ g/kg peso corporal en aceite de oliva/etanol 3:2 v/v; Sigma Chemical Co, St. Louis, EEUU) (JE y VE), animales ovariectomizados tratados con dos dosis diferentes de genisteína (G1=10mg/kg peso corporal; G2=40mg/kg peso corporal en aceite de oliva/etanol 3:2 v/v; LC Laboratories, Wobum, EEUU) (JG1, VG1, JG2 y VG2), y animales ovariectomizados tratados con vehículo (aceite de oliva/etanol 3:2 v/v) (JV y VV). Además, animales pseudooperados y tratados con vehículo (JC y VC) han sido utilizados como grupo control.

La dosis de 17 $\beta$ -estradiol empleada permite reproducir niveles fisiológicos de esta hormona (57), y se ha demostrado previamente que mejora la sensibilidad a la insulina (124) y que tiene efectos neuroprotectores en ratas (57). Por su parte, la genisteína es capaz de ejercer acciones estrogénicas a las dosis propuestas (123). Sin embargo, se emplearon dos dosis distintas, puesto que los fitoestrógenos activan diferentes mecanismos celulares en función de la concentración (217,218).

Todos los tratamientos experimentales comenzaron una semana después de la operación para asegurar un periodo uniforme de declive de los niveles de estrógenos antes del reemplazamiento, así como para permitir la recuperación completa del estrés quirúrgico. Con el fin de analizar los efectos de un tratamiento agudo, los animales fueron inyectados con los distintos tratamientos una hora antes del sacrificio.

### 4.2. Preparación del extracto crudo cerebral y cuantificación de proteína

Una hora después de la administración de los tratamientos, los animales fueron sacrificados por exanguinación y sus cerebros congelados con isopentano (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Francia) a  $-80^{\circ}\text{C}$ , durante 2 minutos, y conservados en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A continuación, la región del córtex cerebral fue diseccionada y homogeneizada a  $4^{\circ}\text{C}$  en un tampón de lisis compuesto de TRIS-HCL (50mM, pH 7,5), NaCl (150mM), Nonidet P-40 (1% v/v), desoxicolato sódico (0,05% p/v), ortovanadato sódico (1mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1mM). El homogeneizado fue centrifugado a 3500 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, y el sobrenadante fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de estudios posteriores.

El siguiente paso fue cuantificar el contenido de proteína de este sobrenadante mediante el método descrito por Bradford (219), utilizando el reactivo con el mismo nombre (Bradford Reagent, B6916, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Merck, Darmstadt, Alemania).

En este estudio, se ha seleccionado la región del córtex cerebral debido a que, como ya mencionamos anteriormente, juega un papel clave en procesos cognitivos (55,56), siendo al mismo tiempo una región cerebral con una amplia presencia de ERs (10,53) y una fuerte dependencia funcional del estradiol (57).

### 4.3. Análisis de Western blot

Los niveles de expresión de distintas proteínas, así como de sus estados de fosforilación, fueron evaluados mediante la técnica de Western blot. En primer lugar, cantidades equivalentes de proteína (entre 15-30 $\mu\text{g}$  según la proteína de estudio) fueron combinadas con tampón de carga conteniendo TRIS-HCL (12mM, pH 6,8), dodecilsulfato sódico (SDS) (0,4% p/v), glicerol (0,5% v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol (0,5% v/v) y azul de bromofenol (0,02% v/v). Este combinado fue hervido a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 2,5 minutos, para desnaturalizar las proteínas, y sometido a electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (8-13% acrilamida según el peso molecular de la proteína de estudio) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Finalizada la electroforesis, las proteínas fueron electro-transferidas desde el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore, Billerica, EEUU)

siguiendo el método descrito por Towbin y cols. (220). A continuación, para el análisis de proteína total se redujo la unión inespecífica de proteínas a la membrana de PVDF mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo compuesta por leche desnatada en polvo (7,5% p/v) disuelta en TRIS-HCL (20mM, pH 7,5), NaCl (150mM) y Tween-20 (0,1% v/v) (TBS-T). En el caso del estudio de los estados de fosforilación de las proteínas, la solución de bloqueo contenía BSA (3% p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania) disuelta en TBS-T, evitando así la posible existencia de fosfatasa presentes en la leche. Pasados 60 minutos, la membrana fue lavada durante 5 minutos con TBS-T e incubada durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico contra la proteína de estudio [GLUT3, GLUT4, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , subunidad 1 de la CO (CO-1), p-Akt<sub>ser473</sub>, Akt] (Tabla 2) diluido en una solución compuesta por BSA (0,01% p/v), azida sódica (0,01% p/v) y TBS-T. La concentración del anticuerpo primario utilizada varió en cada caso de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Tabla 2).

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con TBS-T de 10 minutos a temperatura ambiente y, seguidamente, se incubaron con su respectivo anticuerpo secundario (Tabla 2) conjugado con peroxidasa y disuelto en leche desnatada en polvo (5% p/v) y TBS-T (para el análisis de la proteína total) o solamente TBS-T (para los estudios de las fosforilaciones), durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurridos los 60 minutos, se realizaron 3 lavados con TBS-T de 10 minutos. Finalmente, las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando un sustrato quimioluminiscente potenciado (ECL) (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Billerica, EEUU) y un dispositivo de revelado por quimioluminiscencia (Chemic Doc-It Imaging System, UVP, Upland, EEUU). La intensidad de cada banda fue cuantificada mediante densitometría con el programa de análisis y procesamiento de imágenes Quantity One 4.6.6 (Bio-Rad, Hercules, EEUU).

Para proceder a la normalización de los valores, la membrana fue, en primer lugar, incubada durante 35 minutos a 65°C con solución *Stripping* (pH 2,5) conteniendo glicina (1,5% p/v), Tween 20 (0,5% p/v) y SDS (0,1% p/v). De esta forma, se eliminaron los restos de la señal luminiscente producida por la detección anterior. A continuación, la membrana fue nuevamente bloqueada con leche desnatada en polvo (5% p/v) y TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y, seguidamente, incubada con un anticuerpo anti  $\beta$ -actina conjugado con peroxidasa (Tabla 2). Los valores de

cada banda fueron entonces normalizados por su respectivo control de carga ( $\beta$ -actina), divididos por el valor del grupo joven control (JC) para estandarizar así todos los resultados, y representados como el porcentaje relativo del valor del grupo JC. En el caso del estudio del estado de fosforilación de una proteína, los valores fueron también normalizados por el valor de la proteína total con el fin de estudiar el ratio de fosforilación relativa.

#### 4.4. Inmunoprecipitación de proteínas

Para determinar posibles interacciones entre distintas proteínas de la vía de señalización intracelular de la insulina, se incubaron alícuotas con 500 $\mu$ g de proteína durante 2 horas a 4°C con 2 $\mu$ g del anticuerpo primario correspondiente (p85 $\alpha$  o IRS-1) (*Tabla 2*) y 25 $\mu$ l de proteína G-agarosa (sc-2002, Santa Cruz, Dallas, EEUU). A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 1 minuto a 4°C, de manera que los complejos proteína-anticuerpo-proteína G agarosa quedasen depositados en el fondo. El pellet se lavó 3 veces con tampón fosfato salino (pH 7,2) [NaCl (0,8% p/v), KCl (0,02% p/v), fosfato de disodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (0,14% p/v), fosfato de dipotasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (0,02% p/v)] y Tween-20 (0,1% v/v) (PBS-T). Seguidamente, se realizó otro lavado con tampón fosfato salino (PBS), en condiciones menos astringentes, y el precipitado fue re-suspendido en tampón de carga. La proteína G-agarosa fue separada del complejo proteína-anticuerpo mediante desnaturalización a 99°C durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó una centrifugación a temperatura ambiente a 13000 rpm durante 2 minutos para precipitar la proteína G. Se recogió el sobrenadante, donde se encontraba la proteína inmunoprecipitada, y se evaluaron sus posibles interacciones con otras proteínas mediante análisis Western blot, como ya explicamos anteriormente. En la inmunoprecipitación de p85 $\alpha$ , se estudiaron sus interacciones con p-IRS1<sub>tyr612</sub>, ER $\alpha$  y ER $\beta$  (*Tabla 2*). Por su parte, en los inmunoprecipitados de IRS-1 se realizaron análisis Western blot contra ER $\alpha$  y ER $\beta$  (*Tabla 2*). En el caso de las inmunoprecipitaciones, el valor que se utilizó para la normalización de los resultados fue el de la proteína inmunoprecipitada.

### 4.5. Extracción de membranas plasmáticas

Para evaluar la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática se utilizó un kit comercial diseñado para la extracción específica de proteínas de membrana plasmática (#K268-50, BioVision, Milpitas, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, la región del córtex cerebral fue diseccionada y homogeneizada en *(1X) Homogenize Buffer*. El homogeneizado fue centrifugado a 700g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue recogido y centrifugado nuevamente a 10000g durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet (proteínas de membrana celular total) fue posteriormente re-suspendido en 200µl de *Upper Phase Solution*. Al mismo tiempo, se preparó otra solución sin muestra que contenía 120µl de *Upper Phase Solution* y 120µl de *Lower Phase Solution*. Ambos tubos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se transfirieron las fases superior e intermedia del tubo que contenía la muestra a un nuevo tubo, del cual se extrajeron nuevamente las fases superior e intermedia mediante la adición de 100µl de *Lower Phase Solution* del tubo sin muestra y posterior centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C. A continuación, el producto obtenido fue diluido (1:5) en agua bidestilada y centrifugado a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Por último, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet (proteínas de membrana plasmática) en 20µl de PBS con Tritón X-100 (0,5% v/v). De esta forma quedaron aisladas las proteínas de membrana plasmática, de las cuáles se cuantificó el contenido de proteína, como ya se explicó anteriormente, y se realizaron también ensayos de Western blot contra GLUT4 (*Tabla 2*) utilizando 15µg de proteína por cada muestra. En este caso, la proteína utilizada para normalizar los resultados fue una proteína específica de membrana plasmática como es la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (*Tabla 2*).

## 5. Estudio de un modelo *in vitro* de daño por isquemia/reperfusión recurrente

### 5.1. Cultivo celular

Para este estudio se utilizó la línea neuronal de hipocampo de ratón HT22, gentilmente cedida por el Dr. Juan Carlos Mayo del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo. Las células HT22 fueron mantenidas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con suero bovino fetal

(FBS) (10% v/v), glucosa (4,5g/l), glutamina (0,86g/l), piruvato (0,11g/l), penicilina (100UI/ml) y estreptomina (100µg/ml), a una temperatura constante de 37°C en una atmósfera plenamente humidificada con una concentración del 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó cada tres días. La densidad inicial a la que fueron sembradas las células se especifica en cada experimento.

### 5.2. Protocolo de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación

La privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R) es un modelo bien establecido para estudiar la patología del daño isquémico, ya que permite mimetizar *in vitro* las condiciones que se dan en un daño por isquemia/reperfusión (221,222). Para generar dos situaciones consecutivas de OGD/R, en primer lugar las células fueron lavadas tres veces con Dulbecco's PBS (Gentaur, Kampenhout, Bélgica). A continuación, las células fueron inmersas en un medio de cultivo sin suero y con baja concentración de glucosa [DMEM suplementado con baja concentración de glucosa (1g/l), glutamina (2mM), piruvato (0,11g/l), penicilina (100UI/ml) y estreptomina (100µg/ml)] e incubadas en una cámara hipóxica (TEB1000 Flow Bioreactor, EBERS Medical Technology, Zaragoza, España) al 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 37°C durante 18 horas. Finalizado el período de privación de oxígeno y glucosa (OGD), las células fueron lavadas nuevamente tres veces con PBS e incubadas con medio de cultivo completo en condiciones de normoxia durante 24 horas. Una vez terminado el período de reoxigenación, las células que sobrevivieron fueron sometidas a un nuevo ciclo de OGD/R en las mismas condiciones. Los tiempos del protocolo de OGD/R se escogieron de acuerdo a la literatura (221). Las células fueron tratadas con 17β-estradiol (10nM), genisteína (1µM) o vehículo (DMSO) desde 1 hora después de comenzar el primer período de OGD hasta el final de la primera reoxigenación. Durante esta primera reoxigenación, el FBS fue sustituido por FBS tratado con carbón activo para así eliminar las hormonas sexuales presentes en el suero y evitar posibles interferencias con los tratamientos. La concentración utilizada de 17β-estradiol está considerada como una dosis fisiológica (223) y ha sido utilizada previamente por otros autores en este modelo celular (224). Por su parte, la concentración de genisteína se corresponde con concentraciones circulantes de este fitoestrógeno en humanos y se ha revelado previamente como neuroprotectora en modelos de daño isquémico *in vitro* (210).



Paralelamente, durante todo el experimento un grupo de células ha sido sujeto de los mismos lavados y cambios de medio, pero siempre mantenido en medio de cultivo completo y normoxia. Estas células también han sido tratadas durante el mismo tiempo con vehículo (DMSO). Por tanto, el experimento en total constó de 4 grupos de tratamiento: células cultivadas en medio completo y normoxia, y que fueron tratadas con DMSO (N); y células que han sido sometidas a dos ciclos de OGD/R y han sido tratadas con DMSO (V), 17 $\beta$ -estradiol (E) o genisteína (G).

### 5.3. Ensayo de viabilidad celular

Para valorar la viabilidad celular se utilizó el ensayo de reducción del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) (222). El MTT es reducido por las enzimas oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H citosólicas (225) a su forma insoluble, que adquiere un color púrpura, reflejando así el número de células viables presentes en cada ensayo. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, a una densidad inicial de  $5 \times 10^3$  células/pocillo y en un volumen de 100 $\mu$ l de medio de cultivo. Para estimar el número de células viables, se añadió el reactivo MTT (0,5mg/ml) (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) al medio de cultivo y se incubó durante 4 horas en condiciones normales de crecimiento (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Una vez transcurrido el periodo de incubación, las células fueron lisadas a temperatura ambiente mediante la adición de una disolución con SDS (20% p/v) y N-N-dimetilformamida (50% v/v) durante 24 horas. A continuación, la cantidad de reactivo reducido fue cuantificado mediante densidad óptica en un lector de microplacas (KC junior, BioTek, Winooski, EEUU) a una longitud de onda de 540nm. Cada tratamiento se ensayó por octuplicado y los datos fueron representados como el porcentaje del valor medio del grupo normóxico.

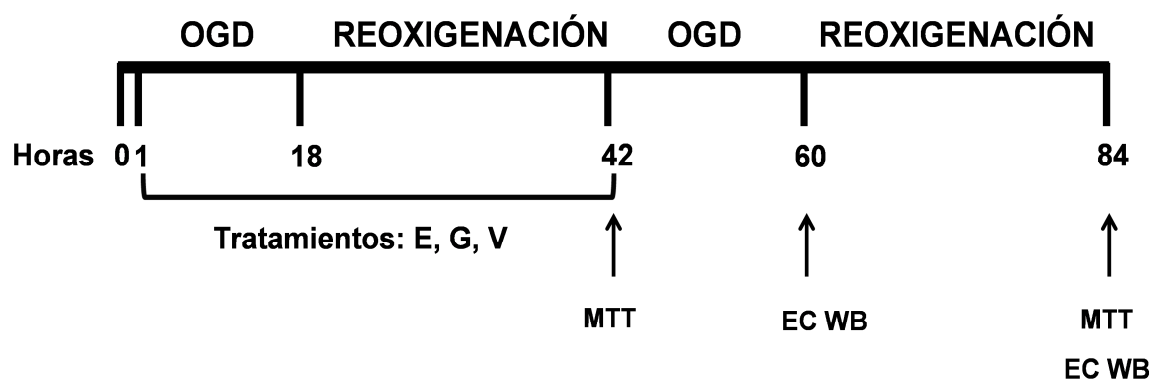
Los ensayos de viabilidad celular fueron realizados a dos tiempos, tras la primera y la segunda reoxigenación.

### 5.4. Análisis de Western blot

Para llevar a cabo el análisis de proteínas mediante Western blot, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, a una densidad inicial de  $2 \times 10^5$

células/pocillo y en un volumen de 2500µl de medio de cultivo. Se obtuvieron lisados celulares a dos tiempos, al finalizar la segunda OGD y al finalizar la segunda reoxigenación. Para ello, se lavaron las células 3 veces con PBS y, posteriormente, se añadió 10µl/cm<sup>2</sup> de buffer de lisis RIPA [TRIS-HCl (50mM; pH 7,4); NaCl (150mM), Nonidet P-40 (0,5% v/v), desoxicolato sódico (0,5% p/v), SDS (0,1% p/v), EDTA (1mM), PMSF (1mM), ortovanadato sódico (1mM), glicerofosfato sódico (1mM), pirofosfato (1mM)]. A continuación, las muestras fueron tratadas con una sonda de ultrasonidos para completar su lisis y solubilizar las proteínas, y centrifugadas a 12000g durante 30 minutos a 4°C para eliminar las fracciones no solubles. Seguidamente, se cuantificó el contenido de proteína, como se explicó anteriormente, y se realizaron ensayos de Western blot contra las proteínas de estudio (PARP-1, LC3, CO-1, HIF-1α, GLUT3 y GLUT1) (Tabla 2), utilizando cantidades equivalentes de proteína. Los valores de cada banda fueron normalizados por su respectivo control de carga (β-actina) (Tabla 2), y representados como el porcentaje del valor del grupo normóxico para estandarizar todos los resultados. Cada tratamiento se ensayó por triplicado en 2 experimentos independientes.

El siguiente esquema (Figura 11) resume las distintas intervenciones realizadas en el modelo *in vitro* de daño por isquemia/reperfusión recurrente:



**Figura 11.** Esquema representativo del diseño experimental llevado a cabo en un modelo *in vitro* de dos situaciones consecutivas de isquemia/reperfusión en células HT22. OGD=privación de oxígeno y glucosa; E=estradiol; G=genisteína; V=vehículo; MTT=ensayo de reducción del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; EC WB=extracción de extractos crudos para estudios de Western blot.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 2.** Lista de anticuerpos y concentraciones empleadas en los análisis de Western blot.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN
<b>GLUT3</b> (sc-7582, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:2000	<i>rabbit anti-goat</i> (sc-2768, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:40000
<b>GLUT4</b> (07-1404, Millipore, Billerica, EEUU)	1:1000	<i>goat anti-rabbit</i> (sc-2004, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:10000
<b>ER<math>\alpha</math></b> (sc-542, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:1000	<i>goat anti-rabbit</i> (sc-2004, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:20000
<b>ER<math>\beta</math></b> (sc-8974, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:1000	<i>goat anti-rabbit</i> (sc-2004, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:30000
<b>CO-1</b> (Invitrogen Carlsbad, EEUU)	1:3000	<i>goat anti-mouse</i> (sc-2005, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:40000
<b>p-Akt<sub>ser473</sub></b> (sc-101629, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:500	<i>goat anti-rabbit</i> (sc-2004, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:5000
<b>Akt</b> (sc- 7126, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:5000	<i>rabbit anti-goat</i> (sc-2768, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:30000
<b><math>\beta</math>-actina</b> (sc-1616 Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:15000		
<b>p85<math>\alpha</math></b> (sc-1637, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:500	<i>goat anti-mouse</i> (sc-2005, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:15000
<b>IRS-1</b> (sc-559, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:1000	<i>goat anti-rabbit</i> (sc-2004, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:20000
<b>p-IRS1<sub>tyr612</sub></b> (sc-17195, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:1000	<i>rabbit anti-goat</i> (sc-2768, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:20000
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa</b> (sc-28800, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:5000	<i>goat anti-rabbit</i> (sc-2004, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:40000
<b>PARP-1</b> (#9542, Cell Signaling, Danvers, EEUU)	1:1000	<i>goat anti-rabbit</i> (sc-2004, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:10000
<b>LC3</b> (0260S, Nanotools, Teningen, Alemania)	1:200	<i>goat anti-mouse</i> (sc-2005, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:10000
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b> (AF1935, R&D Systems, Minneapolis, EEUU)	1:2000	<i>rabbit anti-goat</i> (sc-2768, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:20000
<b>GLUT1</b> (sc-7903, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:1000	<i>goat anti-rabbit</i> (sc-2004, Santa Cruz, Dallas, EEUU)	1:20000

## 6. Análisis estadístico

En el estudio sobre la influencia de los niveles de estrógenos en distintas fases del ciclo estral sobre el metabolismo oxidativo cerebral, se utilizó la prueba para grupos independientes T de Student para comparar la actividad cerebral entre los grupos estro y diestro. En los casos en los que la variable no seguía una distribución normal y/o no se cumplía la igualdad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica para muestras independientes U de Mann-Whitney. La distribución normal de los datos fue comprobada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, mientras que la igualdad de varianzas fue estudiada con la prueba de Levene.

Por otro lado, los efectos del envejecimiento femenino, así como de los tratamientos con estradiol o genisteína, sobre diferentes aspectos de la homeostasis cerebral y de la vía de señalización intracelular de la insulina, se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y la prueba para grupos independientes T de Student. El ANOVA fue utilizado para comparar los distintos grupos de tratamiento dentro de la misma edad. Además, la prueba a posteriori Test de Tukey permitió realizar la comparación múltiple de todos los pares de muestra. El test no paramétrico de Kruskal Wallis y el método de Dunn fueron llevados a cabo cuando no se cumplía la normalidad y/o igualdad de varianzas. Por otro lado, una T de Student no pareada permitió comparar los animales jóvenes y viejos que recibieron el mismo tratamiento. En los casos en los que la variable no seguía una distribución normal y/o no se cumplía la igualdad de varianzas, el estadístico U de Mann-Whitney fue utilizado para el análisis de los datos.

Asimismo, para el estudio del modelo *in vitro* de dos situaciones consecutivas de isquemia/reperfusión, se utilizó un ANOVA de una vía para comparar los distintos grupos de tratamiento. Además, se realizó la prueba a posteriori Test de Tukey para la comparación múltiple de todos los pares de muestra. El test no paramétrico de Kruskal Wallis y el método de Dunn fueron llevados a cabo cuando no se cumplía la normalidad y/o igualdad de varianzas.

En todos los casos, los valores fueron representados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y se estableció un nivel de significación ( $\alpha$ ) del 5%, considerando, por tanto, la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre aquellos valores en los que el grado de significación o nivel crítico (p) fue menor a 0,05.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

Para el análisis y representación de los datos se utilizaron los programas SigmaStat 3.5 (Systat Software, Chicago, USA), SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, EEUU), SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Chicago, USA) y GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, EEUU).

