

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS



**EFFECTO PROTECTOR DE LA TIBOLONA EN UN MODELO INFLAMATORIO DE
MICROGLÍA ESTIMULADO POR PALMITATO**

OSCAR ALEJANDRO HIDALGO LANUSSA

Trabajo para optar al título de

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Tutor

George Emilio Sampaio Barreto

Co-tutor

Luis Miguel García Segura

BOGOTÁ, D.C. NOVIEMBRE DE 2016

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23, Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**EFFECTO PROTECTOR DE LA TIBOLONA EN UN MODELO INFLAMATORIO DE
MICROGLÍA ESTIMULADO POR PALMITATO**

Oscar Alejandro Hidalgo Lanussa



George Emilio Barreto

Director



Sonia Luz Albarracín, PhD.

Jurado 1



Lisandro Giraldez, PhD.

Jurado 2



Rosa Margarita Gómez, PhD.

Jurado 3

**EFFECTO PROTECTOR DE LA TIBOLONA EN UN MODELO INFLAMATORIO DE
MICROGLÍA ESTIMULADO POR PALMITATO**

Oscar Alejandro Hidalgo Lanussa

Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D.

Decana

Facultad de Ciencias

Alba Alicia Trespalacios, Ph.D.

Directora de Posgrado

Facultad de Ciencias

DEDICATORIA

A mi mamá siempre...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra manera me apoyaron durante este camino de investigación y formación, de manera muy especial agradezco a mis compañeros de laboratorio de Bioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. A Eliana Báez y Marco Ávila por todo lo que me enseñaron y colaboraron en este trabajo. De igual manera a mi tutor el profesor George Barreto por confiar siempre en mí y darme la oportunidad de trabajar con él.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Planteamiento del problema de investigación.....	3
1.2 Justificación	6
2. MARCO TEORICO	8
2.1 Metabolismo de los ácidos grasos y mecanismo celular en condición de daño	8
2.2 Inflamación del sistema nervioso.....	12
2.2.1 Ácidos grasos, neuroinflamación y neurodegeneración	13
2.2.2 Rol de la microglía en el proceso inflamatorio	16
2.3 Estrógenos.....	17
2.3.1 Receptores de Estrógeno	17
2.4. Neuroesteroides y esteroides neuroactivos	19
2.4.1 Rol de los compuestos estrogénicos en la inflamación	20
2.5 Tibolona, un esteroide neuroactivo y regulador de la actividad estrogénica	22
2.5.1 Regulación estrogénica de la inflamación	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo General	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. METODOLOGÍA.....	27
4.1. MÉTODOS EXPERIMENTALES	27
4.1.1. Línea Celular	27
4.1.2 Modelo de estimulación con ácido palmítico.....	28
4.1.3 Tratamientos farmacológicos	28
4.1.4. Determinación de parámetros en el modelo	29
4.1.5. Estimación celular de la intensidad media de fluorescencia	32
4.1.6. Citometría de flujo	32
4.1.7. Determinación de Citoquinas:.....	33
4.1.8. Determinación y cuantificación de proteínas por Western Blot	33
4.1.9. Inmunofluorescencia	34
4.1.10. Análisis estadístico.....	35

5. RESULTADOS	36
5.1. Efecto del ácido palmítico sobre la viabilidad en el modelo microglial.....	36
5.1.1. Evaluación de la fragmentación nuclear, potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno en células insultadas con ácido palmítico	38
5.2. Efecto de la tibolona sobre la fragmentación nuclear, las especies reactivas de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial y masa mitocondrial en el modelo inflamatorio de ácido palmítico	40
5.2.1. Efecto de la tibolona sobre los parámetros celulares en el modelo.....	40
5.3. Efecto de los receptores alfa y beta de estrógeno sobre el modelo inflamatorio estimulado por ácido palmítico	48
5.3.1. Efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores de estrógeno sobre el modelo inflamatorio de ácido palmítico	48
5.3.3. Evaluación del efecto de la tibolona sobre los parámetros de función celular asociados con el tratamiento con agonistas de los receptores de estrógeno.	51
5.3.4. Caracterización de la respuesta asociada a proteínas del mecanismo antioxidante mediante el tratamiento con tibolona y agonistas-antagonistas de los receptores de estrógenos	53
5.4. Efecto de la tibolona sobre el componente inflamatorio en células microglia bajo un insulto con ácido palmítico	62
5.4.1 Efecto de la tibolona sobre la expresión de citoquinas en el modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	62
5.4.2. Efecto de la tibolona sobre la modulación de la subunidad p65 de factor de transcripción Kappa B (NF-κB) y su translocación al núcleo.....	64
5.4.3. Efecto de la tibolona y la modulación de receptor de estrógeno beta sobre la expresión de la subunidad p65 del factor transcripción Kappa B.....	65
6. DISCUSIÓN.....	69
6.1. Efecto del ácido palmítico sobre el modelo microglial	69
6.2. Efecto de la tibolona sobre la respuesta de las células BV-2 al ácido palmítico	70
6.3 Mecanismo de acción de la tibolona sobre el modelo inflamatorio con palmitato.....	72
6.4. Respuesta del modelo estimulado con tibolona en la expresión de proteínas de efecto antioxidante.....	75
6.4.1 Efecto de la tibolona sobre la expresión de la proteína neuroglobina en células sometidas a ácido palmítico	78
6.5 Respuesta inflamatoria del modelo a la estimulación con palmitato y tratamiento con tibolona	80
7. CONCLUSIONES.....	84
8. BIBLIOGRAFIA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estandarización del modelo inflamatorio con ácido palmítico.....	36
Figura 2 Caracterización del modelo inflamatorio con ácido palmítico	37
Figura 3. Caracterización de la fragmentación nuclear, potencial de membrana mitocondrial, niveles de peróxido e ion superóxido en la microglía tratada con el palmitato.....	39
Figura 4. Estandarización del efecto de la tibolona sobre la viabilidad en el modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	41
Figura 5. Efecto de la tibolona (post-tratamiento) sobre la captación de yoduro de propidio en la microglia bajo tratamiento con palmítato.....	42
Figura 6. Efecto de la tibolona a 10 nM sobre la condensación y fragmentación nuclear.....	43
Figura 7. Efecto de la tibolona en la producción de peróxido de hidrógeno en un modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	44
Figura 8. Efecto de la tibolona sobre la producción de ion superóxido en un modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	45
Figura 9. Efecto de la tibolona sobre el potencial de membrana mitocondrial en un modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	46
Figura 10. Efecto de la tibolona sobre la masa mitocondrial en un modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	47
Figura 11. Efecto de los agonistas de los receptores de estrógeno sobre la viabilidad del modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	48
Figura 12. Efecto del bloqueo de los receptores de estrógenos sobre la acción protectora de la tibolona en el modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	49
Figura 13. Expresión de los receptores de estrógenos beta y alfa en el modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	50
Figura 14. Efecto de la tibolona sobre el bloqueo del receptor de andrógenos en un modelo inflamatorio	50
Figura 15. Evaluación de la acción de los agonistas de los receptores de estrógenos DPNy PPT sobre los parámetros del modelo inflamatorio.....	51

Figura 16. Efecto de la tibolona en la expresión de enzimas antioxidantes en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	54
Figura 17. Efecto de la tibolona y agonista del RE β sobre la expresión del 8-Hidroxiguanosina en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	56
Figura 18. Efecto de la tibolona sobre la producción de nitritos bajo un daño con ácido palmítico.	57
Figura 19. Efecto de la tibolona y agonista del RE β sobre la expresión del 3-Nitrotirosina en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico.....	57
Figura 20. Expresión de 4-Hidroxyononal en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico durante 12 horas y posterior estimulación con tibolona y agonistas de los receptores de estrógenos.....	59
Figura 21. Expresión de neuroglobina en células BV-2 estimuladas con tibolona luego de ser sometidas a un daño con ácido palmítico.	61
Figura 22. Efecto de la tibolona sobre el nivel de secreción de citoquinas en células expuestas al ácido palmítico.	63
Figura 23. Efecto de la tibolona sobre la translocación de la subunidad p65 de factor de transcripción Kappa B	65
Figura 24. Efecto de la tibolona y del receptor de estrógeno beta sobre la expresión de la subunidad p65 de NF- κ B.	66
Figura 25. Efecto de la tibolona en la expresión de la subunidad p65 de NF- κ B e I κ B en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico	67

ABREVIATURAS

SNC : Sistema nervioso central

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

AMPC: Adenosin monofosfato cíclico

IGF-1: Factor de Crecimiento de tipo Insulínico-1

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

NGF: Factor de crecimiento nervioso

AG: Acidos grasos

ATP: Adenosina Trifosfato

FADH: Flavín adenín dinucleótido

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

TAG: Triacil glicerol

ADN: Ácido desoxiribunucleico

TLR: Receptores tipo toll

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-6: Interleuquina 6

IL-10: Interleuquina 10

EA: Enfermedad de Alzheimer

E2: 17 β -estradiol

NT: Neurotransmisores

BHE: Barrera hematoencefálica

MCP-1: Proteina quimiotáctica de monocitos

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

AINEs: Anti-inflamatorios no esteroideos

EP: Enfermedad de Parkinson

PGE2: Dinoprostona

PGD2: Prostaglandina D2
ERO: Especies reactivas de oxígeno
NO: Óxido Nítrico
NM: Neuromielina
IFN- γ : Interferón- γ
IL-12: Interleuquina 12
IL-4: Interleuquina 4
RE: Receptor de estrógeno
RE α : Receptor de estrógeno α
RE β : Receptor de estrógeno β
GMPC: Guanina monofosfato cíclico
GRP30: Receptor de estrógeno acoplado a proteína G
MAP: Proteína activada por mitógeno quinasa
NE: Neuroesteroide
PREG: Pregnenolona
DHEA: Dehidroepiandrosterona
ENA: Esteroides neuroactivos
STEAR: Reguladores de la actividad estrogénica tejido específica
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
MAC1: Antígeno macrófago
GFPA: Proteína glial fibrilar ácida
GC: Galactocerebrósido
PBS: Buffer fosfato salino
BSA: Albumina sérica bovina
RA: Receptor Androgenos
PPT: 4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triyl)trisfenol/
PHTPP: 4-[2-Fenyl-5,7-bis(trifluorometil)pirazol[1,5-a]pirimidina-3-yl]Fenol
DPN: 2,3-bis(4-Hidroxifenil)-propionitrilo
MPP: 1,3-Bis(4-hidroxyfenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoxy)fenol]-1H-pirazole

DMSO: Dimetil sulfóxido

MTT: 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazolio

IP: Ioduro de propidio

DHE: Dihidroetidina

DCFDA: Diclorofluoresceina diacetato

TMRM: Tetrametil rodamina éster metílico

NAO: 10-N-nonil naranja de acridina

TBS: Tampón Tris salino

SOD : Superóxido dismutasa

GPX-1: Glutación peroxidasa

ERN : Especies reactivas de nitrógeno

CoA: Coenzima A

SERM: Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos

Ngb-1: Neuroglobina

LPS: Lipopolisacárido

VDCA: Canal dependiente de voltaje

µm: Micras

RESUMEN

Un gran número de patologías y lesiones afectan el normal funcionamiento del sistema nervioso. Enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer o traumas de tipo agudo como la isquemia cerebral o la neuroinflamación representan una alta morbilidad en la población mundial. La mayoría de las lesiones alteran el correcto funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) lo que implica la modificación del microambiente neuronal y glial como respuesta al insulto. Además, la progresión de estas enfermedades son consecuencia de procesos inflamatorios exacerbados que conducen a un deterioro continuo y sistemático del tejido cerebral. Estudios recientes muestran que la obesidad está relacionada con el incremento de patologías de tipo cognitivas. Los desórdenes alimenticios y la dieta alta en grasa aumentan significativamente los niveles de ácidos grasos libres en el plasma, así como el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos. En el cerebro la activación de las células gliales (por ejemplo, la microglia) puede modular la respuesta neuroinflamatoria actuando de manera neuroprotectora o promoviendo la neurodegeneración a partir de la secreción de factores inflamatorios implicados en la pérdida neuronal.

La microglía tiene un rol crítico en la homeostasis del SNC. Ante una injuria de tipo traumático o metabólico, la microglía sufre cambios morfológicos y bioquímicos que la hacen cambiar a un fenotipo reactivo. Estos mecanismos se dan como respuesta a estímulos inflamatorios y conducen a la secreción de factores proinflamatorios que pueden afectar directamente la viabilidad celular. En este contexto, la modulación de la activación microglial puede ser considerada como una potencial estrategia neuroprotectora frente a injurias cerebrales o procesos de neurodegeneración.

Reciente evidencia demuestra que el uso de compuestos estrogénicos (esteroides neuroactivos) puede proporcionar un efecto protector que contrarresta el daño cerebral, el cual actúa regulando los procesos de activación glial. Sin embargo, el estradiol puede ejercer algunos efectos periféricos indeseables en su uso terapéutico. Por lo tanto, estudios previos recomiendan el uso de moléculas similares al estradiol para mantener los beneficios estrogénicos, pero evitando sus riesgos

colaterales. Una de esas moléculas es la tibolona, un compuesto con propiedades estrogénicas, progestogénicas y androgénicas. En este trabajo, se estudió el efecto protector de la tibolona en un modelo microglial simulando un ambiente inflamatorio metabólico con ácido palmítico. Se utilizó la línea celular BV-2 inmortalizada de cultivo primario de microglia de ratón, la cual comparte similitudes estructurales y funcionales con la microglia primaria cercanas a un 90%. Para suministrar evidencia sobre el efecto protector de la tibolona, inicialmente se determinó su acción sobre la viabilidad celular y el estrés oxidativo en células expuestas a palmitato. De igual manera, se evidenció un mejoramiento de la función mitocondrial, la cual han sido ampliamente reportada como una causa fundamental del proceso inflamatorio. Para caracterizar el mecanismo protector de la tibolona se demostró que el efecto protector estaba asociado preferencialmente al receptor de estrógeno beta, lo cual se evidenció mediante el bloqueo y activación farmacológica tanto del receptor de estrógeno alfa como del beta. Adicionalmente, se demostró que la tibolona disminuye el estrés oxidativo mediante la evaluación de enzimas y proteínas responsables de la regulación antioxidante, y de igual manera se determinó que la tibolona incrementa la expresión de neuroglobina, una proteína que ha sido ampliamente reportada en neuronas por sus efectos protectores. Al mismo tiempo, la tibolona ejerce un efecto protector sobre el componente inflamatorio, regulando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias, donde también se encontró que disminuye la translocación de la subunidad p65 del factor de transcripción NF-kB regulando el proceso inflamatorio. Los anteriores hallazgos en conjunto sugieren que la tibolona protege a la microglía estimulada con palmitato de un daño inflamatorio y que su actividad neuroprotectora puede estar asociada a proteínas como la neuroglobina y la regulación de la vía NF-kB.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema de investigación

Los desórdenes alimenticios y las dietas altas en grasas, aumentan significativamente los niveles de ácidos grasos libres en el plasma, así como el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos (Karelis et al., 2005). Las enfermedades crónicas degenerativas asociadas a la obesidad constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes en la actualidad y representan una base fisiopatológica común para muchas enfermedades (De Zwaan et al., 2002). Una dieta rica en azúcares simples y ácidos grasos saturados reduce por ejemplo la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); la presencia de valores bajos de BDNF se asocia con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Mattson, Chan, & Duan, 2002). La grasa ingerida con los alimentos presenta una doble función en el organismo, ya que a su función energética se asocia una regulación de la expresión génica que afecta al metabolismo de los lípidos, los hidratos de carbono y las proteínas, como también el crecimiento celular y a su diferenciación (Jump, 2004). Los ácidos grasos interactúan con el genoma a través de distintos mecanismos que incluyen diversos factores de transcripción (PPAR, LXR, HNF-4, NF-kappaB y SREBP), y lo hacen mediante enzimas reguladoras de vías metabólicas, como la ciclooxigenasa, la proteincinasa C o enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, catalasa o a través de cambios en la estructura de la membrana celular afectando los receptores de la proteína G o del receptor ligando de la tirosincinasa (Sampath & Ntambi, 2005).

La mayoría de lesiones y alteraciones metabólicas modifican el correcto funcionamiento del sistema nervioso central, lo que implica cambios del ambiente neuronal y glial como respuesta al insulto (Pekny & Pekna, 2014). Además, la progresión de estas enfermedades es una consecuencia de procesos inflamatorios exacerbados que conducen a un deterioro continuo y sistemático del tejido cerebral (Pedraza-Alva, Perez-Martinez, Valdez-Hernandez, Meza-Sosa, & Ando-Kuri, 2015) Estudios recientes han encontrado que la obesidad está relacionada con el incremento de patologías cognitivas, como la enfermedad de Alzheimer (Colton, 2009; Tracy, Bergqvist, Ivanova,

Jacobsen, & Iverfeldt, 2013). En el cerebro, la activación de las células microglia modulan la respuesta neuroinflamatoria en donde pueden actuar de manera neuroprotectora o por el contrario promover la neurodegeneración a partir de la secreción de factores inflamatorios implicados en la pérdida neuronal (Haversen, Danielsson, Fogelstrand, & Wiklund, 2009).

Décadas atrás fue posible caracterizar los componentes celulares responsables de la regulación y control de la inflamación en el sistema nervioso (Amor et al., 2014). El componente glial - principalmente el astrocitario- y el microglial son los principales encargados de la regulación de la inflamación (Karve, Taylor, & Crack, 2016). El mecanismo regulatorio es un proceso en extremo complejo, determinado por la transducción de señales de tipo inflamatorio y mediado por citoquinas y quimiocinas (Niu, Li, Wang, Ren, & Bai, 2016) . A pesar del gran cuerpo de evidencia acerca de los mecanismos inflamatorios, aún no está completamente claro cómo se lleva a cabo la regulación de la inflamación y como puede alterarse en eventos patológicos (Z. Wang et al., 2012). Sin embargo, la literatura (Sochocka, Diniz, & Leszek, 2016) apoya la aseveración de que la modulación de los procesos inflamatorios exacerbados puede constituir un potencial terapéutico para muchas enfermedades del sistema nervioso. Fisiológicamente, la inflamación puede ser regulada por medio de la neurotransmisión o por mensajeros intracelulares liberados por neuronas y glía (Arevalo, Santos-Galindo, Acaz-Fonseca, Azcoitia, & Garcia-Segura, 2013). Por tanto, se ha teorizado que la inflamación crónica en patologías del sistema nervioso pueda conducir a procesos de neurodegeneración en lesiones traumáticas (Ransohoff, 2016). La literatura sugiere que los esteroides neuroactivos podrían tener un rol crítico en la regulación de los procesos inflamatorios en un contexto patológico, principalmente en la función inmunomoduladora de la microglía. Los receptores de estrógenos están presentes en neuronas y células gliales como astrocitos, oligodendrocitos y en la microglia, la activación microglial puede estar presentes en diferentes patologías y promover diferentes cascadas de señalización que lleven a procesos apoptóticos, los estrógenos pueden modificar la expresión de mediadores inflamatorios (citoquinas y quimiocinas) producidos por la microglia y otras células glía que están implicados en la neuroinflamación y neurodegeneración (Nilsen & Brinton, 2004). Se ha identificado que el tratamiento con estradiol regula la expresión de receptores de estrógenos y activa receptores de membrana, además disminuye la actividad de proteasas proapoptóticas como calpaina y caspasa -3

(Sribnick, Ray, & Banik, 2006). Por tanto, la inflamación crónica del sistema nervioso puede conducir a procesos de neurodegeneración en lesiones traumáticas (Millington et al., 2014) . La literatura sugiere que los esteroides neuroactivos podrían tener un rol crítico en la regulación de los procesos inflamatorios en un contexto patológico (Giatti et al., 2015), principalmente en la función inmunomoduladora de la microglía (Lei et al., 2014).

Entre los principales efectores inmunes como los glucocorticoides, interleucinas y estrógenos, la literatura reporta que los glucocorticoides y estrógenos tienen un papel crítico en la modulación de la inflamación de tipo humoral (Goujon, Laye, Parnet, & Dantzer, 1997; Turnbull & Rivier, 1999). Otras moléculas como el factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF, el factor de crecimiento nervioso NGF entre otras, pueden disminuir los efectos perjudiciales de la inflamación mediados por el incremento de los niveles intracelulares de AMPc (McCluskey & Lampson, 2000). El mecanismo de protección está mediado por la disminución de un proceso denominado activación microglial y activación astrocitaria. De hecho, las condiciones fisiológicas impiden la activación microglial, por ejemplo, la proteína de membrana neuronal CD200 mantiene un contacto físico con su receptor CD200R presente en la microglia (Walker & Lue, 2013). Sin embargo, estos procesos no necesariamente significan que se llevarán a cabo procesos perjudiciales para el SNC. Varios estudios demuestran que la activación aguda de la microglía y los astrocitos pueden ejercer efectos neuroprotectores mediante la liberación de neurotrofinas como la IGF-1(Hasebe et al., 2013), trombospondina (Turpie et al., 2009), bFGF y NGF (Heese, Fiebich, Bauer, & Otten, 1997). Adicionalmente, la microglía es necesaria para la reorganización del tejido nervioso dañado (Shinozaki et al., 2014), y se ha observado que la actividad fagocítica de la microglia limpia restos de mielina y residuos celulares, los cuales son potentes inhibidores del crecimiento axonal (Streit, Graeber, & Kreutzberg, 1988).

En la actualidad no existen medicamentos o tratamientos que detengan por completo los procesos neurodegenerativos, e incluso, en enfermedades como el Alzheimer y Parkinson. A la fecha aún no es claro el mecanismo de respuesta a esteroides neuroactivos por parte de diferentes tipos celulares del cerebro (astrocitos, neuronas, oligodendrocitos, microglia, etc). En general, existe la necesidad de mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, además de aliviar los costos asociados tanto a los diferentes proveedores de salud y las familias que asumen gran

parte de los cuidados y del soporte económico. Considerando este panorama que impone un claro problema de investigación, este proyecto busca realizar un análisis del proceso inflamatorio a través de la evaluación del efecto neuroprotector de un esteroide sintético (tibolona) al estrés ocasionado por ácidos grasos libres, a través de la respuesta de un modelo microglial.

De acuerdo a lo anterior resulta necesario aportar evidencia experimental que permita determinar los mecanismos de acción de los neuroesteroides en la regulación de la inflamación en células microgliales. Por otro lado, el estudio busca demostrar si estos mecanismos pueden ser una fuente terapéutica para detener o atenuar procesos degenerativos o traumáticos en el sistema nervioso.

1.2 Justificación

La obesidad y el sobrepeso son factores de riesgo para diferentes enfermedades, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas (van Dijk et al., 2015). La obesidad y el sobrepeso tuvieron una prevalencia del 50% para el año 2015 en Colombia (Salud, 2015) y del 70% en los Estados Unidos. Convirtiéndose en un problema de salud pública de gran importancia para el país y el mundo. Estudios previos han reportado que personas con un índice de masa corporal alto (IMC ≥ 30) tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades como Alzheimer (Profenno, Porsteinsson, & Faraone, 2010) (Martin-Jimenez, Gaitan-Vaca, Echeverria, Gonzalez, & Barreto, 2016). La obesidad ha sido relacionada con procesos de inflamación, donde estos constituyen una probable causa de varias alteraciones a nivel celular y funcional en el cerebro (Das, 2001). Algunas alteraciones incluyen apoptosis neuronal, daños en la neurogénesis y remodelación sináptica, las cuales pueden conducir al decline de funciones cognitivas (Miller & Spencer, 2014).

Se conoce que hormonas como el estrógeno tiene efectos benéficos para el cerebro, pero tienen efectos adversos para otros tejidos como el endometrio (Wessels, Leyland, Agarwal, & Foster, 2015). Por esta razón, algunos estudios han evaluado el efecto neuroprotector de moléculas agonistas de estrógeno como la tibolona, una molécula con actividad tejido específica (Takuma, Baba, & Matsuda, 2004). Se ha evidenciado que la activación de los receptores de estrógenos

genera cambios en la expresión de algunas proteínas a través de sus efectos genómicos, las cuales pueden influir en la supervivencia celular (Katsyv et al., 2016).

Independientemente de la causa que genere el daño metabólico o lesión cerebral, procesos neurodegenerativos, baja respuesta vascular, respuesta neuronal disminuida y procesos inflamatorios determinan esta problemática, donde estas resultan en alteraciones cognitivas, psicosociales, económicas, físicas y emocionales que impactan drásticamente la vida del paciente y de sus familias, y determinando una alta discapacidad e insatisfacción en la calidad de vida para estos pacientes (Wright & Diaz, 2014).

Es importante resaltar que el impacto de esta patología ocurre no solo sobre la persona que lo sufre, sino sobre los diferentes miembros de la familia quienes en la mayoría de los casos deben asumir el cuidado del paciente, lo que requiere tiempo, dedicación y gastos económicos que afectan la calidad de vida de dichas familias y traen dificultades emocionales, físicas y económicas. Por las razones anteriormente expuestas, existe la necesidad de realizar investigación basada en la posible correlación entre la obesidad y el sobrepeso y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Eso con el objetivo de mejorar la calidad de vida de dichos pacientes y reducir los costos asociados para los diferentes proveedores de salud y las familias que actualmente asumen gran parte de los cuidados y del soporte económico.

2. MARCO TEORICO

En concordancia con el problema de investigación y justificación expuesto previamente, este proyecto busca realizar un aporte significativo en el entendimiento e identificación de blancos de interés asociados a la problemática de obesidad y sobre peso (extensivo a enfermedades neurodegenerativas que presentan patrones patofisiológicos similares), y que afectan significativamente a este tipo de pacientes. Como se puede observar en los objetivos de este proyecto se ha planteado determinar el efecto de la tibolona (esteroide neuroactivo), específicamente de la respuesta determinada por sus metabolitos que presentan actividades estrogénicas, progestogénicas y androgénicas (Formoso et al., 2016), a un insulto metabólico específico que imita o recrea diferentes escenarios biológicos de relevancia en el entendimiento de patologías asociadas a la neurodegeneración, para lo cual se propone determinar la expresión basal en microglia e identificar y evaluar proteínas expresadas durante la respuesta protectora; se ha seleccionado como modelo de estudio la microglía puesto que estos son uno de los tipos celulares que soportan fuertemente la actividad cerebral y son potenciales para el desarrollo de drogas que estimulen la neuroprotección (Beltran-Campos et al., 2015).

2.1 Metabolismo de los ácidos grasos y mecanismo celular en condición de daño

El ácido palmítico $C_{16}H_{32}O_2$, es un ácido graso saturado, se fabrica de forma natural en el cuerpo humano y constituye entre un 21-30% de los depósitos de grasa en el tejido adiposo (Kingsbury et al., 1962) (Fernandez-Quintela, Churruca, & Portillo, 2007). El ácido palmítico es el principal ácido graso saturado de la dieta y está presente en muchos alimentos comúnmente consumidos, constituyendo aproximadamente un 60% en la composición de los mismos (El Akoum, Lamontagne, Cloutier, & Tanguay, 2011). Este es el más abundante en las carnes y grasas lácteas y en los aceites vegetales como el aceite de coco y el aceite de palma y de igual manera es ácido graso menos saludable pues es el que más aumenta los niveles de colesterol en la sangre (Jacob & Grimmer, 1968), por lo que es el más aterogénico (Heo et al., 2002).

Los ácidos grasos (AG) son una fuente muy importante de obtención de energía y ATP en el mantenimiento de organismos celulares (Large, Peroni, Letexier, Ray, & Beylot, 2004) . El exceso de ácidos grasos pueden almacenarse eficientemente como tejido adiposo (Xu & Xu, 2008). Los triglicéridos proporcionan más del doble de energía con respecto a los carbohidratos o las proteínas (Miyoshi et al., 2007), pues generan más equivalentes reductores (FADH₂ y NADH) y AcetilCoa durante la beta oxidación en la mitocondria.

Los AG son fundamentales para el funcionamiento celular, son utilizados como fuentes de energía a través de la β -oxidación bajo un estricto control enzimático a nivel mitocondrial y peroxisomal (Li, Wahlqvist, & Li, 2016); además, derivados de AG participan en cascadas de señalización y generación de segundos mensajeros (Menegaut, Thomas, Lagrost, & Masson, 2016). Por otro lado, se ha descrito que pueden ser citotóxicos cuando la regulación de su metabolismo no es adecuada, con consecuencias fisiopatológicas, como la inducción de daño en diversos órganos, , desarrollando un hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (Varin et al., 2015). A nivel pancreático, disfunción de las células β ; a nivel cardiaco, pérdida de la contractilidad miocárdica con la consecuente insuficiencia cardíaca y a nivel cerebral como precursor de procesos neuroinflamatorios (Schonfeld & Reiser, 2016).

La lipotoxicidad es un fenómeno caracterizado por aumento de los AG, este aumento genera la activación de diversas vías metabólicas que provocan el desacoplamiento del metabolismo celular, con la generación de cascadas de señalización relacionadas con el inicio de los procesos de muerte celular programada de las células afectadas y finalmente la falla en la función del órgano implicado (Hauck & Bernlohr, 2016). En la obesidad, el consumo excesivo de alimentos ricos en hidratos de carbono y el aumento de la liberación excesiva de AG por parte del tejido adiposo, sobrepasa el límite de almacenamiento y la capacidad de oxidación en diferentes tejidos (Zlobine, Gopal, & Ussher, 2016). Los AG son redirigidos a vías metabólicas dañinas no oxidativas, con acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, como las especies reactivas de oxígeno ERO (Ruiz-Ramirez, Lopez-Acosta, Barrios-Maya, & El-Hafidi, 2016).

La oxidación de ácidos grasos incrementa la proporción de acetilcoenzima A/coenzima A y NADH/NAD⁺ en la mitocondria, lo cual resulta en la inactivación de la enzima piruvato deshidrogenasa (Randle, Garland, Hales, & Newsholme, 1963), esto conlleva la acumulación de

citrato y posterior inactivación de la enzima fosfofructocina. Esta inactivación conlleva a la acumulación de la glucosa-6-fosfato, que estimula la síntesis de glucógeno y la inhibición de la hexocinasa; teniendo como resultado una inhibición de la captación de glucosa (Gong, Zhang, & Xu, 2016). La gran cantidad de AG disponibles y al no ser requeridos por actividad celular, se produce una β -oxidación compensatoria, para mantener un equilibrio celular, al final cuando la oxidación compensatoria de los AG falla, los ácidos grasos son metabolizados por vías alternativas para ser degradados o incorporados a otras moléculas, donde una de ellas es la formación de TAG, pero subsecuentemente la hidrólisis generaría nuevos sustratos para las vías alternativas (Gries & Oberdisse, 1970). Las principales vías sobre las que pueden tener repercusión el exceso de ácidos grasos pueden ser, el incremento de la actividad de la Serina palmitoil transferasa que aumenta la condensación de la palmitoil coenzima A y Serina para formar dihidroesfingosina, siendo este el primer paso para la síntesis de novo de ceramida, la formación excesiva de ceramida junto con una baja expresión de la molécula antiapoptótica Bcl2 contribuyen al inicio procesos apoptóticos celulares (Unger, 2002). La acumulación de metabolitos derivados de la síntesis de ceramida y otros derivados del catabolismo de los AG desencadena una red de señalización entre el retículo endoplasmático, el núcleo celular y la mitocondria. Por ejemplo, los transductores del retículo endoplasmático son la proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1), el factor activador de la transcripción 6 (ATF6) y la proteína cinasa semejante a la PKR del retículo endoplásmico (PERK) (Puri et al., 2008). La acumulación intracelular de ácido palmítico y de ácido esteárico provoca la activación de la apoptosis vía IRE1 y PERK en humanos con esteatohepatitis no alcohólica (Henkel & Green, 2013). La mitocondria es el principal compartimento celular afectado por los ácidos grasos, donde el aumento de la β -oxidación mitocondrial, la inducción del citocromo P450 y la infiltración leucocitaria tienen como consecuencia la generación de estrés oxidativo y radicales libres de nitrógeno (Madan, Bhardwaj, Thareja, Gupta, & Saraya, 2006). Varios estudios con modelos animales de obesidad y esteatohepatitis no alcohólica, han observado un aumento en la expresión de metabolitos derivados del estrés oxidativo ocasionado por el exceso de ácidos grasos (Yesilova, Ozata, et al., 2005), así se han encontrado niveles elevados de 4-nitrotirosina, hidroxinonanal, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (marcadores de lipoperoxidación), 8-hidroxideoxiguanosina (marcador de daño al ADN) entre otros biomarcadores de estrés oxidativo (Yesilova, Yaman, et al., 2005).

Varias investigaciones han demostrado que los receptores tipo toll (TLR) son los encargados de recibir el AG, estos receptores reconocen agentes patógenos y responden activando el sistema de respuesta inmune innato (J. Y. Lee et al., 2004) (Leszek et al., 2016). En cultivos de macrófagos, el ácido láurico puede activar al receptor TLR4 y dimerizar con el TLR2 (H. Shi et al., 2006). El TLR4 también se puede activar por el ácido palmítico, desencadenando la translocación al núcleo del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y regulando la alta expresión del TNF- α y de la IL-6 (citoquinas pro inflamatorias) (D. H. Hwang, Kim, & Lee, 2016), lo que contribuye al proceso inflamatorio asociado con la obesidad (Pal et al., 2012).

Diversas investigaciones han reportado una alta relación entre las dietas altas en grasa y la pérdida de la función cognitiva en los seres humanos (Begin, Plourde, Pifferi, & Cunnane, 2010), de igual manera en pacientes diagnosticados con patologías como la obesidad y la diabetes tipo 2 (DM2) (Barnard, Bunner, & Agarwal, 2014), se ha encontrado una probabilidad mayor cercad el 50% de llegar a padecer enfermedades como la demencia y la enfermedad de Alzheimer (EA), como consecuencia del desarrollo de los procesos inflamatorios y su fuerte relación con la obesidad (Martin-Jimenez et al., 2016). El sedentarismo, la falta de actividad física y los malos hábitos alimenticios, se han catalogado como factores determinantes en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas debido a la alta respuesta inflamatoria que se presenta en el cerebro ante la presencia de estos malos hábitos (Sandu, Buga, Uzoni, Petcu, & Popa-Wagner, 2015).

Otro tipo de lesiones que alteran la función cerebral son las lesiones traumáticas cerebrales agudas, estas junto a diversas alteraciones metabólicas producen cambios en la maquinaria energética cerebral, impidiendo la reparación de tejidos y retrasando la recuperación de la funcionalidad cerebral (Peters, 2016) esto debido a la alteración transitoria de las demandas de glucosa y la presencia de altas concentraciones de ácidos grasos libres (característico de pacientes con obesidad) (J. H. Lee et al., 2016). La obesidad caracterizada por la resistencia a la insulina y la presencia de procesos neuroinflamatorios incrementan las consecuencias de las lesiones traumáticas cerebrales (Corrigan, Mander, Leonard, & Vink, 2016). Varios estudios han observado un aumento en la presencia de ácidos grasos saturados al analizar cerebros post mortem como consecuencia del padecimiento de una lesión traumática (Nasaruddin, Holscher,

Kehoe, Graham, & Green, 2016), de igual manera estudios con ratones obesos *in vivo* que se sometieron a una lesión cerebral traumática, se encontró la reducción de proteínas de vías de señalización (PI3k/Akt – MAPK) , así como la activación de células gliales (astrocitos–microglia), incrementando los procesos neuroinflamatorios (Martins, Rivers-Auty, Allan, & Lawrence, 2016); por otra parte, también se observó afectaciones sobre procesos de aprendizaje y de memoria. Todas estas alteraciones sugieren una capacidad reducida del cerebro lesionado para responder con acciones neuroprotectoras y anti-inflamatorios, por lo tanto, puede ser un factor contribuyente para la neuroinflamación (Karelina, Sarac, Freeman, Gaier, & Weil, 2016).

Ha sido bien establecido que los estrógenos desempeñan un papel esencial en la prevención de la ganancia de peso corporal (Taylor & Sullivan, 2016). Existe una fuerte relación entre el desarrollo de la obesidad, la diabetes tipo II y el síndrome metabólico con una dramática disminución en la circulación de 17 β -estradiol (E2) en mujeres post-menopáusicas (Alvarado-Garcia et al., 2015). El tratamiento con 17 β -estradiol reduce notablemente los riesgos de desarrollar alguna de estas patologías (Han et al., 2015), debido a que la acción del 17 β -estradiol sobre los receptores de estrógeno (RE) desencadena la activación de señales intracelulares que disminuyen los procesos inflamatorios (Cheng, Hung, & Chu, 2016), pero estos beneficios terapéuticos proporcionados por E2 también se han relacionado con una alta probabilidad de riesgo de algunos efectos secundarios como los son una toxicidad endocrina reproductiva (Sjogren, Morch, & Lokkegaard, 2016) y el desarrollo de cáncer de mama entre otras (Zarate, Hernandez-Valencia, Saucedo, Basurto, & Manuel-Apolinar, 2014), por lo anterior la aplicación de la terapia de reemplazo de estrógenos en mujeres post-menopáusicas ha sido muy controvertido.

2.2 Inflamación del sistema nervioso

Mediante la liberación de neurotransmisores (NT) y mensajeros intercelulares, el sistema nervioso (SN) controla y modula la fisiología de la inflamación. A través de la unión neurotransmisor-receptor de membrana, se modula la acción y función de las células inmunitarias involucradas en la inflamación (Marques-Deak, Cizza, & Sternberg, 2005). Durante el proceso inflamatorio los NT

pueden actuar como pro o anti-inflamatorios, en función de las células que activen o según el tipo de receptor de membrana celular al que se unan (Reyes-Garcia & Garcia-Tamayo, 2009) (Strle et al., 2007). La respuesta inflamatoria en el SNC se caracteriza por la activación de la microglía y astrocitos, además de una limitada invasión de células inflamatorias circulantes reguladas por la expresión de mediadores inflamatorios (Fumagalli, Perego, Pischutta, Zanier, & De Simoni, 2015). Mediadores como las citoquinas, quimiocinas y prostaglandinas, aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), facilitando la entrada de células inflamatorias circulantes, y como consecuencia se liberan moléculas potencialmente tóxicas para las neuronas cerebrales (Kaur & Ling, 2008).

Por tanto, en una lesión cerebral se aumenta la permeabilidad de la BHE y las células inflamatorias entran en contacto con los antígenos del SNC tanto en el cerebro como en la periferia (Kaur & Ling, 2008). Las células inflamatorias innatas en el sistema nervioso SNC son la microglía y los macrófagos, donde estas cumplen un rol fundamental en la recepción y propagación de señales inflamatorias. El sistema inmune y el proceso inflamatorio están ligados directamente a la pérdida neuronal que se presenta en enfermedades del SNC (Ritzel et al., 2015). De aquí parte la importancia de estudiar la inflamación en los procesos de neurodegeneración, isquemia y lesiones de tipo traumático (Cuenca-Lopez et al., 2010).

2.2.1 Ácidos grasos, neuroinflamación y neurodegeneración

Como se describió anteriormente la liberación y presencia de una gran cantidad de ácidos grasos saturados en el torrente sanguíneo pueden llegar a afectar la funcionalidad cerebral. El desarrollo de procesos inflamatorios en el sistema nervioso contribuye de manera determinante a la probabilidad de sufrir alguna enfermedad neurodegenerativa. La inflamación crónica se caracteriza por la activación microglial, así como también por la liberación prolongada de mediadores inflamatorios, que contribuyen al aumento en la producción de especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno (Singh et al., 2016). La activación microglial desregulada estimula a un mayor la liberación

de factores inflamatorios, que, junto a los niveles elevados de varias citoquinas, incrementa el ambiente neuroinflamatorio crónico, este estado se han asociado con muchos trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central tales como la degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y tauopatías (Perry, Nicoll, & Holmes, 2010).

Uno de los trastornos más comunes que afecta el sistema nervioso es la enfermedad de Alzheimer que corresponde aproximadamente al 50-60% de todas las demencias (Farlow et al., 2015). El incremento en la expectativa de vida en algunos países tiene una relación directa con el aumento de la prevalencia de esta enfermedad (Miller & Spencer, 2014). La EA esta principalmente asociada con el envejecimiento, siendo este el principal factor de riesgo en la aparición de esta patología neurodegenerativa (Ferri et al., 2005), pero se ha encontrado también una alta probabilidad en pacientes con obesidad. Múltiples investigaciones han encontrado diversos factores desencadenantes y determinantes de esta enfermedad como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, inflamación, neurotoxicidad y la gliosis reactiva (Growdon et al., 2015). La progresión de la enfermedad está directamente ligada a alteraciones en respuestas inmunes locales, un ambiente caracterizado por la inflamación y la activación de los astrocitos y la microglía (Lopategui Cabezas, Herrera Batista, & Penton Rol, 2014). La neuroinflamación está involucrada en múltiples mecanismos patológicos de la EA, se han identificado mediadores como interleuquinas, IL-1 β e IL-6, y TNF α (Factor de necrosis tumoral) asociados con Alzheimer (Luterman et al., 2000).

En el ambiente de la inflamación crónica que caracteriza la EA, la microglía y los astrocitos activados producen una gran cantidad de moléculas pro inflamatorias que han sido reportadas por estudios clínico-patológicos y de neuroimagen donde se demuestra que la inflamación, la activación microglial y el estrés oxidativo preceden al daño neuronal (Eikelenboom & van Gool, 2004) (J. U. Lee et al., 2007). Se han encontrado otros mediadores inflamatorios elevados en la EA como la Interleuquina-1 β (IL-1 β), el Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β) y la ciclooxigenasa inducible (COX-2) (Luterman et al., 2000). La mayoría de estudios y evidencias experimentales muestran que un ambiente de condiciones pro-inflamatorias promueven el

desarrollo de EA, mientras que el tratamiento anti-inflamatorio disminuye la progresión de la EA (Broe et al., 2000) (Melton et al., 2003).

Principalmente la microglía activada y los astrocitos secretan factores proinflamatorios, al igual que las neuronas pueden secretar citoquinas en forma constitutiva, cuando los mecanismos de regulación inflamatoria de las neuronas y astrocitos se puede incrementar el daño en el SN (Wu et al., 2004) . La inflamación puede actuar como neuroprotectora en sus etapas tempranas, pero puede llegar a tener efectos crónicos si no se controla el estímulo responsable de la inflamación generando una sobre activación microglial que incrementa la liberación de citoquinas (Wyss-Coray et al., 2002). Por ejemplo, las placas amiloideas están rodeadas por la glía que secreta moléculas pro inflamatorias incluyendo Factor de Necrosis Tumoral- α , (TNF- α), IL-1 β , MCP-1, estas moléculas aumentan la sensibilidad neuronal a los radicales libres que pueden llegar a potenciar la neurodegeneración (Combs, Bates, Karlo, & Landreth, 2001). Otro factor que incrementa la neuroinflamación es el aumento en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual puede estar incrementada en la EA (Luth, Munch, & Arendt, 2002). A partir del el rol crítico que tiene la inflamación en el daño neuronal, el tratamiento con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) (McGeer, Rogers, & McGeer, 2006) así como también el tratamiento con estrógenos han sido ampliamente reportados que disminuyen significativamente el riesgo de desarrollar esta enfermedad, principalmente con la suplementación con esteroides (Bruce-Keller et al., 2000) que actúan a partir del bajo nivel de estrógenos que se ha encontrado en pacientes con obesidad (Large et al., 2004) caracterizados por el incrementa la presencia de ácidos grasos libres promoviendo el estado inflamatorio (Zlobine et al., 2016) (Henkel & Green, 2013).

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer. Afecta 1- 2% de la población general alrededor de los 65 años de edad (Wilms et al., 2007). Uno de los marcadores de la neurodegeneración en la EP es la acumulación anormal de la proteína α -sinucleína en las neuronas, lo que desencadena la activación de las células gliales y la progresión de la inflamación (Dehay et al., 2015). De hecho, se ha observado microglía reactiva en la sustancia negra en los pacientes con EP, lo que indica que este proceso inflamatorio podría agravar la neurodegeneración (Anitua, Pascual, Perez-Gonzalez, Orive, & Carro, 2015). Por lo tanto, la microglía activa, y también los astrocitos reactivos en menor

medida, se encuentran asociados con la pérdida de células neuronales. Esto se debe a la liberación de factores nocivos como las citoquinas pro-inflamatorias que incluyen el TNF- α , IL-1 β e IL-6, las prostaglandinas (PGE2, PGD2), las especies reactivas de oxígeno (ERO) y el Óxido Nítrico (NO) (Teismann & Schulz, 2004). Sin embargo, el análisis de la pérdida neuronal en pacientes con EP demuestra que dicha pérdida es un proceso heterogéneo, puesto que las neuronas que contienen neuromelanina (NM) están predominantemente más implicadas (Wilms et al., 2003). Debido a que la NM humana activa el factor de transcripción factor nuclear kappa B (NF-kappaB) a través de la fosforilación y la degradación de la proteína inhibidora kappaB (IkappaB). Esto da lugar a un incremento de moléculas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 y NO que desencadenan procesos neuroinflamatorios. La NM tiene un rol crítico en la activación microglial, que conduce a un círculo vicioso de la muerte neuronal (Zecca et al., 2008).

2.2.2 Rol de la microglía en el proceso inflamatorio

La activación de la microglía y astrocitos al igual que la expresión de mediadores inflamatorios son las acciones que caracterizan la respuesta inflamatoria en el SNC. La microglía activada produce citoquinas, quimiocinas y prostaglandinas, mediadores inflamatorios que regulan la adhesión e incrementan la permeabilidad de la BHE, lo que no solo contribuye en la invasión de células inflamatorias circulantes, pero también a su vez secretan moléculas que afectan la viabilidad de las neuronas cerebrales (Kaur & Ling, 2008). Por ejemplo la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón- γ (IFN- γ), activan la proliferación, aumentan la adhesión celular, producen radicales libres y citotoxicidad que afectan directamente los tejidos cercanos (Drew, Chavis, & Bhatt, 2003).

El efecto de las citoquinas liberadas sobre la viabilidad neuronal y glial después de la lesión cerebral, está determinado por la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-12). que contribuyen a la neurodegeneración (Lanussa et al., 2016). Por el contrario las citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, NGF, IGF-1) favorecen la supervivencia neuronal (Slepko & Levi, 1996).

Las enfermedades neurodegenerativas son consecuencia, tanto de la inflamación de células residentes en el cerebro como de la infiltración de leucocitos desde la periferia (Kurkowska-Jastrzebska, Wronska, Kohutnicka, Czlonkowski, & Czlonkowska, 1999), lo que supone que la microglía está implicada en procesos críticos del insulto y existe una relación directa entre el proceso inflamatorio y las patologías neuronales. Por lo tanto, la microglía puede tener roles tanto benéficos como perjudiciales, dependiendo de varios factores que van desde el inicio de la injuria, la progresión y un estado crónico de la enfermedad.

2.3 Estrógenos

Los estrógenos cumplen una función vital en la fisiología reproductiva tanto femenina como masculina, estimulando el crecimiento y diferenciación celular en varios tejidos como lo son mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo y próstata (Korach, 1994). Se ha demostrado que los estrógenos son de gran importancia en la fisiología cardiovascular como por ejemplo el riesgo de enfermedad cardiovascular es menor en mujeres antes de la menopausia que en hombres (Windler, Zyriax, Eidenmuller, & Boeing, 2007). Después de la menopausia los niveles de 17β -estradiol- (E2), el estrógeno que predomina en la circulación antes de la menopausia, disminuyen al nivel que se encuentra en los hombres de edad similar y a veces puede ser hasta menor (Castello-Porcar & Martinez-Jabaloyas, 2016). Los estrógenos son requeridos para el crecimiento y diferenciación neuronal y se sabe que están relacionados a funciones cognitivas y del estado de ánimo. Además, estudios prospectivos han demostrado que los estrógenos pueden ser útiles en la prevención o retardo en la aparición de las enfermedades degenerativas del sistema nervioso como en la enfermedad de Alzheimer (Yi, Bao, Tang, Fan, & Xu, 2016).

2.3.1 Receptores de Estrógeno

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la súper familia de receptores nucleares, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroideas, el receptor de la

vitamina D, retinoides, hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos. El receptor de estrógeno fue identificado hace aproximadamente 40 años, cuando en 1962 Jensen et al describieron la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de ratas. Se conocen actualmente dos isoformas, el RE alfa (RE α) y el RE beta (RE β) (Brzozowski et al., 1997). Los RE presentan una localización subcelular diversa en citoplasma (Welsh et al., 2012), núcleo (Htun, Holth, Walker, Davie, & Hager, 1999) , mitocondria y retículo endoplasmático (Govind & Thampan, 2003). Ambos receptores poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción. La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el receptor esteroideo, es activado al unir el ligando, en este caso el E2, y actúa como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de ciertos genes, de ahí el nombre de receptores nucleares, ya que ejercen su acción a nivel del núcleo, y este modo de acción de los esteroides ha sido denominado *genómico* (Lieberman, 1997). La transcripción estimulada por el RE es finalmente regulada dependiendo del tejido donde ocurre. Además de su respuesta canónica, el estrógeno puede inducir efectos de forma rápida e independiente de mecanismos genómicos (Diep, Ahrendt, & Lange, 2016). El modo de acción *no genómico* del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es un proceso rápido y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario, siendo por esta razón mediado por un receptor localizado en la membrana (Borahay et al., 2016). Entre estos efectos rápidos se encuentran flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas kinasas asociadas a la membrana (Tabarestani, Motallebi, & Akbari, 2016). En 1967 se describió por primera vez la idea de que el estrógeno podía inducir efectos por mecanismos no genómicos, al demostrar el aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP) *in vivo*, después del tratamiento con estradiol (Nakamura, Kusakabe, Swanson, & Young, 2016; Szego & Davis, 1967). Posteriormente, se demostró que el estradiol aumentaba la concentración intracelular de Ca²⁺ inducida por glucosa y GMP cíclico (GMPc) en células beta del páncreas (Audy, Vacher, & Duly, 1996).

Varios estudios han reportado que un receptor un acoplado a proteína G era activado por estradiol, este receptor fue llamado GPR30 y se demostró que podía activar la vía de proteína activada por mitógeno quinasa (MAP) (Lei et al., 2016). Dependiendo el contexto celular GPR30 puede mediar

respuestas proliferativas y de supervivencia (Huang et al., 2015). Por otro lado, GPR30 también participa modulando respuestas no-genómicas del estradiol (Pupo, Maggiolini, & Musti, 2016). El mecanismo de acción del receptor GPR30 aún no están del todo claros; sin embargo se ha reportado que también es blanco de moléculas como el tamoxifeno, y que su función también estaría relacionada con el sistema cardiovascular (Catalano et al., 2014).

2.4. Neuroesteroides y esteroides neuroactivos

A principios de los años 80 Baulieu, utilizó el termino Neuroesteroides (NE) para hacer referencia a un conjunto de esteroides que presentaban unas concentraciones más altas en cerebro y no tenían relación alguna con secreciones periféricas, sugiriendo una probable síntesis de estos en el cerebro (Baulieu, Robel, & Schumacher, 2001). Se han encontrado en diferentes estudios, enzimas responsables de la esteroidogénesis en el sistema nervioso. Estas enzimas son responsables de sintetizar esteroides a partir del colesterol como también de metabolizar los que llegan al sistema nervioso por medio del torrente sanguíneo (Arevalo, Azcoitia, & Garcia-Segura, 2015).

El citocromo P450_{scc} actúa sobre los esteroides neuroactivos y los NE sintetizados a partir del colesterol convirtiéndolos en pregnenolona (PREG), de la que derivan la dehidroepiandrosterona (DHEA) y todas las hormonas esteroides conocidas (Strauss, Christenson, Devoto, & Martinez, 2000). El mecanismo clásico de acción de las hormonas sexuales en el sistema nervioso es a través de la interacción con los receptores de estrógeno alfa y beta, el receptor de andrógenos y el receptor de progesterona (Barreto et al., 2009). Estos esteroides actúan sobre las neuronas, las sinapsis y las células gliales, regulando la supervivencia, diferenciación y conectividad de grupos neuronales específicos, tanto en el cerebro, como en la médula espinal (Baulieu & Robel, 1995). De igual manera los NE tienen funciones muy importantes durante el desarrollo prenatal del SNC y en la etapa adulta regulan respuestas conductuales y neuroendocrinas (Garcia-Segura, Naftolin, Hutchison, Azcoitia, & Chowen, 1999). Los NE son considerados una nueva clase de neuromoduladores que afectan la excitabilidad neuronal, teniendo en cuenta la función sobre los receptores de membrana y a la regulación en la expresión génica a través de receptores intracelulares (Wolf et al., 2015). A nivel comportamental, estos receptores están involucrados con

procesos de aprendizaje y la memoria, la respuesta al estrés, la depresión, la inflamación y la neuroprotección (Maurice, Urani, Phan, & Romieu, 2001).