## **RESULTADOS**



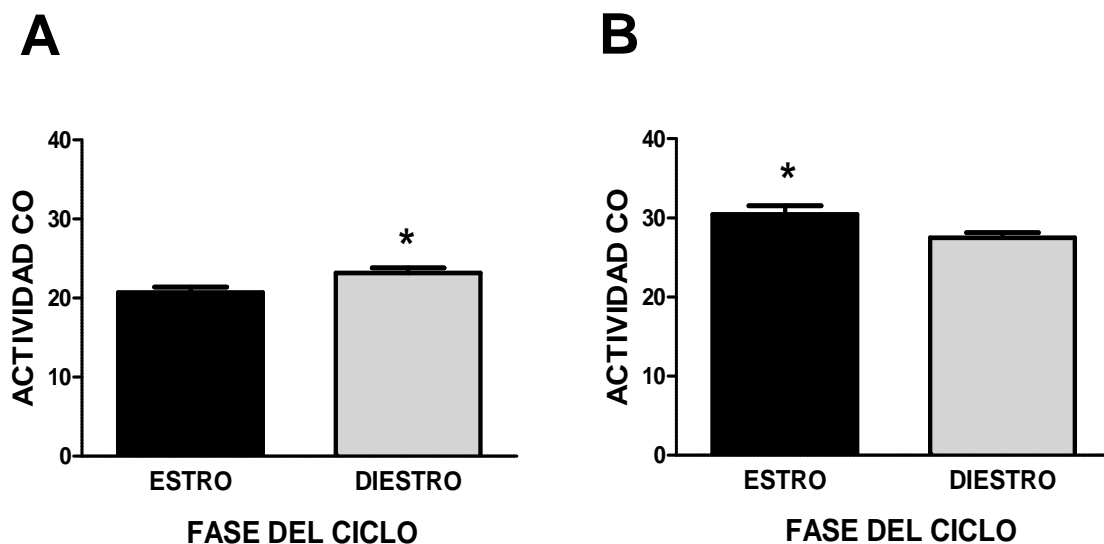
## 1. Pruebas neurológicas

Todos los animales pasaron con éxito la batería de pruebas neurológicas, por lo que ningún sujeto fue excluido del estudio debido a déficits sensoriales o motores.

## 2. Niveles de actividad citocromo c oxidasa en las fases estro y diestro

En la corteza prefrontal, los niveles de actividad citocromo c oxidasa del grupo diestro fueron significativamente superiores a los del grupo grupo estro en el área prelímbica (*Figura 12A y Tabla 3*). Sin embargo, en el resto de áreas de esta región cerebral no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (*Tabla 3*).

En cuanto al hipocampo dorsal, no se encontraron diferencias entre las distintas áreas de esta región (*Tabla 3*). Mientras que en la porción ventral, el grupo estro mostró unos valores de actividad CO significativamente mayores que los del grupo diestro en el área CA3 (*Figura 12B y Tabla 3*).



**Figura 12.** Valores de actividad CO ( $\mu\text{mol}$  de citocromo c oxidado/minuto/g de tejido húmedo) en la región prelímbica de la corteza prefrontal (A) y área CA3 del hipocampo ventral (B) en los grupos estro ( $n=8$ ) y diestro ( $n=8$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  estro vs diestro (\*). CO=citocromo c oxidasa.



## RESULTADOS

---

**Tabla 3.** Actividad citocromo c oxidasa ( $\mu\text{mol}$  de citocromo c oxidado/minuto/g de tejido húmedo) en las distintas regiones cerebrales de estudio en los grupos estro ( $n=8$ ) y diestro ( $n=8$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM.  $p<0,05$  estro vs diestro (\*).

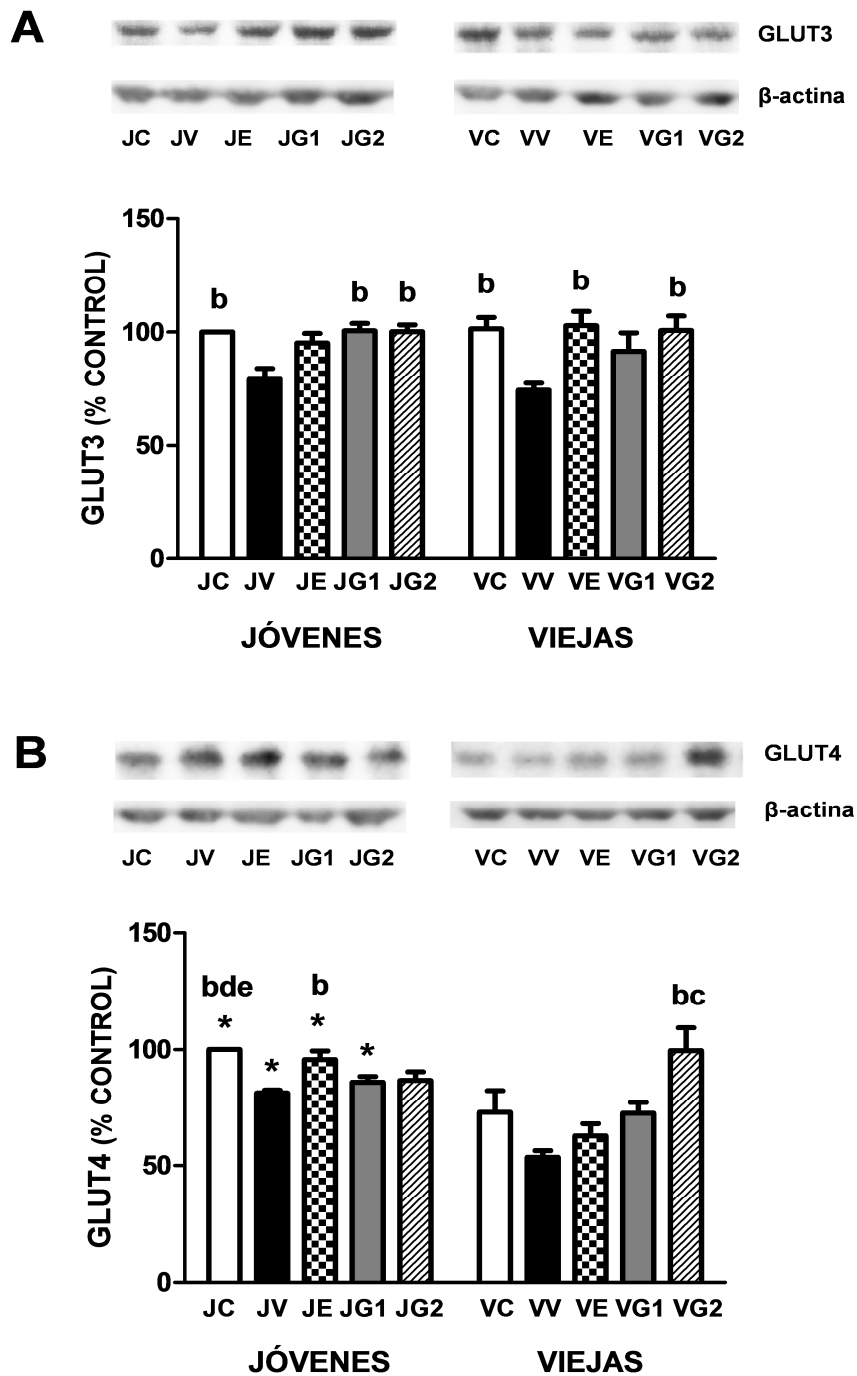
REGIÓN CEREBRAL	ESTRO	DIESTRO
<b>Corteza prefrontal</b>		
Infralímbico	21,1 $\pm$ 0,8	23,5 $\pm$ 0,3
Prelímbico	20,7 $\pm$ 0,7	23,2 $\pm$ 0,6*
Corteza cingulada	21,1 $\pm$ 0,5	22,3 $\pm$ 0,8
Corteza motora secundaria	22,3 $\pm$ 0,6	24,2 $\pm$ 0,7
<b>Hipocampo dorsal</b>		
Área CA1	27,9 $\pm$ 0,9	28,6 $\pm$ 1,5
Área CA3	25,9 $\pm$ 1,0	25,5 $\pm$ 1,1
Giro dentado	40,9 $\pm$ 1,6	40,7 $\pm$ 1,8
<b>Hipocampo ventral</b>		
Área CA1	30 $\pm$ 1,2	27,7 $\pm$ 0,9
Área CA3	30,5 $\pm$ 1,1*	27,5 $\pm$ 0,7
Giro dentado	23,7 $\pm$ 0,9	22,5 $\pm$ 1,6

---

### **3. Niveles de GLUT3 y GLUT4 en los animales jóvenes y viejos**

Los niveles de GLUT3, principal transportador de glucosa en cerebro, no se han visto influenciados por el envejecimiento. Al analizar los resultados por rango de edad, observamos que la cantidad de GLUT3 fue significativamente menor en los grupos JV y VV que en el resto de grupos de la misma edad, excepto en relación con el grupo JE en el caso de los animales jóvenes, y con el grupo VG1 en el caso de los animales viejos, donde no se alcanzó la significación estadística (*Figura 13A*).

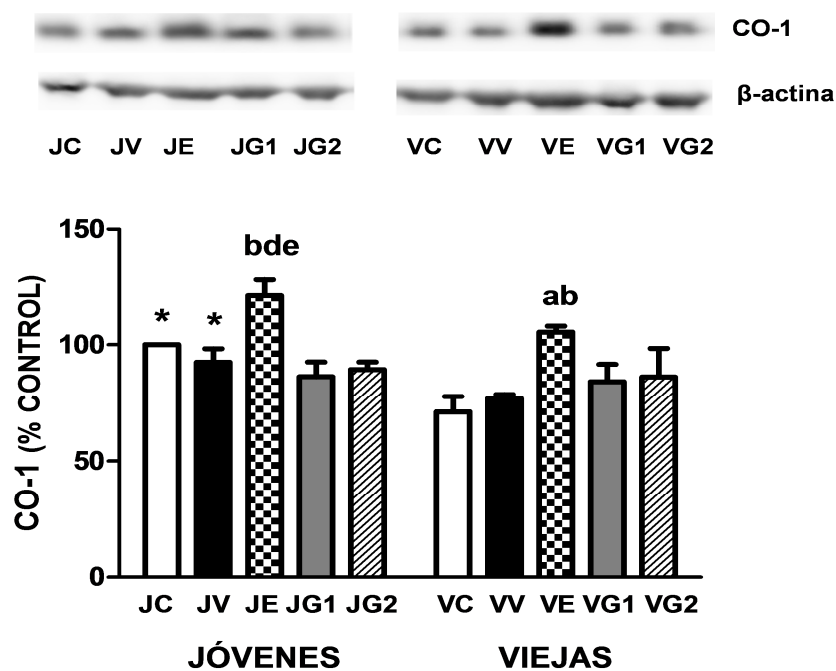
Sin embargo, en el caso de GLUT4 sí que se produjo un descenso estadísticamente significativo asociado al envejecimiento, excepto en los grupos ovariectomizados tratados con la dosis alta de genisteína. Al analizar este transportador por rango de edad observamos que los grupos JC y JE presentaron cantidades superiores que el resto de grupos de animales jóvenes, si bien las diferencias sólo alcanzaron significación estadística al comparar al grupo pseudooperado con los grupos JV, JG1 y JG2, y al comparar al grupo ovariectomizado tratado con estradiol con el grupo JV. Por su parte, los animales viejos con mayores niveles de GLUT4 fueron los ovariectomizados tratados con la dosis alta de genisteína, los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos VV y VE (*Figura 13B*).



**Figura 13.** Niveles de proteína GLUT3 (A) y GLUT4 (B) en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC).  $p < 0,05$  jóvenes vs viejas (\*), con respecto al grupo V (b), E (c), G1 (d), G2 (e). GLUT3 y GLUT4=transportadores de glucosa 3 y 4, respectivamente; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.

#### 4. Niveles de CO-1 en los animales jóvenes y viejos

Una vez cuantificados los niveles de la subunidad catalítica y principal (subunidad 1) de la citocromo c oxidasa (CO-1), encontramos un descenso estadísticamente significativo relacionado con la edad en la expresión de esta proteína, tanto en el grupo pseudooperado (JC vs VC) como en el ovariectomizado tratado con vehículo (JV vs VV). En los animales jóvenes, el grupo JE mostró unos niveles de esta proteína significativamente superiores en relación a los grupos ovariectomizados tratados con genisteína y vehículo. Por su parte, en los animales viejos el grupo VE mostró mayores niveles que el resto de grupos, aunque sólo se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo VC y VV (*Figura 14*).

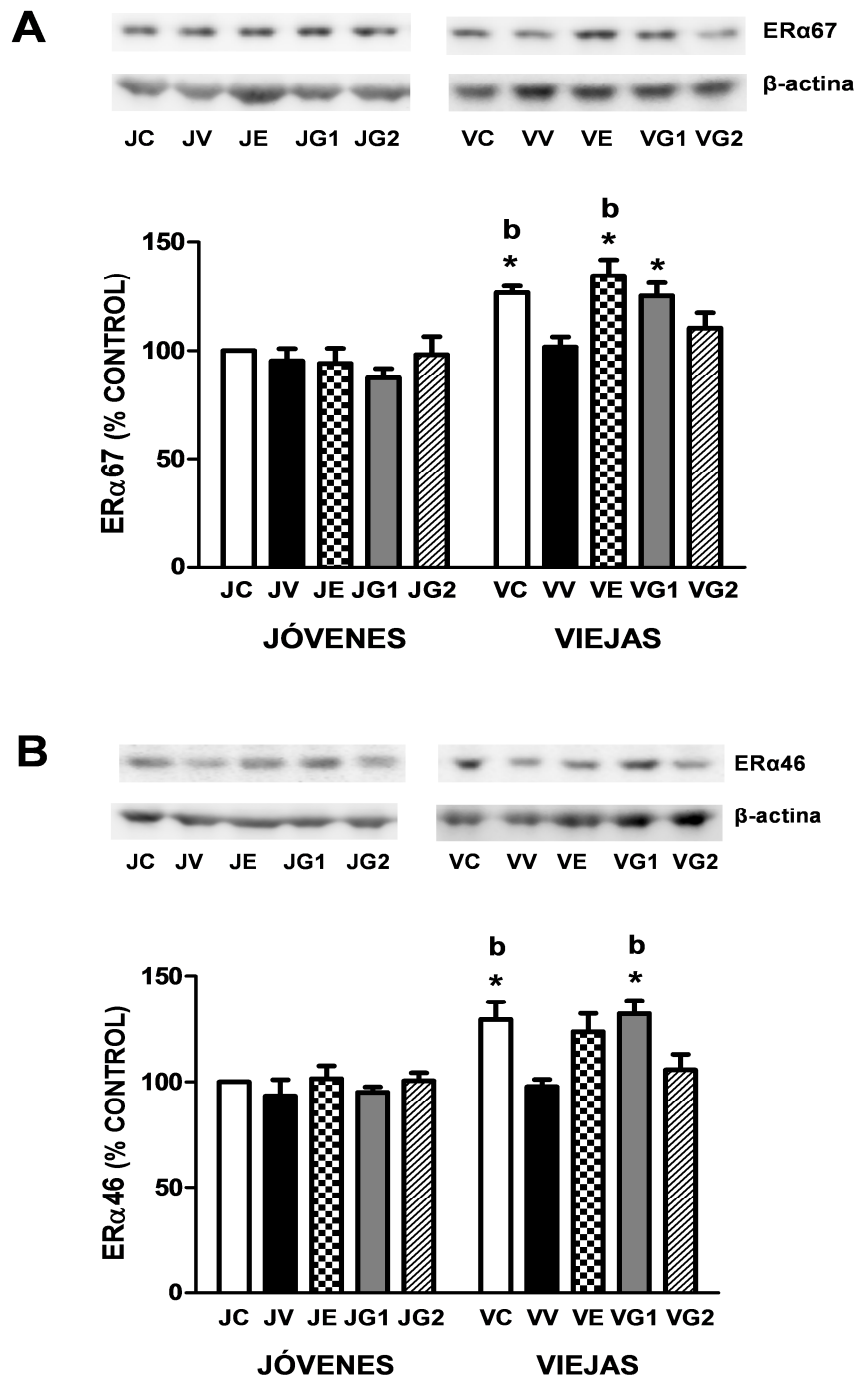


**Figura 14.** Niveles de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (CO-1) en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC).  $p < 0,05$  jóvenes vs viejas (\*), con respecto al grupo C (a), V (b), G1 (d), G2 (e). JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.

### 5. Niveles de ER $\alpha$ 67 y ER $\alpha$ 46 en los animales jóvenes y viejos

También analizamos la influencia del envejecimiento y los tratamientos empleados sobre las isoformas de 67 y 46kDa del receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ 67 y ER $\alpha$ 46 respectivamente), habiendo encontrado un incremento estadísticamente significativo asociado al envejecimiento en el grupo pseudooperado (JC vs VC) y en los grupos ovariectomizados tratados con estradiol (JE vs VE) y dosis baja de genisteína (JG1 vs VG1) en los niveles de ER $\alpha$ 67 (*Figura 15A*), así como en los animales pseudooperados (JC vs VC) y ovariectomizados tratados con dosis baja de genisteína (JG1 vs VG1) en la abundancia de ER $\alpha$ 46 (*Figura 15B*).

Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ni en los niveles de ER $\alpha$ 67 (*Figura 15A*), ni en los de ER $\alpha$ 46 (*Figura 15B*), en los animales jóvenes. Sin embargo, sí se han encontrado diferencias entre los grupos de animales viejos, mostrando los grupos VC, VE y VG1 cantidades mayores tanto de ER $\alpha$ 67 como de ER $\alpha$ 46, si bien las diferencias solo alcanzaron significación estadística al comparar VV respecto a VC y VE en el caso de ER $\alpha$ 67 (*Figura 15A*) y VV respecto a VC y VG1 en el caso de ER $\alpha$ 46 (*Figura 15B*).

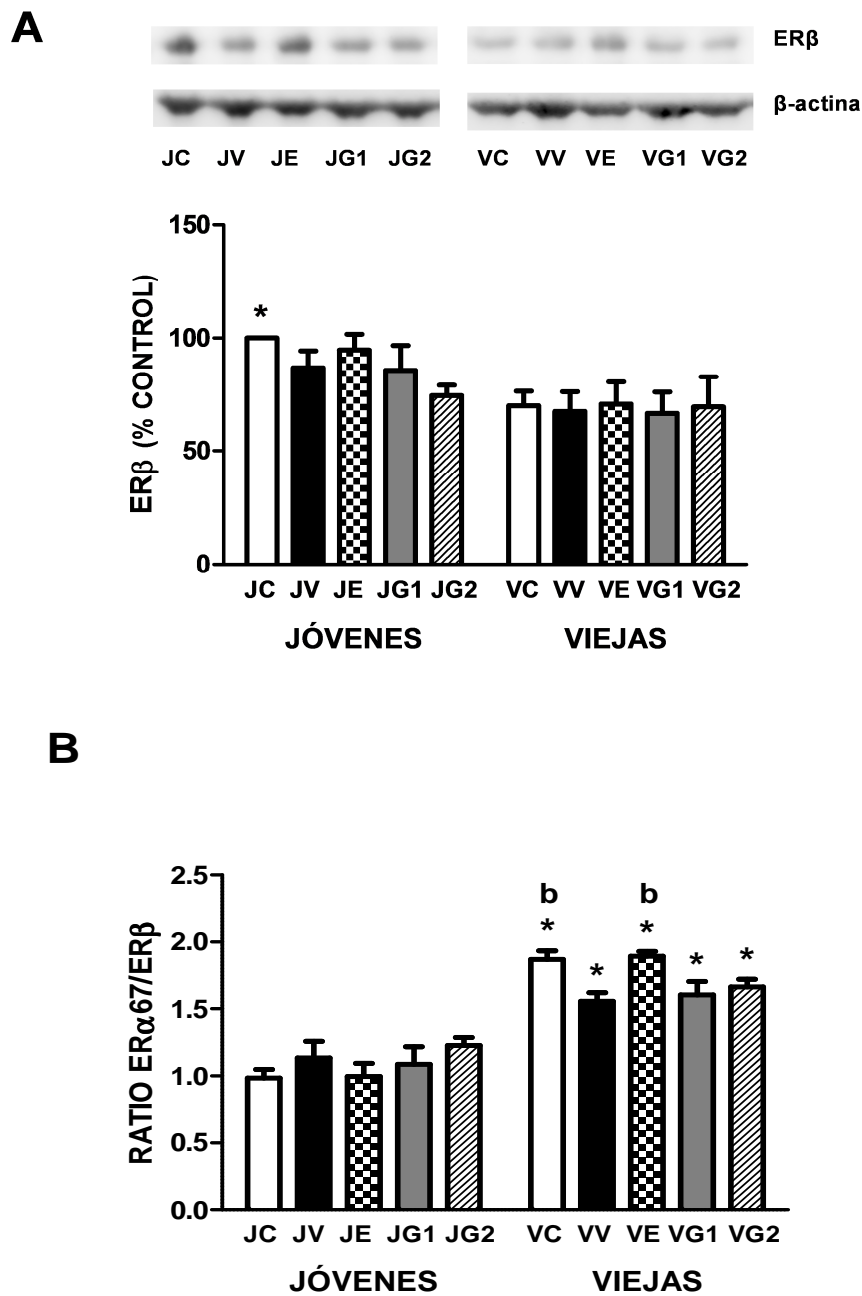


**Figura 15.** Niveles de ERα67 (A) y ERα46 (B) en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC).  $p < 0,05$  jóvenes vs viejas (\*), con respecto al grupo V (b). ERα67 y ERα46=isoformas de 67 y 46kDa del receptor de estrógenos α, respectivamente; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.

### 6. Niveles de ER $\beta$ y ratio ER $\alpha$ 67/ER $\beta$ en los animales jóvenes y viejos

Los niveles del otro subtipo del receptor de estrógenos, ER $\beta$ , también fueron cuantificados. La comparación entre edades mostró una caída en los niveles de esta proteína asociada al envejecimiento, llegando a ser estadísticamente significativa en el grupo pseudooperado. En relación a los posibles efectos de los tratamientos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni entre los grupos de animales jóvenes ni entre los de animales viejos (*Figura 16A*).

Además, se estudió el ratio entre ambos subtipos del receptor de estrógenos. Para ello, calculamos el cociente resultante de dividir la cantidad de ER $\alpha$ 67 entre la de ER $\beta$  de cada animal. El balance se mantuvo en un ratio cercano a 1 en las ratas jóvenes, es decir, abundancia similar de ambos subtipos del receptor de estrógenos. Sin embargo, esta relación sufrió un desplazamiento significativo con el envejecimiento hacia ER $\alpha$ 67, con una clara predominancia de este subtipo sobre ER $\beta$  en todos los grupos de tratamiento. En cuanto a los efectos de los tratamientos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos jóvenes. Sin embargo, una alteración de este ratio fue evidenciada en el grupo VV, siendo significativamente menor que en los grupos VC y VE (*Figura 16B*).