Las moléculas que tienen efecto sobre el SNC y que tienen síntesis exógena son denominadas esteroides neuroactivos (ENA) (Dubrovsky, 2006). Estudios recientes encontraron que alteraciones periféricas de ENA repercuten en el contenido de NE en el cerebro (Reddy, 2016). Debido a que los NE y ENA intervienen en procesos comportamentales, algunos estudios han demostrado sus efectos terapéuticos en condiciones como el desorden de pánico, depresión, epilepsia y ansiedad entre otros (Rogawski, Loya, Reddy, Zolkowska, & Lossin, 2013).

De igual forma los NE y los ENA presentan propiedades neuroprotectoras, las cuales todavía no se tiene un mecanismo completamente claro. Los NE y los ENA ejercen efectos diversos en las células del SNC (Biagini, Marinelli, Panuccio, Puia, & Avoli, 2012). Por ejemplo, se han demostrado efectos protectores de los NE y ENA en neuronas, astrocitos (Kim, Lee, & Koh, 2012) y microglia (Lanussa et al., 2016). Estas moléculas pueden modular la función de las espinas dendríticas en neuronas (Srivastava, 2012), incrementar la viabilidad neuronal en células bajo daño y ejercer un efecto antioxidante (Avila Rodriguez et al., 2014). En células gliales los NE y los ENA incrementan la síntesis de moléculas antioxidantes (S. Wang et al., 2015), favorecen la función mitocondrial (Arnold, Victor, & Beyer, 2012), modulan la secreción y señalización asociada a factores de crecimiento (Cardona-Gomez, Mendez, DonCarlos, Azcoitia, & Garcia-Segura, 2001), y promueven la síntesis de moléculas promotoras de supervivencia como Bcl-2 (Perillo, Sasso, Abbondanza, & Palumbo, 2000). En microglia se ha demostrado que los NE y los ENA modulan la secreción y síntesis de citoquinas anti y pro-inflamatorias (Lanussa et al., 2016).

2.4.1 Rol de los compuestos estrogénicos en la inflamación

Algunos neuroesteroides como la DHEA *in vitro* modulan la activación microglial y la respuesta inmunológica (M. J. Wang, Huang, Chen, Kuo, & Jeng, 2001). De igual forma la viabilidad celular de las células microgliales estuvo condicionada por la cantidad de glucosa en el medio (Yang, Jeng,

Ho, Chou, & Hu, 2000). En experimentos *in vivo*, los NE inhibieron algunas moléculas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral TNF- α e INF γ en astrocitos y microglía (Barger, Chavis, & Drew, 2000). Por el contrario, la progesterona (PROG) no inhibe las respuestas inmunes de la microglía (Bruce-Keller et al., 2000), pero impide los cambios morfológicos que caracterizan el fenotipo activado de la microglía (Fujita et al., 1996). Adicionalmente, otros estudios reportaron que el tratamiento con PROG no tienen efectos anti-inflamatorios sobre cultivos mixtos de astrocitos y microglía, pero en cultivos separados inhibe la proliferación microglial (Ganter, Northoff, Mannel, & Gebicke-Harter, 1992).

Los esteroides tanto centrales como periféricos participan en la activación y protección del cerebro más aun durante el proceso de envejecimiento y después de una lesión (Barreto et al., 2009). Las acciones neuroprotectoras de los esteroides han sido reportados en varios estudios, en los que se muestra que estos compuestos tiene una gran afinidad específica a sus receptores nucleares y median varias funciones de protección, entre las cuales se encuentran el aumento en los niveles de factores anti-apoptóticos y la disminución en la expresión de mediadores inflamatorios (Perry et al., 2010). Los neuroesteroides (pregnenolona y dehidroepiandrosterona) son conocidos por promover la supervivencia y diferenciación de células neuronales cultivadas a partir de cerebro de rata embrionario (Schumacher et al., 2003). De hecho, el estradiol se ha utilizado en la microglia para modular la producción de citoquinas tales como IL-1, IL-6 y TNF- α controlando su activación y mejorando la supervivencia celular después de la exposición a lipopolisacárido (Tapia-Gonzalez, Carrero, Pernia, Garcia-Segura, & Diz-Chaves, 2008). El mecanismo clásico de acción de la hormona esteroide en el cerebro es a través de la interacción con sus receptores intracelulares tales como el estrógeno, la progesterona y receptores de andrógenos (Barreto, Veiga, Azcoitia, Garcia-Segura, & Garcia-Ovejero, 2007) (Stein, 2008). Estos receptores están expresados en los astrocitos y microglia, lo que sugiere que la glía puede mediar parcialmente la acción de compuestos estrogénicos en el cerebro (Arevalo, Diz-Chaves, Santos-Galindo, Bellini, & Garcia-Segura, 2012). La respuesta producida por cada receptor estimula la supervivencia celular, la diferenciación y la conectividad de las neuronas y células gliales en el cerebro, incluyendo la médula (Tabarestani et al., 2016). Además, los neuroesteroides tienen una función importante en el desarrollo del SNC prenatal, mientras regulan el comportamiento y la señalización neuroendocrina en el cerebro adulto

(Garcia-Segura et al., 1999). Aunque muchas de las vías de señalización activada por los estrógenos son conocidos, los mecanismos moleculares inflamatorios no están completamente aclaradas (Petroni, Simpkins, & Barr, 2014).

2.5 Tibolona, un esteroide neuroactivo y regulador de la actividad estrogénica

Existe una familia de fármacos con actividad estrogénica que son los reguladores de la actividad estrogénica tejido específica o STEAR (Kloosterboer, 2004a). La molécula más representativa de esta familia de fármacos es la tibolona (Reed & Kloosterboer, 2004). La tibolona puede considerarse un esteroide sintético con actividad estrogénica, progestogénica y androgénica (Steckelbroeck, Jin, Oyesanmi, Kloosterboer, & Penning, 2004). La tibolona es prescrita para el tratamiento de síntomas climatéricos en mujeres post-menopáusicas (Radowicki, Arsoba, & Dubrawski, 1988).

La tibolona está identificada como un esteroide sintético con propiedades y modo de acción combinado, es decir que este tiene acción androgénica, progestogénica y estrogénica; sin embargo, este compuesto presenta una configuración 3-Keto- δ^5 -10, un sustituyente 7α -metilo y un grupo 17α -etinil que per se no permite explicar sus efectos combinados en diferentes tejidos, entre estos en vagina, huesos y cerebro (Reed & Kloosterboer, 2004). Adicionalmente, este compuesto imita la actividad del estrógeno a pesar que no presenta en su estructura ni un anillo aromático ni el sustituyente 3-OH, necesarios para actuar como agonista en receptores de estrógeno (Eikelenboom & van Gool, 2004), y su actividad similar al estrógeno se debe a los grupos hidróxilo e isómero metabolitos.

Este esteroide es rápidamente metabolizado en el organismo en tres diferentes metabolitos: a) 3α - y b) 3β -OH-tibolona (metabolizado por las enzimas $3\alpha/\beta$ hidroxio-esteroide deshidrogenasa – HSD, respectivamente), y c) δ^4 -tibolona (también denominado δ^4 -isomero y metabolizado por la enzima 3β -HSD-isomerasa) (Eikelenboom & van Gool, 2004), los cuales permiten explicar la actividad combinada de la tibolona; específicamente, evidencia clínica ha indicado que los metabolitos 3α - y 3β -OH-tibolona son responsables de la actividad estrogénica mientras que la δ^4 -tibolona está

asociada a la actividad progestogénica y androgénica (determinado por su capacidad de interactuar con los receptores de andrógenos y progestágenos) (Kloosterboer, 2004b). De otra parte, similar a una de las formas predominantes de estrógeno (estradiol), la tibolona es metabolizada a formas estrogénicas débiles sulfatadas que sirven como fuente de enzimas tipo sulfatasas para la producción permanente de metabolitos estrogénicos en diferentes tejidos (de Gooyer et al., 2001).

La tibolona y sus metabolitos presentan diferentes tipos de actividad (progestogénica, androgénica y estrogénica) en diferentes tipos de tejidos (hígado, huesos, tejido mamario, cerebro, entre otros) modulada selectivamente de acuerdo a los receptores con los que interactúe (Colombo et al., 2008),

Estudios donde se utilizó un compuesto estrogénico (17β -estradiol) bajo un modelo de isquemia cerebral en ratón, se demostró que la activación del receptor de estrógeno beta es neuroprotectora contra dicho daño (Carswell, Macrae, Gallagher, Harrop, & Horsburgh, 2004). Similar a este trabajo, bajo un modelo de esclerosis múltiple evaluaron los efectos neuroprotectores del estradiol y un ligando del receptor de estrógeno alfa y en ausencia de efectos anti-inflamatorios, encontraron que tratamientos basados en el receptor beta potencialmente permitirían desarrollar estrategias neuroprotectoras para diferentes EN, mientras que el uso de ligandos de los receptores alfa deben ser restringida debido a efectos colaterales en seno y útero (Tiwari-Woodruff, Morales, Lee, & Voskuhl, 2007). Sin embargo, otros estudios reportan neuroprotección mediada por el receptor alfa, resultado que se obtiene a través de la señalización mediada exclusivamente por astrocitos (Spence & Voskuhl, 2012) .

No solo la actividad estrogénica ha sido estudiada en modelos animales para enfermedades neurodegenerativas por su potencial neuroprotector, sino también progestágenos y andrógenos exhiben este tipo de efectos. En el caso de progestágenos, se ha reportado en astrocitos que su síntesis puede ser inducida directamente por el estrógeno (Sinchak et al., 2003) lo cual demuestra no solo la importancia del estrógeno sino también la acción combinada de este con otros esteroides. La actividad progestogénica de la tibolona resulta de gran interés dado que se ha reportado efectos protectores mediados por progesterona (pre y post-insulto) en diferentes modelos que imitan condiciones fisiopatológicas de enfermedades neurodegenerativas importantes, insultos oxidativos por citotoxicidad con glutamato, privación de glucosa, entre otras (Herzog, Zendedel, Lammerding, Beyer, & Slowik, 2016). A nivel del SNC, áreas o regiones como hipocampo, corteza cerebral,

médula espinal y nervio ciático exhiben este efecto protector (Yousuf, Atif, Sayeed, Wang, & Stein, 2016).

2.5.1 Regulación estrogénica de la inflamación

El efecto de los estrógenos sobre los diversos tejidos donde presenta alguna actividad está asociado a la regulación del crecimiento, diferenciación y metabolismo celular (Russo et al., 2016). Esta actividad estrogénica se encuentra principalmente determinada por la acción de los receptores de estrógenos, que desencadenan la activación de diversos factores de transcripción que intervienen en la expresión de un gran número de genes (Yasrebi, Rivera, Krumm, Yang, & Roepke, 2016). Se estima que 17 mil genes están relacionados con la respuesta estrogénica y que alrededor de 660 están implicados en la regulación estrogénica (Welboren, Stunnenberg, Sweep, & Span, 2007). Un gran número de investigaciones han encontrado una asociación directa entre la respuesta estrogénica y la neuroprotección de procesos patológicos presentes en enfermedades neurodegenerativas, por lo que sus mecanismos de acción son cada vez más estudiados y se perfilan como potenciales moléculas terapéuticas (Yi et al., 2016) (Engler-Chiurazzi, Brown, Povroznik, & Simpkins, 2016).

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas están caracterizadas por el desarrollo de un ambiente cerebral inflamatorio como consecuencias de lesiones o daños metabólicos (Corrigan et al., 2016). Una de las principales acciones de la respuesta estrogénica está dirigida hacia la regulación de estos procesos inflamatorios (Beltran-Campos et al., 2015), donde múltiples investigaciones han reportado el papel protector del estradiol en diversos modelos experimentales, disminuyendo la expresión de varios componentes inflamatorios (Lieberman, 1997). La inflamación en el sistema nervioso puede desencadenarse por condiciones como el estrés oxidativo, endotoxinas, secreción de citoquinas, lesión mecánica y patologías crónicas neurodegenerativas (Amor et al., 2014). Esta inflamación puede ser de tipo aguda o crónica, y el componente celular del sistema nervioso como la microglia o la astrogliia pueden responder a la actividad estrogénica modulando estos procesos inflamatorios (Lanussa et al., 2016).

En pacientes en condiciones de obesidad, se ha reportado una disminución significativa en los niveles plasmáticos de estrógenos, donde los bajos niveles de estos junto con el incremento de los

ácidos grasos libres saturados y la infiltración de agentes pro-inflamatorios son el escenario ideal para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Crespi, Bottai, & Santarpia, 2016) (Bessesen et al., 2015). Se ha establecido como los estrógenos desempeñan un papel fundamental en la prevención de la obesidad (Engler-Chiurazzi et al., 2016). Por ejemplo, ratones hembras presentaron un aumento de peso y una hiperadiposidad después de ser sometidas a una ovariectomía en la que se eliminaron los estrógenos endógenos, y el tratamiento de suplementación con estradiol redujo el desarrollo de este fenotipo obeso (Yasrebi et al., 2016). Estos efectos estrogénicos sobre la homeostasis del peso corporal están mediados fundamentalmente por la activación de los receptores de estrógenos (Ponnusamy et al., 2016). Los seres humanos o ratones con mutaciones en el gen RE (ESR1) son obesos (Shahed, Simmons, Featherstone, & Young, 2015); de igual manera se encontró que la terapia con estradiol no presentó ningún efecto en ratones sometidos a una supresión de los RE (Z. F. Wang, Pan, Xu, & Li, 2016).

Dentro de la respuesta estrogénica asociado a los procesos inflamatorios se ha encontrado que tiene la capacidad de disminuir la secreción de moléculas inflamatorias y reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (Said & Bosland, 2016). En ese sentido, se reportó que este mecanismo estaba asociado a la respuesta de receptores de estrógenos a través de la activación de la vía inflamatoria NFκB (Deshpande, Khalili, Pergolizzi, Michael, & Chang, 1997) (Mak, Li, Samanta, & Mercurio, 2015), como también a la expresión y modificación de algunas proteínas como la neuroglobina (Avila-Rodriguez et al., 2016). La neuroglobina es una proteína globina monomérica de cerca 150 aminoácidos (Ascenzi et al., 2016). Tiene la capacidad de transportar y almacenar oxígeno gracias al grupo hemo que contiene (Zhang et al., 2016). Ha sido identificada en células glía en los últimos años, teniendo en cuenta que solo estaba reportada su presencia en neuronas.

Esta proteína se ha estudiado en diferentes modelos de daño como la isquemia cerebral focal, toxicidad mediada por el péptido β-amiloide, anoxia y privación de glucosa y oxígeno en donde se han identificado sus efectos neuroprotectores, pero su mecanismo molecular de acción no es muy claro (Fan et al., 2016) (Amri, Ghouili, Amri, Carrier, & Masmoudi-Kouki, 2016). Diversas investigaciones han encontrado que los estrógenos y andrógenos pueden regular la expresión de la neuroglobina, por lo que la modulación de esta proteína a partir de la actividad estrogénica (Toro-

Urrego, Garcia-Segura, Echeverria, & Barreto, 2016) podría ser en parte la responsable de los efectos protectores de los estrógenos en modelos caracterizados por un aumento en el estrés oxidativo (Baez et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Investigar el efecto de la tibolona mediante la caracterización de los elementos que intervienen en el mecanismo de acción en células microgliales bajo un modelo inflamatorio de ácido palmítico

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Evaluar el efecto de la tibolona sobre la viabilidad celular, la producción de especies reactivas de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial y masa mitocondrial en el modelo inflamatorio de microglia estimulado con ácido palmítico

3.2.2. Investigar si la acción de la tibolona sobre la microglia tratada con el ácido palmítico es dependiente de los receptores de estrógenos o andrógenos

3.2.3. Determinar el efecto de la tibolona sobre la expresión de proteínas inflamatorias en la microglía sometida a un daño con ácido palmítico.

4. METODOLOGÍA

Se presentan todos los métodos experimentales desarrollados durante el estudio para tener una idea clara de cómo se realizó cada experimento.

4.1. MÉTODOS EXPERIMENTALES

4.1.1. Línea Celular

En este estudio fue utilizada la línea celular BV-2 (ATCC TIB-71) como un sistema de modelo celular microglial. La línea BV-2 ha sido utilizada en numerosos estudios y se ha demostrado que comparte similitudes estructurales y funcionales con la microglia primaria (Z. Wang et al., 2012). Las células se mantuvieron bajo crecimiento exponencial en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 RPMI (Lonza, Walkersville, EE.UU.), que contenía 10% de suero bovino fetal (Lonza, Walkersville, EE.UU.), y penicilina 10 U/ estreptomycin 10 mg / anfotericina 25 ng (Lonza, Walkersville, EE. UU). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de dióxido de carbono. El medio se cambió tres veces por semana.

La línea BV-2 es una línea celular de ratón con morfología de macrófago derivada de neonatales murinos, y se generó mediante la infección de cultivos de células microgliales primarias con un v-raf / v-myc retrovirus oncogénicos. Las células BV-2 expresan una actividad esterasa no específica, la capacidad de fagocitosis y una baja de la peroxidasa. Las células secretan lisozima y después de la estimulación adecuada, también la IL-1 y TNF α . Fenotípicamente, las células BV-2 resultaron positivos para los antígenos MAC1 y MAC2, y negativo para MAC3, la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y antígenos galactocerebrósido (GC). La línea BV-2 conserva la mayor parte de las propiedades morfológicas, fenotípicas y funcionales descritos para células microgliales recién aisladas. (Blasi, Barluzzi, Bocchini, Mazzolla, & Bistoni, 1990).

4.1.2 Modelo de estimulación con ácido palmítico

Una vez terminados los protocolos de incubación en placas de múltiples pozos, las células se lavaron 2 veces con una solución tampón fosfato salino (PBS 1X) que contenía en mM: NaCl, 116; KCl, 1,8; Na₂HPO₄, 1; KH₂PO₄, 14,7, la solución fue ajustada a pH 7,4. Posteriormente, para la estimulación del modelo inflamatorio se utilizó un insulto metabólico con ácido grasos que consistió en la preparación de una solución de ácido palmítico 5mM que contenía: Acido palmítico (Sigma-Aldrich, P5585) en etanol 200 mM, albumina sérica bovina 30 % (BSA) (Sigma- Aldrich A2153) además de medio de cultivo sin suero. Para la solución de trabajo se adicionó L-carnitina (Sigma-Aldrich C0283) 2 Mm, se llevaron a la incubadora durante el tiempo establecido en el protocolo experimental. Como tratamiento de control se utilizó la misma solución libre de ácido palmítico.

4.1.3 Tratamientos farmacológicos

Una vez que las células se sembraron en placas de múltiples pozos, el medio de cultivo fue reemplazado con RPMI libre de suero fetal bovino (Lonza, Walkersville, EE.UU.) con el objeto de disminuir la estimulación trófica que pudiera afectar los resultados del estudio. En el mismo sentido las condiciones de daño metabólico (insulto con palmitato) tampoco contaron con suplementación de suero. Las concentraciones de la tibolona, agonistas y antagonistas de los RE y antagonista de receptor de andrógenos (RA) flutamida se estandarizaron previamente mediante ensayos de dosis respuesta. Estos ensayos estuvieron fundamentados en estudios relacionados en los cuales se utilizaron cada una de las moléculas de interés (Kloosterboer 2001, Barreto, White et al. 2011, Guo, Duckles et al. 2012, Pinto-Almazán, Calzada-Mendoza et al. 2012, De Marinis, Acaz-Fonseca et al. 2013, Acaz-Fonseca, Sanchez-Gonzalez et al. 2014, Pinto-Almazan, Rivas-Arancibia et al. 2014, Arevalo, Azcoitia et al. 2015). Doce horas después del insulto con palmitato se incubaron las células de acuerdo al protocolo experimental con: a) Tibolona (Sigma-Aldrich, T0827) Se realizó una curva dosis respuesta para determinar el tiempo y la concentración optima; b) Concentraciones desde 10 nM-10µM 1,3,5-Tris (4-hidroxifenil) -4-propil-1H-pirazol (PPT) (agonista ERα; Sigma-Aldrich, H6036); o iv) Concentraciones desde 10 nM-10µM 2,3-Bis (4-

hidroxifenil) propionitrilo (DPN) (agonista ER β ; Sigma-Aldrich, H5915). Además, 3 o 6 horas antes de la incubación con tibolona, PPT o DPN, algunos cultivos se trataron con 100 nM de 1,3-Bis (4- hidroxifenil) -4-metil-5- [4- (2-piperidinil etoxi) fenil] dihidrocloruro-1H-pirazol (MPP) (antagonista de ER α , Tocris BioScience, Bristol, Reino Unido) o 100 nM 4- [2-fenil-5,7-bis (trifluorometil) pirazol [1,5-a] pirimidin 3-il] fenol (PHTPP) (antagonista ER β ; Tocris BioScience, Bristol, Reino Unido catago- 2662).

La dilución patrón de tibolona 5mM preparada en dimetil sulfóxido (DMSO) se disolvió en medio RPMI sin rojo fenol y el porcentaje de DMSO no superó el 0.01% en las diferentes diluciones. Los compuestos PPT, DPN, MPP y PHTPP se disolvieron en una concentración de trabajo de 10 mM en DMSO y luego a una concentración final en medio RPMI sin rojo fenol. Con el fin de evitar posibles variaciones relacionadas con las concentraciones, la tibolona, agonistas y antagonistas fueron estandarizados previamente (dosis-respuesta óptima).

4.1.4. Determinación de parámetros en el modelo

4.1.4.1. Viabilidad y la fragmentación nuclear

La viabilidad fue determinada mediante la técnica de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.) y de Ioduro de propidio (IP) (Sigma-aldrich). Para las determinaciones de viabilidad mediante MTT, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medio de cultivo RPMI que contenía 10% de suero fetal bovino a densidad de siembra de 10.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, las células se trataron de acuerdo a diferentes paradigmas experimentales (tiempos y concentraciones). La viabilidad se evaluó después de los tratamientos farmacológicos mediante la adición de solución de MTT a la concentración final de 5 mg/ml, durante 4 horas a 37 °C. Luego, las células se lisaron mediante la adición de dimetil sulfóxido DMSO. El producto de formazan azul se evaluó en un lector de placas a 595 nm (espectofotómetro). Luego los valores se normalizaron al valor de los cultivos de control sin palmitato, que fue considerado como una supervivencia del 100%. Cada ensayo se realizó con un mínimo de tres repeticiones por experimento.

Para la determinación de la viabilidad por IP, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos en medio de cultivo RPMI que contenía suero fetal bovino al 10% en densidad de siembra de 40.000 células por pocillo, se incubaron durante 24 h hasta que alcanzan la confluencia. A continuación, las células se sometieron a los respectivos tratamientos y protocolos experimentales. Posteriormente, se lavaron las células en PBS y se separaron con tripsina (tripsina / EDTA 500 mg / L: 200 mg / l; Lonza, Walkersville, EE.UU.). A continuación, las células se tiñeron con IP disuelto en PBS a una concentración final de 10 µg/ml durante 15 minutos. Posteriormente las células PI positivas fueron cuantificadas mediante citometría de flujo (citómetro Guava EasyCyte™ Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) o mediante microscopía de fluorescencia. Cada ensayo se realizó con un mínimo de 3 réplicas para cada condición.

La fragmentación y condensación nuclear se determinaron mediante tinción Hoechst 33258. Después de la exposición al palmitato y diferentes paradigmas experimentales, las células se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato PBS 1X y se fijaron durante 20 minutos en una solución de PBS al 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron y se marcaron con Hoechst 33258 (5 mg/ml; Invitrogen) durante 15 minutos. Se observaron los núcleos celulares y se fotografiaron usando un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-53. Se determinó el número de núcleos fragmentados y condensados en al menos ocho áreas seleccionadas al azar de cada grupo experimental. Los datos se expresaron como un porcentaje de núcleos fragmentados y condensados en relación al número total de células.

4.1.4.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Evaluación radical superóxido

La producción de especies reactivas del oxígeno se evaluó por citometría de flujo. Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio de cultivo RPMI que contenía 10% de SFB y luego fueron tratados de acuerdo a cada paradigma experimental al día siguiente. Una vez concluidos los tratamientos, las células fueron tratadas en la oscuridad durante 30 minutos a 37 °C con dihidroetidina 10 µM (DHE; Sigma) para evaluar el

radical superóxido O₂⁻. Luego, las células se lavaron en PBS y se desprendieron con tripsina (Tripsina/EDTA 500 mg/L: 200 mg/L; Lonza, Walkersville, EE.UU.) para análisis por citometría de flujo o se mantuvieron en la placa para ser evaluadas por microscopía de fluorescencia. Como control positivo de utilización de rotenona 50 μM, esto permitió inducir la producción de especies reactivas de oxígeno.

Evaluación radical peróxido de hidrogeno

La producción de este radical se evaluó mediante tinción con Diclorofluoresceína diacetato (DCFDA- Sigma). La producción de intermediarios reactivos de oxígeno se realizó con la sonda inespecífica Diclorofluoresceína a una concentración final de 10 μM. Una vez finalizado el protocolo experimental las células se incubaron durante 30 minutos, posteriormente se separaron con tripsina o se dejaron en la placa de acuerdo a la cuantificación mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia respectivamente.

4.1.4.3. Potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó mediante la tinción de tetrametil rodamina éster metílico (TMRM). Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se trataron de acuerdo con cada paradigma experimental en el día siguiente. Posterior al paradigma experimental, las células se tiñeron en la oscuridad con 500 nM de TMRM, y se incubaron a 37°C durante 20 min. Luego las células se lavaron con PBS y se separaron usando tripsina. Subsecuentemente los resultados se cuantificaron por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. Como control experimental, se utilizaron el desacoplador mitocondrial carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona CCCP (Sigma-Aldrich). Esto permitió disipar el potencial de membrana y definir la línea base para el análisis del potencial mitocondrial.