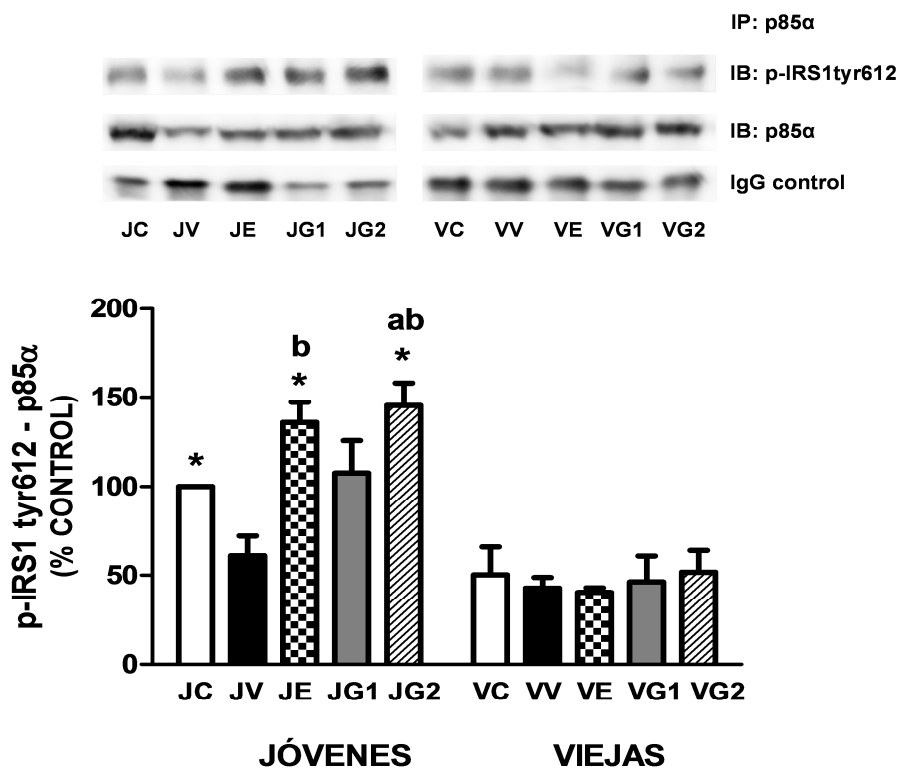


**Figura 16.** Niveles de ERβ (A) y ratio ERα67/ERβ (B) en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC) (A), o bien como los datos brutos (B).  $p < 0,05$  jóvenes vs viejas (\*), con respecto al grupo V (b). ERβ=receptor de estrógenos β; ERα67=isoforma de 67kDa del receptor de estrógenos α; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.



7. Interacción p-IRS1<sub>tyr612</sub> - p85α en los animales jóvenes y viejos

La interacción entre la forma activa de IRS1 (p-IRS1<sub>tyr612</sub>) y la subunidad reguladora de PI3K (p85α) disminuyó significativamente con la edad, tanto en los animales pseudooperados (JC vs VC) como en los ovariectomizados tratados con estradiol (JE vs VE) y dosis alta de genisteína (JG2 vs VG2). En los animales jóvenes, el grupo JV mostró una interacción menor entre estas dos proteínas que el resto de los grupos, alcanzándose significación estadística con respecto a los grupos JE y JG2. Además, el grupo JG2 mostró una interacción significativamente mayor que el grupo JC. Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos en los animales viejos (Figura 17).

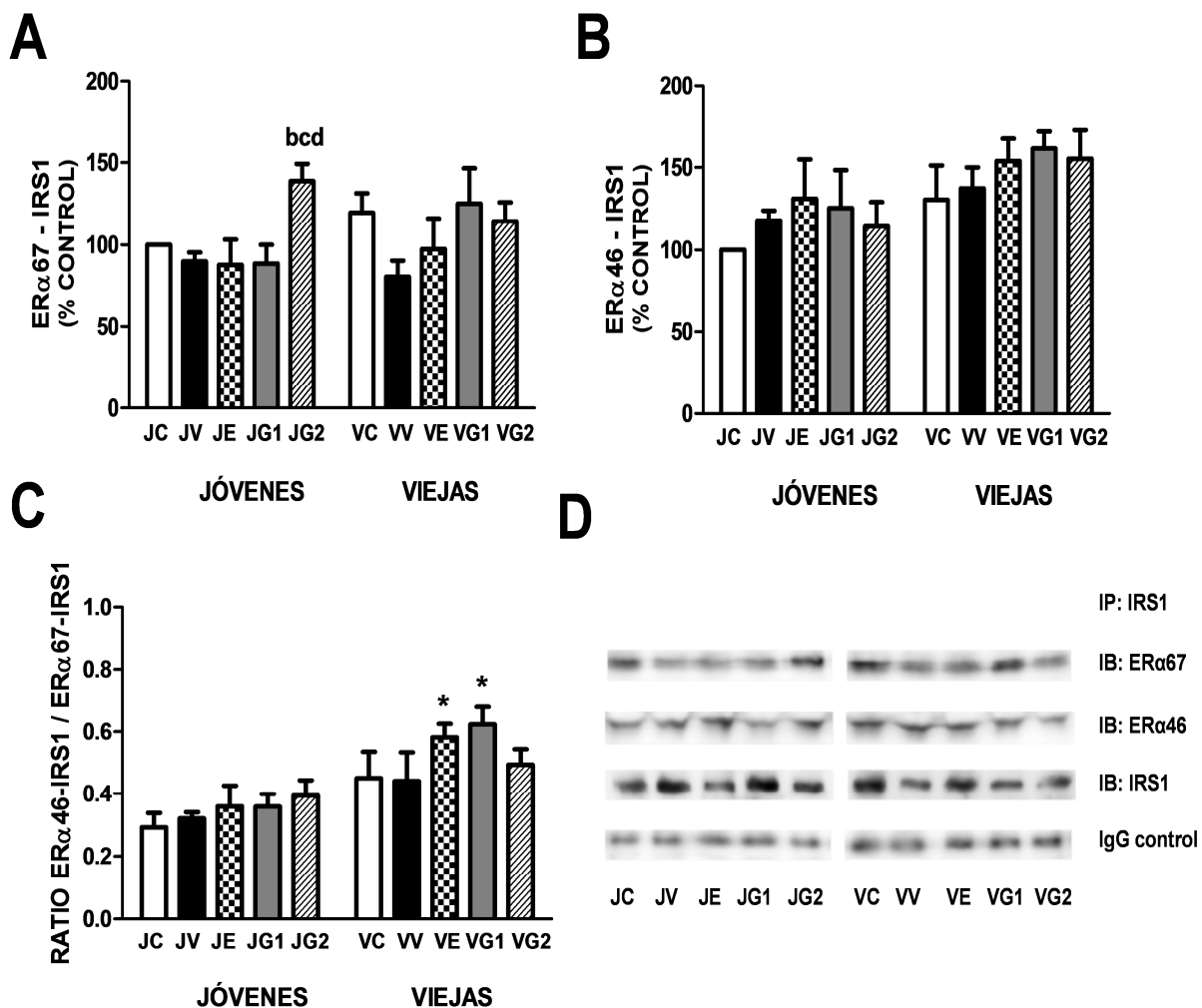


**Figura 17.** Interacción entre p-IRS<sub>tyr612</sub> y p85α en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC). p<0,05 jóvenes vs viejas (\*), con respecto al grupo C (a), V (b). p-IRS1<sub>tyr612</sub>=forma activa de IRS1; p85α=subunidad reguladora de PI3K; IgG=inmunoglobulinas G; IP=inmunoprecipitación; IB=inmunoblot; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.

## 8. Interacción ER $\alpha$ -IRS1 en los animales jóvenes y viejos

No se encontraron diferencias relacionadas con la edad en la interacción entre IRS1 y ambas isoformas de ER $\alpha$ , ER $\alpha$ 67 (*Figura 18A*) y ER $\alpha$ 46 (*Figura 18B*). Además, también se evaluó el ratio entre ambas interacciones dividiendo la unión ER $\alpha$ 46-IRS1 entre ER $\alpha$ 67-IRS1 en cada animal (*Figura 18C*). Calculando este cociente fue posible comprobar qué isoforma de ER $\alpha$  se unió con más fuerza a IRS1. El ratio fue menor de 1 en ambas edades, indicando que la isoforma de 67kDa se unió con mayor afinidad a IRS1 a cualquier edad. Sin embargo, hubo un incremento relacionado con la edad en este ratio en los grupos ovariectomizados tratados con estradiol (JE vs VE) y dosis baja de genisteína (JG1 vs VG1) (*Figura 18C*).

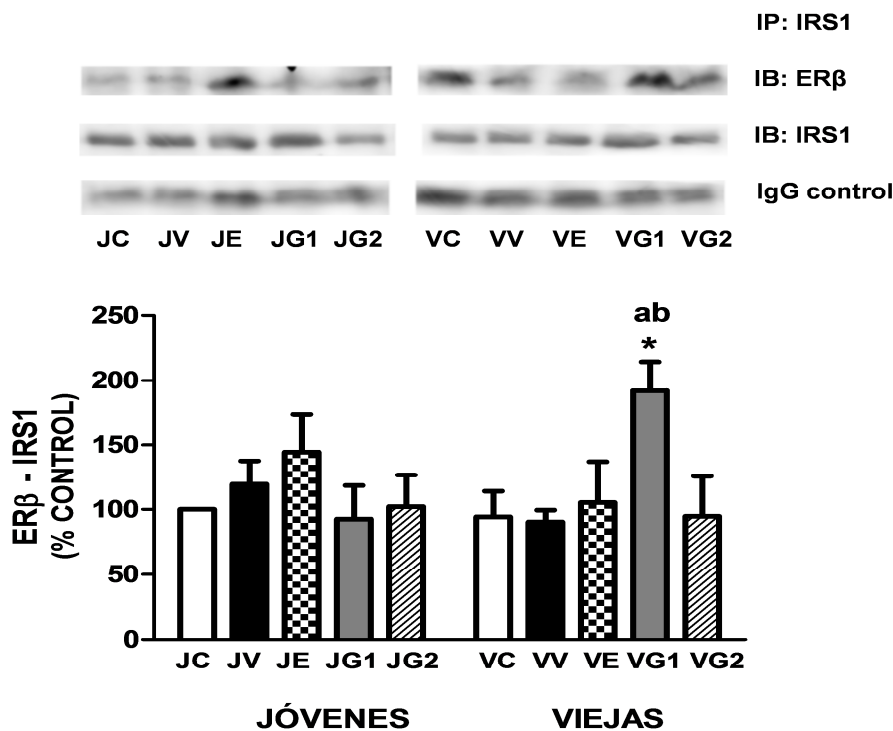
En lo relativo a la comparación entre los distintos grupos de tratamiento por rango de edad, el grupo JG2 mostró una interacción ER $\alpha$ 67-IRS1 significativamente mayor que los grupos JV, JE y JG1 (*Figura 18A*). Por el contrario, no se encontraron diferencias entre los grupos de animales jóvenes, ni en cuanto a la interacción ER $\alpha$ 46-IRS1 (*Figura 18B*), ni en lo relativo al ratio ER $\alpha$ 46-IRS1 / ER $\alpha$ 67-IRS1 (*Figura 18C*). Además, en los animales viejos no se encontraron diferencias entre grupos de tratamiento, ni en lo referente a las interacciones entre IRS1 y ambas isoformas de ER $\alpha$  (*Figura 18A* y *Figura 18B*), ni en el ratio ER $\alpha$ 46-IRS1 / ER $\alpha$ 67-IRS1 (*Figura 18C*).



**Figura 18.** Interacción ERα67-IRS1 (A), interacción ERα46-IRS1 (B), ratio ERα46-IRS1/ERα67-IRS1 (C) y bandas representativas de estas proteínas (D) en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC) (A, B), o bien como los datos brutos (C). p<0,05 jóvenes vs viejas (\*), con respecto al grupo V (b), E (c), G1 (d). ERα67 y ERα46=isoformas de 67 y 46kDa del receptor de estrógenos α; IRS1=sustrato del receptor de insulina 1; IgG=inmunoglobulinas G; IP=inmunoprecipitación; IB=inmunoblot; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.

9. Interacción ERβ-IRS1 en los animales jóvenes y viejos

La interacción entre IRS1 y el otro subtipo del receptor de estrógenos, ERβ, también fue analizada (Figura 19). La comparación entre edades mostró un incremento estadísticamente significativo con el envejecimiento de la interacción en el grupo ovariectomizado tratado con dosis baja de genisteína (JG1 vs VG1). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento en los animales jóvenes. Sin embargo, en los animales viejos, el grupo VG1 exhibió una unión entre estas dos proteínas significativamente mayor que los grupos VC y VV (Figura 19).

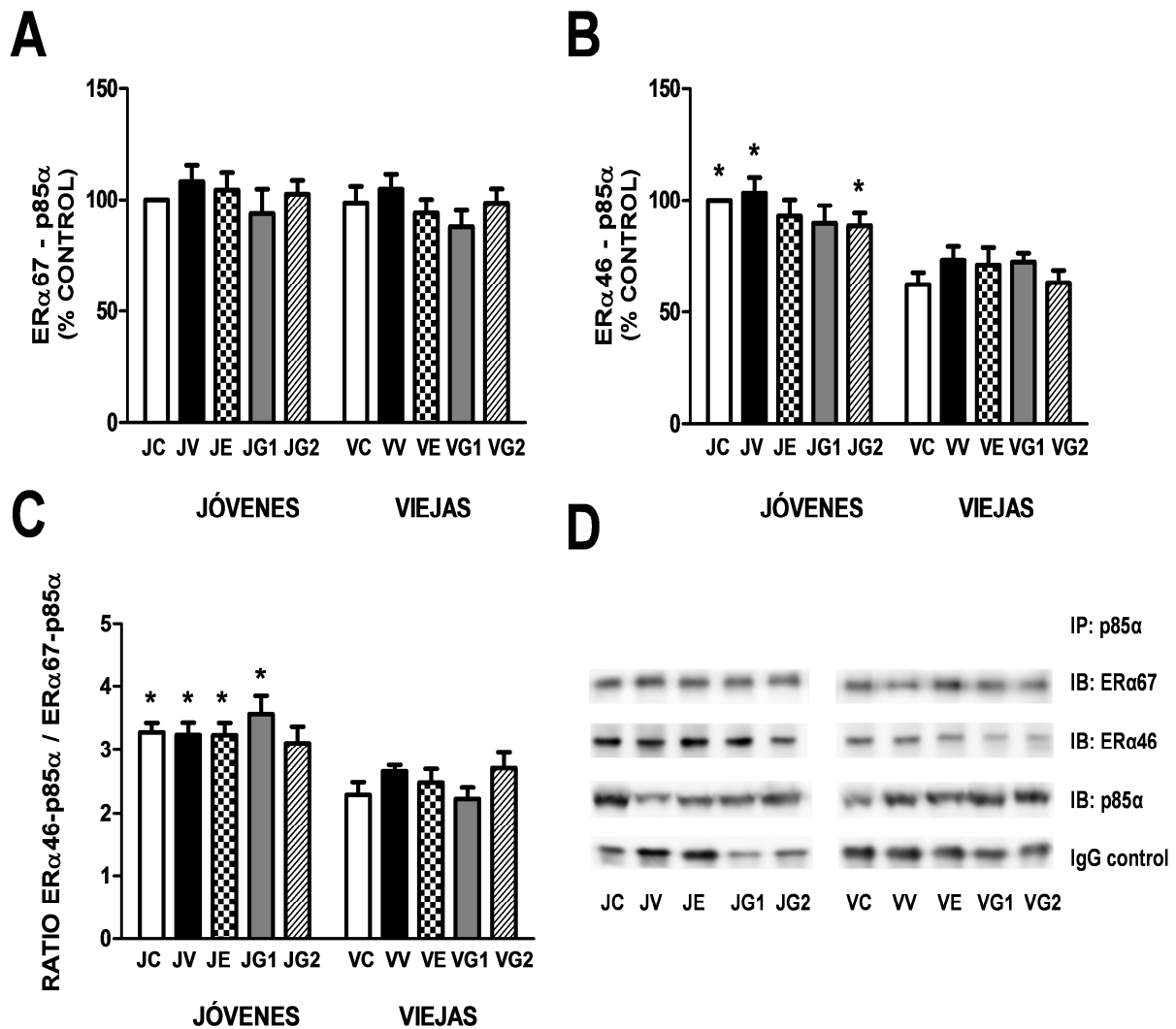


**Figura 19.** Interacción entre ERβ e IRS1 en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC). p<0,05 jóvenes vs viejas (\*), con respecto al grupo C (a), V (b). ERβ=receptor de estrógenos β; IRS1=sustrato del receptor de insulina 1; IgG=inmunoglobulinas G; IP=inmunoprecipitación; IB=inmunoblot; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.

### 10. Interacción ER $\alpha$ -p85 $\alpha$ en los animales jóvenes y viejos

No se encontraron cambios significativos asociados a la edad en cuanto a la interacción entre ER $\alpha$ 67 y la subunidad reguladora de PI3K, p85 $\alpha$  (*Figura 20A*). Sin embargo, hallamos un descenso estadísticamente significativo relacionado con el envejecimiento en la interacción de p85 $\alpha$  con ER $\alpha$ 46 en los grupos pseudooperados (JC vs VC) y en los grupos ovariectomizados tratados con vehículo (JV vs VV) y dosis alta de genisteína (JG2 vs VG2) (*Figura 20B*). Además, tal como hicimos con IRS1, calculamos el ratio entre las interacciones ER $\alpha$ 46-p85 $\alpha$  / ER $\alpha$ 67-p85 $\alpha$  para averiguar qué isoforma de ER $\alpha$  se unía con más fuerza a p85 $\alpha$ . El cociente de este ratio fue mayor de 1 en ambos grupos de edad, indicando que la isoforma de 46kDa se unió con mayor potencia a p85 $\alpha$  a cualquier edad. Sin embargo, el ratio experimentó una caída estadísticamente significativa con el envejecimiento en todos los grupos, excepto en el ovariectomizado y tratado con alta dosis de genisteína (*Figura 20C*).

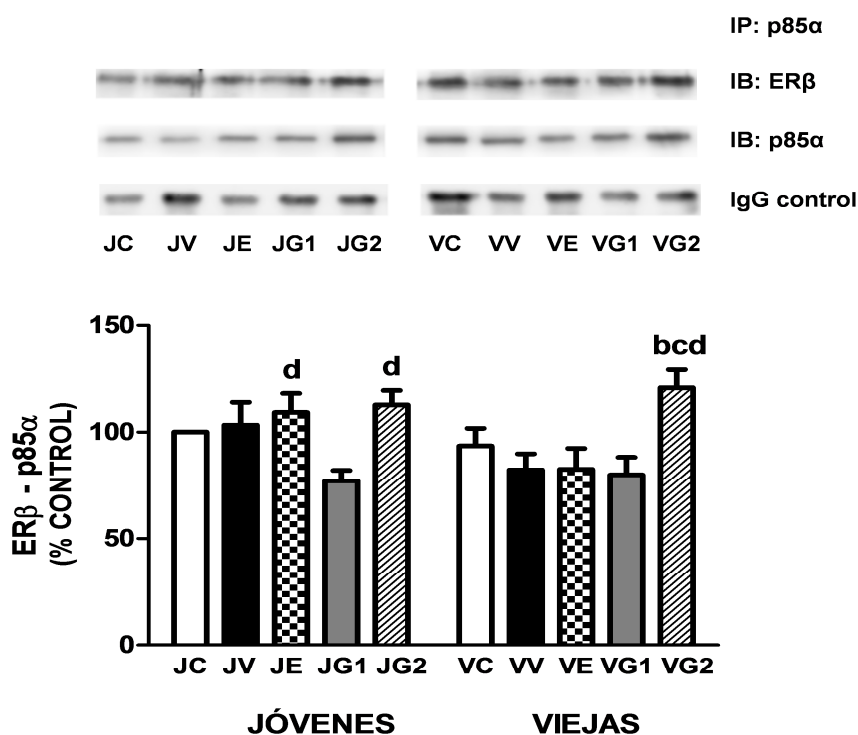
En cuanto a la comparación entre tratamientos en los distintos grupos de edad, no se han visto diferencias estadísticamente significativas ni en las interacciones entre ambas isoformas de ER $\alpha$  y p85 $\alpha$  (*Figuras 20A y 20B*), ni en el ratio ER $\alpha$ 46-p85 $\alpha$  / ER $\alpha$ 67-p85 $\alpha$  (*Figura 20C*).



**Figura 20.** Interacción ERα67-p85α (A), interacción ERα46-p85α (B), ratio ERα46-p85α/ERα67-p85α (C) y bandas representativas de estas proteínas (D) en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC) (A, B), o bien como los datos brutos (C). p<0,05 jóvenes vs viejas (\*). ERα67 y ERα46=isoformas de 67 y 46 kDa del receptor de estrógenos α; p85α=subunidad reguladora de PI3K; IgG=inmunoglobulinas G; IP=inmunoprecipitación; IB=inmunoblot; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genistéina, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genistéina, respectivamente.

### 11. Interacción ERβ-p85α en los animales jóvenes y viejos

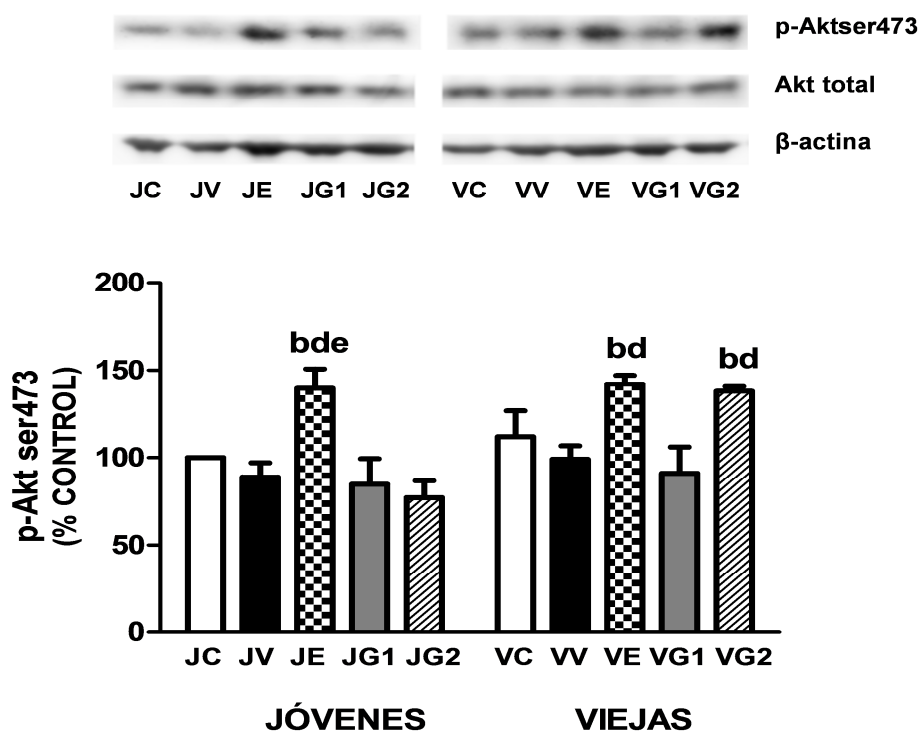
La comparación entre edades no mostró diferencias estadísticamente significativas relacionadas con el envejecimiento en esta interacción (*Figura 21*). En relación al estudio de los efectos de los tratamientos en los distintos grupos de edad, los grupos JE y JG2 experimentaron un aumento estadísticamente significativo de esta interacción comparado con el grupo JG1. En los animales viejos observamos que el grupo VG2 mostró el valor más alto de unión entre estas dos proteínas, siendo significativamente mayor que los valores de los grupos VV, VE y VG1 (*Figura 21*).



**Figura 21.** Interacción entre ERβ y p85α en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC). p<0,05 con respecto al grupo V (b), E (c), G1 (d). ERβ=receptor de estrógenos β; p85α=subunidad reguladora de PI3K; IgG=inmunoglobulinas G; IP=inmunoprecipitación; IB=inmunoblot; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.

**12. Fosforilación de Akt<sub>ser473</sub> en los animales jóvenes y viejos**

La forma activa de Akt no se vio afectada por el envejecimiento. Sin embargo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo de edad. En lo concerniente a las ratas jóvenes, el grupo JE mostró los niveles más altos de fosforilación, alcanzando significación estadística respecto a los grupos JV, JG1 y JG2. Por otra parte, en los animales viejos los grupos VE y VG2 mostraron una fosforilación de Akt<sub>ser473</sub> significativamente mayor que los grupos VV y VG1 (Figura 22).