4.1.4.4. Masa mitocondrial (NAO)

La masa mitocondrial se evaluó mediante la tinción 10-N-nonil naranja de acridina (NAO). Las células se sembraron a una densidad de 40.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se trataron de acuerdo con cada paradigma experimental en el día siguiente. Posterior al paradigma

experimental, las células se tiñeron en la oscuridad con 200 nM de NAO, y se incubaron a 37°C durante 20 min. Luego las células se lavaron con PBS y se separaron usando tripsina. Subsecuentemente los resultados se cuantificaron por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

4.1.5. Estimación celular de la intensidad media de fluorescencia

El uso de fluorocromos permite que la cuantificación de los parámetros de interés pueda realizarse mediante citometría de flujo o mediante microscopía de fluorescencia. Los dos tipos de análisis se complementan entre sí y permiten obtener mayor información del experimento. Para el caso de la microscopía de fluorescencia, la cuantificación y análisis implica la captura de imágenes que posteriormente se analizan mediante un software el cual calcula la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células. Para la determinación de la IMF, las células fueron fotografiadas mediante la cámara Motic moticam CMOS de 10 megapíxeles. Posterior a la captura de las imágenes, éstas fueron analizadas utilizando el software ImageJ versión 1.47 (Bankhead 2014, cooperlab 2016). Las microfotografías se cargaron en el software y se pre-procesaron para restar el fondo, mediante el método de sustracción de fondo del software. Posteriormente, se dibujó un recuadro alrededor de la célula y se midió el valor de fluorescencia medio y la densidad integrada. A continuación, se dibujó un recuadro cerca de la célula a evaluar

Para cuantificar el fondo, mediante una plantilla Excel (2016 Microsoft®), se restó el valor del fondo a la media de fluorescencia, y se usó el valor resultante para el análisis estadístico. 20 células fueron seleccionadas al azar (utilizando un generador de números aleatorios <https://www.random.org/integers/>) utilizando una cuadrícula numerada en cada microfotografía. Se determinó el valor de fluorescencia media de las 20 celdas en 8 microfotografías para cada tratamiento. Las células se analizaron en un área de 0,03 mm². No hubo variaciones en las condiciones del procesamiento de imágenes.

4.1.6. Citometría de flujo

Para la evaluación de viabilidad (IP) y parámetros inflamatorios (producción de ROS, Potencial de membrana mitocondrial, masa mitocondrial) de interés se utilizó la técnica de citometría de flujo. Brevemente, una vez terminados los tratamientos experimentales, las células fueron suspendidas mediante el uso de Tripsina-Versene Lonza®, durante 4 minutos, posteriormente se transfirieron a tubos eppendorff de 1 ml, donde se llevó a cabo la tinción respectiva. Para el diseño de los experimentos se utilizó los tratamientos a estudiar y controles positivos y negativos. Las células se evaluaron en el citómetro Guava Easy Cyte de Millipore®, con un conteo de eventos de 5000 por cada tratamiento, los ajustes de los parámetros del citómetro se hicieron con respecto a los controles.

4.1.7. Determinación de Citoquinas:

Para la determinación de citoquinas se utilizó el kit Multi-Analyte ELISArray (MEM-004A), según las indicaciones del fabricante. Brevemente, una vez terminados los tratamientos respectivos se tomó una alícuota de los sobrenadantes y se evaluaron mediante el uso del kit que utiliza anticuerpos altamente específicos para citoquinas y quimiocinas, mediante pruebas ELISA se pueden detectar 12 citoquinas o quimiocinas simultáneamente en múltiples muestras. El kit perfila 12 citoquinas en 6 sobrenadantes celulares usando un protocolo simple y un tiempo de desarrollo estandarizado. Los anticuerpos de captura y detección se seleccionan para lograr la sensibilidad más alta posible y linealidad para cada ensayo de citoquinas o quimiocinas.

4.1.8. Determinación y cuantificación de proteínas por Western Blot

Para la determinación de proteínas, las células destinadas para tal fin fueron lisadas y se solubilizadas en tampón RIPA (Thermo Scientific, cat. 89900), que contiene 1 mM de fluoruro de sodio 1 mM, 10 mM de pirofosfato de sodio, 200 mM de fluoruro de metil-fenil-sulfoniloPMSF, 10 mM ortovanadato de sodio y cóctel inhibidor de proteasas Halt Thermo 1X (CAT- 78425). Los lisados se centrifugaron a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y, finalmente, se denaturaron por calentamiento durante 5 min. Una muestra de las proteínas solubilizadas se utilizó para la cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bicinconónico (kit BCA-1 Sigma-

Aldrich). Las proteínas solubilizadas se resolvieron en gel de electroforesis al 12% SDS-PAGE a 90 V durante 90 minutos a 25 °C.

Después se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF (Thermo cat.88518) durante 90 minutos a 350 mA y 4 °C. Luego las membranas de PVDF se bloquearon durante 1 hora a 25°C con 5% (w/v) de BSA y 0,1% (w/v) de Tween-20 en tampón Tris salino pH 7,4. A continuación las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Posterior a lavados sucesivos la membrana se incubó en anticuerpo secundario durante 40 minutos. Posteriormente, las membranas se revelaron mediante el método de quimioluminiscencia utilizando el kit West Pico Substrate SuperSignal™ (Life Technologies).

Los análisis densitométricos se realizaron utilizando el software ImageJ versión 1.48p. Se utilizó el método de histograma para analizar y normalizar los datos (Tan and Ng 2008, Gassmann, Grenacher et al. 2009, Lukemiller 2010). El análisis se realizó con películas escaneadas con bajo tiempo de exposición, evitando lecturas producto de la saturación de la señal. A continuación, se utilizó el software ImageJ para realizar el análisis densitométrico. Inicialmente se dibuja un área rectangular alrededor de cada una de las bandas en la imagen. Una vez seleccionadas todas las bandas se generaron los histogramas que indicaron la intensidad de cada una de las bandas usando el algoritmo de análisis de gel en el software. Posteriormente, dibujamos una línea en la parte superior del histograma para cuantificar el área bajo la curva. Finalmente, mediante el uso de una hoja de cálculo Excel, se estimó la relación entre cada banda con su correspondiente control de carga.

4.1.9. Inmunofluorescencia

Algunas proteínas fueron evaluadas por inmunofluorescencia como método de validación y para obtener más información de la proteína en relación al modelo. Las células se cultivaron en placas multipozo de 4 pocillos. Al final de los tratamientos experimentales, las células se lavaron en PBS y se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se permeabilizaron durante 3 minutos en 0,1% de Triton X-100 en

tampón Tris salino (TBS) con 2% de BSA. Una vez permeabilizadas las células, se lavaron con PBS, se bloquearon con 2% de BSA+TBS y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario. Posteriormente, las células se lavaron tres veces durante 5 min con TBS y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo secundario acoplado a DyLight-488 a la concentración establecida. Finalmente, las células fueron lavadas tres veces con TBS, se tiñeron con Hoechst 33258 para marcar los núcleos y se fotografiaron en el microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-53. La cuantificación se realizó mediante el software ImageJ con el método descrito en este estudio.

4.1.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de este estudio fueron analizados inicialmente para determinar el tipo de distribución estadística de los datos. Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se determinó la distribución normal y mediante el test de Levene se determinó la homogeneidad de la varianza. Posteriormente, los datos fueron examinados por análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Dunnett para las comparaciones entre los controles y los tratamientos y prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples entre las medias de los tratamientos. Los datos se presentaron como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Una diferencia estadísticamente significativa se definió en $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto del ácido palmítico sobre la viabilidad en el modelo microglial

El efecto del ácido palmítico fue evaluado en la línea celular BV-2, una línea microglial ampliamente utilizada y con soporte teórico y experimental para este tipo de estudios (Zhou et al., 2016). Fue necesario determinar el tiempo y la concentración en que las células eran afectadas por el ácido palmítico y el tiempo límite en que las células aún podían ser tratadas o rescatadas.

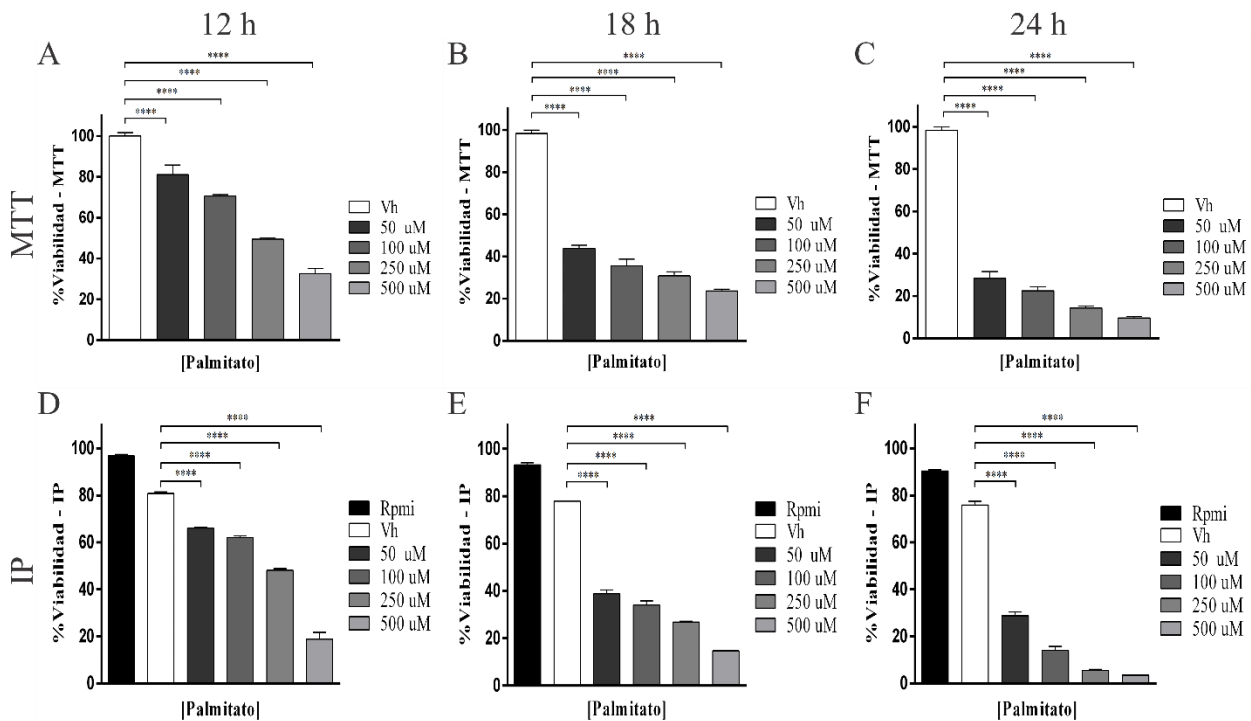


Figura 1. Estandarización del modelo inflamatorio con ácido palmítico. Tiempos y concentraciones del daño en las células BV-2 sometidas al ácido palmítico durante 12, 18 y 24 horas. Viabilidad Palmitato MTT **A.** 12 h, **B.** 18 h, **C.** 24 h, Viabilidad Palmitato IP **D.** 12h, **E.** 18 h, **F.** 24 h Rpmi: Condición basal del cultivo, Vh: Control. Resultados obtenidos por las técnicas de MTT y validados mediante la captación de yoduro de propidio (IP). 12 h **** (P<0.0001 Vh vs Pal), 18 h (P<0.0001 Vh vs Pal), 24 h (P<0.0001 Vh vs Pal).

Mediante ensayos de viabilidad realizados con la técnica de MTT y con ioduro de propidio (Figuras 1-2) se evidenció que a partir de las 12 horas de daño hay cambios significativos respecto al control ($p < 0.0001$, Vh vs Pal; Figuras 1A-D); más allá de este tiempo las células presentaban proporciones de muerte superiores al 60% a las 18 h ($p < 0.0001$, Vh vs Pal; Figuras 1B-E) de estar expuestas al ácido palmítico y cerca de un 90 % a las 24 h de daño ($p < 0.0001$, Vh vs Pal; Figuras 1C-F). Durante 12 horas de ácido palmítico en una concentración de 250 μM se observaron proporciones de muerte cercanas al 50% (Figura 2), y ésta es la condición óptima que se utilizará en los demás experimentos

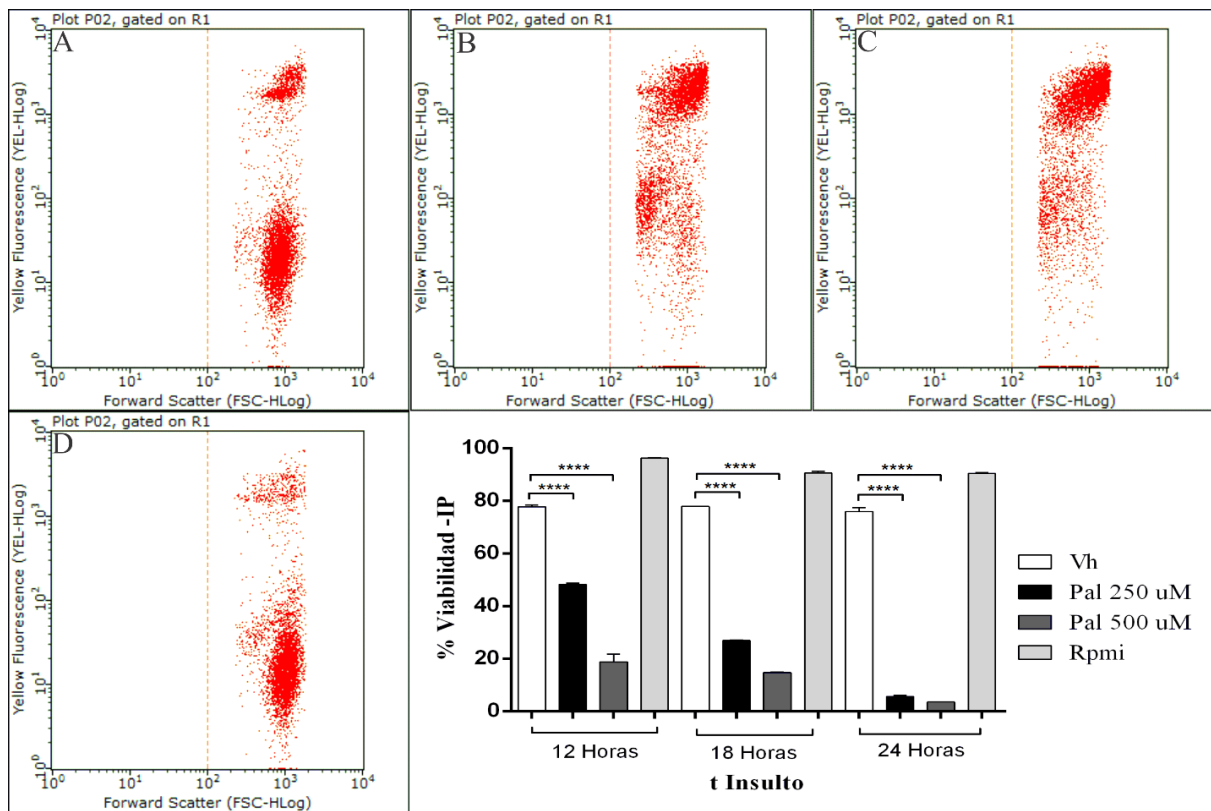


Figura 2 Caracterización del modelo inflamatorio con ácido palmítico. Porcentaje de células que captaron ioduro de propidio a diferentes tiempos y concentraciones de ácido palmítico, a las 12 h de daño las células BV-2 presentan una mortalidad del 50 % a una concentración de 250 μM . Paneles “dotplots” de citometría de flujo representativa de las 12 h de daño con ácido palmítico. **A.** Vh, **B.** Pal 250 μM , **C.** Pal 500 μM , **D.** Rpmi. **** ($p < 0.0001$, Pal 12h 250 μM vs Vh), ($p < 0.0001$, Pal 18h 250 μM vs Vh), ($p < 0.0001$, Pal 24h 250 μM vs Vh).

5.1.1. Evaluación de la fragmentación nuclear, potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno en células insultadas con ácido palmítico

Una vez estandarizado el tiempo y la concentración del ácido palmítico (250 μ M por 12 horas), se procedió a evaluar diferentes parámetros de tipo celular para explicar de forma descriptiva el insulto con ácido palmítico. Se evaluaron entre otros parámetros, la producción de especies reactivas de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial y la fragmentación nuclear. En conjunto estos parámetros describen los procesos que desencadenan la muerte celular en el modelo.

5.1.1.1. Condensación y fragmentación nuclear: La condensación y fragmentación nuclear fueron parámetros que se observaron durante las 3, 6 y 12 horas de daño (Figura 3). La literatura reporta (Feng et al., 2016) que este parámetro puede interpretarse como un indicador de apoptosis. No se observó un incremento significativo de la condensación y fragmentación nuclear en las condiciones basales y en el control. Sin embargo, por el contrario entre las 3, 6 y 12 horas de daño se observó un incremento significativo de la condensación y la fragmentación de los núcleos celulares de manera consecutiva, a partir de las 3 horas ($p < 0.0001$, Pal 3h vs Pal 6h), ($p < 0.0001$ Pal 3h vs Pal 12 h), ($p < 0.001$ Pal 6h vs Pal 12 h; Figura 3A). El mayor incremento de la condensación y fragmentación nuclear en las células sometidas al ácido palmítico se observó a las 12 h en donde aumento alrededor de un 30% respecto al control ($p < 0.0001$, Vh vs Pal 12 h).

5.1.1.2. Potencial de membrana mitocondrial: El potencial de membrana mitocondrial es un indicativo de la función mitocondrial y un reflejo de la actividad de la cadena de transporte de electrones, la cual es la encargada de la producción de ATP en la célula (Garedew, Henderson, & Moncada, 2010). Durante 12 horas de daño se realizó una curva temporal a las 3, 6 y 12 horas para evaluar la función mitocondrial (Figura 3B) en la microglia sometida al palmitato. Se observó una caída significativa en el potencial de membrana a partir de la 3 hora de daño ($p < 0.001$, Pal 3h vs Pal 12 h), que se sigue continua durante las 6h ($p < 0.0001$, Pal 3h vs Pal 12 h) y llega a una pérdida de alrededor del 50% a las 12 horas de daño en las células. Como control positivo se utilizó el desacoplador mitocondrial m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona (CCCP).

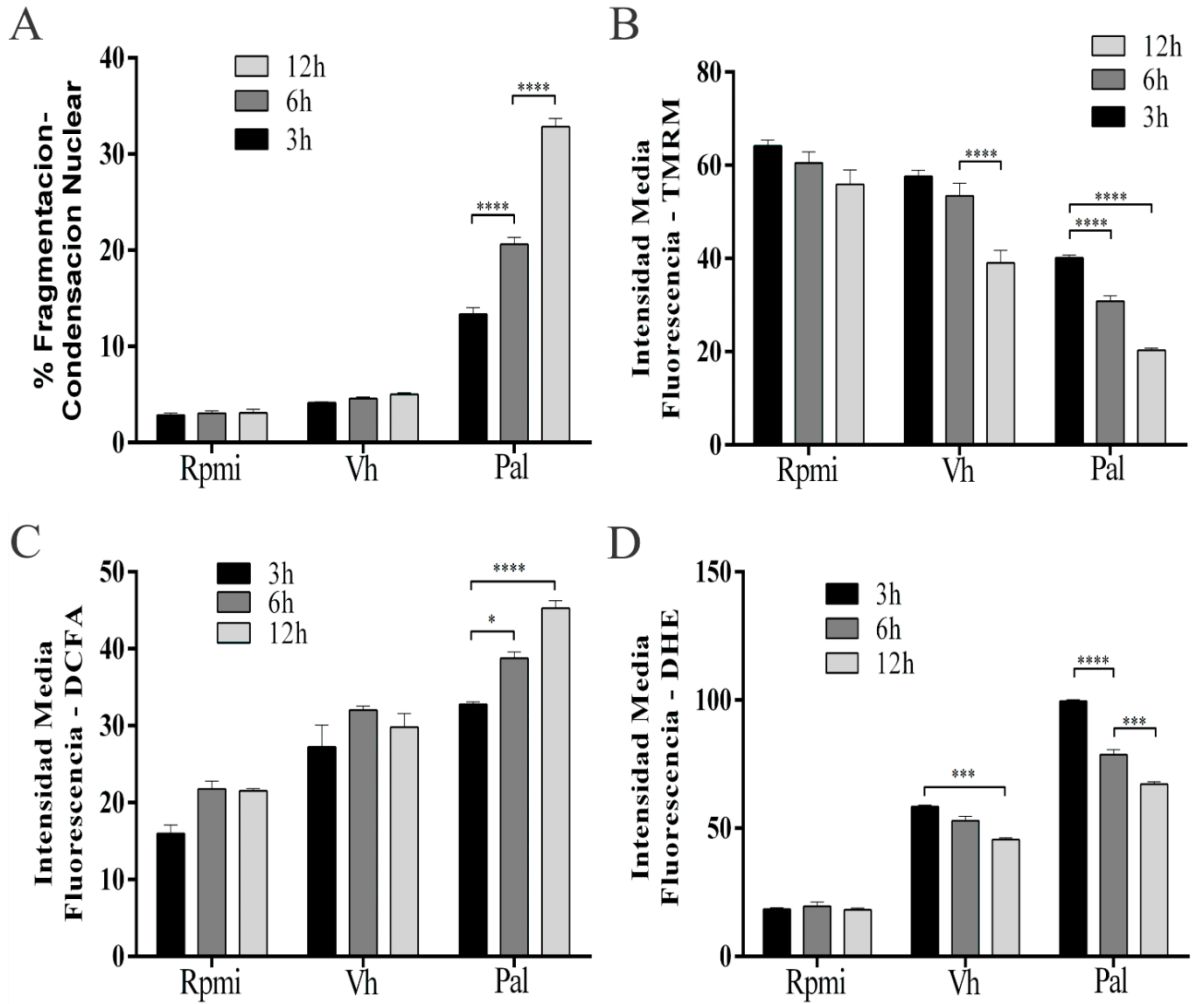


Figura 3. Caracterización de la fragmentación nuclear, potencial de membrana mitocondrial, niveles de peróxido e ion superóxido en la microglía tratada con el palmitato. **A.** Porcentaje de células que presentaron fragmentación y condensación nuclear en el modelo. Desde las 3 h se presenta un incremento en este parámetro, con un mayor porcentaje en la 12 h ($p < 0.0001$, Vh vs Pal 12 h). **B.** Existe una pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células BV-2 bajo estímulo con ácido palmítico ($p < 0.0001$, Pal 3h vs Pal 12 h). **C.** La producción del ion peróxido de hidrogeno aumenta respecto al grupo control en células expuestas al ácido palmítico $*** (p < 0.001$, Pal 6h vs Pal 12 h). **D.** Aumento de la producción del ion superóxido en células microgliales estimuladas con ácido palmítico $**** (p < 0.0001$, Pal 6h vs Pal 12 h). Rpml: Condiciones basal, Vh: Control, Pal: Palmitato.

5.1.1.3. Producción de Peróxido de Hidrogeno: Mediante la sonda fluorescente Diclofluoresceína diacetato (DCFH-DA) se observó un incremento significativo del ion peróxido en el modelo a partir de las 3 horas ($p < 0.0001$, Pal 3h vs Pal 12 h) de insulto con ácido palmítico; Este incremento sigue en las células tratadas con palmitato las 6 y 12 h ($p < 0.001$ Pal 6h vs Pal 12 h) (Figura 3C). Sin embargo, en las células control (Vh) no se observó un incremento significativo al evaluar esta especie reactiva. Como control positivo de este experimento se utilizó el neurotóxico rotenona que es un bloqueador del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial (datos no mostrados).

5.1.1.4. Producción de superóxido: El ion superóxido O_2^- es una especie reactiva de oxígeno que puede ser tóxica en el ambiente celular (Singh et al., 2016). Se observó un incremento significativo de ión superóxido en el modelo a las 3 horas ($p < 0.0001$, Pal 3h vs Pal 12 h) de la exposición con ácido palmítico, y la concentración de este ion disminuye progresivamente a las 6 y 12 horas ($p < 0.0001$, Pal 6h vs Pal 12 h) de daño (Figura 3D).

La estimulación con ácido palmítico en las células microglia BV 2 durante 12 horas evidencia una clara pérdida del potencial de membrana mitocondrial respecto a la condición control (Vh). La pérdida del potencial de membrana mitocondrial puede estar relacionada con el incremento en la producción de ion superóxido y peróxido en las células tratadas, por lo cuales todo esto junto promueve la pérdida de la función mitocondrial, afectando directamente la producción de ATP celular.

5.2. Efecto de la tibolona sobre la fragmentación nuclear, las especies reactivas de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial y masa mitocondrial en el modelo inflamatorio de ácido palmítico

5.2.1. Efecto de la tibolona sobre los parámetros celulares en el modelo

5.2.1.1. Viabilidad celular: Luego de determinar los efectos del ácido palmítico en el modelo inflamatorio, se procedió a determinar el efecto de la tibolona sobre la viabilidad de la microglia expuesta al ácido palmítico mediante las técnicas de MTT e IP. Para evaluar el efecto de la tibolona

fue necesario determinar si este era producto de una estimulación previa (pre-tratamiento), durante (co-tratamiento) o posterior (post-tratamiento) al daño con ácido palmítico (Figura 4) y de manera simultánea estandarizar la concentración y el tiempo en donde la tibolona ejercía un posible efecto.