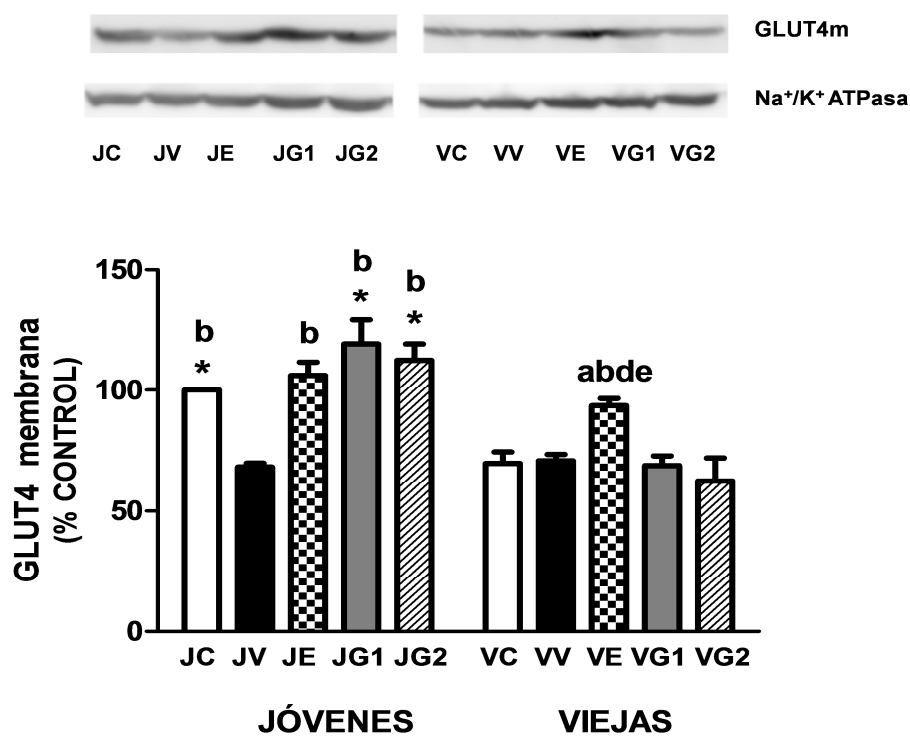


**Figura 22.** Fosforilación de Akt<sub>ser473</sub> en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC). p<0,05 con respecto al grupo V (b), G1 (d), G2 (e). p-Akt<sub>ser473</sub>=forma activa de la proteína quinasa B; Akt=proteína quinasa B; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.



13. Niveles de GLUT4 en membrana plasmática en los animales jóvenes y viejos

La translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática sufrió un descenso con la edad en los animales pseudooperados, así como en los ovariectomizados y tratados con genisteína. En cuanto a la comparativa dentro de cada edad, en las ratas jóvenes todos los grupos de tratamiento mostraron unos niveles de GLUT4 en membrana plasmática significativamente más altos que el grupo JV. Sin embargo, en los animales viejos sólo destacó por encima del resto el grupo VE, el cual presentó niveles significativamente mayores de GLUT4 en membrana plasmática que el resto de grupos de tratamiento (*Figura 23*).

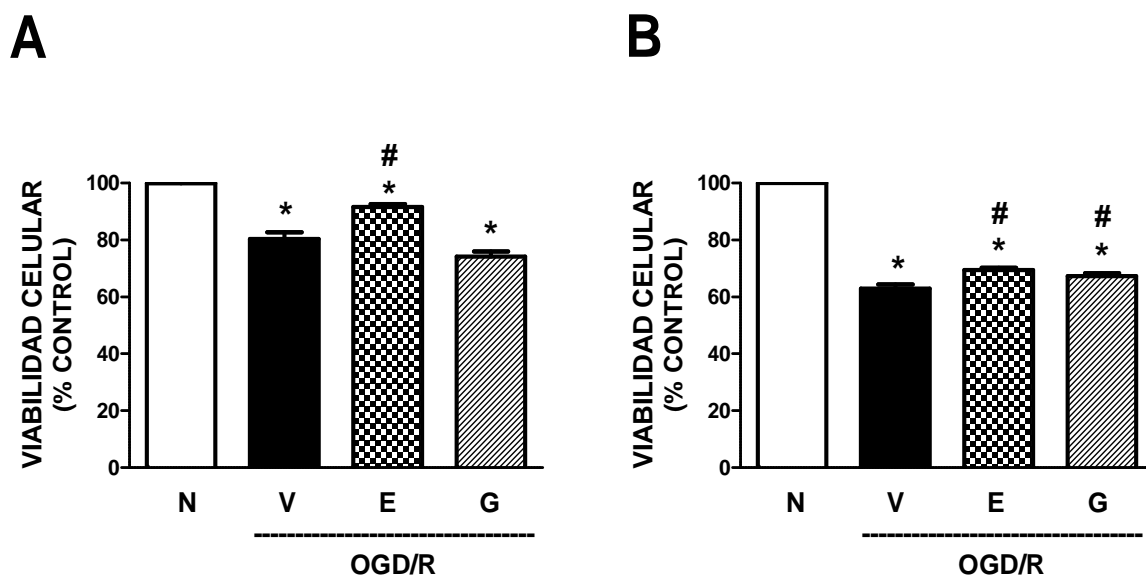


**Figura 23.** Niveles de GLUT4 en membrana plasmática en los animales jóvenes y viejos. El histograma muestra el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes de Western blot (n=5 por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo joven control (JC).  $p < 0,05$  jóvenes vs viejas (\*), con respecto al grupo C (a), V (b), G1 (d), G2 (e). GLUT4m=transportador de glucosa 4 en membrana plasmática; JC=animales jóvenes control; JV, JE, JG1 y JG2=animales jóvenes ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente; VC=animales viejos control; VV, VE, VG1 y VG2=animales viejos ovariectomizados y tratados con vehículo, estradiol, dosis baja y alta de genisteína, respectivamente.

#### 14. Ensayo de viabilidad celular en las células HT22

La viabilidad celular se vio fuertemente reducida en todos los grupos como consecuencia de un ciclo de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R) en comparación con el grupo normóxico (N). Sin embargo, el grupo expuesto a OGD/R tratado con estradiol (E), presentó unos valores de viabilidad celular significativamente más altos que el grupo tratado con DMSO (V) (*Figura 24A*).

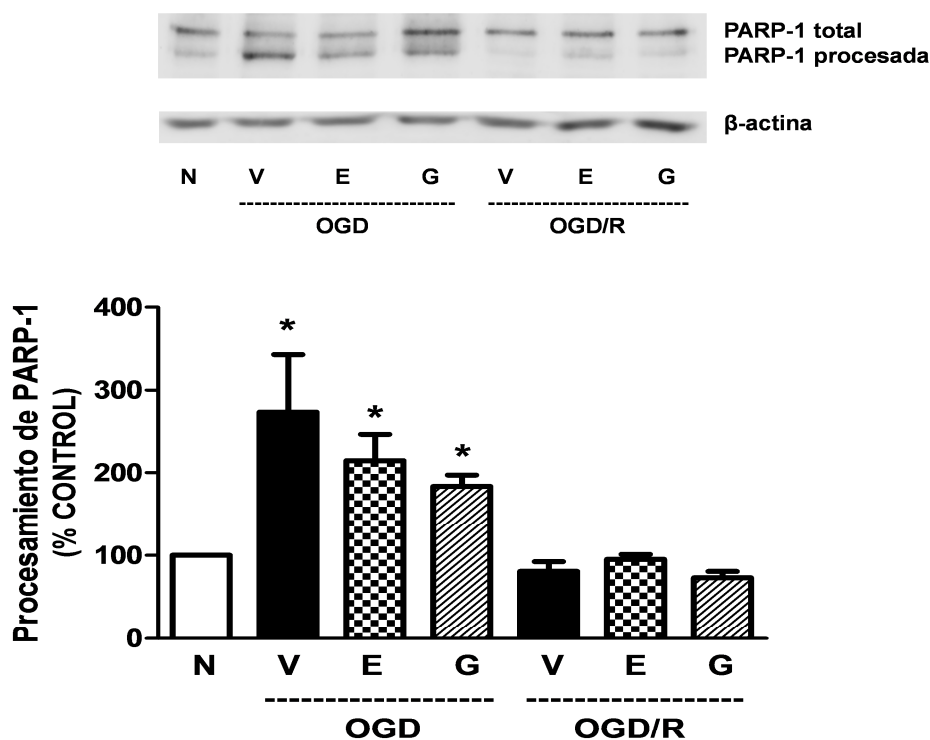
Por su parte, los grupos sometidos a dos ciclos consecutivos de OGD/R sufrieron una reducción de la viabilidad celular aun mayor respecto al grupo N. En este caso, dentro de los grupos expuestos a los dos ciclos de OGD/R, tanto las células tratadas con estradiol (E) como con genisteína (G) presentaron unos valores de viabilidad significativamente superiores al del grupo V (*Figura 24B*).



**Figura 24.** Ensayo MTT de viabilidad celular en las células HT22 expuestas a un ciclo (A) o dos ciclos consecutivos (B) de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de cada uno de los grupos (n=8 por grupo) y son mostrados como el porcentaje relativo del valor medio del grupo normóxico (N).  $p < 0,05$  respecto al grupo normóxico (\*), respecto al grupo vehículo (#). N=células cultivadas en medio completo y normoxia; V, E y G=células expuestas a privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R) y tratadas con vehículo, estradiol o genisteína, respectivamente.

15. Evaluación del procesamiento de PARP-1 en las células HT22

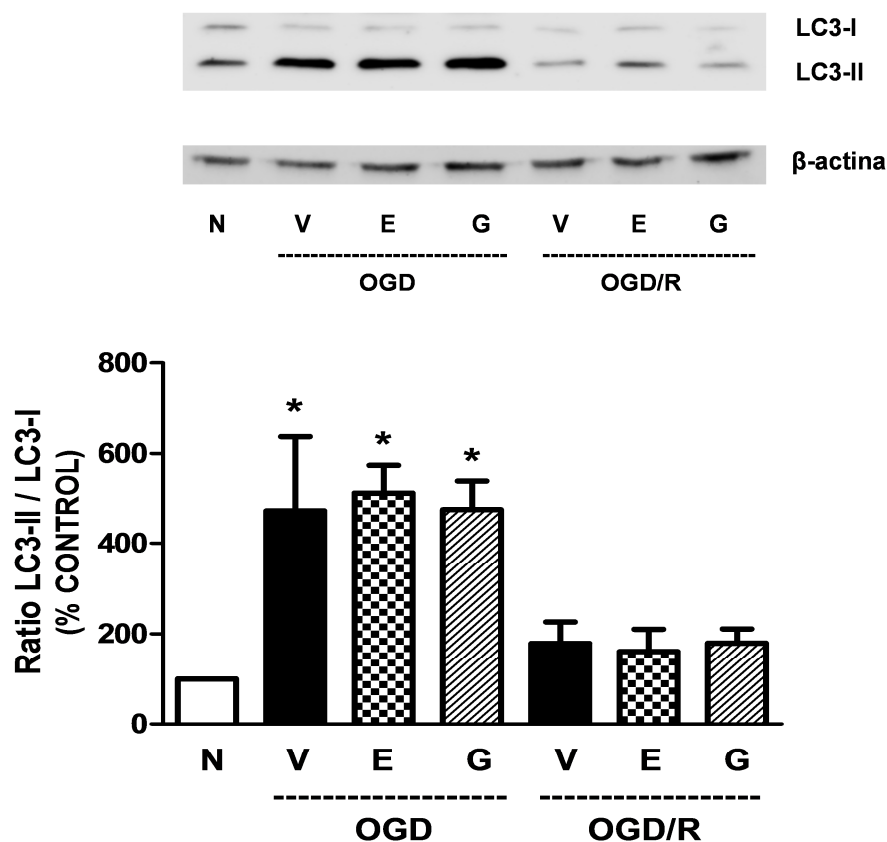
El procesamiento de PARP-1 se evaluó como un marcador de células que están sufriendo procesos de apoptosis. El procesamiento de PARP-1 fue significativamente más alto en todos los grupos que en el grupo N tras la segunda OGD. Sin embargo, cuando las células fueron reoxigenadas nuevamente tras esta segunda OGD, el procesamiento de PARP-1 descendió a los niveles del grupo normóxico en todos los casos (Figura 25).



**Figura 25.** Procesamiento de PARP-1 en las células HT22 expuestas a dos ciclos consecutivos de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R). El histograma muestra el análisis densitométrico del Western blot en dos experimentos independientes ensayados por triplicado (n=6 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo normóxico (N). p<0,05 respecto al grupo normóxico (\*). PARP-1=polimerasa poli (ADP-ribosa) 1; N=células cultivadas en medio completo y normoxia; V, E y G=células expuestas a privación de oxígeno y glucosa (OGD) o privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R) y tratadas con vehículo, estradiol o genisteína, respectivamente.

16. Evaluación del ratio de LC3 en las células HT22

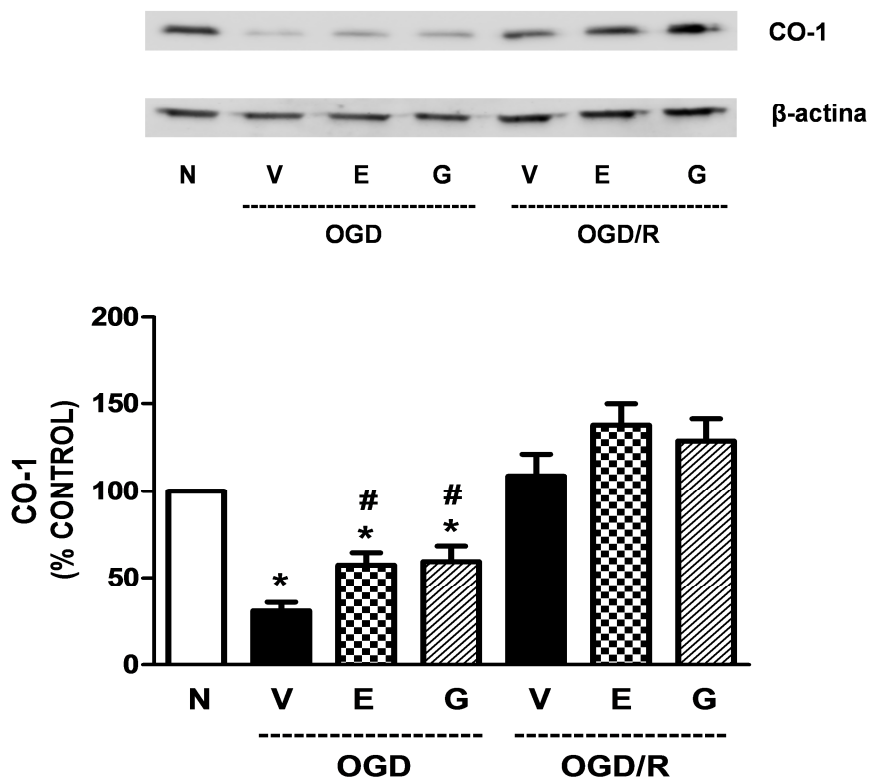
Por otra parte, también se estudió el ratio entre LC3-II y LC3-I como un marcador de células que hayan activado el mecanismo de autofagia. De la misma forma, también se vio un aumento significativo del ratio LC3-II/LC3-I en respuesta a un segundo ciclo de OGD en todos los grupos con respecto a la situación de normoxia. Sin embargo, se produjo una reducción de este ratio con la segunda reoxigenación, llegando a descender a valores cercanos a los del grupo normóxico en todos los casos (Figura 26).



**Figura 26.** Ratio LC3-II/LC3-I en las células HT22 expuestas a dos ciclos consecutivos de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R). El histograma muestra el análisis densitométrico del Western blot en dos experimentos independientes ensayados por triplicado (n=6 por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo normóxico (N).  $p < 0,05$  respecto al grupo normóxico (\*). LC3-I, LC3-II=formas citosólica y lipidada de la cadena ligera 3 de la proteína asociada a los microtúbulos 1A/1B, respectivamente; N=células cultivadas en medio completo y normoxia; V, E y G=células expuestas a privación de oxígeno y glucosa (OGD) o privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R) y tratadas con vehículo, estradiol o genisteína, respectivamente.

17. Niveles de CO-1 en las células HT22

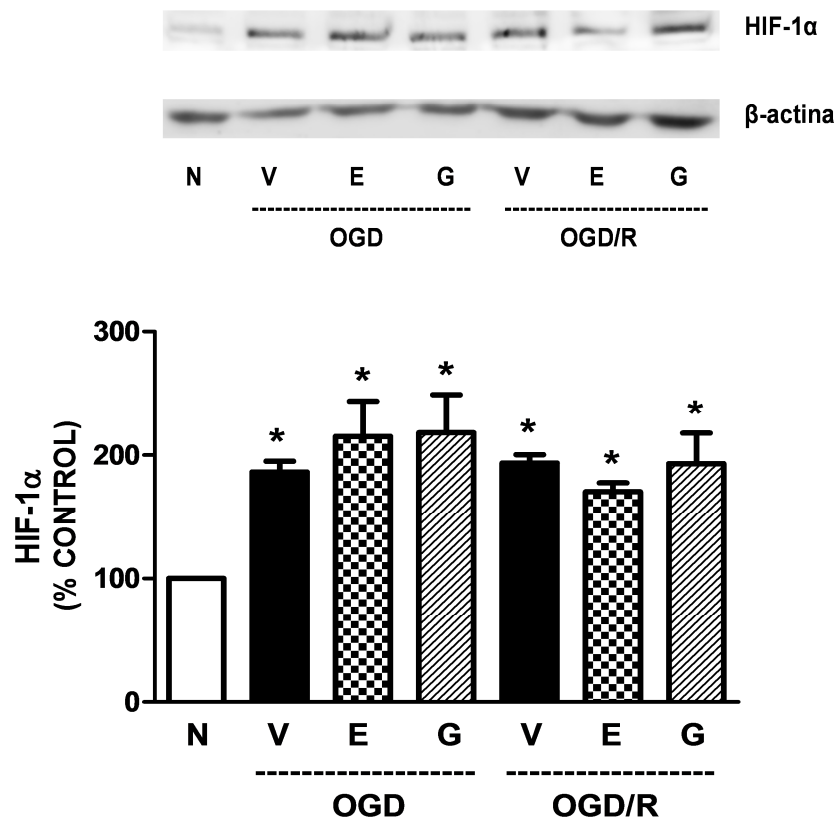
Con el objetivo de estudiar posibles variaciones del metabolismo oxidativo neuronal en respuesta a las dos situaciones consecutivas de OGD/R generadas, se evaluó la subunidad catalítica y principal de la citocromo c oxidasa (CO-1). Los niveles de esta proteína descendieron significativamente por debajo del grupo N en todos los grupos expuestos a esta segunda OGD. Sin embargo, los tratamientos con estradiol y genisteína previnieron parcialmente este descenso de forma significativa respecto al grupo V. La reoxigenación posterior a esta segunda OGD supuso un nuevo incremento de la expresión de CO-1, la cual alcanzó los valores del grupo normóxico en todos los casos (Figura 27).



**Figura 27.** Niveles de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (CO-1) en las células HT22 expuestas a dos ciclos consecutivos de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R). El histograma muestra el análisis densitométrico del Western blot en dos experimentos independientes ensayados por triplicado (n=6 por grupo). Los valores representan la media ± SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo normóxico (N). p<0,05 respecto al grupo normóxico (\*), respecto al grupo vehículo (#). N=células cultivadas en medio completo y normoxia; V, E y G=células expuestas a privación de oxígeno y glucosa (OGD) o privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R) y tratadas con vehículo, estradiol o genisteína, respectivamente.

**18. Niveles de HIF-1 $\alpha$  en las células HT22**

Se analizó HIF-1 $\alpha$  como un marcador de células que atraviesan una situación de hipoxia. Esta proteína se sobreexpresó de forma significativa en todos los grupos respecto al grupo normóxico tras la exposición a una segunda OGD. Además, los valores de esta proteína también se mantuvieron significativamente más altos en todos los grupos comparado con el grupo N durante el segundo periodo de reoxigenación (Figura 28).

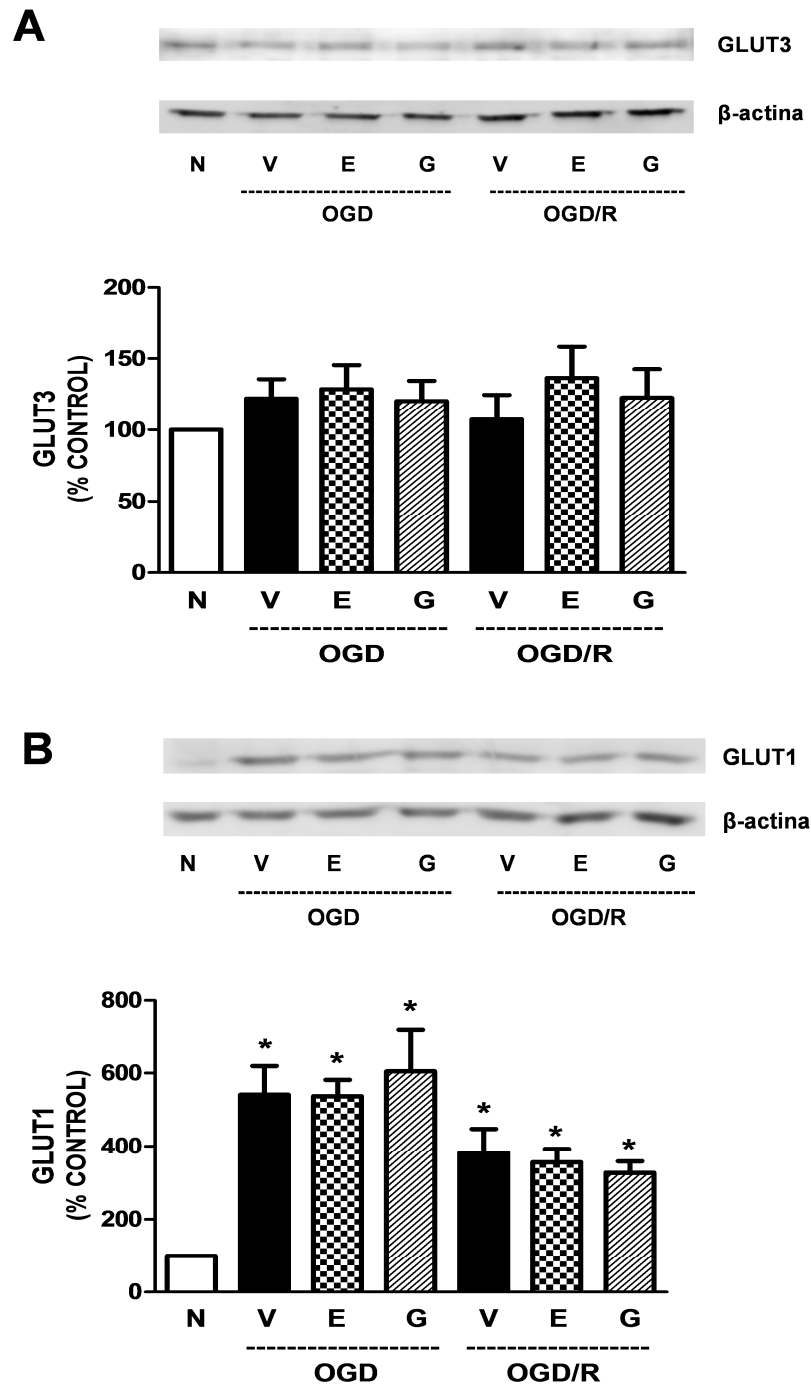


**Figura 28.** Niveles de HIF-1 $\alpha$  en las células HT22 expuestas a dos ciclos consecutivos de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R). El histograma muestra el análisis densitométrico del Western blot en dos experimentos independientes ensayados por triplicado (n=6 por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y son mostrados como el porcentaje del valor medio del grupo normóxico (N). p<0,05 respecto al grupo normóxico (\*). HIF-1 $\alpha$ =subunidad  $\alpha$  del factor inducible por la hipoxia 1; N=células cultivadas en medio completo y normoxia; V, E y G=células expuestas a privación de oxígeno y glucosa (OGD) o privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R) y tratadas con vehículo, estradiol o genisteína, respectivamente.