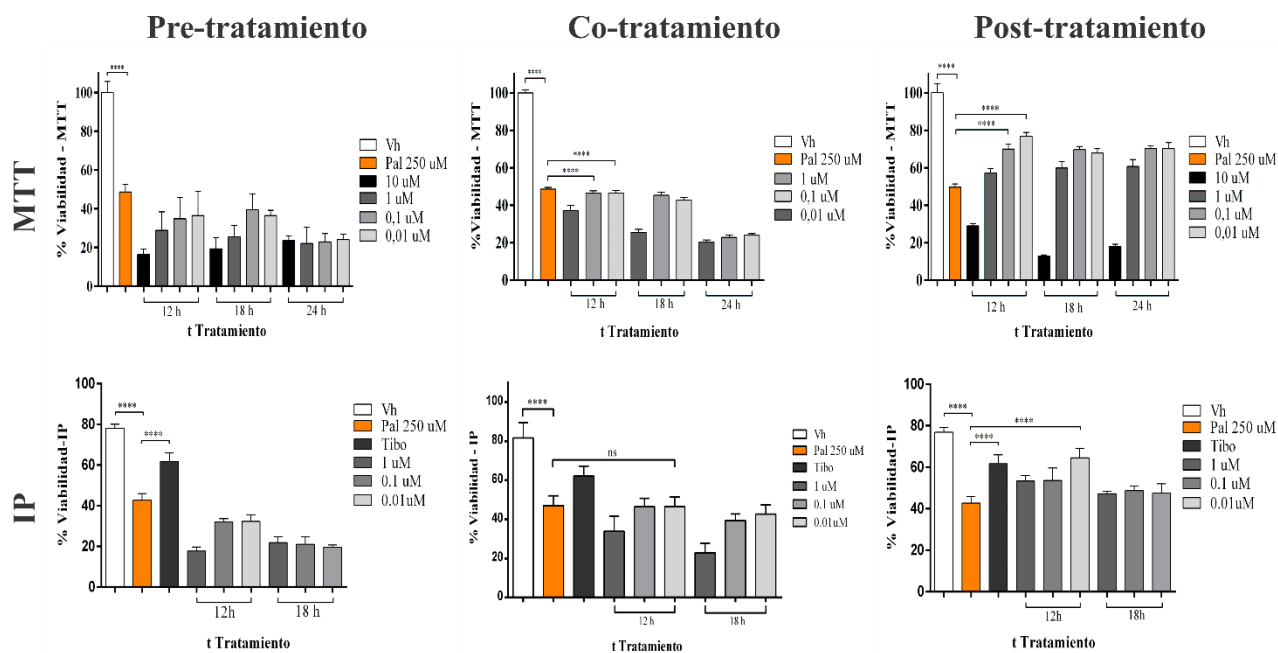


Figura 4. Estandarización del efecto de la tibolona sobre la viabilidad en el modelo inflamatorio de ácido palmítico. Estandarización del tipo de tratamiento (pre, co y post) con tibolona en células insultadas con ácido palmítico, evaluando diferentes concentraciones y tiempos. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las concentraciones para el pre-tratamiento y co-tratamiento por lo que estos fueron descartados para futuros experimentos. Un tratamiento por 12 h posterior al daño con 10 nM de tibolona incrementa significativamente la viabilidad celular en el modelo inflamatorio de ácido palmítico. **** ($p < 0.0001$, Vh vs Pal 12 h), *** ($p < 0.001$, Pal 1 vs Pal +Tibo 10 nM).

Se encontró que la estimulación con tibolona no presentó un efecto significativo sobre la viabilidad (medida por la captación de IP) durante un pre-tratamiento y co-tratamiento (Figura 4). Por el contrario, un tratamiento de 12 h con tibolona en una concentración de 10 nM posterior al daño (post-tratamiento) mostró un incremento cercano al 30% aproximadamente en la viabilidad celular, encontrando un efecto de este esteroide sobre en el modelo inflamatorio (Figuras 4-5).

Esta concentración y tiempo de administración de la tibolona serán utilizados en los próximos experimentos.

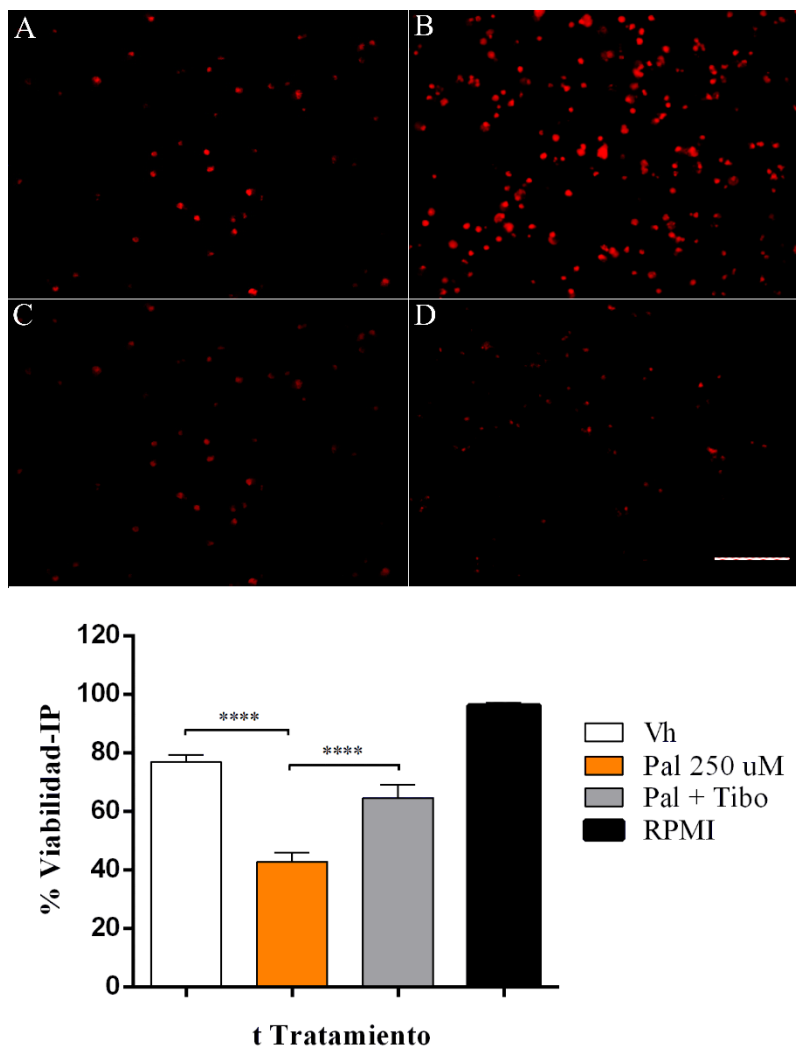


Figura 5. Efecto de la tibolona (post-tratamiento) sobre la captación de yoduro de propidio en la microglia bajo tratamiento con palmítato. La captación de yoduro de propidio indican la cantidad de células con compromiso de la membrana nuclear significativo. Microfotografías de fluorescencia representativas de las condiciones del modelo **A.** Vh, **B.** Pal 250μM, **C.** Pal+Tibo 10nM , **D.** Rpmi. Las células se fotografiaron con tinción de IP en aumento de 20x lo que permitió observar la cantidad de células positivas para yoduro de propidio. Escala 20 μm. **E.** El gráfico de barras muestra la cuantificación del porcentaje de células positivas por citometría de flujo con marcación para IP. **** (p<0.001, v h vs Pal 12 h), (p<0.001, Pal + Tibo vs Pal 12 h).

5.2.1.2. Condensación y fragmentación nuclear: Se realizó una tinción con Hoechst 33258 con el fin de observar la condensación y fragmentación nuclear. La fragmentación nuclear es un indicativo de procesos apoptóticos como posible consecuencia de importantes alteraciones celulares e inflamatorias. La condición control (Figura 6A) no presentó una fragmentación significativa de forma similar a las condiciones basales (con Rpmi). Una concentración de 250 μ M de ácido palmítico mostró que el 35% de las células en el modelo presenten fragmentación a las 12 horas de daño (Figura 6B). El tratamiento posterior con la tibolona disminuyó significativamente el porcentaje de núcleos fragmentados hasta en un 40% (($p < 0.0001$, v h vs Pal 12 h; Figura 6C).

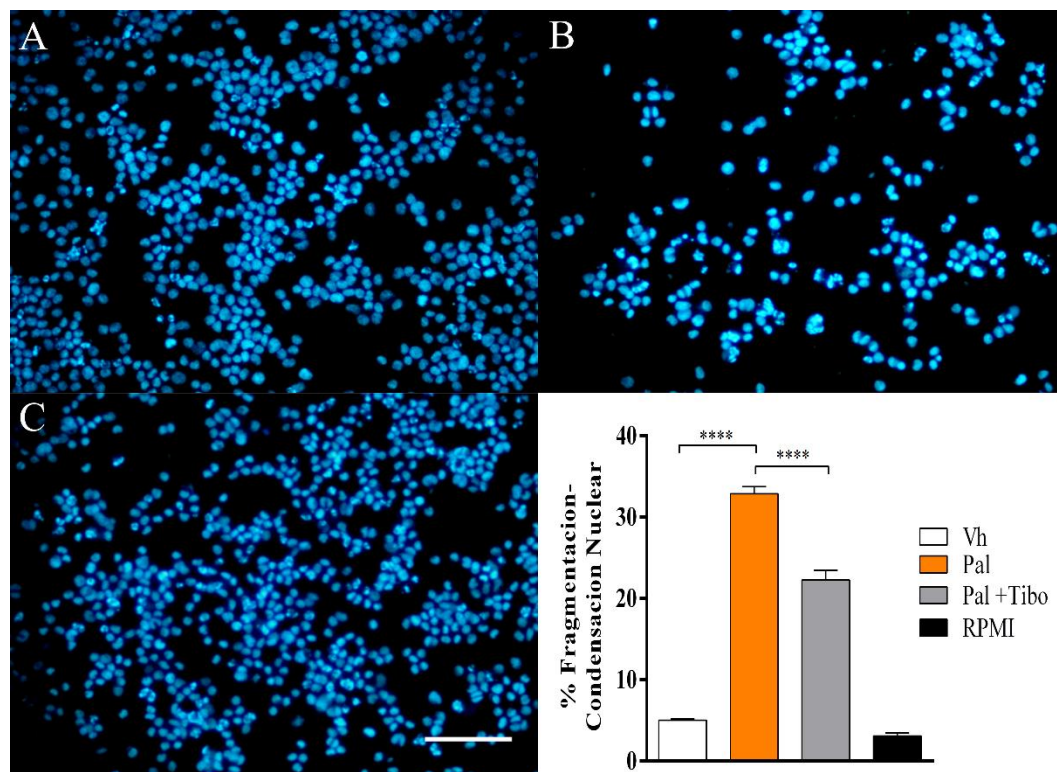


Figura 6. Efecto de la tibolona a 10 nM sobre la condensación y fragmentación nuclear. La tibolona reduce la fragmentación nuclear posterior a un daño con ácido palmítico. El panel superior muestra las microfotografías correspondientes de las células BV-2 expuestas palmitato y tibolona marcadas con hoescht. **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal + Tibo. El gráfico de barras muestra el porcentaje de células con el núcleo fragmentado y condensado. Las células se fotografiaron en aumento de 20x. Escala 20 μ m. **** ($p < 0.0001$, v h vs Pal 12 h), ($p < 0.0001$ Pal + Tibo vs Pal

5.2.1.4 Producción de peróxido de hidrógeno: El daño inducido a las 12h por el ácido palmítico incrementa en un 60% la producción de especies reactivas de oxígeno (Figura 3C). El peróxido de hidrogeno H_2O_2 tiene un aumento significativo ($p < 0.0001$, Vh 12h vs Pal 12h) con respecto al control (Figuras 7A-7B). La estimulación con tibolona posterior al daño incrementó aproximadamente el doble la producción de esta especie reactiva (Figura 7C) en el modelo inflamatorio ($p < 0.0001$, Pal 12h vs Pal+Tibo 12h). Este comportamiento se presentó también en otros tiempos (3 h y 6 h) de insulto evaluados (Figura 7D).

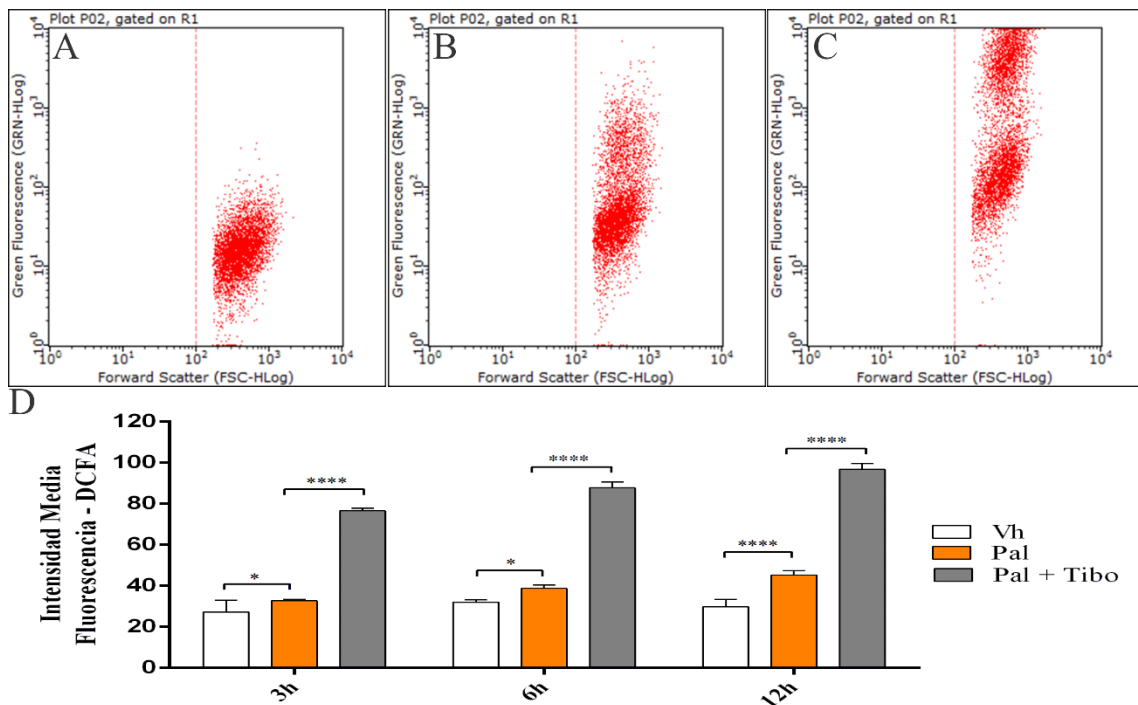


Figura 7. Efecto de la tibolona en la producción de peróxido de hidrógeno en un modelo inflamatorio de ácido palmítico. La concentración de peróxido de hidrógeno aumenta en las células estimuladas con tibolona. Paneles “dotplots” de citometría de flujo representativos del modelo a las 12 h **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal +Tibo. **D.** El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia a diferentes tiempos de insulto con tinción de DCFA-DA. *($p < 0.01$, Vh 3h vs Pal 3h), ****($p < 0.0001$, Pal 3h vs Pal+Tibo 3h), *($p < 0.01$, Vh 6h vs Pal 6h), **($p < 0.001$, Pal 6h vs Pal+Tibo 6h).

5.2.1.5 Producción del ion superóxido: En este ensayo se realizó una curva de palmitato en donde se evaluaron diferentes tiempos del insulto, y se encontró que a partir de las 3h se presenta un incremento significativo del 72% ($p < 0.0001$, Vh 3h vs Pal 3h) en la producción del ion superóxido con respecto al control. Al evaluar tiempos mayores se observó la misma tendencia, pero con una leve disminución de esta especie con el tiempo. El tratamiento con la tibolona disminuyó significativamente ($p < 0.001$, Pal 3h vs Pal+Tibo3h) la producción de especies superóxido a partir de las 3 h, donde dicho efecto reductor de especies superóxido por parte de la tibolona fue determinado hasta las 24 horas (Figura 8D).

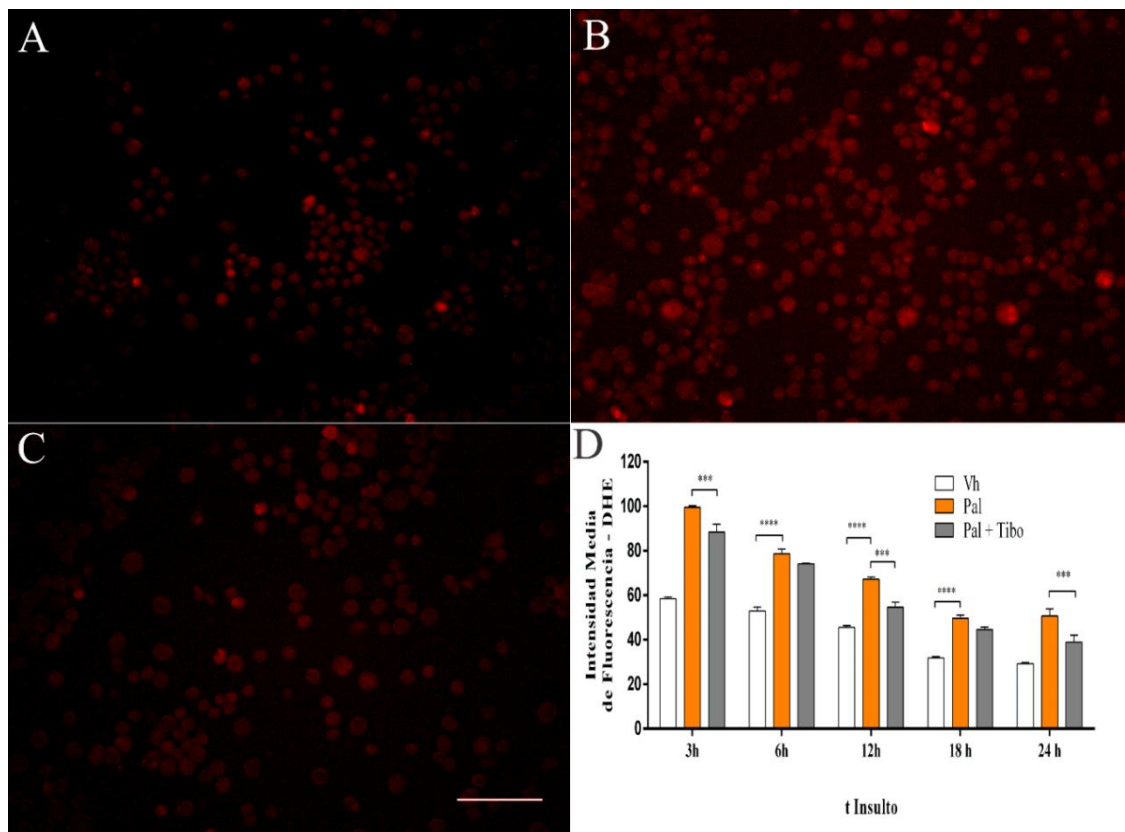


Figura 8. Efecto de la tibolona sobre la producción de ion superóxido en un modelo inflamatorio de ácido palmítico. La concentración del ion superóxido disminuye en las células tratadas con tibolona a partir de las 3h. El panel superior muestra microfotografías representativas del modelo a las 12 h marcadas con DHE **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal + Tibo. El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia a diferentes tiempos de insulto con tinción de DHE evaluado por citometría de flujo. Las células se fotografiaron en aumento de 20x. Escala 20 μ m. ****($p < 0.0001$ Vh 12h vs Pal 12 h), ***($p < 0.001$ Pal 12h vs Pal+Tibo 12h).

5.2.1.4. Función mitocondrial-Potencial de membrana mitocondrial: En las células microgliales BV-2 sometidas al ácido palmítico, se evaluó el efecto de la tibolona en el potencial de membrana mitocondrial (Figura 9). El potencial de membrana mitocondrial determina en parte el correcto funcionamiento de la actividad mitocondrial. Nuestros resultados muestran que en la condición control no hay una pérdida del potencial de membrana (Figura 9A); por el contrario, las células expuestas al ácido palmítico (Figura 9B) muestran una pérdida del 50% significativa ($p < 0.0001$ Vh 12h vs Pal 12h) del potencial de membrana respecto a la condición control. Las células tratadas con tibolona después del daño presentan un mantenimiento de alrededor de un 20% del potencial de membrana mitocondrial a la 12h ($p < 0.0001$, Pal 12h vs Pal +Tibo 12h,

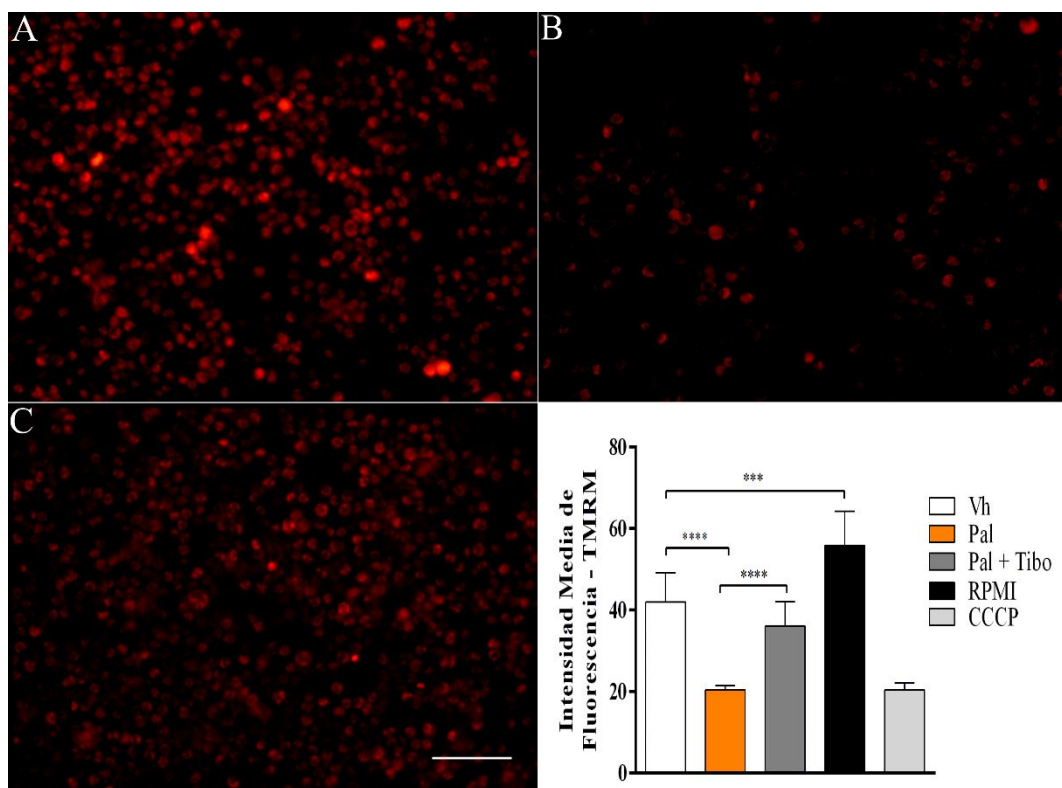


Figura 9. Efecto de la tibolona sobre el potencial de membrana mitocondrial en un modelo inflamatorio de ácido palmítico. El tratamiento con tibolona mejora el potencial de membrana mitocondrial luego de un daño con ácido palmítico. El panel superior muestra las microfotografías correspondientes a las 12 h de las células BV-2 bajo el modelo, marcadas con la sonda TMRM. **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal + Tibo 10 nM. El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia con marcación de TMRM por citometría de flujo. Las células se fotografiaron en aumentos de 20x. Escala 20 μ m. ****($P < 0.0001$ Vh 12h vs Pal 12 h), ****($P < 0.0001$ Pal 12h vs Pal +Tibo 12 h).

Figura 9C). Como control positivo se utilizó CCCP, un desacoplador de la membrana mitocondrial.

5.2.1.5. Masa mitocondrial: El mantenimiento de la integridad de la membrana interna mitocondrial es importante para su correcto funcionamiento. La masa mitocondrial se evaluó a partir de la oxidación de la cardiolipina un lípido presente en la membrana mitocondrial. Se observó una disminución significativa ($p < 0.01$, Vh 12h vs Pal 12h) en las células expuestas al ácido palmítico al compararlo con la condición control (Figuras 10A-B). El tratamiento con la tibolona mantuvo la masa mitocondrial (Figura 10C)($p < 0.001$, Vh 12h vs Pal 12h).

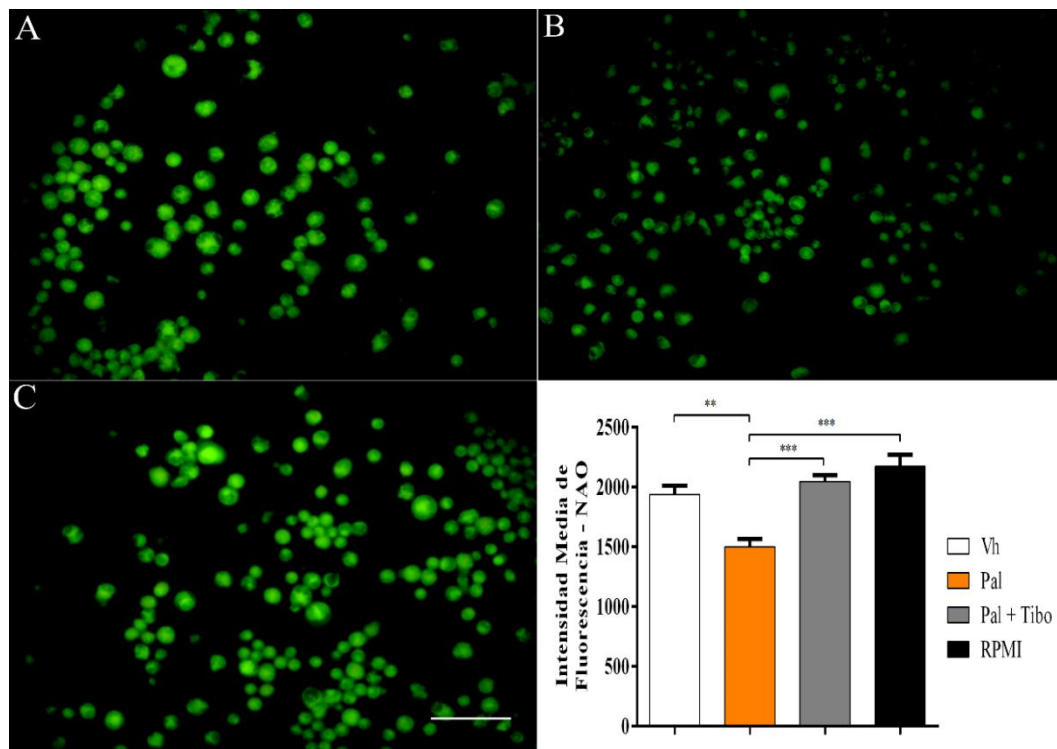


Figura 10. Efecto de la tibolona sobre la masa mitocondrial en un modelo inflamatorio de ácido palmítico. El tratamiento con tibolona mejora la masa mitocondrial luego de un daño con ácido palmítico. El panel superior muestra las microfotografías correspondientes a las 12 h de las células BV-2 bajo el modelo, marcadas con NAO. **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal + Tibo. El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia con marcación de NAO por citometría de flujo. Las células se fotografiaron en aumentos de 20x. Escala 20 μ m. **($p < 0.01$, Vh 12h vs Pal 12h), ***($p < 0.001$, Vh 12h vs Pal 12h).