### **19. Niveles de los transportadores de glucosa GLUT3 y GLUT1 en las células HT22**

En último lugar, se estudió la influencia del experimento de dos OGD/R consecutivas sobre los niveles de expresión de GLUT3, transportador de glucosa mayoritario en las neuronas. No obstante, esta proteína se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo N, ni en los grupos sometidos a una segunda OGD ni en aquellos que fueron posteriormente reoxigenados. Tampoco se hallaron diferencias entre ninguno de los tratamientos ensayados en ninguna de las dos situaciones evaluadas (*Figura 29A*).

De manera adicional se evaluaron los niveles de proteína del otro transportador de glucosa mayoritario en el SNC, GLUT1. Este transportador se encuentra mayoritariamente en la glía. No obstante, tal como reflejaron los datos del grupo normóxico, también se expresa en las neuronas, aunque en muy baja cantidad. Sin embargo, la exposición a la segunda OGD provocó una regulación al alza estadísticamente significativa de este transportador de glucosa en todos los grupos. Durante la fase de reoxigenación, los niveles de GLUT1 disminuyeron en todos los casos, aunque continuaron siendo significativamente más altos que los del grupo normóxico en todos los grupos (*Figura 29B*).



**Figura 29.** Niveles de GLUT3 (A) y GLUT1 (B) en las células HT22 expuestas a dos ciclos consecutivos de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R). El histograma muestra el análisis densitométrico del Western blot en dos experimentos independientes ensayados por triplicado (n=6 por grupo). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y son mostrados como el porcentaje relativo del valor del grupo normóxico (N).  $p < 0,05$  respecto al grupo normóxico (\*). GLUT3 y GLUT1=transportadores de glucosa 3 y 1, respectivamente; N=células cultivadas en medio completo y normoxia; V, E y G=células expuestas a privación de oxígeno y glucosa (OGD) o privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R) y tratadas con vehículo, estradiol o genisteína, respectivamente.





## **DISCUSIÓN**



La actividad sexual de la mayor parte de las hembras de los mamíferos depende de la repetición de un ciclo reproductivo. Dicho ciclo está sujeto a un control preciso en el que intervienen diversos factores, entre los cuales los estrógenos juegan un papel fundamental (7). La importancia de estas hormonas, afectando al hipotálamo, para el buen funcionamiento de las funciones reproductivas es de sobra conocida. Sin embargo, menos conocidas, pero no menos importantes, resultan las funciones que éstas ejercen para el mantenimiento de la homeostasis cerebral, principalmente participando en la regulación de eventos metabólicos (46,47). Por este motivo, el primer objetivo propuesto en este trabajo fue estudiar la posible influencia que tienen las diferencias en los niveles de estrógenos sobre el metabolismo oxidativo en la corteza prefrontal e hipocampo de ratas hembra adultas. Para ello, utilizamos dos fases distintas del ciclo estral, *estro* y *diestro*, que se caracterizan tanto por diferir en los niveles de estrógenos circulantes como por no presentar niveles significativos de otras hormonas ováricas (211), lo que las convierte en las fases ideales para estudiar fenómenos relacionados con la variación de estrógenos en ratas intactas. Cabe destacar que las regiones de la corteza prefrontal e hipocampo fueron escogidas por su implicación en funciones cerebrales básicas como el aprendizaje y la memoria (215,216), así como por la amplia presencia de receptores de estrógenos en ambas regiones (10,53). Además, estudios previos en los que se utilizó la técnica de PET y el trazador metabólico  $^{18}\text{F}$ -FDG evidenciaron en primates la influencia de las fluctuaciones de hormonas ováricas a lo largo del ciclo en el metabolismo de áreas cerebrales implicadas en la emoción (45), cualidad que se le atribuye, entre otras, a nuestras regiones de estudio.

Como ya mencionamos anteriormente, la citocromo c oxidasa es un enzima mitocondrial clave implicado en la respiración celular y en el metabolismo oxidativo. La actividad CO es crítica para la producción de ATP, ya que se ubica en la membrana mitocondrial interna catalizando el último paso de la cadena de transporte de electrones, la cual está acoplada, en último término, al proceso de fosforilación oxidativa. Dado que en el cerebro la producción de ATP está altamente ligada a la demanda energética, la actividad CO se considera un marcador fiable de actividad metabólica cerebral (49). En referencia a este estudio, los datos mostraron una gran homogeneidad en los niveles de actividad citocromo c oxidasa entre las fases *estro* y *diestro* en las distintas regiones cerebrales estudiadas (*Tabla 3*). Esto puede sugerir que pequeñas diferencias en los niveles fisiológicos de estrógenos no son suficientes para modificar significativamente

la actividad metabólica de áreas específicas del SNC. Sin embargo, hallamos un incremento significativo de actividad CO en la región prelámbica de la corteza prefrontal en la fase de diestro, en la cual los niveles de estrógenos son más elevados (*Figura 12A*). Este hallazgo iría en la misma línea que otros trabajos que muestran un aumento en la actividad metabólica cerebral inducido por estradiol (44,226), así como un incremento del consumo de oxígeno en las mitocondrias cerebrales (47). En cambio, el área CA3 del hipocampo ventral mostró una mayor actividad CO durante la fase de estro, cuando los niveles de estrógenos son menores (*Figura 12B*). Este último resultado parece señalar que la relación entre los niveles de estrógenos y la actividad metabólica cerebral no es directamente proporcional en todas las regiones cerebrales. Por tanto, la influencia de las diferencias en los niveles de estrógenos durante el ciclo estral sobre el metabolismo oxidativo cerebral parece ser específica de región. En este sentido, distintos factores como la abundancia de receptores de estrógenos y de distintos neurotransmisores en cada área, así como los tipos de sinapsis predominantes y las conexiones funcionales con otras áreas, podrían explicar este resultado divergente.

Es necesario tener en cuenta que el estudio en ratas hembra a lo largo del ciclo estral resulta una aproximación cercana para intentar esclarecer los cambios moleculares que ocurren durante el ciclo menstrual en mujeres. Sin embargo, el mayor inconveniente de trabajar con ratas intactas reside en que no se pueden controlar fielmente los niveles hormonales. A pesar de haber escogido dos fases en las que los estrógenos predominan claramente sobre el resto de hormonas implicadas en el control del ciclo (211), no se puede descartar la posibilidad de que los niveles mínimos de otras hormonas, presentes en la rata hembra adulta, puedan tener cierta influencia sobre las regiones de estudio. Así, hormonas como la progesterona, la prolactina, la LH o la FSH podrían estar ejerciendo acciones directas o indirectas potenciando o antagonizando los efectos atribuidos a los estrógenos a pesar de estar en niveles mínimos. Por este motivo, decidimos continuar nuestro estudio sobre los efectos de los estrógenos en el SNC de una forma más controlada. Para ello, ratas jóvenes y sexualmente maduras fueron sometidas a una ovariectomía, operación que reduce drásticamente la producción endógena de hormonas femeninas mediante la extirpación de los ovarios. Estas ratas fueron posteriormente tratadas con  $17\beta$ -estradiol, principal estrógeno secretado a nivel ovárico (2). Teniendo en cuenta que la caída en los niveles de estrógenos inherente a la menopausia puede dar lugar a la aparición de diversos síntomas y patologías, decidimos

---

estudiar también tales efectos en ratas viejas, las cuales han llegado al final de su periodo reproductivo. De forma complementaria, analizamos también los efectos de un fitoestrógeno como la genisteína, en la búsqueda de una terapia de reemplazamiento hormonal eficaz con menos efectos secundarios no deseados que los estrógenos.

Con el citado diseño experimental, lo primero que nos propusimos evaluar fueron varios marcadores de la homeostasis cerebral. La reducción drástica de varias funciones metabólicas y el desarrollo de resistencia a la acción de la insulina, inherentes al envejecimiento, parecen ser dos de las principales bases que subyacen el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (57). En hembras, dicha reducción de la sensibilidad a la insulina está fuertemente asociada con la disminución en la producción de estrógenos que sigue a la menopausia (136). Por tanto, escogimos la región de la corteza cerebral para llevar a cabo este estudio, ya que es una de las regiones con una mayor dependencia funcional del estradiol (57). En primer lugar, evaluamos tanto la influencia del envejecimiento como de los tratamientos con estradiol y genisteína, sobre proteínas implicadas en la homeostasis de la glucosa, principal sustrato energético del cerebro (83). Al igual que en los tejidos periféricos, la captación de glucosa en el SNC se produce a través de los GLUTs (227). Específicamente, se conoce que GLUT3 está ampliamente distribuido por el SNC y es, junto con GLUT1, responsable de la mayoría de la captación y utilización de glucosa en el cerebro (84,85). Nuestros resultados mostraron unos niveles de GLUT3 en la corteza cerebral significativamente más bajos después de la ovariectomía, tanto en los animales jóvenes como en los viejos (*Figura 13A*), indicando que la pérdida de la función gonadal deteriora el transporte de glucosa cerebral independientemente de la edad. Sin embargo, la genisteína en las ratas jóvenes, así como el estradiol y la genisteína en las ratas viejas, restauraron los niveles de este transportador de glucosa en tan sólo una hora después de la administración del tratamiento. Por tanto, nuestros datos coinciden con estudios previos e indican que no sólo un tratamiento crónico (57), sino también un tratamiento agudo con estradiol aumenta los niveles de GLUT3 después de la pérdida de función gonadal, sugiriendo una mejoría en el transporte de glucosa. En la misma línea, otros trabajos muestran además que distintos tratamientos con estrógenos provocan un incremento en la utilización de la glucosa cerebral (44,146).

Siguiendo con los transportadores de glucosa, GLUT4 también ha sido previamente hallado en tejido cerebral (86), aunque su localización específica parece

sugerir una implicación en tareas altamente especializadas en el SNC (85). GLUT4 es un transportador de glucosa dependiente de insulina, lo que ha llevado a creer que en el cerebro también tiene lugar la captación de glucosa estimulada por insulina (57). Al contrario de lo sucedido con los niveles de GLUT3, la expresión de GLUT4 experimentó una fuerte reducción con el envejecimiento (*Figura 13B*). Por tanto, nuestros datos sugieren la posible implicación de la resistencia a la acción de la insulina en el déficit cognitivo inherente al fenómeno de envejecimiento. Además, los niveles de GLUT4 disminuyeron tras la ovariectomía en las ratas jóvenes pero no en las viejas, probablemente porque las ratas viejas pseudooperadas ya poseían bajos niveles de GLUT4 a causa del envejecimiento.

En lo concerniente a los efectos provocados por los tratamientos, cabe destacar que los cambios en la expresión de GLUT4 tras el tratamiento con estradiol y genisteína resultaron claramente dependientes de la edad. De este modo, sólo el tratamiento con estradiol restableció los niveles de GLUT4 en las ratas jóvenes ovariectomizadas, sin embargo, el tratamiento con genisteína fue más eficaz en las ratas viejas. Estos resultados nos permiten deducir que el tratamiento con genisteína podría ser más adecuado para restaurar la homeostasis de la glucosa deteriorada con la edad, puesto que fue el único tratamiento capaz de incrementar los niveles de ambos tipos de transportadores de glucosa (GLUT3 y GLUT4) en los animales viejos. No obstante, en estudios previos habíamos hallado un incremento en la expresión de GLUT4 en la misma región cerebral de ratas viejas ovariectomizadas tratadas crónicamente con estradiol (57), por lo que es posible que la dosis de estradiol no haya sido suficiente para potenciar la expresión de GLUT4 dentro del marco de tiempo utilizado en este experimento (una hora). Por lo tanto, en lo concerniente a la homeostasis de la glucosa, serían necesarios estudios adicionales para elucidar los mecanismos que subyacen a los distintos efectos encontrados con los tratamientos con estradiol o genisteína en la corteza cerebral de ratas viejas.

Posteriormente, analizamos nuevamente la CO como un marcador de metabolismo cerebral complementario a los GLUTs. En esta ocasión, analizamos mediante Western blot la expresión de la subunidad catalítica y principal (subunidad 1) de la CO (*Figura 14*). Dicha subunidad sufrió un importante descenso con la edad en la corteza cerebral, lo que concuerda con estudios previos realizados por otros autores que señalan un descenso de actividad cerebral causado por el envejecimiento en otras

regiones cerebrales, tales como los cuerpos mamilares (228). De hecho, se ha comprobado que en el sexo opuesto el envejecimiento también causa cambios bioquímicos, implicando un deterioro en la actividad de varias enzimas de la membrana mitocondrial y comprometiendo la producción energética en el córtex cerebral de ratas macho (229). Si nos centramos en los efectos de los tratamientos en ambos grupos de edad, sólo el estradiol fue capaz de aumentar los niveles de la subunidad 1 de la CO tanto en las ratas jóvenes como en las viejas, no existiendo un efecto aparente del tratamiento con genisteína sobre este parámetro. Este dato iría en la misma línea que el resultado obtenido con la tinción histoquímica de la CO en la región prelámbica de la corteza prefrontal (*Figura 12A*), reforzando nuestra teoría de que el estradiol parece aumentar el metabolismo oxidativo en la corteza de ratas hembra. Sin embargo, a la vista del inaparente efecto obtenido en los grupos tratados con genisteína, podemos decir que a pesar de que la genisteína tiene potencial estrogénico (123), los mecanismos y los efectos funcionales que lleva a cabo deben ser distintos de los desencadenados por los estrógenos. Además, puede ser posible que la genisteína y el estradiol empleen vías moleculares similares pero con distinta dependencia de la dosis. De hecho, hemos obtenido algunos resultados distintos en cuanto a las dos dosis de genisteína administradas, no en el análisis de la citocromo c oxidasa pero sí en cuanto a los niveles de los GLUTs. Así, a pesar de que no existían diferencias significativas entre ambas, la dosis alta potenció en mayor medida los niveles de GLUT3 y GLUT4 en los animales viejos (*Figuras 13A y 13B*). Este hecho sugiere que la dosis alta de genisteína podría ser un tratamiento más adecuado para incrementar los niveles de los transportadores de glucosa y, por lo tanto, el transporte de glucosa en el córtex cerebral envejecido. Estos resultados concuerdan con otros estudios que muestran que los fitoestrógenos activan distintos mecanismos celulares dependiendo de la concentración utilizada (217,218).

Por otro lado, se ha demostrado que la genisteína puede ejercer acciones neuroprotectoras mediadas a través de los receptores de estrógenos (230-232). Sin embargo, a pesar de que existen evidencias que muestran que el tratamiento con estradiol puede alterar la expresión de sus receptores (57), poco se sabe acerca de la posible capacidad de la genisteína para modificar los niveles de estos ERs en el SNC. Nuestros datos mostraron un fuerte declive causado por ovariectomía de ambas isoformas de *splicing* de ER $\alpha$ , ER $\alpha$ 67 y ER $\alpha$ 46, en la corteza cerebral de ratas viejas, siendo ER $\alpha$ 67 regulada al alza por estradiol, mientras que la expresión de ER $\alpha$ 46 se vio



potenciada por el tratamiento con baja dosis de genisteína (*Figuras 15A y 15B*). Este resultado evidencia la existencia de una regulación diferente de ambas isoformas de ER $\alpha$  y muestra que la genisteína puede ser capaz de regular también a ER $\alpha$  a pesar de tener una mayor afinidad por ER $\beta$  (195). No obstante, se cree que los efectos neuroprotectores del estradiol y de la genisteína dependen no sólo de los cambios absolutos en la expresión de ERs, sino también en el ratio ER $\alpha$ 67/ER $\alpha$ 46, así como en sus interacciones con diversas proteínas de la vía de PI3K (57). Debido a esta circunstancia, la mayoría de los estudios realizados con estrógenos se centraban en ER $\alpha$ , ya que es el subtipo de ER más fuertemente implicado en la activación de la vía de PI3K (233). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la importancia de la activación de la vía PI3K mediada por ER $\beta$  en la retina (234) y en neuronas hipocampales (235), sugiriendo que ambos ERs están implicados en la mediación de los efectos neuroprotectores de estrógenos y fitoestrógenos. A pesar de que, como hemos mencionado anteriormente, la genisteína muestra una mayor fuerza de unión a ER $\beta$  que a ER $\alpha$ , ni la genisteína ni el estradiol fueron capaces de alterar la expresión de ER $\beta$  en la corteza cerebral (*Figura 16A*). Por tanto, serían necesarios estudios adicionales para esclarecer la influencia del estradiol y la genisteína sobre ER $\beta$  en esta región.

En lo que respecta a la modulación de ambos subtipos del ER por la edad, nuestros resultados indicaron un aumento de ambas isoformas de ER $\alpha$ , que contrasta con el declive que experimentó ER $\beta$  con el envejecimiento (*Figuras 15A, 15B y 16A*). Estos datos confirman los hallazgos obtenidos previamente con estudios de hibridación *in situ*, los cuales mostraron una expresión disminuida del ARNm de ER $\beta$ , pero no de ER $\alpha$ , en algunas regiones cerebrales de ratas viejas (236). Así mismo, apoyan la teoría propuesta por estos autores que postula una modulación diferencial de ambos subtipos del ER en el cerebro. En relación a este hallazgo, cabe destacar que en un trabajo previo realizado por nuestro grupo utilizando el mismo diseño experimental (123), construimos la hipótesis de que un declive de ER $\beta$  relacionado con la edad en regiones clave para el aprendizaje y la memoria, tales como el hipocampo y la corteza cerebral, podría contribuir a explicar la falta de efecto observado en respuesta a los tratamientos con estradiol y genisteína en las ratas viejas, a la hora de realizar una tarea de memoria espacial en un laberinto acuático de Morris. Por tanto, este declive relacionado a la edad en los niveles de ER $\beta$  en el córtex podría estar en la raíz de tal causa, dando a ER $\beta$  un papel clave en la mediación de las acciones rápidas de los estrógenos y los

fitoestrógenos en la corteza cerebral. Sin embargo, sería conveniente la realización de más estudios para elucidar la importancia de este ER en esta región cerebral.

Por otro lado, para verificar el efecto del envejecimiento sobre ambos ERs, se evaluó el ratio entre la primera isoforma descrita de ER $\alpha$ , ER $\alpha$ 67, y ER $\beta$ . En este sentido, es conocido que no sólo los niveles de ambos subtipos por separado, sino también el mantenimiento de un determinado balance entre ellos, resultan importantes para que se produzcan las acciones protectoras de los estrógenos. Así, se ha comprobado que el ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  modula la acción de los estrógenos sobre el estrés oxidativo y la expresión de enzimas antioxidantes (237,238), pudiendo ser dicho estrés oxidativo un evento crucial en la etiopatología de varias enfermedades neurodegenerativas (239). Además, otros autores han demostrado que el envejecimiento desplaza el balance ER $\alpha$ /ER $\beta$ , afectando a la protección vascular mediada por estrógenos (240). Los resultados de nuestro estudio sobre el balance de ERs en la corteza cerebral mostraron un ratio cercano a 1 en los animales jóvenes, es decir, cantidades similares de proteína de ER $\alpha$  y ER $\beta$ , el cual fue desplazado a favor de ER $\alpha$  con el envejecimiento (*Figura 16B*). La modificación de este ratio podría tener consecuencias negativas en cuanto a la protección vascular y a las defensas antioxidantes, tal y como se ha comprobado en otros tejidos (237,238,240). No obstante, serían necesarios estudios complementarios para corroborar tal hipótesis.

Como expusimos anteriormente, se observó que tanto la edad como los tratamientos con estradiol y genisteína pueden modificar la homeostasis cortical de la glucosa a través de la expresión de los GLUTs. Siguiendo esta línea, es conocido que la insulina juega un papel imprescindible en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, así como que la resistencia a la acción de la insulina inherente al envejecimiento subyace en varias enfermedades ligadas al envejecimiento, tales como diabetes mellitus tipo 2 (129), patologías cardio-circulatorias (241) o algunas enfermedades neurodegenerativas (131). En las mujeres, este incremento en la resistencia a la acción de la insulina está asociado con el descenso en la producción de estrógenos durante la menopausia (136). Se han propuesto varias teorías para explicar cuáles son los mecanismos moleculares implicados en este descenso en la sensibilidad a la insulina, incluyendo entre ellos modificaciones en varios pasos de la cascada de señalización intracelular de la insulina (108). Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar cómo el envejecimiento influye en los principales elementos de esta vía de

señalización en el córtex cerebral, así como los efectos de los tratamientos agudos con estradiol y genisteína en la búsqueda de estrategias neuroprotectoras contra el incremento de resistencia central a la acción de la insulina.

En primer lugar, evaluamos la interacción entre la forma activa de IRS1 (p-IRS1<sub>tyr612</sub>) y p85 $\alpha$ , como un paso fundamental de la vía de señalización de la insulina (104). Cuando IRS1 se fosforila en residuos de tirosina, puede unirse a los dominios SH2 de la subunidad reguladora de PI3K, p85 $\alpha$ . Nuestros resultados mostraron un descenso en la unión entre estas dos proteínas asociado al envejecimiento (*Figura 17*), lo que concuerda con nuestros estudios previos llevados a cabo tanto en tejidos dependientes (108) como independientes de insulina (57). El deterioro con la edad de este paso crucial en la vía de señalización de la insulina podría ser una de las razones que expliquen el incremento de la resistencia central a la insulina inherente al envejecimiento. Además, tanto el tratamiento con estradiol como con genisteína potenciaron la unión entre estas dos proteínas en los animales jóvenes, pero no en los viejos, sugiriendo una distinta eficacia de los tratamientos a este nivel en función de la edad.