5.3. Efecto de los receptores alfa y beta de estrógeno sobre el modelo inflamatorio estimulado por ácido palmítico

5.3.1. Efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores de estrógeno sobre el modelo inflamatorio de ácido palmítico

Una vez determinado el efecto protector de la tibolona sobre los parámetros en el modelo inflamatorio, el estudio se enfocó en determinar por cual receptor la tibolona podría estar ejerciendo su efecto. Inicialmente los experimentos se diseñaron para evaluar si el efecto de la tibolona obedecía preferencialmente a alguno de los receptores de estrógeno, con lo cual se utilizaron agonistas y antagonistas de los receptores de estrógeno.

Para desarrollar estos ensayos se utilizó los agonistas del receptor de estrógeno beta (DPN) y del receptor de estrógenos alfa (PPT), realizando una curva dosis respuesta a diferentes concentraciones de los agonistas para poder determinar a qué concentraciones se presentaba un efecto similar al presentado por la tibolona. Se observó que la estimulación con el agonista del receptor β de estrógeno (DPN) por 12h posterior al daño con ácido palmítico presentó un efecto similar a la tibolona al incrementar de una manera significativa ($p < 0.001$, Pal 12 h vs DPN 12 h) en cerca de un 20% la viabilidad celular (Figura 11A); por el contrario en el tratamiento a diferentes concentraciones con el agonista del receptor alfa de estrógeno (PPT) no se encontró

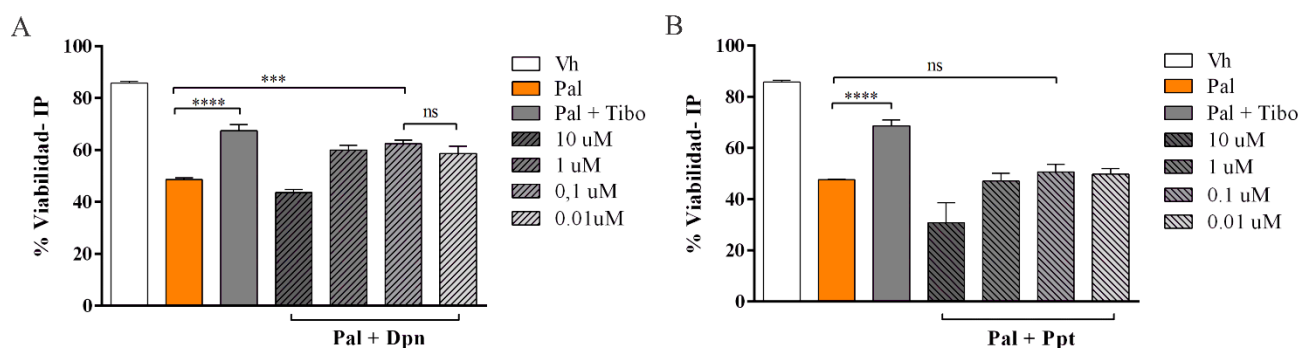


Figura 11. Efecto de los agonistas de los receptores de estrógeno sobre la viabilidad del modelo inflamatorio de ácido palmítico. Estandarización de la concentración de los agonistas de los receptores de estrógenos. **A.** Pal +DPN, El agonista del receptor de estrógeno beta (DPN) aumenta significativamente la viabilidad celular ejerciendo un efecto protector en las células expuestas al ácido palmítico, por el contrario **B.** Pal +PPT el agonista del receptor alfa (PPT) no presentó ningún efecto sobre la viabilidad del modelo. ***($p < 0.001$ Pal 12 h vs DPN 12 h), ****(0.0001 Pal 12 h vs Pal+Tibo12 h)

ninguna diferencia significativa al evaluar la viabilidad celular del modelo (Figura 11B). Estos resultados podrían sugerir que la acción de la tibolona está asociado a la activación del receptor de estrógeno beta.

Con el fin de validar lo resultados anteriores se utilizaron antagonistas tanto del receptor de estrógeno alfa (MPP) como del receptor de estrógeno beta (PHTTP), esto con la necesidad de demostrar que el efecto se debía a la actividad estrogénica de la tibolona. Inicialmente se observó que el bloqueo del receptor de estrógeno beta (PHTTP+Pal+Tibo) disminuyó significativamente ($p < 0.0001$, Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo) la viabilidad de las células tratadas con la tibolona (Figura 12A); de igual manera este efecto fue similar en el tratamiento con DPN en donde se había bloqueado el receptor de estrógeno beta disminuyendo notablemente el efecto ($p < 0.0001$, Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN). También se evaluó el efecto del bloqueo del receptor de estrógenos alfa para confirmar los resultados obtenidos. En este ensayo se encontró que al bloquear el receptor alfa (MPP+Pal+Tibo) no se presentó ninguna disminución significativa del efecto de la tibolona sobre la viabilidad celular ($p \geq ns$, Pal+Tibo vs MPP+Pal+Tibo; Figura 12B) y tampoco ninguna acción sobre las células tratadas con PPT ($p \geq ns$, Pal+PPT vs MPP+Pal+PPT).

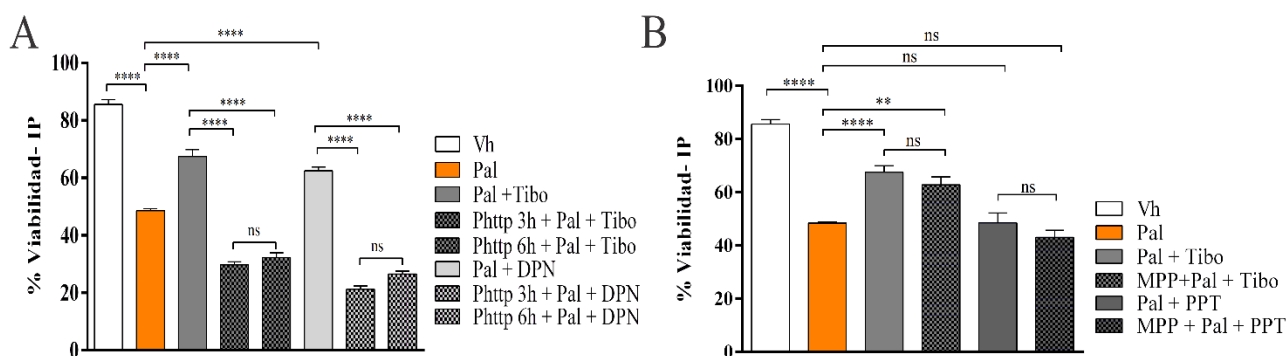


Figura 12. Efecto del bloqueo de los receptores de estrógenos sobre la acción protectora de la tibolona en el modelo inflamatorio de ácido palmítico. Estandarización del tiempo de bloqueo con los antagonistas de los receptores de estrógenos. **A.** El bloqueo durante 3 y 6 h del RE β con el antagonista PHTTP redujo el efecto de la tibolona y del agonista DPN. **B.** El bloqueo del RE α con el antagonista MPP no ejerció ningún efecto sobre el tratamiento con tibolona. *****($P < 0.0001$ Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo), *****($P < 0.0001$ Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN).

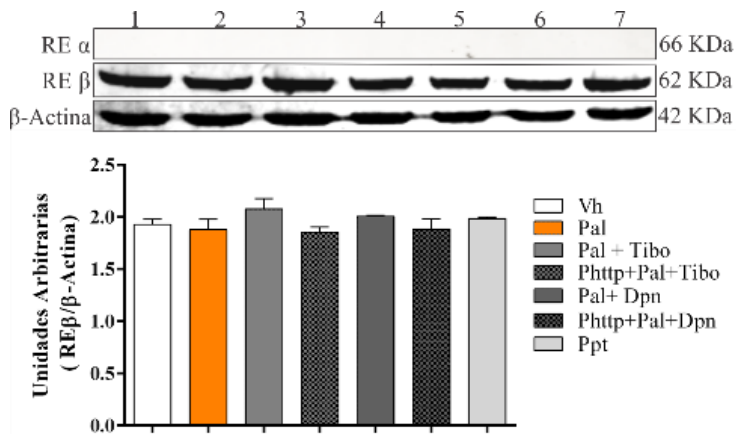


Figura 13. Expresión de los receptores de estrógenos beta y alfa en el modelo inflamatorio de ácido palmítico. Carriles Western Blot. **1.** Vh, **2.** Pal, **3.** Pal+Tibo, **4.** Phttp+Pal+Tibo, **5.** Pal+DPN, **6.** Phttp+Pal+Dpn, **7.** Pal+PPT.

de los tratamientos (Figura 13). Este experimento confirmó la posible asociación del receptor de estrógenos beta con el efecto de la tibolona.

5.3.2. Efecto de la tibolona mediado por los receptores de andrógenos y progesterona

El efecto de la tibolona radica en la actividad estrogénica de sus metabolitos. Por ejemplo, la acción del alfa 4-isomero tibolona, uno de estos metabolitos, ha sido asociada a través la activación de los

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó un western blot en células lisadas bajo las condiciones del modelo para evaluar la expresión de los receptores de estrógeno alfa y beta. No se encontró diferencia significativa en la expresión del receptor de estrógeno beta bajo las diferentes condiciones. Al parecer, estas células no expresan el receptor alfa de estrógenos, pues no se observó ninguna expresión de dicho receptor en los lisados de las células BV-2 bajo ninguno

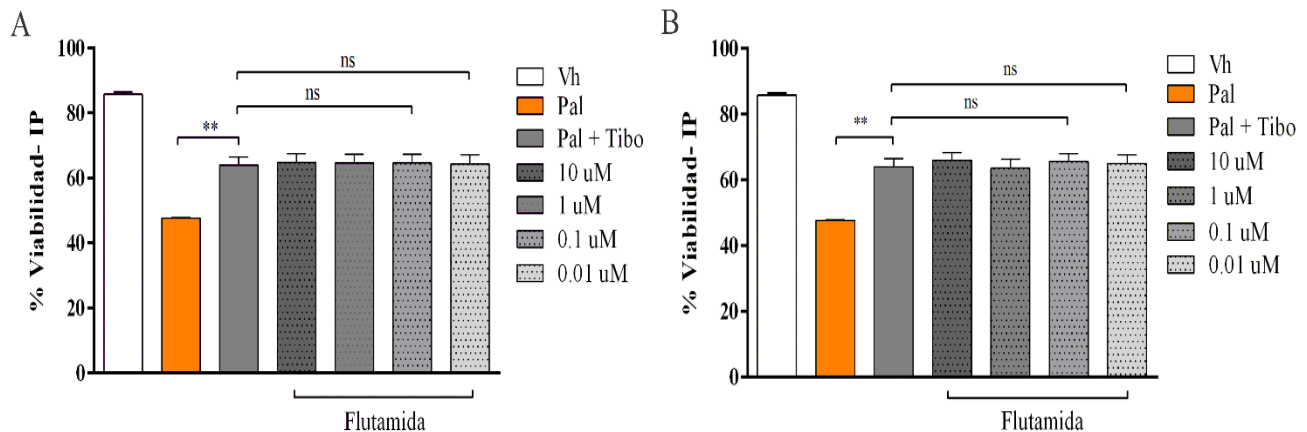


Figura 14. Efecto de la tibolona sobre el bloqueo del receptor de andrógenos en un modelo inflamatorio. El bloqueo de los receptores de andrógenos en diferentes concentraciones no disminuye el efecto de la tibolona. **A.** Bloqueo por 3h con Flutamida, **B.** Bloqueo por 6h con Flutamida. La viabilidad fue evaluada por citometría de flujo con marcación de IP. ns $p \geq 0.05$.

receptores de andrógeno (Escande et al., 2009). De acuerdo a lo anterior combinamos el tratamiento de la tibolona junto con el uso de un antagonista del receptor de andrógenos (Flutamida). Para llevar a cabo este experimento se realizó una curva con diferentes concentraciones y tiempos del bloqueo para determinar el efecto de esta sobre la viabilidad celular (Figura 14). Sin embargo, no se encontró ningún efecto sobre el efecto protector de la tibolona al bloquear estos receptores con la flutamida. Estos resultados sugieren que el efecto de la tibolona no está asociado al receptor de andrógenos y por el contrario afirma una vez más su acción sobre los receptores de estrógenos.

5.3.3. Evaluación del efecto de la tibolona sobre los parámetros de función celular asociados con el tratamiento con agonistas de los receptores de estrógeno.

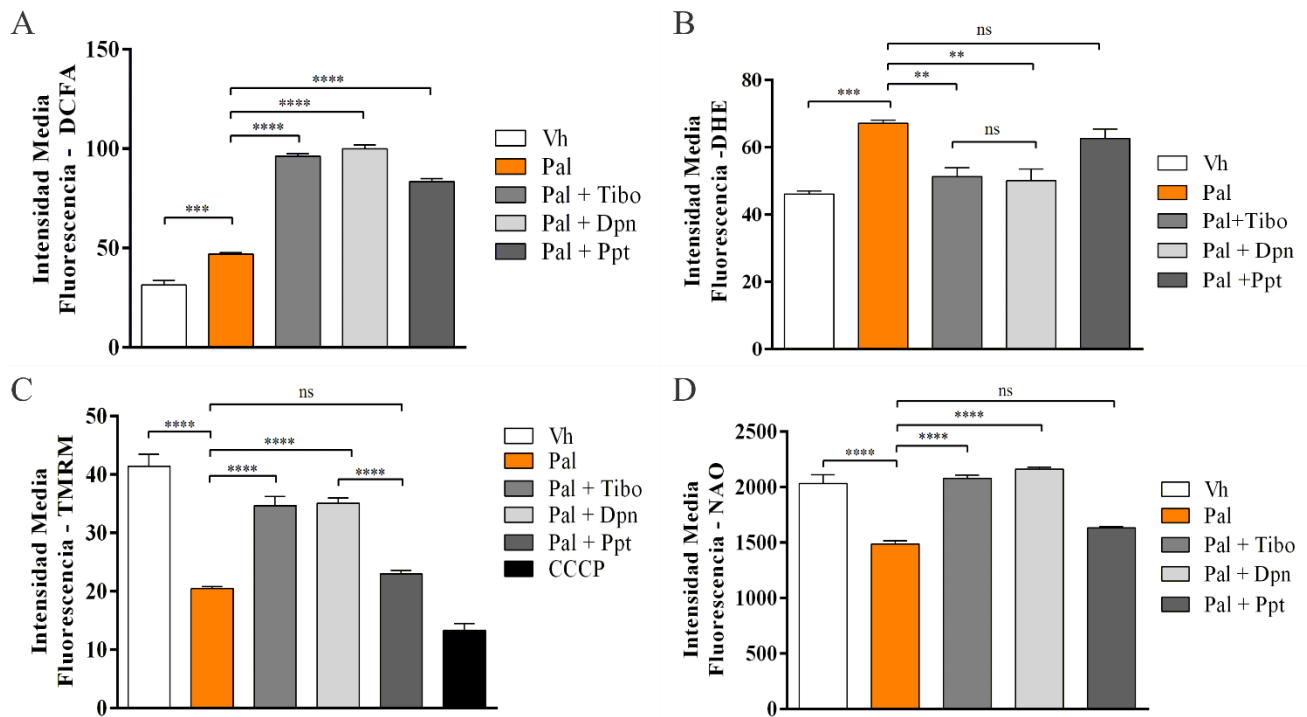


Figura 15. Evaluación de la acción de los agonistas de los receptores de estrógenos DPN y PPT sobre los parámetros del modelo inflamatorio. El agonista del RE β (DPN) tiene un efecto similar a la tibolona en todos los parámetros evaluados del modelo, por el contrario, el agonista del RE α no presenta ningún efecto protector. **A.** Peróxido de hidrógeno, ****($p < 0.0001$ Pal vs Pal+DPN) **B.** Ion superóxido, ** ($p < 0.01$ Pal vs Pal+DPN), **C.** Potencial de membrana mitocondrial, **** ($p < 0.0001$ Pal vs Pal+DPN) **D.** Masa mitocondrial ****($p < 0.0001$ Pal vs Pal+DPN).

Partiendo de los resultados anteriores en donde sugieren que el efecto protector de la tibolona estaba asociado a los receptores de estrógenos, específicamente al receptor beta, se determinó si lo observado en la viabilidad del modelo también se reflejaba en algunos parámetros caracterizados en el modelo. Para llevar a cabo estos ensayos se realizó el tratamiento con tibolona y con la presencia de los agonistas de los receptores de estrógenos, donde se evaluaron parámetros como la producción de especies reactivas de oxígeno, potencial de membrana mitocondrial y masa mitocondrial (Figura 15).

Especies reactivas de oxígeno: Se encontró un aumento significativo de la producción de peróxido de hidrógeno con la estimulación del receptor beta mediante el agonista DPN por 12 h ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+DPN); el aumento en esta especie reactiva de oxígeno fue similar al efecto que presentan las células tratadas con tibolona emulando el efecto del agonista DPN en la estimulación del receptor de estrógeno beta. También se evaluó la estimulación del receptor de estrógenos α mediante el agonista PPT y se encontró un leve incremento en la producción de peróxido de hidrógeno ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+PPT; Figura 15A). De igual manera se determinó la concentración del ion superóxido, y se observó que la estimulación del receptor beta con el agonista DPN redujo significativamente ($p < 0.01$, Pal vs Pal+DPN) la producción de esta especie (Figura 15B); por el contrario, el tratamiento con el PPT no evidenció ningún efecto significativo ($p = 0.6520$, Pal vs Pal+PPT). Finalmente, el efecto del tratamiento con la tibolona fue similar a la estimulación del receptor beta con el DPN (Figura 15B), demostrando que el efecto de la tibolona sobre la producción de especies reactivas de oxígeno está influenciado por el receptor de RE β .

Potencial de Membrana mitocondrial: Nuestros resultados demuestran que la estimulación del receptor de estrógenos beta con el agonista DPN mantuvo el potencial de membrana mitocondrial en las células BV-2 tras el daño con ácido palmítico; además, este estímulo con el agonista presentó un efecto similar al tratamiento con la tibolona, en la cual también se observó un efecto protector sobre el potencial de membrana mitocondrial encontrando de nuevo un posible efecto de la tibolona mediado por el receptor de estrógeno beta ($p < 0.01$ Pal vs Pal+DPN; Figura 15C). Por otro lado en el tratamiento con PPT no se observó ningún efecto significativo sobre el potencial de membrana

mitocondrial ($p=0.8548$, Pal vs Pal+PPT). Como control positivo se utilizó el CCCP un desacoplador de membrana.

Masa Mitocondrial: En este experimento se encontró que la estimulación con DPN agonista del RE β en células BV-2 después del daño con ácido palmítico protegió la integridad de la composición de la membrana mitocondrial ($p<0.0001$ Pal vs Pal+DPN) (Figura 15C) , este efecto se presentó de manera similar en el tratamiento con la tibolona en donde la estimulación por 12h con este esteroide mejoro de manera significativa la composición de la membrana mitocondrial ($p<0.0001$ Pal vs Pal+Tibo), en cuento a el tratamiento con el agonista del RE α no se evidencio un efecto protector sobre el parámetro evaluado ($p=0.1476$ Pal vs Pal+PPT) (Figura 15C).

Los resultados presentados anteriormente en conjunto sugieren que el efecto protector de la tibolona está más relacionado con una actividad estrogénica asociada al receptor de estrógeno beta. La actividad de este receptor según la evidencia obtenida favorece la actividad mitocondrial y disminuye el estrés oxidativo como consecuencia de un daño metabólico.

5.3.4. Caracterización de la respuesta asociada a proteínas del mecanismo antioxidante mediante el tratamiento con tibolona y agonistas-antagonistas de los receptores de estrógenos

El tratamiento con la tibolona sobre algunos parámetros mitocondriales analizados en el modelo sugiere una gran influencia del componente antioxidante en el mecanismo de protección de la tibolona asociado al receptor de estrógeno beta; razón por la cual en esta investigación se evaluaron otros componentes celulares sujetos a al estrés oxidativo como lo son algunas enzimas y proteínas asociadas al sistema antioxidante celular.

5.3.4.1 Determinación de la expresión de enzimas antioxidantes mediante el tratamiento con tibolona y agonistas-antagonistas de los receptores de estrógenos

Como observamos anteriormente, la determinación de las especies reactivas de oxígeno H₂O₂ y O₂⁻ en el modelo mostraron un incremento significativo en la producción del peróxido de hidrógeno por parte del tratamiento con la tibolona (Figura 7) luego de una exposición al palmitato. Para determinar si la tibolona afecta el sistema antioxidante de la célula bajo estímulo con palmitato,

realizamos un análisis por western blot para medir la expresión de algunas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), Catalasa y Glutación peroxidasa (GPX-1).

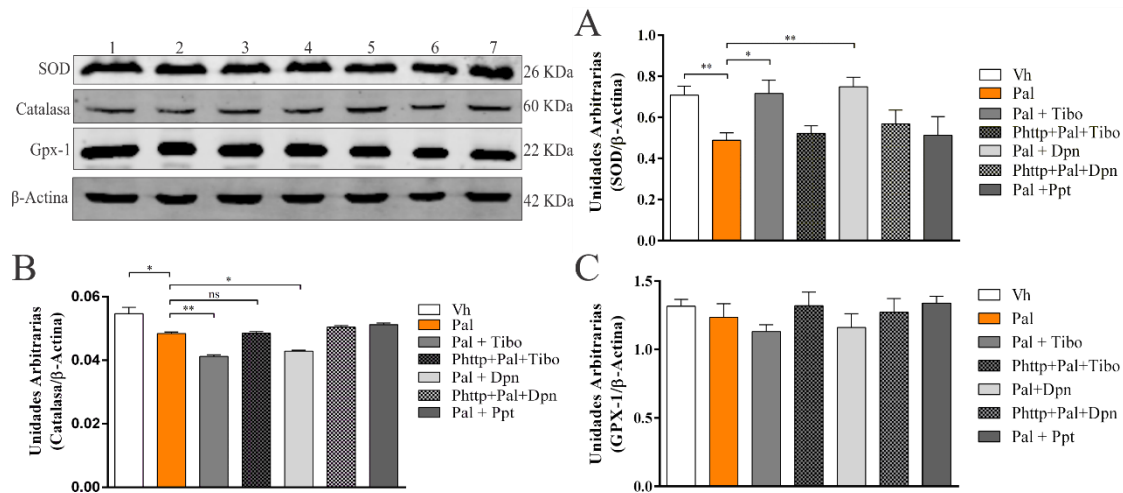


Figura 16. Efecto de la tibolona en la expresión de enzimas antioxidantes en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico. Cuantificación por Western Blot enzimas antioxidantes en células tratadas con agonistas y antagonistas de los receptores de estrógenos. **A.** SOD, ($p < 0.01$ Pal vs Pal+Tibo), ($p < 0.001$ Pal vs Pal+Tibo), ($p < 0.01$ Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo), ($p < 0.01$ Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN) **B.** Catalasa, **C.** GPX-1. Carriles Western Blot **1.** Vh, **2.** Pal, **3.** Pal+Tibo, **4.** Phttp+Pal+Tibo, **5.** Pal+DPN, **6.** Phttp+Pal+Dpn, **7.** Pal+PPT.

Se observó una reducción en la expresión de la enzima SOD en los lisados de las células expuestas con ácido palmítico (Carril 2, Figura 16); por el contrario, en las células tratadas con la tibolona se encontró un aumento significativo ($p < 0.01$, Pal vs Pal+Tibo) en la expresión de esta enzima, y un comportamiento similar se evidenció en el tratamiento con el agonista (DPN) del RE β (Carril 4, Figura 16; $p < 0.001$, Pal vs Pal+DPN). Adicionalmente, evaluamos el efecto del bloqueo del RE β sobre la acción de la tibolona y el DPN donde se observó una pérdida significativa de la expresión de SOD (carriles 4 y 6) ($p < 0.01$ Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo), ($p < 0.01$ Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN) (Figura 16 A). Otro componente del sistema antioxidante evaluado en el modelo fue la enzima catalasa, en cual su función principal es la reducción del peróxido de hidrogeno en agua. Se observó una disminución significativa en la expresión de esta enzima en las células tratadas con la tibolona ($p < 0.001$, Pal vs Pal+Tibo) y DPN ($p < 0.01$, Pal vs Pal+DPN), respecto a las células expuestas al ácido palmítico; de igual forma el bloqueo con el antagonista del receptor de estrógeno beta ($p < 0.001$ PHTTP + Pal+Tibo vs + Pal+Tibo) presentó un

comportamiento similar a la condición de injuria (Figura 16 B). La tercera enzima evaluada fue la GPX-1 con el fin de observar su expresión para determinar los cambios en el modelo en la producción de peróxido de hidrogeno. Los resultados sugieren una cierta similitud y tendencia a los datos encontrados para la enzima catalasa, pero no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p= 0.1425$, Figura 16C), por lo que este resultado no fue concluyente.

Es conjunto estos resultados evidencian un claro efecto estrogénico de la tibolona asociado al RE β y confirman que el sistema antioxidante puede estar presente como mecanismo protector de la tibolona en el modelo inflamatorio inducido por ácido palmítico.