A continuación, comprobamos si los tratamientos con estradiol y genisteína eran capaces de estimular la unión entre IRS1 y los ERs (*Figuras 18 y 19*), como un punto alternativo de control de la vía de señalización intracelular de la insulina en la corteza cerebral, y así compensar el descenso relacionado con el envejecimiento en la interacción entre la forma activa de IRS1 y p85 $\alpha$ . La dosis alta de genisteína, pero no el tratamiento con estradiol, incrementó la interacción entre ER $\alpha$ 67 e IRS1 en comparación con el grupo vehículo en las ratas jóvenes. Sin embargo, a pesar de que en estudios previos habíamos encontrado que el tratamiento crónico con estradiol potenciaba la unión entre ER $\alpha$ 46 e IRS1 (57) en el córtex de ratas hembra viejas, ni la genisteína ni el estradiol fueron capaces de aumentar esta interacción, a ninguna de las dos edades de estudio, en la administración aguda realizada en el presente experimento. Quizás esta isoforma de ER $\alpha$  no sea un buen mediador de los efectos rápidos del estradiol y la genisteína a este nivel, y tal vez serían necesarios estudios adicionales sobre la activación de IRS1 por estradiol a través del receptor 30 unido a proteína G (GPR30), un receptor de estrógenos transmembrana con alta afinidad por esta hormona (242), que parece estar implicado en la mediación de las acciones rápidas o no genómicas del estradiol (243). De los resultados obtenidos podemos inferir que la

genisteína parece ser una mejor opción que el estradiol para potenciar esta interacción entre IRS1 y ER $\alpha$ , al menos al nivel de ER $\alpha$ 67. Además, el ratio de unión de ambas isoformas a IRS1 evidenció que ER $\alpha$ 67 está más implicada en la regulación de esta proteína, ya que presentó una mayor unión con IRS1 tanto en las ratas jóvenes como en las viejas. No obstante, el tratamiento con estradiol o genisteína desplazó el ratio hacia ER $\alpha$ 46 con el envejecimiento, resaltando diferencias funcionales de ambas isoformas con la edad. Además, la unión entre el otro subtipo del ER, ER $\beta$ , e IRS1 aumentó en respuesta al tratamiento con dosis baja de genisteína en los animales viejos, sugiriendo que en la vejez la genisteína podría promover sus efectos neuroprotectores a este nivel a través de este subtipo del ER por el que presenta una mayor afinidad (195).

El siguiente paso fue evaluar la interacción entre los ERs y p85 $\alpha$  (*Figuras 20 y 21*), ya que el potenciamiento de esta interacción podría ser otro mecanismo compensatorio para la posterior activación de Akt (223,244). En contraste con nuestros estudios previos llevados a cabo en cerebro (57) y células MCF-7 de cáncer de mama (223), el estradiol no afectó a la interacción de p85 $\alpha$  con el subtipo ER $\alpha$ , tal vez como consecuencia de diferencias en las dosis o en los lapsos de tiempo empleados en cada experimento. Además, al contrario que en el caso de IRS1, los datos derivados del ratio de unión de ambas isoformas denotaron una mayor implicación de ER $\alpha$ 46 en la regulación de p85 $\alpha$ , sugiriendo que esta isoforma de ER $\alpha$  puede tener un papel importante en la mediación de los efectos neuroprotectores del estradiol a través de PI3K en el córtex cerebral. Adicionalmente, el estradiol en las ratas jóvenes y la genisteína tanto en las jóvenes como en las viejas, potenciaron la unión entre p85 $\alpha$  y ER $\beta$ . Este resultado reafirma nuevamente la hipótesis de que ER $\beta$  podría jugar un papel clave en la mediación de los efectos a corto plazo de los estrógenos y los fitoestrógenos en el tejido cerebral.

Siguiendo el análisis en dirección descendente en la cascada de señalización intracelular de la insulina, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la activación de Akt (*Figura 22*). Esta quinasa puede ser activada a través de la fosforilación del residuo de serina 473 (245), mediando su forma activa la mayoría de las acciones celulares de PI3K, como por ejemplo la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (244,246). Nuestros resultados mostraron un incremento de esta fosforilación desencadenado por estradiol en ambas edades de estudio. En este sentido, otros autores han encontrado también una actividad de Akt potenciada por estradiol en otros tejidos y

tipos celulares, tales como el músculo esquelético (108), los adipocitos 3T3-L1 (243), el corazón (247) y las células MCF-7 de cáncer de mama (223). Sin embargo, resulta interesante el hecho de que la genisteína sólo fuese capaz de incrementar la fosforilación de Akt en los animales viejos, posiblemente mediado por la potenciación cascada arriba de la interacción ER $\beta$ -p85 $\alpha$ . Este último resultado iría en la misma línea que otros trabajos que resaltan una eficacia distinta de los fitoestrógenos en función de la edad (123).

Posteriormente, estudiamos el último paso de la cascada de señalización intracelular de la insulina, que consiste en la translocación de GLUT4 desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática, con el fin de facilitar la captación de glucosa hacia el interior celular (92,248). Es sobradamente conocido que el tratamiento con estrógenos incrementa tanto la actividad metabólica (249) como la utilización de glucosa en el SNC (44,146). Los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 son los principales encargados de mediar el transporte de este sustrato energético esencial para el cerebro (84,85). No obstante, GLUT4 también se encuentra distribuido en distintas regiones cerebrales y su presencia parece indicar que la insulina también media el transporte de glucosa en este órgano (86). Como ya mencionamos anteriormente, la expresión total de GLUT4 en la corteza cerebral había sido disminuida con la edad (*Figura 13B*), apoyando la implicación de la resistencia a la insulina en la disfunción cognitiva inherente al envejecimiento. Además, los niveles de GLUT4, localizados específicamente en la membrana plasmática, también fueron inferiores en los animales viejos (*Figura 23*), lo que indica que el envejecimiento interrumpe uno de los pasos más importantes para la captación de glucosa estimulada por insulina y, por tanto, posiciona al malfuncionamiento de la vía de señalización intracelular de la insulina como uno de los grandes responsables del incremento de la resistencia central a la acción de esta hormona con la edad. A pesar de que tanto el estradiol como la genisteína potenciaron la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en ratas jóvenes, el estradiol fue el único tratamiento capaz de mejorar este paso de la señalización de la insulina en las ratas viejas, como también ha sido demostrado en tejidos dependientes de insulina como el músculo esquelético (108). Este resultado resulta intrigante, ya que la genisteína había aumentado los niveles totales de GLUT4 en las ratas viejas (*Figura 13B*), pareciendo, por tanto, ser un tratamiento potencialmente adecuado para combatir el incremento de resistencia central a la insulina asociado a la

vejez. Sin embargo, a pesar del incremento en la fosforilación de Akt provocado por la genisteína en los animales viejos (*Figura 22*), ésta no fue capaz de estimular el último paso de la vía de señalización de la insulina incrementando la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y favoreciendo entonces la captación de glucosa hacia el interior celular (*Figura 23*). Este resultado podría indicar, por lo tanto, que durante el proceso de envejecimiento la genisteína activa la vía PI3K/Akt con un propósito distinto al de potenciar la captación de glucosa. En línea con esta idea, además de su función reguladora sobre el metabolismo, la vía de señalización PI3K/Akt también se conoce por jugar un papel importante en la regulación de la proliferación (250), la progresión del ciclo (251) y la supervivencia celular (252). En este sentido, se sabe que Akt promueve la supervivencia neuronal mediante la inhibición de la maquinaria pro-apoptótica (96). Además, la genisteína muestra acciones neuroprotectoras en ratas que padecen un incremento en la neurodegeneración inducido por ovariectomía, modulando la vía apoptótica dependiente de la mitocondria (208). Por lo tanto, es posible que la genisteína pudiera activar la vía PI3K/Akt para promover la supervivencia celular en el cerebro envejecido, aunque la evaluación tanto de la viabilidad celular como de varios marcadores pro- y anti-apoptóticos serían necesarios para probar esta hipótesis.

Por el contrario, el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol sí redujo el impacto negativo del envejecimiento sobre la sensibilidad central a la insulina, favoreciendo la localización de GLUT4 en la membrana plasmática (*Figura 23*). Este hecho resulta especialmente importante si tenemos en cuenta que la regulación de los transportadores de glucosa en el cerebro juega un papel fundamental en la homeostasis neuronal, ya que la glucosa es la principal fuente energética del cerebro (83). A pesar de que GLUT4 no es el principal transportador de glucosa en el tejido cerebral, podría proporcionar una captación adicional de glucosa o estar implicado en mecanismos que actúen de sensores de glucosa en el SNC (57). Sin embargo, aún queda otra pregunta sin resolver, la cual guarda relación con los pasos que sigue el estradiol hasta estimular la translocación de GLUT4 a la membrana. En los animales jóvenes parece bastante claro que el estradiol promovió la captación de glucosa a través de GLUT4 activando la vía de señalización clásica de la insulina, es decir, potenciando en primer lugar la interacción entre la forma activa de IRS1 y p85 $\alpha$ , activando después Akt mediante fosforilación en serina 473 y, finalmente, estimulando la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. En cambio, el estradiol pareció actuar de una forma distinta en las ratas viejas para

estimular la captación de glucosa mediada por insulina, ya que sólo fue capaz de activar los últimos pasos de la vía, promoviendo la activación de Akt y la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, pero no así los pasos iniciales de la cascada. Esto podría evidenciar la existencia de rutas adicionales que medien los efectos del estradiol por encima de la fosforilación de Akt, distintas de la vía clásica. De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado que la activación de Akt puede ser estimulada en las células musculares por la sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) (253), la cual puede ser regulada al alza por estradiol en otros tejidos como la médula ósea (254). Cabría por tanto la realización de experimentos adicionales, que permitiesen estudiar distintas vías de activación de Akt por estradiol en el córtex cerebral envejecido, para poder esclarecer esta cuestión.

Por otro lado, al igual que sucedió con los niveles totales de GLUT3 y GLUT4, parece que la dosis alta de genisteína fue más eficaz que la dosis baja para estimular algunos de los pasos clave de la cascada de señalización intracelular de la insulina en el córtex cerebral envejecido aunque, como ya mencionamos anteriormente, los efectos neuroprotectores de la genisteína durante el envejecimiento parecen ser distintos a la estimulación de la captación de glucosa mediada por insulina. Por lo tanto, el tratamiento con estradiol parece ser una mejor estrategia para combatir este incremento de resistencia central a la insulina inherente al envejecimiento, así como las enfermedades neurodegenerativas que pudieran derivarse del mismo. Además, teniendo en cuenta que el cerebro es un tejido completamente dependiente de la glucosa (83), la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, favorecida por estradiol, podría potenciar la captación de glucosa hacia el interior de estas células que, posiblemente, tengan los mecanismos de captación de glucosa deteriorados por el envejecimiento, ayudándolas así a satisfacer la alta demanda energética del tejido cerebral. No obstante, trabajos complementarios con protocolos de tratamiento crónico serían precisos para comprobar si esta mejoría metabólica podría mantenerse a lo largo del tiempo.

Además de la relación existente con un deterioro de la homeostasis de la glucosa y de la sensibilidad central a la acción de la insulina, el descenso de los niveles de estrógenos circulantes, inherente al envejecimiento femenino, también se relaciona con un incremento en la incidencia de otras patologías como el daño isquémico cerebral. Las mujeres tienen una menor probabilidad de sufrir un ictus que los hombres durante la edad adulta (175), sin embargo, esta incidencia se invierte después de la menopausia

(176). De ahí que nuestro siguiente objetivo fuera estudiar el posible papel neuroprotector del  $17\beta$ -estradiol y la genisteína en este tipo de situaciones. En concreto, nos centramos en el estudio de una situación de un doble daño isquémico, ya que en ocasiones los ictus pueden repetirse y presentarse como recurrentes, especialmente poco tiempo después de haberse producido el primero (147,183). Para llevar a cabo este estudio utilizamos la línea neuronal de células HT22 de hipocampo de ratón, la cual fue sometida a dos ciclos consecutivos de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación (OGD/R), modelo bien contrastado para estudiar *in vitro* la patología del daño por isquemia/reperfusión (221,222). Para estudiar los posibles efectos protectores de los tratamientos en una situación de daño isquémico recurrente, estos fueron administrados desde una hora después de comenzar el primer período de OGD hasta el final de la primera reoxigenación. De modo coincidente con los resultados mostrados por otros autores que han empleado distintos protocolos *in vitro* de isquemia/reperfusión (255,256), observamos que un ciclo de OGD/R supuso un descenso de la viabilidad celular (*Figura 24A*). La cascada de eventos que conducen al daño y muerte neuronal durante una situación de isquemia/reperfusión podrían incluir la liberación de citoquinas y radicales libres, así como un incremento de procesos inflamatorios, apoptosis y excitotoxicidad (257). Esta disminución en la viabilidad se vio aún más incrementada cuando las células fueron expuestas a un segundo ciclo consecutivo de OGD/R (*Figura 24B*). Este hecho sugiere que una parte de las células que sobrevivieron a un daño isquémico fueron incapaces de hacer frente a una situación similar consecutiva, quizás porque estas células hayan quedado parcialmente dañadas, lo que reduciría sus posibilidades de combatir a un nuevo daño isquémico. Cabe resaltar que sólo el tratamiento con estradiol, a diferencia del tratamiento con genisteína, fue capaz de aumentar la viabilidad celular tras el primer ciclo de OGD/R. En concordancia con este resultado, otros autores han encontrado un incremento de la supervivencia celular en respuesta al tratamiento agudo con estradiol administrado poco tiempo después de generar una situación de isquemia en ratas hembra ovariectomizadas (182). En este sentido, se ha demostrado que los estrógenos pueden ejercer acciones neuroprotectoras a través de la inhibición o activación de vías pro- o anti-apoptóticas (258,259), respectivamente, reduciendo la excitotoxicidad (180), interactuando con factores de crecimiento (181) o reduciendo parámetros inflamatorios (260). Resulta también interesante que, en cambio, tras la generación de dos ciclos consecutivos de OGD/R tanto el estradiol como la genisteína fueron capaces de aumentar la viabilidad celular.



En la misma línea, otros autores han encontrado también un papel beneficioso de la genisteína frente al daño isquémico (192,261). Sin embargo, es sorprendente que la genisteína sólo consiga reducir la muerte neuronal tras dos ciclos de OGD/R. Este dato, junto con el hecho de que durante la segunda OGD y posterior reoxigenación ya no estaban presentes los tratamientos en el medio, podría indicar que la genisteína desencadenó acciones protectoras mediante mecanismos de acción genómicos o lentos a través de ERs situados en la cercanía del núcleo. No obstante, serían necesarios experimentos adicionales para probar esta hipótesis.

Por otro lado, obtuvimos extractos crudos de las células al final de la segunda OGD, así como de la reoxigenación posterior, con el fin de analizar algunos de los parámetros moleculares que cursan con una situación de daño isquémico recurrente. En primer lugar, evaluamos el procesamiento de PARP-1 como un marcador apoptótico fiable, ya que es conocido que las caspasas 3 y 7 pueden generar la escisión e inactivación de PARP durante el proceso de apoptosis (157). El procesamiento de PARP-1 aumentó durante la exposición de las células a una segunda OGD (*Figura 25*). Sin embargo, este procesamiento disminuyó de nuevo a los valores del grupo normóxico durante la fase de reoxigenación posterior. Por tanto, nuestros datos concuerdan con estudios previos que demuestran una inducción de fenómenos apoptóticos en neuronas corticales en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa (262). No obstante, a pesar de que la fase de reoxigenación también podría contribuir al daño generado mediante un aumento de las ROS y de la respuesta inflamatoria (154), ésta no se caracterizó por un aumento de la apoptosis, al menos a nivel de PARP-1. Estudios adicionales que evalúen otros marcadores apoptóticos serían necesarios para esclarecer si durante la fase de reoxigenación se siguen generando eventos de muerte celular. Por otra parte, a pesar de que tras la segunda OGD se pudo apreciar un descenso en el procesamiento de PARP-1 en las células tratadas con estradiol y genisteína respecto al vehículo, la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa. Esto podría indicar que ambos tratamientos utilizan otros mecanismos para favorecer la viabilidad celular o bien ejercer sus efectos a través de otras moléculas implicadas en el fenómeno de apoptosis, ya que han sido probadas anteriormente las acciones anti-apoptóticas de ambos en situaciones de daño isquémico (209,258).

A continuación, analizamos el ratio entre la forma lipidada y citosólica de LC3 (LC3-II/LC3-I) como un marcador de autofagia. Cuando la célula pone en marcha este

mecanismo, la LC3 citosólica (LC3-I) se conjuga con fosfatidiletanolamina originando la forma lipídica de LC3 (LC3-II), que constituye un elemento específico de la membrana autofagosomal (169), y cuyo incremento se corresponde con un aumento de la actividad autofágica (170). Al igual que ocurría con el procesamiento de PARP-1, el ratio LC3-II/LC3-I aumentó durante este segundo período de OGD (*Figura 26*), para posteriormente disminuir hasta los valores del grupo normóxico durante la fase de reoxigenación. Además, ni el estradiol ni la genisteína parecieron estar implicados en la activación/desactivación de la autofagia en ninguna de estas dos fases. Este resultado apoya a trabajos previos que muestran una activación de la autofagia ante una situación de daño isquémico (165,166). En general, la autofagia está considerada como un mecanismo de supervivencia, ya que proporciona fuentes de energía alternativas a las células en condiciones de escasez de nutrientes y las ayuda a eliminar proteínas alteradas o desechos moleculares (173). Sin embargo, también hay autores que defienden que la autofagia podría promover la muerte celular mediante la excesiva autodigestión y degradación de componentes celulares esenciales (263), así como aluden a que un incremento excesivo en la actividad autofágica podría estar implicado en el aumento de la muerte neuronal que sigue a un daño isquémico cerebral (264). Esta teoría estaría acorde con nuestros resultados que mostraron un patrón idéntico en cuanto a la actividad apoptótica y autofágica, evidenciadas por el procesamiento de PARP-1 (*Figura 25*) y el ratio LC3-II/LC3-I (*Figura 26*), respectivamente. En la misma línea, hay estudios que demuestran una alta superposición entre la autofagia y la muerte celular por apoptosis, las cuales podrían sucederse la una a la otra o incluso coexistir en la misma célula (265,266). Por tanto, el papel de la autofagia en situaciones de daño isquémico cerebral parece ambiguo y aún está por esclarecer si tiene un papel pro-supervivencia o pro-muerte celular.

El siguiente paso fue analizar nuevamente la CO-1 como un marcador de metabolismo oxidativo. En condiciones normales, el cerebro consume gran cantidad de oxígeno y glucosa para el mantenimiento de la actividad neuronal (267). Este oxígeno y glucosa son utilizados, principalmente, mediante el metabolismo energético aeróbico para satisfacer la mayor parte de la demanda energética del cerebro (268). De hecho, las neuronas contienen una elevada cantidad de mitocondrias, lo que da idea de la alta actividad de la fosforilación oxidativa que tiene lugar, y presentan una habilidad limitada para metabolizar sustratos distintos a la glucosa (269). Esto sugiere la gran

importancia que tiene para las neuronas el mantenimiento del metabolismo oxidativo y explica, en gran medida, la muerte neuronal que sigue a un daño isquémico. Nuestros datos reflejaron una fuerte caída en los niveles de expresión de la CO-1 tras la segunda OGD (*Figura 27*), lo que sugiere un descenso del metabolismo oxidativo neuronal. Sin embargo, en esta ocasión tanto el estradiol como la genistéina fueron capaces de prevenir parcialmente este descenso, lo que podría permitir a las células optimizar la pequeña cantidad de oxígeno que aun reciben para ser utilizado por el metabolismo oxidativo para la obtención de energía. Esto permitiría a las neuronas obtener un pequeño aporte energético que podría estar reflejándose en el aumento de viabilidad celular observado (*Figura 24B*). Para complementar estos resultados, se podrían llevar a cabo estudios de producción de lactato por células gliales en esta condición de escasez de oxígeno, ya que ha sido mostrado que el lactato también puede ser importante para determinados procesos de las neuronas como la diferenciación neuronal, lo que requiere un cambio del metabolismo oxidativo al fermentativo (269). De hecho, el lactato producido principalmente en las células gliales podría ser importante en periodos de privación de oxígeno, según la hipótesis que aboga por la existencia de un servicio de transporte de lactato entre las células gliales y las neuronas y que podría ser vital para la supervivencia post-isquemia de las neuronas (268).

Por otro lado, también analizamos la expresión de HIF-1 $\alpha$ , factor inducible por la hipoxia que se une a las regiones promotoras de genes que contrarrestan los efectos de la privación de oxígeno, promoviendo de esta forma la supervivencia celular en condiciones hipóxicas (270). Los niveles de HIF-1 $\alpha$  se mantuvieron bajos en la condición de normoxia (*Figura 28*), probablemente gracias a la acción de prolin hidroxilasas, ya que ha sido demostrado que su acción permite el reconocimiento y ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  por ubiquitin ligasas para su posterior degradación por el proteasoma (162). Sin embargo, ante la situación de privación de oxígeno y glucosa aumentó la expresión de HIF-1 $\alpha$ , en concordancia con el papel inductor de la hipoxia sobre este factor previamente descrito (271). No obstante, resulta interesante que durante la fase de reoxigenación, en la que los niveles de oxígeno vuelven a ser normales, HIF-1 $\alpha$  se mantuvo en un estado más elevado que en condiciones de normoxia. Este resultado es realmente llamativo, dado que se ha descrito que la presencia de oxígeno regula negativamente la expresión de HIF-1 $\alpha$  (162). Esto nos llevaría a la importante cuestión de si otros factores distintos al oxígeno podrían estar

interviniendo en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  durante la fase de reoxigenación. Como posibles alternativas, se ha sugerido que la vía de señalización PI3K/Akt puede activar HIF-1 $\alpha$  mediante fosforilación, o bien a través de la inhibición de la prolil hidroxilasa 2 (PH2) que participa en la degradación de HIF-1 $\alpha$  en presencia de niveles normales de oxígeno (272,273). De esta forma, como se ha sugerido previamente por otros autores, vías de señalización que inhiban la actividad de las PHs podrían regular al alza HIF-1 $\alpha$  a pesar de la presencia de oxígeno (274). Serían necesarios estudios adicionales sobre la implicación de la vía PI3K/Akt durante la reoxigenación que sigue a un periodo de OGD para entender mejor su potencial papel regulador sobre HIF-1 $\alpha$ .

En último lugar, estudiamos el papel de los principales transportadores de glucosa en el SNC, GLUT3 y GLUT1, ante la situación de privación de oxígeno y glucosa. Ambos transportadores han sido detectados tanto en procesos neuronales como en el cuerpo celular de la neurona (275), aunque parece que GLUT3 es el principal encargado de mediar el transporte de glucosa en las células neuronales, mientras que GLUT1 parece adquirir un papel más importante en las células de glía (276). A pesar de que la expresión de GLUT3 puede ser incrementada en respuesta a la hipoxia e hipoglucemia (277), nuestros datos mostraron una gran homogeneidad en los niveles de este transportador de glucosa durante todo el experimento, no viéndose alterados ni por la privación de oxígeno y glucosa, ni por la reoxigenación posterior (*Figura 29A*). Por el contrario, los niveles de GLUT1 en la situación de normoxia fueron muy bajos (*Figura 29B*), lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros autores que indican que este transportador cobra más importancia en las células gliales, mientras que el transporte de glucosa en neuronas es mediado principalmente por GLUT3 (275). Sin embargo, tanto en la OGD como en la fase de reoxigenación, la expresión de GLUT1 se vio fuertemente incrementada, lo que sugiere que estas neuronas podrían estar sobreexpresando transportadores de glucosa, que en condiciones normales tienen un papel secundario, con el fin de optimizar el escaso aporte que reciben de glucosa. Entre los mecanismos que podrían estar mediando esta regulación al alza de GLUT1, se sabe que su expresión puede ser regulada positivamente por HIF-1 $\alpha$  (271), lo que concuerda perfectamente con nuestros resultados en relación al patrón de expresión de estas dos proteínas (*Figuras 28 y 29B*). De hecho, es conocido que, además de a la hipoxia, HIF-1 $\alpha$  es capaz de responder a los niveles de glucosa. Así, se ha observado que la hiperglucemia produce una disminución tanto de los niveles de esta proteína

como de su actividad transcripcional (278), del mismo modo que la falta de glucosa conduce a la transcripción de varios genes controlados por HIF-1 $\alpha$  (279). No obstante, también ha sido demostrada una regulación positiva de GLUT3 por HIF-1 $\alpha$  frente al daño por isquemia/reperfusión (280), lo que podría sugerir que las células presentan mecanismos complejos de regulación para hacer frente a un daño isquémico recurrente que no son exactamente iguales que aquellos desencadenados por un solo daño isquémico.