5.3.4.2 Determinación de proteínas asociadas al componente antioxidante mediante el tratamiento con tibolona y agonistas de los receptores de estrógenos

El efecto del estrés oxidativo por parte del modelo inflamatorio es evidente, razón por la cual en este estudio se exploraron otros componentes celulares sujetos a efectos oxidantes. El gran ambiente oxidante que se desarrolla al estimular con un exceso de ácido palmítico en las células microglia BV-2 tiene varias consecuencias que afectan diferentes componentes celulares (proteínas, ADN, lípidos, etc.). Para evidenciar esto, se diseñaron diferentes experimentos, e inicialmente se realizó una inmunocitoquímica contra el 8- hidroxiguanosina (8-OHdG), que es un marcador del daño oxidativo en el material genético. Los resultados muestran que las células expuestas al daño con ácido palmítico tenían una mayor expresión del 8-OHdG con respecto al control (Figuras 17 A-B). La estimulación con tibolona disminuye significativamente en un 40% la expresión de 8-OHdG (Figura 17C; $p<0.0001$, Pal vs Pal+Tibo). Este efecto también es imitado por el agonista del receptor de estrógeno beta (DPN) ($Pp<0.0001$, Pal vs Pal+Dpn) en el modelo (Figura 17D). Estos resultados demuestran el efecto protector que tiene la tibolona en el estrés oxidativo bajo un modelo inflamatorio y su posible mediación por la actividad del receptor de estrógeno beta.

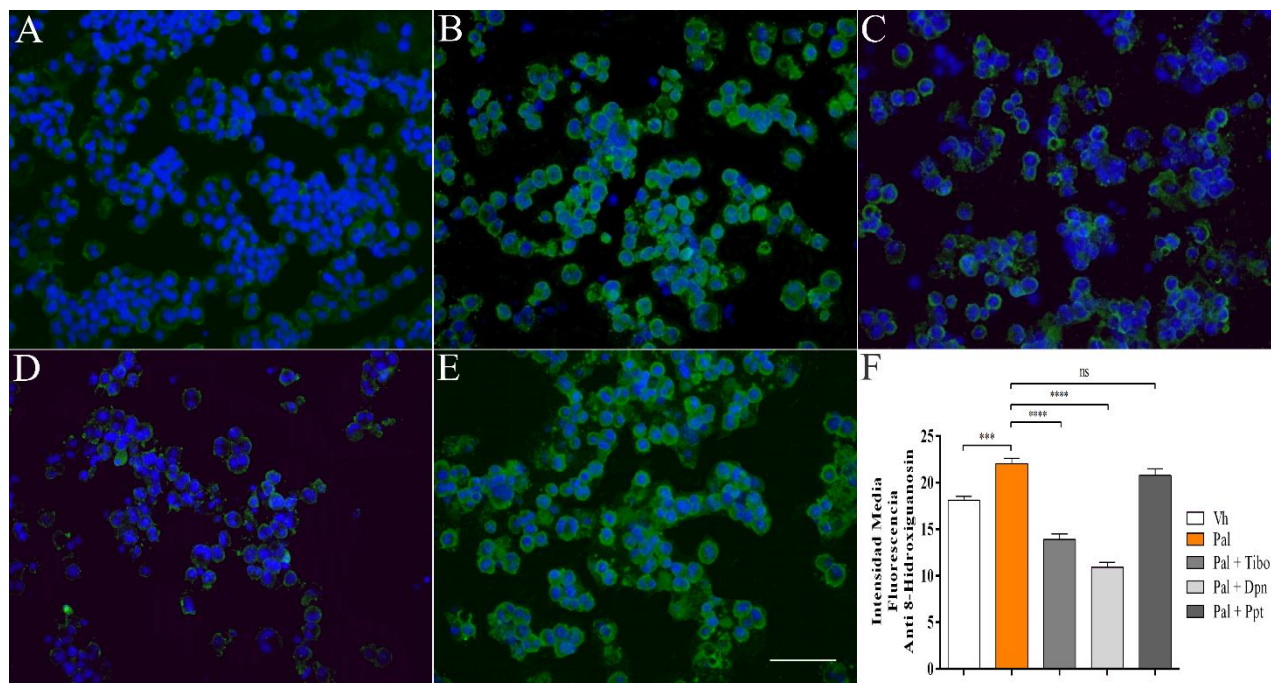


Figura 17. Efecto de la tibolona y agonista del RE β sobre la expresión del 8-Hidroxi-guanosina en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico La tibolona disminuyó la expresión del 8OHdG, con un efecto similar al presentado por el agonista de RE β **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal+Tibo, **D.** Pal+Dpn, **E.** Pal+Ppt. **F.** El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia con marcación de 8OHdG. Las células se fotografiaron en aumentos de 20x. Escala 20 μ m. ***($P < 0.001$ Vh vs Pal), *****($P < 0.0001$ Pal vs Pal+Tibo).

El efecto antioxidante de la tibolona y su actividad estrogénica asociado al RE β sigue estando presente en el mecanismo protector del modelo inflamatorio; sin embargo el daño oxidativo también puede tener efectos deletéreos sobre algunas proteínas y más aún si no solo se tiene un ambiente rico en especies reactivas de oxígeno (ERO) sino que también se presenta la producción de especies reactivas de nitrógeno (ERN); estas dos especies reaccionan formando radicales mucho más tóxicos y perjudiciales, que afectan significativamente la correcta funcionalidad celular.

Es por esta razón que paralelamente se exploró el daño oxidativo asociado al radical peroxinitrito (NOO^-). Para desarrollar estos ensayos se realizó inicialmente la cuantificación de nitritos orgánicos por la prueba del reactivo de griess, donde se observó un incremento significativo ($P < 0.0001$ Vh vs Pal) en las células expuestas al ácido palmítico respecto a la condición control (Figura 18).

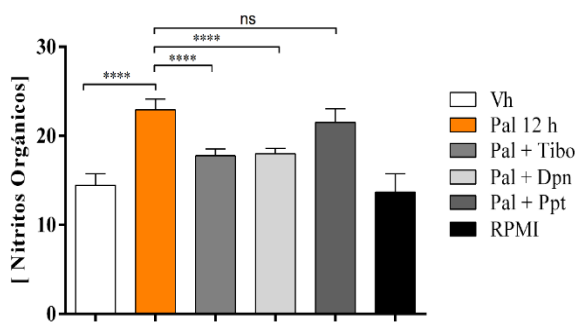


Figura 18. Efecto de la tibolona sobre la producción de nitritos bajo un daño con ácido palmítico. El tratamiento con la tibolona disminuyó significativamente los niveles de nitritos con respecto a las células expuestas al ácido palmítico. ****($P < 0.001$ Vh vs Pal), ($P < 0.0001$ Pal vs Pal+Tibo).

Al evaluar el papel de la tibolona en esta prueba se encontró que este tratamiento disminuyó significativamente ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+Tibo), la producción de nitritos (Figura 18). El efecto de la estimulación con el agonista del RE β presentó un resultado similar a la tibolona ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+Dpn), asociando una vez más la acción protectora al RE β .

La alta producción de nitritos (NO-NO $_2$) combinada con las elevadas concentraciones del ion superóxido que se presentan en el modelo celular, permiten la producción del radical

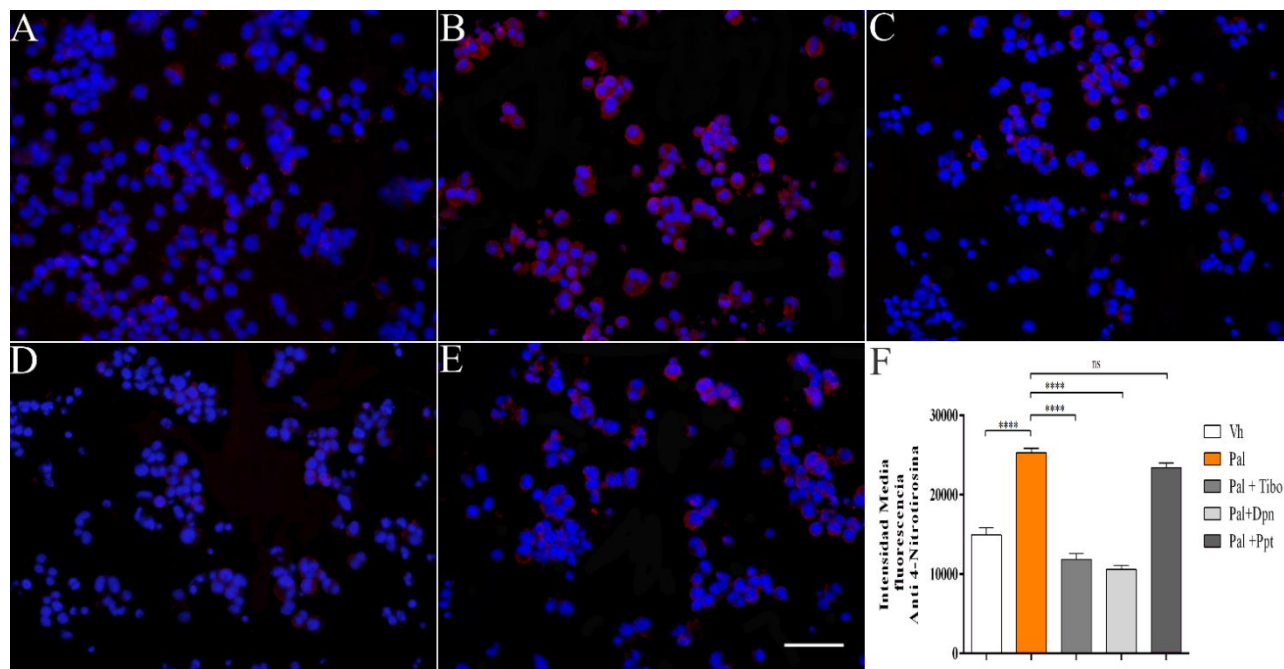


Figura 19. Efecto de la tibolona y agonista del RE β sobre la expresión del 3-Nitrotirosina en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico La tibolona disminuyó la expresión del 3-Nitrotirosina, con un efecto similar al presentado por el agonista de RE β . **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal+Tibo, **D.** Pal+Dpn, **E.** Pal+Ppt. **F.** El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia con marcación de 3-Nitrotirosina. Las células se fotografiaron en aumentos de 20x. Escala 20 μ m. ****($p < 0.0001$, Vh vs Pal), ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+Tibo), ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+DPN).

peroxinitrito, una especie altamente reactiva capaz de dañar la integridad proteica. A partir de esto se determinó por inmunocitoquímica la expresión del 3-Nitrotirosina, un marcador de proteínas nitradas como consecuencia de estas especies reactivas. Como se observa en la figura 19, con respecto a la condición control (Figura 19A), el ácido palmítico (Figura 19B) incrementa significativamente en un 50 % ($P < 0.0001$ Vh vs Pal) la expresión del 3-Nitrotirosina; por el contrario, el tratamiento con la tibolona disminuye significativamente en un 60% ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+Tibo) la expresión (Figura 19C).

Adicionalmente, las células tratadas con DPN presentaron un comportamiento similar a las tratadas con tibolona ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+DPN). Los resultados anteriores mostraron un efecto protector de la tibolona sobre el daño del material genético y las proteínas como consecuencia de un desbalance del estrés oxidativo generado por el exceso de ácido palmítico.

Otro de los componentes que se ve afectado por el incremento del estrés oxidativo son los lípidos, donde este proceso hace referencia a un incremento en la degradación oxidativa de los lípidos de membrana celular, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos. Para evaluar esto se realizó una inmucitoquímica contra el 4-hidroxynonenal (4-HNE) que identifica productos aldehícos de la peroxidación lipídica. Se encontró que en las células respecto a la condición control (Figura 20A) el ácido palmítico (Figura 20B) incrementa la expresión de 4-HNE significativamente ($p < 0.0001$, Vh vs Pal) en un 70%, y la tibolona disminuye la expresión de 4-HNE alrededor de un 50% ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+Tibo; Figura 20C). De igual manera se presenta una disminución significativa al estimular el receptor de estrógenos beta con su agonista ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+DPN; Figura 20D).

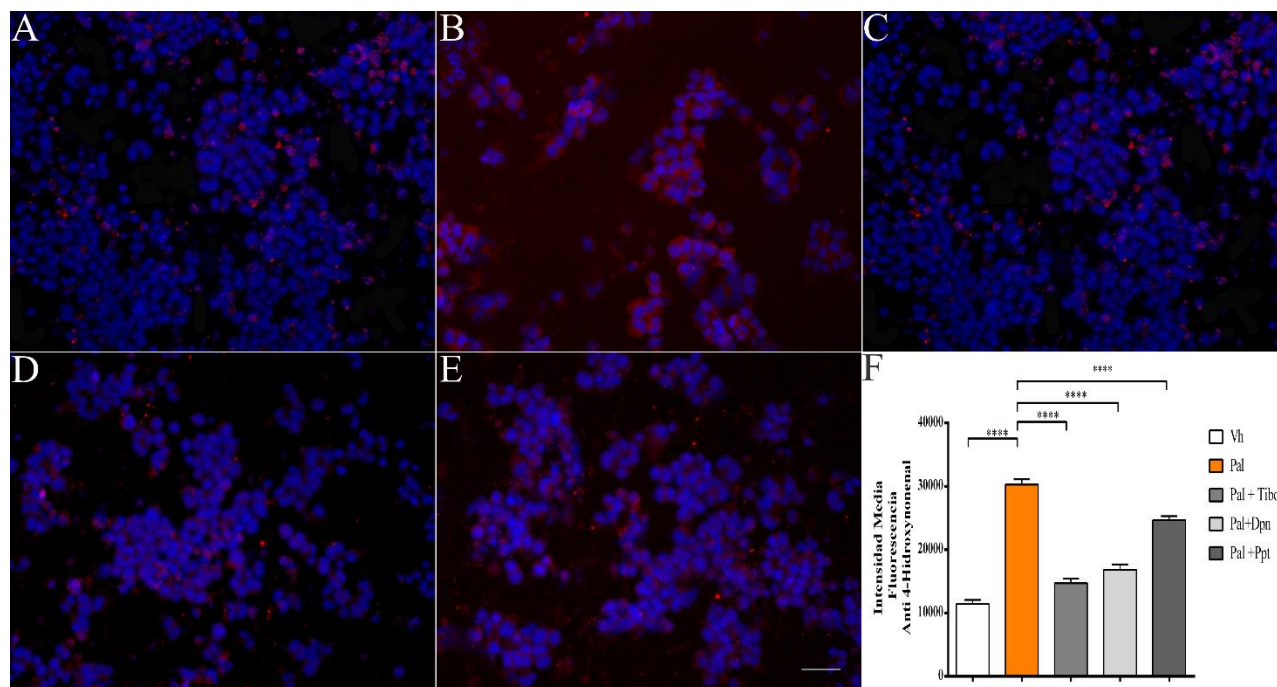


Figura 20. Expresión de 4-Hidroxy-nonenal en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico durante 12 horas y posterior estimulación con tibolona y agonistas de los receptores de estrógenos. La tibolona disminuyó la expresión del 4-HNE, con un efecto similar al presentado por el agonista de RE β . **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal+Tibo, **D.** Pal+Dpn, **E.** Pal+Ppt. **F.** El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia con marcación de 4-HNE. Las células se fotografiaron en aumentos de 20x. Escala 20 μ m. **** (p<0.0001, Vh vs Pal), (p<0.0001, Pal vs Pal+Tibo), (p<0.0001, Pal vs Pal+DPN).

El daño oxidativo puede afectar varios componentes celulares que incluyen el ADN, las proteínas y lípidos. En ese sentido, es posible que el mecanismo protector de la tibolona puede estar asociado a la expresión tanto de proteínas asociadas a mecanismos antioxidantes como a proteínas que disminuyen y regulan la producción de EROs. La literatura ha demostrado que proteínas como la neuroglobina tienen un potencial rol antioxidante y regulador de estrés oxidativo en células neuronales y gliales (Baez et al., 2016). Por tanto, hipotetizamos que la neuroglobina también podría intervenir en la disminución de estrés oxidativo en nuestro modelo.

5.3.4.3 Efecto de la tibolona sobre la expresión de la proteína neuroglobina en células sometidas al ácido palmítico y al bloqueo del receptor de estrógeno beta.

A continuación, evaluamos la expresión de la proteína neuroglobina en el modelo inflamatorio de ácido palmítico. También evaluamos el efecto del bloqueo del RE β para determinar si a nivel del modelo, este influía sobre la expresión de neuroglobina y el efecto de la tibolona. Inicialmente se evaluó la expresión de neuroglobina por medio de inmunofluorescencia en células estimuladas con tibolona después de ser sometidas a un insulto con ácido palmítico. Los resultados muestran que la expresión de la neuroglobina con respecto al control (Figura 21A) disminuye significativamente en un 30% en las células expuestas al palmitato ($p < 0.0001$, Vh vs Pal; Figura 21B).

La estimulación de las células con tibolona incrementa significativamente en un 50% ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+Tibo) la expresión de neuroglobina (Figura 21C), y este efecto también es imitado por el agonista DPN del RE β ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+DPN; Figura 21E). Por otro lado, el bloqueo del receptor de estrógeno beta disminuye significativamente un 35% la expresión de neuroglobina tanto en las células estimuladas con tibolona ($p < 0.01$, Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo; Figura 21D) como con el DPN ($p < 0.01$, Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN; Figura 21E).

Con el objeto de validar lo observado por inmunofluorescencia, se realizó la cuantificación de los niveles de expresión de neuroglobina en el modelo por medio de western blot. Para ello, las células fueron sometidas a las condiciones del modelo inflamatorio para su posterior lisado, y se encontró que el tratamiento con tibolona incrementa en un 25% los niveles de expresión de neuroglobina en relación a la condición de daño ($p < 0.01$, Pal vs Pal+Tibo), al igual que el tratamiento realizado con el agonista del RE β ($p < 0.01$, Pal vs Pal+DPN). Por otro lado, el bloqueo del RE β disminuye alrededor de un 10% la expresión de neuroglobina en las células tratadas con tibolona ($p < 0.01$, Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo; Figura 21H).

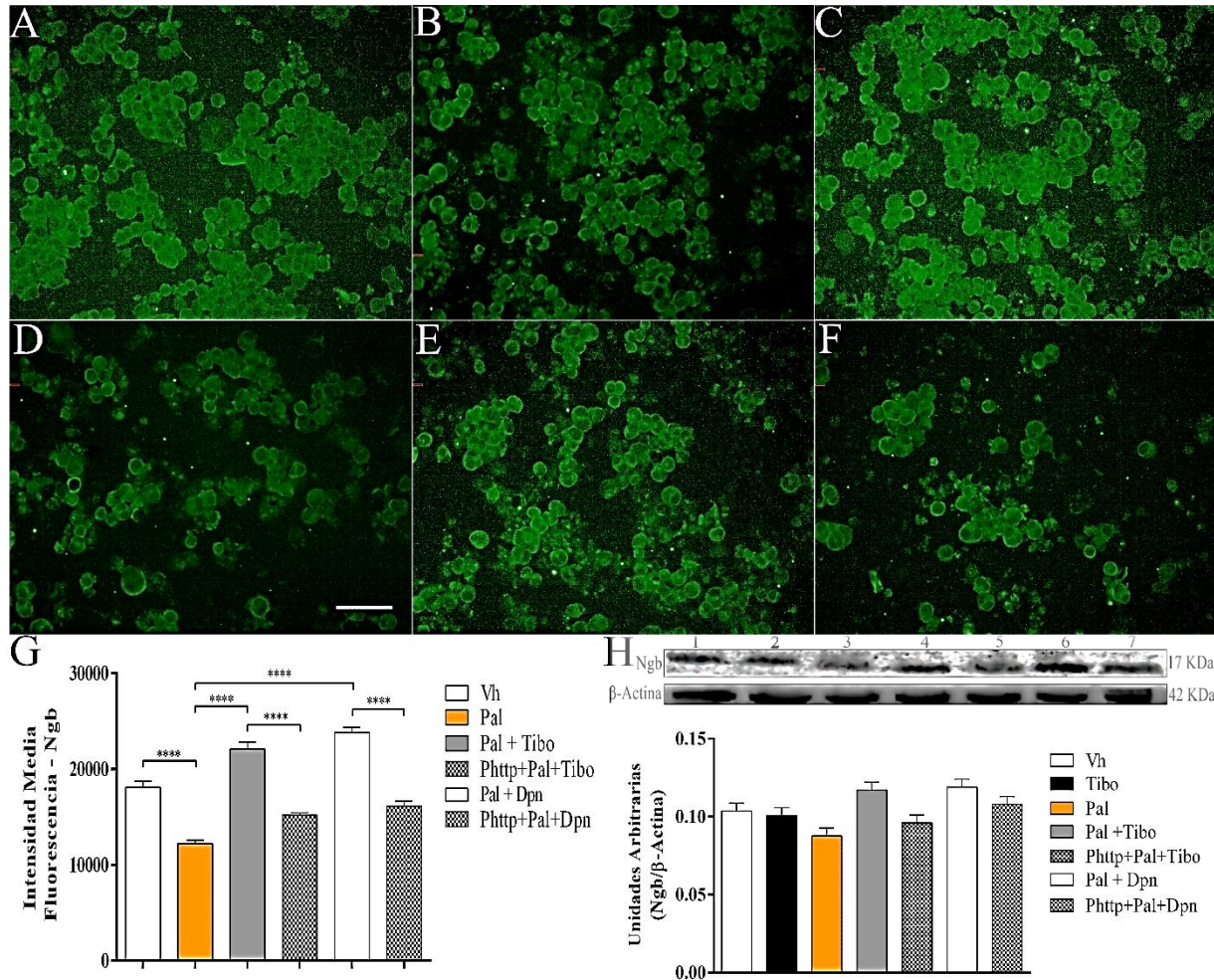


Figura 21. Expresión de neuroglobina en células BV-2 estimuladas con tibolona luego de ser sometidas a un daño con ácido palmítico. La tibolona aumentó la expresión de la Ngb, con un efecto similar al presentado por el agonista de RE β . **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal+Tibo, **D.** Phttp+ Pal+Dpn, **E.** Pal+Dpn. **F.** Phttp+Pal+Dpn, **G** El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia con marcación de Ngb. Las células se fotografiaron en aumentos de 20x. Escala 20 μ m. **H.** Cuantificación por western blot de la proteína Ngb bajo condiciones del modelo. Carriles Western Blot **1.** Vh, **2.** Pal, **3.** Pal+Tibo, **4.** Phttp+Pal+Tibo, **5.** Pal+DPN, **6.** Phttp+Pal+Dpn, **7.** Pal+PPT. **** (p<0.0001, Vh vs Pal), (p<0.0001, Pal vs Pal+Tibo), (p<0.0001, Pal vs Pal+DPN).

5.4. Efecto de la tibolona sobre el componente inflamatorio en células microglia bajo un insulto con ácido palmítico

5.4.1 Efecto de la tibolona sobre la expresión de citoquinas en el modelo inflamatorio de ácido palmítico

Diferentes estudios han demostrado que la actividad estrogénica está relacionada con la modulación de la expresión de citoquinas tanto en astrocitos como en microglía (Machacek, Panska, Dvorakova, & Horak, 2016) (Xiong et al., 2011). Con el objeto de profundizar en los mecanismos de acción de la tibolona y como justificación en demostrar el efecto estrogénico de la tibolona en nuestro modelo, se plantearon los siguientes experimentos.

Se determinó la secreción de un conjunto de citoquinas en el modelo inflamatorio de ácido palmítico. Para tal efecto se recolectaron los sobrenadantes celulares en las condiciones estudiadas y fueron analizados mediante un kit de detección de citoquinas. A partir de los resultados obtenidos en el conjunto de citoquinas evaluadas mediante el kit colorimétrico (técnica ELISA), sobresalieron la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Figuras 22 A,B,C) y la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Figura 22D). Es posible que las otras citoquinas no se tuvieran las concentraciones necesarias en el modelo para ser detectadas o que no están asociadas al modelo inflamatorio por ácidos grasos y estimulación por tibolona.

Al evaluar la cuantificación de las citoquinas pro-inflamatorias, se encontró que la exposición de las células microglia al ácido palmítico durante 12h incrementó significativamente los niveles de estas citoquinas. Para la IL-6 se observó un aumento considerable del 30% al compararla con el control (Figura 22 A). De igual manera, se destacan el TNF- α (Figuras 22 B) y la IL-1 β (Figuras 22 C). las cuales tuvieron un incremento superior al 50% en sus valores con respecto al control. Por el contrario, en las células estimuladas con la tibolona posterior al daño, se encontró una disminución del 15% en la expresión de IL-6, del 70 % en la TNF- α y del 50% en los niveles de IL-1 β

Para determinar si el efecto de la tibolona sobre la producción de citoquinas esta mediado por el receptor beta de estrógenos, utilizamos el antagonista del receptor de estrógenos β PHTTP. De

manera muy interesante se observó que la expresión de estas citoquinas aumentó en las células estimuladas con el PHTTP y tratadas con tibolona (IL-6, 50%) (TNF- α , 25%) (IL-1 β , 55%) . Estos resultados están en coherencia con lo observado en experimentos anteriores y sugieren una vez más que el mecanismo de la tibolona está asociado al receptor de estrógenos beta (Figuras 22

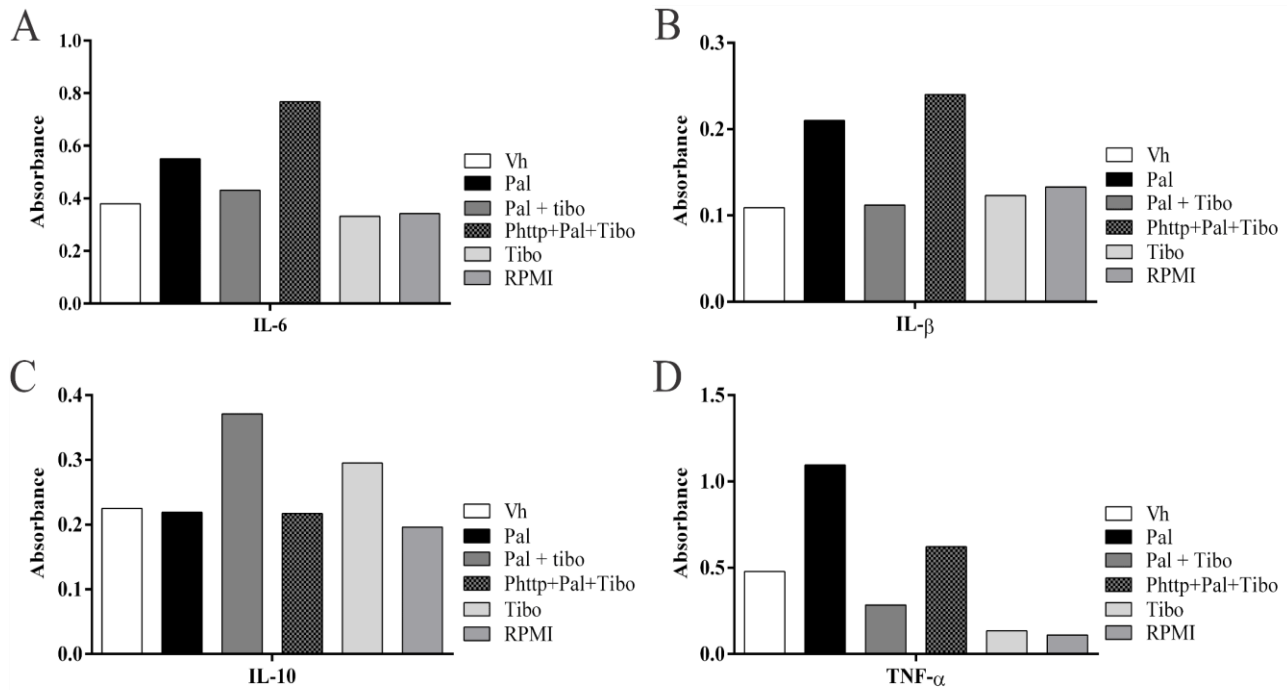


Figura 22. Efecto de la tibolona sobre el nivel de secreción de citoquinas en células expuestas al ácido palmítico. La tibolona disminuye la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y aumenta la citoquina anti-inflamatoria (IL-10). El bloqueo del receptor de estrógeno beta aumento los niveles de las citoquinas. **A.** IL-6, **B.** TNF α , **C.** IL-1 β , **D.** IL-10.