A pesar de la evidente importancia de los resultados descritos, no debemos olvidar que los cultivos *in vitro* presentan ciertas limitaciones. Por ejemplo, un daño isquémico repetitivo no afecta sólo selectivamente a las neuronas, ni tiene porque producirse específicamente en la misma zona cerebral. Por tanto, estudios con líneas gliales así como estudios en modelos animales *in vivo* ayudarían a arrojar luz sobre los mecanismos moleculares que intervienen en una situación de daño isquémico repetitivo. Para finalizar, nuestros resultados apuntan hacia un papel protector del 17 $\beta$ -estradiol y la genisteína frente al daño isquémico, preservando parcialmente un componente importante de la cadena de transporte de electrones como la CO y, por tanto, el metabolismo oxidativo neuronal. Sin embargo, sería aconsejable evaluar el posible efecto de nuestros tratamientos sobre otros marcadores relacionados con procesos de estrés oxidativo e inflamación, los cuales son también dos componentes importantes del daño generado por isquemia/reperfusión (154).

En resumen, a lo largo de este trabajo de investigación observamos en primer lugar que las diferencias en los niveles de estrógenos que existen entre distintas fases del ciclo estral parecen modular el metabolismo oxidativo cerebral de una forma específica de región. Además, hallamos un deterioro asociado al envejecimiento en algunos aspectos relacionados con la homeostasis cortical, principalmente en la cascada de señalización intracelular de la insulina. A pesar de que el tratamiento con genisteína fue capaz de mejorar algunos pasos de esta vía, el tratamiento con estradiol resultó ser una alternativa más sólida para mejorar este deterioro inherente al envejecimiento de la cascada de señalización de la insulina. No obstante, la mejoría de algunos pasos de esta vía, que además participan en la regulación de otros procesos importantes, sugiere que la genisteína podría llevar a cabo otros mecanismos neuroprotectores en el córtex cerebral envejecido. Finalmente, tanto el estradiol como la genisteína mostraron un papel neuroprotector en una situación repetitiva de privación de oxígeno y

glucosa/reoxigenación mediado, al menos en parte, por una mejoría del metabolismo oxidativo neuronal deteriorado por el daño isquémico. En conjunto, todo ello apunta a que los estrógenos juegan un papel muy importante en la regulación de diversos procesos a nivel central relacionados con el envejecimiento femenino. A pesar de que la genisteína no ha sido capaz de mimetizar este papel protector del estradiol en todas las patologías estudiadas, los resultados positivos encontrados con este fitoestrógeno, tales como la activación de Akt en el córtex cerebral de ratas hembra viejas y su papel neuroprotector frente al daño isquémico recurrente, son esperanzadores y alientan a la realización de más estudios, bien sea utilizándolos como monoterapia o en terapias combinadas con otros fitoestrógenos. Por último, no debemos olvidar que estos resultados fueron hallados en modelos animales y celulares, por lo que su comprobación en el ser humano sería imperativa antes de confirmar rotundamente el atribuido papel neuroprotector del estradiol y de la genisteína.



## **CONCLUSIONES - CONCLUSIONS**





1. Las diferencias en los niveles de estrógenos, que existen entre distintas fases del ciclo estral, intervienen en la modulación del metabolismo oxidativo cerebral de una forma específica de región en ratas hembra adultas.
2. El tratamiento agudo con  $17\beta$ -estradiol, pero no con genisteína, reduce el impacto negativo del envejecimiento sobre la sensibilidad a la acción de la insulina en el córtex cerebral de ratas hembra. Sin embargo, el hecho de que la genisteína provoque la activación de Akt, una proteína quinasa implicada en múltiples procesos celulares, sugiere la existencia de otros mecanismos implicados en la mediación de los efectos neuroprotectores de este fitoestrógeno durante el envejecimiento femenino.
3. Los tratamientos agudos con  $17\beta$ -estradiol y genisteína ejercen acciones neuroprotectoras frente a un daño por isquemia/reperfusión recurrente en un estudio *in vitro* realizado con la línea neuronal de hipocampo de ratón HT22. Este efecto protector parece ser mediado, al menos en parte, por una mejoría del metabolismo oxidativo neuronal.



1. The differences in estrogen levels between different stages of the estrous cycle are involved in modulating brain oxidative metabolism in a region-specific manner in adult female rats.
2. Acute treatment with  $17\beta$ -estradiol, but not with genistein, reduces the negative impact of aging on insulin sensitivity in the cerebral cortex of female rats. However, the fact that genistein induces Akt activation, which is a protein kinase involved in multiple cellular processes, suggests that other possible mechanisms are involved in the neuroprotective effects of this phytoestrogen during female aging.
3. Acute treatments with  $17\beta$ -estradiol and genistein exert neuroprotective actions in an *in vitro* study carried out with the HT22 neuronal line of mouse hippocampus. This protective effect seems to be mediated, at least partially, by an improvement of the neuronal oxidative metabolism.



## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. Williams Textbook of Endocrinology. *Tenth Edition, Elsevier, Netherlands*. 2002.
2. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. *Eleventh Edition, Elsevier, Netherlands*. 2006.
3. Guillemin R. Hypothalamic control of the secretion of adenohipophysial hormones. *Advances in metabolic disorders*. 1971;5:1-51.
4. Strauss JF, Barbieri RL. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. *Sixth Edition, Elsevier, Netherlands*. 2009.
5. Amsterdam A, Rotmensch S. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocrine reviews*. 1987;8(3):309-337.
6. Muthukumar S, Rajesh D, Saibaba G, Alagesan A, Rengarajan RL, Archunan G. Urinary lipocalin protein in a female rodent with correlation to phases in the estrous cycle: an experimental study accompanied by in silico analysis. *PLoS one*. 2013;8(8):e71357.
7. Barrington EJW. An introduction to general and comparative endocrinology. *Second Edition, Oxford University Press, United Kingdom*. 1975.
8. Guo YS, Sun Z, Ma J, Cui W, Gao B, Zhang HY, Han YH, Hu HM, Wang L, Fan J, Yang L, Tang J, Luo ZJ. 17beta-Estradiol inhibits ER stress-induced apoptosis through promotion of TFII-I-dependent Grp78 induction in osteoblasts. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2014.
9. Pelligrino DA, Santizo R, Baughman VL, Wang Q. Cerebral vasodilating capacity during forebrain ischemia: effects of chronic estrogen depletion and repletion and the role of neuronal nitric oxide synthase. *Neuroreport*. 1998;9(14):3285-3291.
10. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine reviews*. 1999;20(3):279-307.
11. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews*. 2001;81(4):1535-1565.
12. Lanzino M, Morelli C, Garofalo C, Panno ML, Mauro L, Ando S, Sisci D. Interaction between estrogen receptor alpha and insulin/IGF signaling in breast cancer. *Current cancer drug targets*. 2008;8(7):597-610.
13. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters*. 1996;392(1):49-53.
14. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):5925-5930.
15. Levin ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol (1985)*. 2001;91(4):1860-1867.
16. Nadal A, Diaz M, Valverde MA. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News in physiological sciences : an international journal of*



- physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society.* 2001;16:251-255.
17. Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene.* 2000;19(43):4970-4978.
  18. Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2005;94(5):499-518.
  19. Kong EH, Pike AC, Hubbard RE. Structure and mechanism of the oestrogen receptor. *Biochemical Society transactions.* 2003;31(Pt 1):56-59.
  20. Rao J, Jiang X, Wang Y, Chen B. Advances in the understanding of the structure and function of ER-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2011;127(3-5):231-237.
  21. Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(8):4807-4812.
  22. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochemical and biophysical research communications.* 2005;336(4):1023-1027.
  23. Windahl SH, Lagerquist MK, Andersson N, Jochems C, Kallkopf A, Hakansson C, Inzunza J, Gustafsson JA, van der Saag PT, Carlsten H, Pettersson K, Ohlsson C. Identification of target cells for the genomic effects of estrogens in bone. *Endocrinology.* 2007;148(12):5688-5695.
  24. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol.* 2002;16(1):100-115.
  25. Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(47):33551-33556.
  26. Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(49):17126-17131.
  27. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1995;9(5):404-410.
  28. Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochemical and biophysical research communications.* 2004;316(3):878-883.

29. Acconcia F, Bocedi A, Ascenzi P, Marino M. Does palmitoylation target estrogen receptors to plasma membrane caveolae? *IUBMB life*. 2003;55(1):33-35.
30. McEwen BS. Neural gonadal steroid actions. *Science*. 1981;211(4488):1303-1311.
31. Kelly MJ, Moss RL, Dudley CA. The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale*. 1977;30(1):53-64.
32. Nabekura J, Oomura Y, Minami T, Mizuno Y, Fukuda A. Mechanism of the rapid effect of 17 beta-estradiol on medial amygdala neurons. *Science*. 1986;233(4760):226-228.
33. Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2001;12(4):152-156.
34. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *The EMBO journal*. 2001;20(21):6050-6059.
35. Kelly MJ, Wagner EJ. Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 1999;10(9):369-374.
36. Woolley CS. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Hormones and behavior*. 1998;34(2):140-148.
37. Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1990;10(4):1286-1291.
38. McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent progress in hormone research*. 2002;57:357-384.
39. Liu M, Kelley MH, Herson PS, Hurn PD. Neuroprotection of sex steroids. *Minerva endocrinologica*. 2010;35(2):127-143.
40. Pozzi S, Benedusi V, Maggi A, Vegeto E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1089:302-323.
41. Baraka AM, Korish AA, Soliman GA, Kamal H. The possible role of estrogen and selective estrogen receptor modulators in a rat model of Parkinson's disease. *Life sciences*. 2011;88(19-20):879-885.
42. Xu H, Wang R, Zhang YW, Zhang X. Estrogen, beta-amyloid metabolism/trafficking, and Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1089:324-342.
43. Peng MT, Peng YI, Chen FN. Age-dependent changes in the oxygen consumption of the cerebral cortex, hypothalamus, hippocampus, and amygdaloid in rats. *Journal of gerontology*. 1977;32(5):517-522.
44. Namba H, Sokoloff L. Acute administration of high doses of estrogen increases glucose utilization throughout brain. *Brain research*. 1984;291(2):391-394.

45. Rilling JK, Lacreuse A, Barks SK, Elfenbein HA, Pagnoni G, Votaw JR, Herndon JG. Effect of menstrual cycle on resting brain metabolism in female rhesus monkeys. *Neuroreport*. 2008;19(5):537-541.
46. Chen JQ, Yager JD, Russo J. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1746(1):1-17.
47. Klinge CM. Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;105(6):1342-1351.
48. Luine VN, Khylichevskaya RI, McEwen BS. Oestrogen effects on brain and pituitary enzyme activities. *Journal of neurochemistry*. 1974;23(5):925-934.
49. Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in neurosciences*. 1989;12(3):94-101.
50. Daniel JM, Roberts SL, Dohanich GP. Effects of ovarian hormones and environment on radial maze and water maze performance of female rats. *Physiology & behavior*. 1999;66(1):11-20.
51. Fader AJ, Hendricson AW, Dohanich GP. Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnesic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiology of learning and memory*. 1998;69(3):225-240.
52. Chen JR, Yan YT, Wang TJ, Chen LJ, Wang YJ, Tseng GF. Gonadal hormones modulate the dendritic spine densities of primary cortical pyramidal neurons in adult female rat. *Cereb Cortex*. 2009;19(11):2719-2727.
53. Montague D, Weickert CS, Tomaskovic-Crook E, Rothmond DA, Kleinman JE, Rubinow DR. Oestrogen receptor alpha localisation in the prefrontal cortex of three mammalian species. *Journal of neuroendocrinology*. 2008;20(7):893-903.
54. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology*. 1997;388(4):507-525.
55. Conejo NM, Gonzalez-Pardo H, Vallejo G, Arias JL. Changes in brain oxidative metabolism induced by water maze training. *Neuroscience*. 2007;145(2):403-412.
56. Jo YS, Park EH, Kim IH, Park SK, Kim H, Kim HT, Choi JS. The medial prefrontal cortex is involved in spatial memory retrieval under partial-cue conditions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(49):13567-13578.
57. Alonso A, Moreno M, Ordonez P, Fernandez R, Perez C, Diaz F, Navarro A, Tolivia J, Gonzalez C. Chronic estradiol treatment improves brain homeostasis during aging in female rats. *Endocrinology*. 2008;149(1):57-72.
58. Perez SE, Chen EY, Mufson EJ. Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain research Developmental brain research*. 2003;145(1):117-139.
59. Ruch TC, Patton HD, Woodbury JW, Towe AL. *Neurophysiology*. W B Saunders Company, Philadelphia. 1965.

60. Patton KT, Thibodeau GA. *Anatomy & Physiology. Eighth Edition, Elsevier, Netherlands.* 2012.
61. Groenewegen HJ, Berendse HW, Wolters JG, Lohman AH. The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Progress in brain research.* 1990;85:95-116; discussion 116-118.
62. Van Eden CG, Lamme VA, Uylings HB. Heterotopic Cortical Afferents to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat. A Combined Retrograde and Anterograde Tracer Study. *The European journal of neuroscience.* 1992;4(1):77-97.
63. Heidbreder CA, Groenewegen HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2003;27(6):555-579.
64. Hara Y, Yuk F, Puri R, Janssen WG, Rapp PR, Morrison JH. Presynaptic mitochondrial morphology in monkey prefrontal cortex correlates with working memory and is improved with estrogen treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(1):486-491.
65. Groenewegen HJ, Wright CI, Uylings HB. The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J Psychopharmacol.* 1997;11(2):99-106.
66. Jay TM, Witter MP. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *The Journal of comparative neurology.* 1991;313(4):574-586.
67. Swanson LW. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain research.* 1981;217(1):150-154.
68. Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *The Journal of comparative neurology.* 1995;352(4):567-593.
69. Jay TM, Glowinski J, Thierry AM. Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain research.* 1989;505(2):337-340.
70. Aggleton JP, Brown MW. Interleaving brain systems for episodic and recognition memory. *Trends in cognitive sciences.* 2006;10(10):455-463.
71. Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1990;10(12):4035-4039.
72. Yankova M, Hart SA, Woolley CS. Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(6):3525-3530.
73. McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, Li C, Yuen G, Milner TA. Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-

- induced synapse formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(13):7093-7100.
74. Bayer TA, Wiestler OD, Wolf HK. Hippocampal loss of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 mRNA in chronic temporal lobe epilepsy. *Acta neuropathologica*. 1995;89(5):446-450.
75. Hampson RE, Simeral JD, Deadwyler SA. Distribution of spatial and nonspatial information in dorsal hippocampus. *Nature*. 1999;402(6762):610-614.
76. Mendez-Lopez M, Mendez M, Lopez L, Arias JL. Spatial working memory learning in young male and female rats: involvement of different limbic system regions revealed by cytochrome oxidase activity. *Neuroscience research*. 2009;65(1):28-34.
77. Bulloch K, Brake W, Lee S, Patel A, Wolf O, McEwen B. Estrogen increases synaptic protein immunoreactivity in the dorsal and ventral hippocampus of ovariectomized rats. *Abstr Soc Neurosci*. 2000;26:4.
78. Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1767-1775.
79. Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids*. 2008;73(9-10):874-879.
80. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of cellular physiology*. 2005;202(3):654-662.
81. Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14523-14526.
82. Keller K, Strube M, Mueckler M. Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. Comparison of kinetic parameters. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(32):18884-18889.
83. Pardridge WM. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiological reviews*. 1983;63(4):1481-1535.
84. Duelli R, Kuschinsky W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 2001;16:71-76.
85. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *European journal of pharmacology*. 2004;490(1-3):13-24.
86. El Messari S, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Penicaud L, Arluison M. Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology*. 1998;399(4):492-512.

87. Rea S, James DE. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes*. 1997;46(11):1667-1677.
88. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic*. 2003;4(11):711-716.
89. Dumonteil E, Philippe J. Insulin gene: organisation, expression and regulation. *Diabetes & metabolism*. 1996;22(3):164-173.
90. Matschinsky FM. Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 3:S394-404.
91. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *The Journal of nutrition*. 2006;136(4):873-876.
92. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(4):267-277.
93. Freychet P, Roth J, Neville DM, Jr. Monoiodoinsulin: demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1971;43(2):400-408.
94. Jarett L, Schweitzer JB, Smith RM. Insulin receptors: differences in structural organization on adipocyte and liver plasma membranes. *Science*. 1980;210(4474):1127-1128.
95. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978;272(5656):827-829.
96. Correia SC, Santos RX, Perry G, Zhu X, Moreira PI, Smith MA. Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease? *Ageing research reviews*. 2011;10(2):264-273.
97. Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *The American journal of physiology*. 1994;266(2 Pt 1):C319-334.
98. Olson TS, Lane MD. Post-translational acquisition of insulin binding activity by the insulin proreceptor. Correlation to recognition by autoimmune antibody. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(14):6816-6822.
99. Hu X, Wang S, Xu J, Wang DB, Chen Y, Yang GZ. Triterpenoid saponins from *Stauntonia chinensis* ameliorate insulin resistance via the AMP-activated protein kinase and IR/IRS-1/PI3K/Akt pathways in insulin-resistant HepG2 cells. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(6):10446-10458.
100. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*. 2001;410(6831):944-948.
101. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
102. Woscholski R, Dhand R, Fry MJ, Waterfield MD, Parker PJ. Biochemical characterization of the free catalytic p110 alpha and the complexed heterodimeric p110 alpha.p85 alpha forms of the mammalian phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(40):25067-25072.

103. Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(3):1379-1387.
104. Rordorf-Nikolic T, Van Horn DJ, Chen D, White MF, Backer JM. Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(8):3662-3666.
105. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *The Biochemical journal*. 1998;333 ( Pt 3):471-490.
106. Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Current opinion in genetics & development*. 1998;8(1):55-62.
107. Gonzalez C, Diaz F, Alonso A. Neuroprotective effects of estrogens: cross-talk between estrogen and intracellular insulin signalling. *Infectious disorders drug targets*. 2008;8(1):65-67.
108. Moreno M, Ordonez P, Alonso A, Diaz F, Tolivia J, Gonzalez C. Chronic 17beta-estradiol treatment improves skeletal muscle insulin signaling pathway components in insulin resistance associated with aging. *Age (Dordr)*. 2010;32(1):1-13.
109. Martin S, Millar CA, Lyttle CT, Meerloo T, Marsh BJ, Gould GW, James DE. Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. *Journal of cell science*. 2000;113 Pt 19:3427-3438.
110. Czech MP, Buxton JM. Insulin action on the internalization of the GLUT4 glucose transporter in isolated rat adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(13):9187-9190.
111. Ren W, Cheema S, Du K. The association of ClipR-59 protein with AS160 modulates AS160 protein phosphorylation and adipocyte Glut4 protein membrane translocation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(32):26890-26900.
112. Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galldiks N, Kustermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Bruning JC. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(9):3100-3105.
113. van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Progress in neurobiology*. 2006;79(4):205-221.
114. Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *European journal of pharmacology*. 2004;490(1-3):71-81.
115. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956;11(3):298-300.

116. Strehler BL. Lectures on Gerontology. *Academic Press, London*. 1982.
117. McKinlay SM, Bifano NL, McKinlay JB. Smoking and age at menopause in women. *Annals of internal medicine*. 1985;103(3):350-356.
118. Torgerson DJ, Avenell A, Russell IT, Reid DM. Factors associated with onset of menopause in women aged 45-49. *Maturitas*. 1994;19(2):83-92.
119. Troen BR. The biology of aging. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2003;70(1):3-22.
120. Lopez-Gruoso R, Borrás C, Gambini J, Vina J. [Aging and ovariectomy cause a decrease in brain glucose consumption in vivo in Wistar rats]. *Revista española de geriatría y gerontología*. 2010;45(3):136-140.
121. Borrás C, Stvolinsky S, Lopez-Gruoso R, Fedorova T, Gambini J, Boldyrev A, Vina J. Low in vivo brain glucose consumption and high oxidative stress in accelerated aging. *FEBS letters*. 2009;583(13):2287-2293.
122. Yanase D, Matsunari I, Yajima K, Chen W, Fujikawa A, Nishimura S, Matsuda H, Yamada M. Brain FDG PET study of normal aging in Japanese: effect of atrophy correction. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2005;32(7):794-805.
123. Alonso A, Gonzalez-Pardo H, Garrido P, Conejo NM, Llana P, Diaz F, Del Rey CG, Gonzalez C. Acute effects of 17 beta-estradiol and genistein on insulin sensitivity and spatial memory in aged ovariectomized female rats. *Age (Dordr)*. 2010;32(4):421-434.
124. Alonso A, Fernandez R, Moreno M, Ordonez P, Gonzalez-Pardo H, Conejo NM, Diaz F, Gonzalez C. Positive effects of 17beta-estradiol on insulin sensitivity in aged ovariectomized female rats. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2006;61(5):419-426.
125. Larkin LM, Reynolds TH, Supiano MA, Kahn BB, Halter JB. Effect of aging and obesity on insulin responsiveness and glut-4 glucose transporter content in skeletal muscle of Fischer 344 x Brown Norway rats. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2001;56(11):B486-492.
126. Reaven GM, Reaven EP. Age, glucose intolerance, and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1985;33(4):286-290.
127. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007;375(1-2):20-35.
128. Morisco C, Lembo G, Trimarco B. Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology. *Trends in cardiovascular medicine*. 2006;16(6):183-188.
129. Yki-Jarvinen H. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia*. 1995;38(12):1378-1388.
130. Novo G, Pugliesi M, Visconti C, Spatafora P, Fiore M, Di Miceli R, Guarneri Francesco P, Vitale G, Novo S. Early subclinical ventricular dysfunction in



- patients with insulin resistance. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2014;15(2):110-114.
131. Rasgon N, Jarvik L. Insulin resistance, affective disorders, and Alzheimer's disease: review and hypothesis. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2004;59(2):178-183; discussion 184-192.
  132. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059-1062.
  133. Turcotte LP, Swenberger JR, Zavitz Tucker M, Yee AJ. Increased fatty acid uptake and altered fatty acid metabolism in insulin-resistant muscle of obese Zucker rats. *Diabetes*. 2001;50(6):1389-1396.
  134. Gallardo N, Arribas C, Villar M, Ros M, Carrascosa JM, Martinez C, Andres A. ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged food-restricted rats: effects on circulating soluble leptin receptor levels. *Endocrinology*. 2005;146(11):4934-4942.
  135. Pereira S, Park E, Mori Y, Haber CA, Han P, Uchida T, Stavar L, Oprescu AI, Koulajian K, Ivovic A, Yu Z, Li D, Bowman TA, Dewald J, El-Benna J, Brindley DN, Gutierrez-Juarez R, Lam TK, Najjar SM, McKay RA, Bhanot S, Fantus IG, Giacca A. FFA-induced Hepatic Insulin Resistance in vivo is mediated by PKC-delta, NADPH Oxidase, and Oxidative Stress. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014.
  136. Stoney RM, O'Dea K, Herbert KE, Dragicevic G, Giles GG, Cumpston GN, Best JD. Insulin resistance as a major determinant of increased coronary heart disease risk in postmenopausal women with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2001;18(6):476-482.
  137. Gonzalez C, Alonso A, Alvarez N, Diaz F, Martinez M, Fernandez S, Patterson AM. Role of 17beta-estradiol and/or progesterone on insulin sensitivity in the rat: implications during pregnancy. *The Journal of endocrinology*. 2000;166(2):283-291.
  138. Scott AR, Macdonald IA, Bowman CA, Jeffcoate WJ. Effect of phase of menstrual cycle on insulin sensitivity, peripheral blood flow and cardiovascular responses to hyperinsulinaemia in young women with type 1 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1990;7(1):57-62.
  139. Unnikrishnan AG. Tissue-specific insulin resistance. *Postgraduate medical journal*. 2004;80(946):435.
  140. Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and the blood-brain barrier. *Current pharmaceutical design*. 2003;9(10):795-800.
  141. Alonso A, Gonzalez C. Neuroprotective role of estrogens: relationship with insulin/IGF-1 signaling. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:607-619.
  142. Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ. Effect of diabetes mellitus on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Peptides*. 1997;18(10):1577-1584.
  143. Pan M, Han H, Zhong C, Geng Q. Effects of genistein and daidzein on hippocampus neuronal cell proliferation and BDNF expression in H19-7 neural cell line. *The journal of nutrition, health & aging*. 2012;16(4):389-394.

144. Yu X, Rajala RV, McGinnis JF, Li F, Anderson RE, Yan X, Li S, Elias RV, Knapp RR, Zhou X, Cao W. Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(13):13086-13094.
145. Zhang QG, Wang R, Tang H, Dong Y, Chan A, Sareddy GR, Vadlamudi RK, Brann DW. Brain-Derived Estrogen Exerts Anti-inflammatory and Neuroprotective Actions in the Rat Hippocampus. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014.
146. Cheng CM, Cohen M, Wang J, Bondy CA. Estrogen augments glucose transporter and IGF1 expression in primate cerebral cortex. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(6):907-915.
147. Sabín JA, Vallejo JM. Comprender el Ictus (Infarto y hemorragia cerebral). *Amat editorial, Barcelona*. 2013.
148. Hachinski V, Donnan GA, Gorelick PB, Hacke W, Cramer SC, Kaste M, Fisher M, Brainin M, Buchan AM, Lo EH, Skolnick BE, Furie KL, Hankey GJ, Kivipelto M, Morris J, Rothwell PM, Sacco RL, Smith SC, Jr., Wang Y, Bryer A, Ford GA, Iadecola C, Martins SC, Saver J, Skvortsova V, Bayley M, Bednar MM, Duncan P, Enney L, Finklestein S, Jones TA, Kalra L, Kleim J, Nitkin R, Teasell R, Weiller C, Desai B, Goldberg MP, Heiss WD, Saarela O, Schwamm LH, Shinohara Y, Trivedi B, Wahlgren N, Wong LK, Hakim A, Norrving B, Prudhomme S, Bornstein NM, Davis SM, Goldstein LB, Leys D, Tuomilehto J. Stroke: working toward a prioritized world agenda. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2010;41(6):1084-1099.
149. Cortina B, Torregrosa G, Castello-Ruiz M, Burguete MC, Moscardo A, Latorre A, Salom JB, Valles J, Santos MT, Alborch E. Improvement of the circulatory function partially accounts for the neuroprotective action of the phytoestrogen genistein in experimental ischemic stroke. *European journal of pharmacology*. 2013;708(1-3):88-94.
150. Gwag BJ, Lobner D, Koh JY, Wie MB, Choi DW. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neuroscience*. 1995;68(3):615-619.
151. Malagelada C, Xifro X, Minano A, Sabria J, Rodriguez-Alvarez J. Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiology of disease*. 2005;20(1):27-37.
152. Martinez-Sanchez M, Striggow F, Schroder UH, Kahlert S, Reymann KG, Reiser G. Na(+) and Ca(2+) homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience*. 2004;128(4):729-740.
153. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in neurobiology*. 2000;62(3):215-249.
154. van Wijk SJ, Hageman GJ. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free radical biology & medicine*. 2005;39(1):81-90.

155. Huttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, Varughese A, Lu G, Liu J, Ramzan R, Vogt S, Grossman LI, Doan JW, Marcus K, Lee I. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1817(4):598-609.
156. Satoh MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*. 1992;356(6367):356-358.
157. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal*. 1997;326 ( Pt 1):1-16.
158. Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2002;7(4):321-328.
159. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(50):33533-33539.
160. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(12):5510-5514.
161. Adamcio B, Sperling S, Hagemeyer N, Walkinshaw G, Ehrenreich H. Hypoxia inducible factor stabilization leads to lasting improvement of hippocampal memory in healthy mice. *Behavioural brain research*. 2010;208(1):80-84.
162. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271-275.
163. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 2004;19:176-182.
164. Sandau KB, Faus HG, Brune B. Induction of hypoxia-inducible-factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;278(1):263-267.
165. Qin AP, Liu CF, Qin YY, Hong LZ, Xu M, Yang L, Liu J, Qin ZH, Zhang HL. Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy*. 2010;6(6):738-753.
166. Tian F, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Morimoto N, Shang J, Zhang X, Liu N, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model. *Autophagy*. 2010;6(8):1107-1114.
167. Lopez-Alonso I, Aguirre A, Gonzalez-Lopez A, Fernandez AF, Amado-Rodriguez L, Astudillo A, Batalla-Solis E, Albaiceta GM. Impairment of autophagy decreases ventilator-induced lung injury by blockade of the NF-kappaB pathway. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013;304(12):L844-852.

168. Armour SM, Baur JA, Hsieh SN, Land-Bracha A, Thomas SM, Sinclair DA. Inhibition of mammalian S6 kinase by resveratrol suppresses autophagy. *Aging*. 2009;1(6):515-528.
169. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*. 2000;19(21):5720-5728.
170. Marino G, Ugalde AP, Salvador-Montoliu N, Varela I, Quiros PM, Cadinanos J, van der Pluijm I, Freije JM, Lopez-Otin C. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Human molecular genetics*. 2008;17(14):2196-2211.
171. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in enzymology*. 2009;452:181-197.
172. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999;402(6762):672-676.
173. Aguirre A, Lopez-Alonso I, Gonzalez-Lopez A, Amado-Rodriguez L, Batalla-Solis E, Astudillo A, Blazquez-Prieto J, Fernandez AF, Galvan JA, Dos Santos CC, Albaiceta GM. Defective autophagy impairs ATF3 activity and worsens lung injury during endotoxemia. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(6):665-676.
174. Sun Y, Li C, Shu Y, Ju X, Zou Z, Wang H, Rao S, Guo F, Liu H, Nan W, Zhao Y, Yan Y, Tang J, Zhao C, Yang P, Liu K, Wang S, Lu H, Li X, Tan L, Gao R, Song J, Gao X, Tian X, Qin Y, Xu KF, Li D, Jin N, Jiang C. Inhibition of autophagy ameliorates acute lung injury caused by avian influenza A H5N1 infection. *Science signaling*. 2012;5(212):ra16.
175. Koellhoffer EC, McCullough LD. The effects of estrogen in ischemic stroke. *Translational stroke research*. 2013;4(4):390-401.
176. Towfighi A, Saver JL, Engelhardt R, Ovbiagele B. A midlife stroke surge among women in the United States. *Neurology*. 2007;69(20):1898-1904.
177. Simpkins JW, Rajakumar G, Zhang YQ, Simpkins CE, Greenwald D, Yu CJ, Bodor N, Day AL. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *Journal of neurosurgery*. 1997;87(5):724-730.
178. Lebesgue D, Chevaleyre V, Zukin RS, Etgen AM. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids*. 2009;74(7):555-561.
179. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes & development*. 1999;13(22):2905-2927.
180. Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM. Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience letters*. 1996;212(1):13-16.

181. Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *Journal of neuroscience research*. 1999;58(6):815-822.
182. Gulinello M, Lebesgue D, Jover-Mengual T, Zukin RS, Etgen AM. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. *Hormones and behavior*. 2006;49(2):246-260.
183. Kaplan RC, Tirschwell DL, Longstreth WT, Jr., Manolio TA, Heckbert SR, Lefkowitz D, El-Saed A, Psaty BM. Vascular events, mortality, and preventive therapy following ischemic stroke in the elderly. *Neurology*. 2005;65(6):835-842.
184. Viscoli CM, Brass LM, Kernan WN, Sarrel PM, Suissa S, Horwitz RI. A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. *The New England journal of medicine*. 2001;345(17):1243-1249.
185. Wise P. Estradiol exerts neuroprotective actions against ischemic brain injury: insights derived from animal models. *Endocrine*. 2003;21(1):11-15.
186. Colditz GA. Hormones and breast cancer: evidence and implications for consideration of risks and benefits of hormone replacement therapy. *Journal of women's health / the official publication of the Society for the Advancement of Women's Health Research*. 1999;8(3):347-357.
187. Gapstur SM, Morrow M, Sellers TA. Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology: results of the Iowa Women's Health Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;281(22):2091-2097.
188. Daly E, Vessey MP, Hawkins MM, Carson JL, Gough P, Marsh S. Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet*. 1996;348(9033):977-980.
189. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(6):1191-1201.
190. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-4263.
191. Baker VL, Leitman D, Jaffe RB. Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. *Obstetrical & gynecological survey*. 2000;55(7 Suppl 2):S21-47.
192. Qian Y, Guan T, Huang M, Cao L, Li Y, Cheng H, Jin H, Yu D. Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF-kappaB activation in a cerebral ischemia mouse model. *Neurochemistry international*. 2012;60(8):759-767.
193. Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gurrpide E. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1993;45(5):399-405.

194. Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 1978;103(5):1860-1867.
195. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138(3):863-870.
196. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(12):5592-5595.
197. Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer research*. 1989;49(18):5111-5117.
198. Lock M, Kaufert P, Gilbert P. Cultural construction of the menopausal syndrome: the Japanese case. *Maturitas*. 1988;10(4):317-332.
199. Barnes S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *The Journal of nutrition*. 1995;125(3 Suppl):777S-783S.
200. Park D, Huang T, Frishman WH. Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiology in review*. 2005;13(1):13-17.
201. Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Grobbee DE, de Haan EH, Aleman A, Lampe JW, van der Schouw YT. Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;292(1):65-74.
202. Lavigne C, Marette A, Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2000;278(3):E491-500.
203. Wagner JD, Cefalu WT, Anthony MS, Litwak KN, Zhang L, Clarkson TB. Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factors and decrease aortic cholesteryl ester content in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Metabolism: clinical and experimental*. 1997;46(6):698-705.
204. Pan Y, Anthony M, Clarkson TB. Effect of estradiol and soy phytoestrogens on choline acetyltransferase and nerve growth factor mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of female rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;221(2):118-125.
205. Patisaul HB, Melby M, Whitten PL, Young LJ. Genistein affects ER beta- but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2002;143(6):2189-2197.
206. Lund TD, West TW, Tian LY, Bu LH, Simmons DL, Setchell KD, Adlercreutz H, Lephart ED. Visual spatial memory is enhanced in female rats (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens. *BMC neuroscience*. 2001;2:20.

207. Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of neurochemistry*. 2001;76(1):1-10.
208. Huang YH, Zhang QH. Genistein reduced the neural apoptosis in the brain of ovariectomised rats by modulating mitochondrial oxidative stress. *The British journal of nutrition*. 2010;104(9):1297-1303.
209. Liang HW, Qiu SF, Shen J, Sun LN, Wang JY, Bruce IC, Xia Q. Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience letters*. 2008;438(1):116-120.
210. Schreihofler DA, Redmond L. Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury in vitro. *Neuroscience*. 2009;158(2):602-609.
211. Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. The laboratory rat. *Kringe GJ (Eds) Academic Press, London*. 2000.
212. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Fifth Edition, Academic Press, New York*. 2005.
213. Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain research*. 1979;171(1):11-28.
214. Gonzalez-Lima F, Jones D. Quantitative mapping of cytochrome oxidase activity in the central auditory system of the gerbil: a study with calibrated activity standards and metal-intensified histochemistry. *Brain research*. 1994;660(1):34-49.
215. Conejo NM, Cimadevilla JM, Gonzalez-Pardo H, Mendez-Couz M, Arias JL. Hippocampal inactivation with TTX impairs long-term spatial memory retrieval and modifies brain metabolic activity. *PloS one*. 2013;8(5):e64749.
216. Mendez-Couz M, Conejo NM, Vallejo G, Arias JL. Spatial memory extinction: a c-Fos protein mapping study. *Behavioural brain research*. 2014;260:101-110.
217. Wang C, Kurzer MS. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutrition and cancer*. 1997;28(3):236-247.
218. Zhao L, Chen Q, Diaz Brinton R. Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(7):509-519.
219. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-254.
220. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(9):4350-4354.
221. Gu JH, Ge JB, Li M, Xu HD, Wu F, Qin ZH. Poloxamer 188 protects neurons against ischemia/reperfusion injury through preserving integrity of cell membranes and blood brain barrier. *PloS one*. 2013;8(4):e61641.

222. Guo F, Wang H, Li L, Zhou H, Wei H, Jin W, Wang Q, Xiong L. A novel domain of amino-Nogo-A protects HT22 cells exposed to oxygen glucose deprivation by inhibiting NADPH oxidase activity. *Cellular and molecular neurobiology*. 2013;33(3):443-452.
223. Garrido P, Moran J, Alonso A, Gonzalez S, Gonzalez C. 17beta-estradiol activates glucose uptake via GLUT4 translocation and PI3K/Akt signaling pathway in MCF-7 cells. *Endocrinology*. 2013;154(6):1979-1989.
224. Sheldahl LC, Shapiro RA, Bryant DN, Koerner IP, Dorsa DM. Estrogen induces rapid translocation of estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, to the neuronal plasma membrane. *Neuroscience*. 2008;153(3):751-761.
225. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*. 2005;11:127-152.
226. Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology*. 2008;149(6):3167-3175.
227. Gomez O, Ballester-Lurbe B, Poch E, Mesonero JE, Terrado J. Developmental regulation of glucose transporters GLUT3, GLUT4 and GLUT8 in the mouse cerebellar cortex. *Journal of anatomy*. 2010;217(5):616-623.
228. Begega A, Cuesta M, Rubio S, Santin LJ, Arias JL. Age-related changes of the nucleolar organizer regions without neuron loss in medial mamillary bodies (hypothalamus) in old rats. *Mechanisms of ageing and development*. 1999;108(2):113-125.
229. Shehata NI, Abd-Elgawad HM, Mawsouf MN, Shaheen AA. The potential role of ozone in ameliorating the age-related biochemical changes in male rat cerebral cortex. *Biogerontology*. 2012;13(6):565-581.
230. Bang OY, Hong HS, Kim DH, Kim H, Boo JH, Huh K, Mook-Jung I. Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiology of disease*. 2004;16(1):21-28.
231. Linford NJ, Dorsa DM. 17beta-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids*. 2002;67(13-14):1029-1040.
232. Zeng H, Chen Q, Zhao B. Genistein ameliorates beta-amyloid peptide (25-35)-induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(2):180-188.
233. Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain research Molecular brain research*. 2003;112(1-2):170-176.
234. Giddabasappa A, Bauler MN, Barrett CM, Coss CC, Wu Z, Miller DD, Dalton JT, Eswaraka JR. GTx-822, an ER{beta}-selective agonist, protects retinal pigment epithelium (ARPE-19) from oxidative stress by activating MAPK and PI3-K pathways. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(11):5934-5942.



235. Zhao L, Yao J, Mao Z, Chen S, Wang Y, Brinton RD. 17beta-Estradiol regulates insulin-degrading enzyme expression via an ERbeta/PI3-K pathway in hippocampus: relevance to Alzheimer's prevention. *Neurobiology of aging*. 2011;32(11):1949-1963.
236. Wilson ME, Rosewell KL, Kashon ML, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Wise PM. Age differentially influences estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) gene expression in specific regions of the rat brain. *Mechanisms of ageing and development*. 2002;123(6):593-601.
237. Miro AM, Sastre-Serra J, Pons DG, Valle A, Roca P, Oliver J. 17beta-Estradiol regulates oxidative stress in prostate cancer cell lines according to ERalpha/ERbeta ratio. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;123(3-5):133-139.
238. Nadal-Serrano M, Sastre-Serra J, Pons DG, Miro AM, Oliver J, Roca P. The ERalpha/ERbeta ratio determines oxidative stress in breast cancer cell lines in response to 17beta-estradiol. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(10):3178-3185.
239. Chhunchha B, Fatma N, Kubo E, Rai P, Singh SP, Singh DP. Curcumin abates hypoxia-induced oxidative stress based-ER stress-mediated cell death in mouse hippocampal cells (HT22) by controlling Prdx6 and NF-kappaB regulation. *American journal of physiology Cell physiology*. 2013;304(7):C636-655.
240. Novensa L, Novella S, Medina P, Segarra G, Castillo N, Heras M, Hermenegildo C, Dantas AP. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ERalpha/ERbeta balance in female mice. *PloS one*. 2011;6(9):e25335.
241. Giuseppina N, Marinella P, Claudia V, Pietro S, Marianna F, Riccardo DM, Paolo GF, Giustina V, Salvatore N. Early subclinical ventricular dysfunction in patients with insulin resistance. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2014.
242. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-1630.
243. Kim JY, Jo KJ, Kim BJ, Baik HW, Lee SK. 17beta-estradiol induces an interaction between adenosine monophosphate-activated protein kinase and the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *International journal of molecular medicine*. 2012;30(4):979-985.
244. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000;407(6803):538-541.
245. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal*. 1996;15(23):6541-6551.
246. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(49):31372-31378.

247. Koricanac G, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Zakula Z, Tepavcevic S, Ribarac-Stepic N, Isenovic ER. Impact of estradiol on insulin signaling in the rat heart. *Cell biochemistry and function*. 2009;27(2):102-110.
248. Johnston AM, Pirola L, Van Obberghen E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS letters*. 2003;546(1):32-36.
249. Nilsen J, Irwin RW, Gallaher TK, Brinton RD. Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(51):14069-14077.
250. Zheng L, Gong W, Liang P, Huang X, You N, Han KQ, Li YM, Li J. Effects of AFP-activated PI3K/Akt signaling pathway on cell proliferation of liver cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014.
251. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(5):2110-2115.
252. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-437.
253. Frojdo S, Durand C, Molin L, Carey AL, El-Osta A, Kingwell BA, Febbraio MA, Solari F, Vidal H, Pirola L. Phosphoinositide 3-kinase as a novel functional target for the regulation of the insulin signaling pathway by SIRT1. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;335(2):166-176.
254. Elbaz A, Rivas D, Duque G. Effect of estrogens on bone marrow adipogenesis and Sirt1 in aging C57BL/6J mice. *Biogerontology*. 2009;10(6):747-755.
255. Mehta SL, Kumari S, Mendeleev N, Li PA. Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *BMC neuroscience*. 2012;13:79.
256. Shimada S, Hirabayashi M, Ishige K, Kosuge Y, Kihara T, Ito Y. Activation of dopamine D4 receptors is protective against hypoxia/reoxygenation-induced cell death in HT22 cells. *Journal of pharmacological sciences*. 2010;114(2):217-224.
257. Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci*. 1997;4(4):199-212.
258. Bagetta G, Chiappetta O, Amantea D, Iannone M, Rotiroti D, Costa A, Nappi G, Corasaniti MT. Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neuroscience letters*. 2004;368(1):87-91.
259. Chiueh C, Lee S, Andoh T, Murphy D. Induction of antioxidative and antiapoptotic thioredoxin supports neuroprotective hypothesis of estrogen. *Endocrine*. 2003;21(1):27-31.
260. Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30(2):201-211.

261. Wang S, Wei H, Cai M, Lu Y, Hou W, Yang Q, Dong H, Xiong L. Genistein attenuates brain damage induced by transient cerebral ischemia through up-regulation of ERK activity in ovariectomized mice. *International journal of biological sciences*. 2014;10(4):457-465.
262. Wang L, Chen M, Yuan L, Xiang Y, Zheng R, Zhu S. 14,15-EET promotes mitochondrial biogenesis and protects cortical neurons against oxygen/glucose deprivation-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014.
263. Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic cell*. 2002;1(1):11-21.
264. Ginet V, Puyal J, Clarke PG, Truttmann AC. Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *The American journal of pathology*. 2009;175(5):1962-1974.
265. Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell death and differentiation*. 2001;8(6):569-581.
266. Canu N, Tufi R, Serafino AL, Amadoro G, Ciotti MT, Calissano P. Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *Journal of neurochemistry*. 2005;92(5):1228-1242.
267. Bolanos JP, Peuchen S, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 1994;63(3):910-916.
268. Schurr A, Rigor BM. Brain anaerobic lactate production: a suicide note or a survival kit? *Developmental neuroscience*. 1998;20(4-5):348-357.
269. Fornazari M, Nascimento IC, Nery AA, da Silva CC, Kowaltowski AJ, Ulrich H. Neuronal differentiation involves a shift from glucose oxidation to fermentation. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2011;43(5):531-539.
270. Sharp FR, Bergeron M, Bernaudin M. Hypoxia-inducible factor in brain. *Advances in experimental medicine and biology*. 2001;502:273-291.
271. Huang Y, Lei L, Liu D, Jovin I, Russell R, Johnson RS, Di Lorenzo A, Giordano FJ. Normal glucose uptake in the brain and heart requires an endothelial cell-specific HIF-1 $\alpha$ -dependent function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(43):17478-17483.
272. Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;12(7):363-369.
273. Spinella F, Rosano L, Del Duca M, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 inhibits prolyl hydroxylase domain 2 to activate hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in melanoma cells. *PloS one*. 2010;5(6):e11241.
274. Sun YY, Lin SH, Lin HC, Hung CC, Wang CY, Lin YC, Hung KS, Lien CC, Kuan CY, Lee YH. Cell type-specific dependency on the PI3K/Akt signaling pathway for the endogenous Epo and VEGF induction by baicalein in neurons versus astrocytes. *PloS one*. 2013;8(7):e69019.

- 
275. Maher F, Davies-Hill TM, Lysko PG, Henneberry RC, Simpson IA. Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Molecular and cellular neurosciences*. 1991;2(4):351-360.
276. Maher F, Simpson IA. The GLUT3 glucose transporter is the predominant isoform in primary cultured neurons: assessment by biosynthetic and photoaffinity labelling. *The Biochemical journal*. 1994;301 ( Pt 2):379-384.
277. Yu J, Li J, Zhang S, Xu X, Zheng M, Jiang G, Li F. IGF-1 induces hypoxia-inducible factor 1alpha-mediated GLUT3 expression through PI3K/Akt/mTOR dependent pathways in PC12 cells. *Brain research*. 2012;1430:18-24.
278. Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, Brismar K, Poellinger L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability and function. *Diabetes*. 2004;53(12):3226-3232.
279. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *The EMBO journal*. 1998;17(11):3005-3015.
280. Zhang Z, Yan J, Taheri S, Liu KJ, Shi H. Hypoxia-inducible factor 1 contributes to N-acetylcysteine's protection in stroke. *Free radical biology & medicine*. 2014;68:8-21.