A-C).

De igual manera, en este experimento se encontró también que la estimulación con la tibolona incrementó en un 40 % los niveles de la citoquina IL-10, una citoquina anti-inflamatoria. Por otra parte, la concentración de esta citoquina en las células expuesta solo al ácido palmítico se encontró en bajos niveles, un efecto muy similar cuando tratamos las células con el antagonista del receptor beta de estrógenos (Figura 22D).

5.4.2. Efecto de la tibolona sobre la modulación de la subunidad p65 de factor de transcripción Kappa B (NF- κ B) y su translocación al núcleo

En continuación con el interés de estudiar el efecto del ácido palmítico y la estimulación con tibolona en la función inflamatoria, evaluamos la subunidad p65 del factor de transcripción Kappa B (NF- κ B) el cual está asociado con la activación de una de las vías inflamatorias más estudiadas, la vía NF- κ B.

Para determinar la expresión de la subunidad p65 se planteó inicialmente una inmunocitoquímica, con la cual se pretendía observar la translocación de esta subunidad al núcleo y el efecto de la tibolona sobre ella. Con respecto a la condición control (Figura 23A) se encontró un aumento de un 50% en la expresión de la subunidad p65 en el núcleo en células expuestas al ácido palmítico durante 12 h ($p < 0.0001$, Vh vs Pal; Figura 23B). Por otra parte, en las células tratadas con tibolona la expresión de la subunidad p65 en el núcleo se redujo significativamente en cerca de un 25% ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+Tibo; Figura 23C).

De igual manera se realizó una curva donde se evaluaron diferentes tiempos de exposición de las células al ácido palmítico y su correspondiente tratamiento con la tibolona (Figura 23D). Los resultados sugieren que la translocación de la subunidad p65 al núcleo aumenta de manera significativa con el incremento del tiempo. A partir de la 4h de insulto con palmítico, se observó como en las células estimuladas con la tibolona se disminuyó significativamente la translocación de la subunidad p65 al núcleo, un efecto de la tibolona que se evidenció hasta las 12h.

La figura 23 D muestra en conjunto los resultados de la curva de tiempo en la translocación de la subunidad p65 en las tres condiciones evaluadas en el modelo inflamatorio. Mediante análisis de co-localización se encontró en la condición control una menor co-localización de p65 y Hoescht (Figura 23F) al compararlo con la condición de injuria en donde se evidenció una mayor localización (95%) de la subunidad p65 en el núcleo (Figura 23G). En este análisis también se determinó que en células estimuladas con la tibolona (Figura 23H) se disminuyó cerca de un 40 % el porcentaje de co-localización entre la subunidad p65 y el Hoescht.

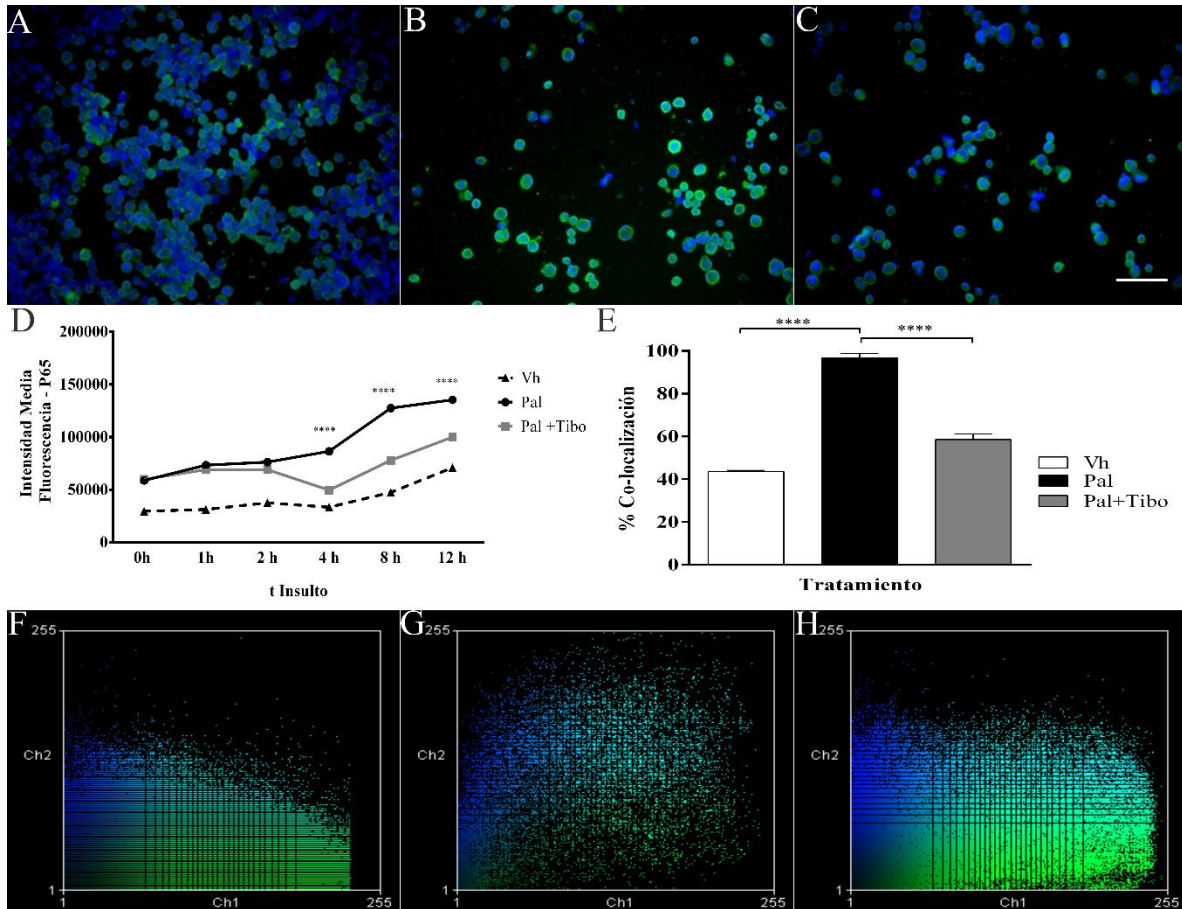


Figura 23. Efecto de la tibolona sobre la translocación de la subunidad p65 de factor de transcripción Kappa B. La tibolona a partir de la 4h de daño reduce la translocación de la subunidad p65 al núcleo. **A.** Vh, **B.** Pal, **C.** Pal+Tibo, **D.** Expresión de la unidad p65 a diferentes tiempos de exposición al ácido palmítico, **E.** Cuantificación del porcentaje de co-localización de p65 y Hoescht, **F.** Co-localización de p65 y Hoescht en Vh. **G.** Co-localización de p65 y Hoescht en Pal. **H.** Co-localización de p65 y Hoescht en Pal+Tibo. Las células se fotografiaron en aumento de 20x. Escala 20 μ m. *****($P < 0.0001$ Vh vs Pal), ($P < 0.0001$ Pal vs Pal+Tibo).

5.4.3. Efecto de la tibolona y la modulación de receptor de estrógeno beta sobre la expresión de la subunidad p65 del factor transcripción Kappa B.

Teniendo en cuenta el efecto de la tibolona sobre la expresión del factor de transcripción kB, disminuyendo su translocación al núcleo, se evaluó el mecanismo estrogénico de la tibolona sobre el receptor de estrógeno beta en relación a la subunidad p65 ante la estimulación con agonistas y antagonistas del Re β . Los resultados del modelo sugieren una asociación entre la actividad de la

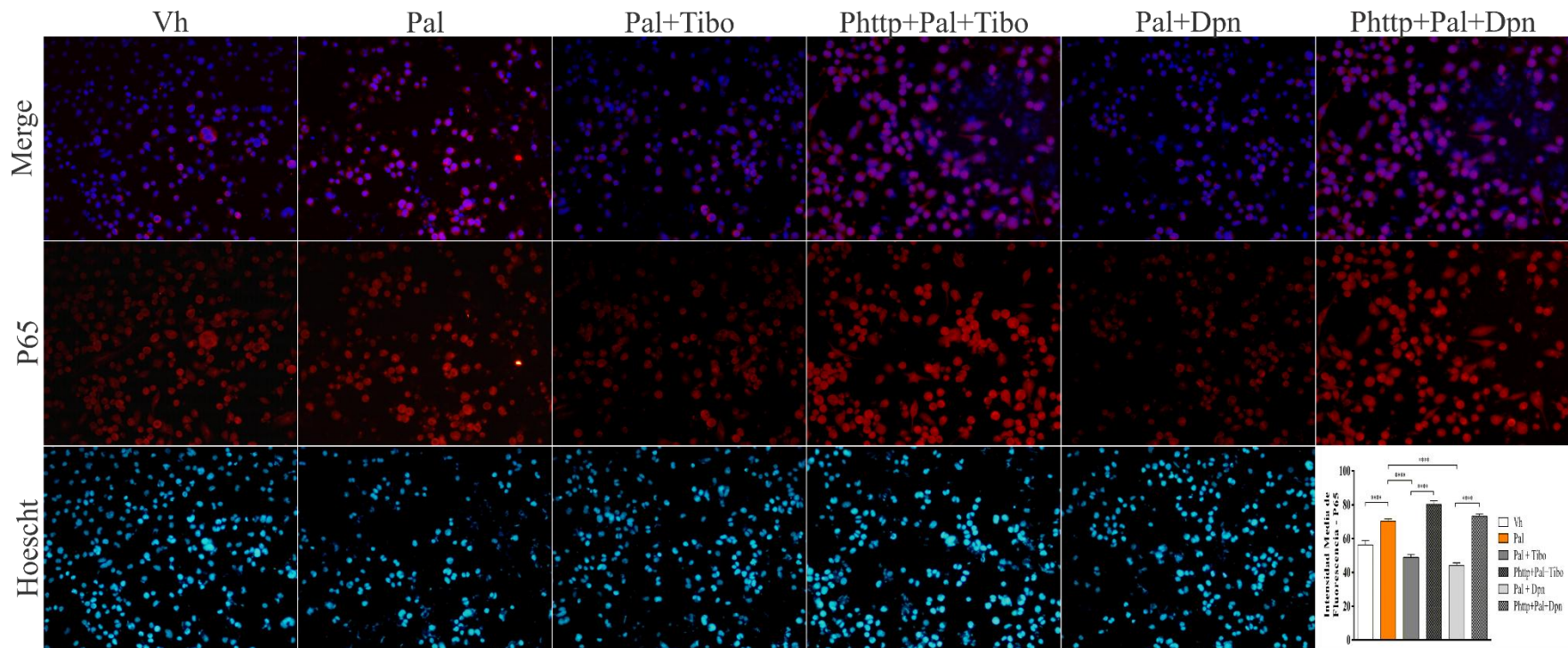


Figura 24. Efecto de la tibolona y del receptor de estrógeno beta sobre la expresión de la subunidad p65 de NF- κ B. El efecto del agonista de receptor de estrógeno beta (DPN) fue similar al efecto mostrado por la tibolona en el modelo, disminuyendo la expresión de la subunidad p65 ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+DPN; $p < 0.0001$, Pal vs Pal+Tibo). El bloqueo farmacológico del RE β incrementó la expresión de p65, inhibiendo significativamente el efecto de los tratamientos con la tibolona y el DPN **** ($p < 0.0001$, Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo) ($p < 0.0001$, Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN).

estrogénica con modulación de la expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción Kappa B (Figura 24).

Inicialmente se determinó por inmunofluorescencia el efecto del tratamiento con el agonista del receptor de estrógeno beta (DPN), y se observó una disminución significativa de la expresión de p65 ($P < 0.0001$ Pal vs Pal+DPN), con un comportamiento similar a las células expuestas a la tibolona ($p < 0.0001$, Pal vs Pal+Tibo). Al realizar el bloqueo del receptor beta de estrógenos se encontró un aumento significativo del 40% en la expresión de p65 para los tratamientos de la tibolona y DPN ($p < 0.0001$, Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo; $p < 0.0001$ Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN; Figura 24).

Para validar los resultados encontrados anteriormente, se realizó la cuantificación de la expresión de la subunidad p65 y una proteína reguladora que inhibe NF-kappa-B (IkB) mediante western blot, bajo las condiciones del modelo inflamatorio.

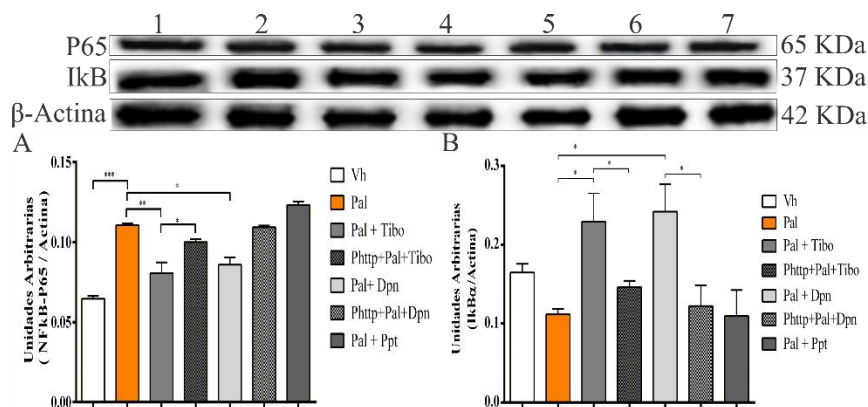


Figura 25. Efecto de la tibolona en la expresión de la subunidad p65 de NF- κ B e IkB en células sometidas a un modelo inflamatorio de ácido palmítico. Evaluación por western blot **A**. Cuantificación de la expresión de p65, **B**. Cuantificación de la expresión de IkB. Carriles Western Blot **1**. Vh, **2**. Pal, **3**. Pal+Tibo, **4**. Phhttp+Pal+Tibo, **5**. Pal+DPN, **6**. Phhttp+Pal+Dpn, **7**. Pal+PPT. ** ($p < 0.001$, Pal vs Pal+Tibo) * ($p < 0.01$, Pal vs Pal+DPN)

Se encontró que la tibolona redujo la expresión de p65 al igual que el tratamiento con el agonista del RE β con respecto a las células expuestas al ácido palmítico ($p < 0.001$, Pal vs Pal+Tibo; $p < 0.01$, Pal vs Pal+DPN; Figura 25A). En coherencia con los anteriores resultados, en los lisados de los tratamientos que fueron sometidos al bloqueo del receptor de estrógenos, la expresión de p65 aumentó significativamente en un 20% ($p < 0.01$, Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo; $p < 0.001$ Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN; Figura 25A). En cuanto a la

expresión de la proteína I κ B, en las células estimuladas con la tibolona y el DPN se observó una mayor expresión ($p < 0.01$, Pal vs Pal+Tibo; $p < 0.01$, Pal vs Pal+DPN). Por el contrario, la exposición al ácido palmítico redujo esta proteína ($p < 0.01$, Vh vs Pal; Figura 25B). De igual manera al ensayo anterior se evaluó el efecto de la tibolona y el DPN en células bajo un bloqueo farmacológico del RE β , y los resultados demuestran que la expresión de I κ B en estos tratamientos disminuyó significativamente ($p < 0.01$, Pal+Tibo vs PHTTP+Pal+Tibo; $p < 0.001$, Pal+DPN vs PHTTP+Pal+DPN; Figura 25B). Por lo tanto, estos resultados en conjunto sugieren que la regulación de esta vía inflamatoria puede estar mediada por la tibolona y su posible acción estrogénica a través del receptor de estrógeno beta.

6. DISCUSIÓN

6.1. Efecto del ácido palmítico sobre el modelo microglial

En la primera parte del estudio nuestro interés fue la caracterización del modelo inflamatorio y el efecto que pudiera presentar el palmitato sobre el mismo. Se recopiló evidencia en relación a la viabilidad, la condensación nuclear y el funcionamiento mitocondrial.

Como se mostró en resultados, fue evidente que el incremento de las concentraciones de palmitato representó una influencia sobre la viabilidad de las células BV-2 (Figura 1). El descenso en la viabilidad puede verse explicado tanto por desequilibrios metabólicos (en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria) como a la activación de vías de transducción de señales. De acuerdo a la caracterización de la viabilidad el mecanismo de muerte puede estar asociado a dos aspectos fundamentales: 1) el funcionamiento mitocondrial (evidenciado por la prueba MTT) y 2) alteraciones en conformación de la membrana celular y el núcleo (evidenciado en la prueba IP y de condensación nuclear) (Tracy et al., 2013). Por otro lado, con el objeto de describir más en detalle la disfunción mitocondrial, la evidencia presentada mostró que el palmitato incrementaba considerablemente la producción de especies reactivas de oxígeno lo cual puede ser consecuencia de desequilibrios antioxidantes y del descenso del ATP celular y mitocondrial. Lo anterior es asociado con los resultados presentados en cuanto que el radical superóxido y el radical peróxido se incrementaron por efecto deletéreo del palmitato (Haslund-Vinding, McBean, Jaquet, & Vilhardt, 2016).

El proceso de oxidación de ácidos grasos aumenta la proporción de acetilcoenzima A/coenzima A y NADH/NAD⁺ en la mitocondria, lo cual inactiva la enzima piruvato deshidrogenasa (Randle et al., 1963), que llevará a disminuir la síntesis de Acetil-CoA, causando la acumulación de citrato. Por su vez, la fosfofructocinasa, que es una enzima inhibida por el citrato, conllevará a un aumento de la glucosa-6-fosfato, y este aumento incrementará la síntesis de glucógeno y la inhibición de la hexocinasa, teniendo como resultado la disminución de la captación de glucosa (Gong et al., 2016). Un exceso de ácidos

grasos en la célula sugiere un inicio de una β -oxidación alterna para intentar equilibrar el metabolismo celular. El problema de este mecanismo es que no puede sostenerse de manera indefinida, por lo tanto, estos ácidos grasos entrarán en vías metabólicas alternativas desencadenando fallos en diferentes compartimientos celulares (Biagini et al., 2012). La literatura sugiere algunas vías que pueden afectarse por esta desregulación metabólica. Por ejemplo, el incremento de la actividad de la Serina palmitoil transferasa aumentando la condensación de la palmitoil coenzima A y Serina para formar dihidroesfingosina, como el primer paso para la síntesis de novo de ceramida, la formación excesiva de ceramida junto con una baja expresión de la molécula antiapoptótica Bcl2 contribuyen al inicio procesos apoptóticos celulares (Unger, 2002). La acumulación de metabolitos derivados de la síntesis de ceramida y otros derivados del catabolismo de los AG desencadena una red de señalización entre el retículo endoplasmático, el núcleo celular y la mitocondria (Lei et al., 2016). La mitocondria es el principal compartimento celular afectado por los ácidos grasos, donde el aumento de la β -oxidación mitocondrial, la inducción del citocromo P450 y la infiltración leucocitaria tienen como consecuencia la generación de estrés oxidativo y radicales libres de nitrógeno (Susin, Zamzami, & Kroemer, 1998). Nuestros resultados demuestran que la acumulación crónica de eventos perjudiciales sobre el núcleo, membrana y mitocondria desembocó en un descenso significativo de la viabilidad celular a las 12 horas en donde cerca del 50% de la población celular fue afectada. Por tanto, a partir del efecto evidenciado por la concentración de palmitato en el modelo, nos encaminamos a dilucidar el mecanismo de muerte de las células BV-2 y su relación con la respuesta inflamatoria.

6.2. Efecto de la tibolona sobre la respuesta de las células BV-2 al ácido palmítico

Uno de los objetivos planteados en el presente estudio establece anteponer a la condición de daño una estrategia hormonal sintética para revertir los efectos deletéreos del palmitato sobre el modelo. La literatura actual describe a los efectores estrogénicos como el estradiol como moléculas con función anti-inflamatoria y pro-supervivencia (Bowling et al., 2014). Sin embargo, el espectro terapéutico de las moléculas estrogénicas es limitado por ser también

potenciales promotores de enfermedades vasculares y cáncer en diferentes tejidos blanco (Gajulapalli, Malisetty, Chitta, & Manavathi, 2016). El desarrollo de moléculas estrogénicas selectivas como los SERM y los STEAR han permitido abrir las fronteras terapéuticas de las vías estrogénicas ante diferentes tipos de injuria. La tibolona es una molécula de la familia de los STEAR que fue seleccionada por ser una potencial molécula que tiene blanco sobre los receptores de estrógeno, andrógeno y progestágeno (Gambacciani & Levancini, 2014). Esta molécula ha sido estudiada en los últimos 20 años y se han descrito interesantes efectos protectores en modelos *in vivo* e *in vitro* (Formoso et al., 2016).

Para el caso de nuestro estudio la tibolona demostró tener un efecto protector sobre la viabilidad en condiciones posteriores a la injuria de palmitato, aspecto que resulta ser muy prometedor en términos terapéuticos. La protección de la tibolona en nuestro modelo se extiende a la protección y estabilidad de la membrana celular (efectos protectores significativos en la prueba de IP), a la disminución de la fragmentación nuclear (lo cual es un indicativo anti-apoptótico) y a proteger la función mitocondrial mediante la disminución de la producción de especies reactivas y preservando la masa mitocondrial.

La función mitocondrial está determinada por la actividad de la cadena de transporte de electrones, cuya función radica en la salida de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, cuya función final es la de establecer un potencial electroquímico que será utilizado para la síntesis de ATP (Turakulov Ia, Gainutdinov, Salikhov, Gizatullina, & Lavina, 1976). Una falla en este potencial indica la ausencia de metabolitos energéticos necesarios para la síntesis de NADH o FADH₂ que son utilizados como donadores en la cadena de transporte (Beauvoit & Rigoulet, 2001). El comportamiento del potencial de membrana mitocondrial durante el daño suministró información valiosa sobre la viabilidad celular. Los datos evidenciaron que el potencial comienza a alterarse significativamente a partir de las 6 horas de inicio del daño (Figura 3), manteniendo este comportamiento hasta 12 horas (máximo tiempo evaluado). El primer tiempo evaluado fue de 3h de insulto y en este no se encontró una pérdida significativa del potencial de membrana. Esto podría ser explicado debido a la alteración metabólica, que conlleva un incremento de la producción de ATP por parte de la mitocondria, y paralelamente esta desregulación aumenta la producción de especies

reactivas, y esto coincide con lo observado en el incremento de las especies reactivas de oxígeno (Linsinger, Wilhelm, Wagner, & Hacker, 1999).

La red mitocondrial es un compartimiento crítico para la supervivencia celular y el desarrollo, debido su gran función como lo es la proporción de la energía celular. Es un actor principal en la producción de especies reactivas y regula la muerte celular apoptótica (Kuznetsov, Margreiter et al. 2011, Perry, Norman et al. 2011). Un daño metabólico afecta directamente la función mitocondrial (Susin et al., 1998), interfiriendo con la cadena de transporte de electrones y contribuyendo con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la generación de ATP. Por tanto, hipotetizamos que los efectos protectores de la tibolona podrían explicarse debido al mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial. Los resultados mostraron que la tibolona preservaba el potencial de membrana mitocondrial en células bajo estímulo con ácido palmítico (Figura 9). Además, los resultados mostraron una reducción de la fragmentación nuclear en células sometidas a daño, lo cual fue un indicativo de que los procesos apoptóticos iniciados por la disminución crítica de energía fueron atenuados por el tratamiento con tibolona (Figura 6). La tibolona demostró ser por tanto una molécula promisoría para nuestro modelo, sobre la cual planteamos diversas hipótesis acerca de su mecanismo de acción sobre el modelo inflamatorio.

6.3 Mecanismo de acción de la tibolona sobre el modelo inflamatorio con palmitato

La modulación de la activación microglial es un proceso fundamental para la mediación de procesos inflamatorios frente a diferentes condiciones degenerativas o de daño que permite la recuperación del tejido neuronal (Perry et al., 2010). De igual manera, como se ha descrito anteriormente en condiciones de daño como la obesidad (ácidos grasos libres), se presenta un incremento en los procesos neuroinflamatorios al igual que una disminución significativa en los niveles de estrógenos. Estas alteraciones en los niveles de estrógenos pueden desregular el metabolismo de estos ácidos grasos contribuyendo a la ganancia de peso, como también a aumentar la susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Es por ello que se ha buscado una terapia de suplementación estrogénica evaluando una gran cantidad

de moléculas se logren disminuir o modular de alguna manera la reactividad celular cerebral (Bhardwaj et al., 2015), entre estos compuestos se encuentran moléculas que presenta una acción estrogénica protectora en el tejido nervioso como el estradiol, los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) y los reguladores de la actividad estrogénica tejido específica (STEAR) (Hill, Crider, & Hill, 2016) (Barreto et al., 2009).

Los resultados de este estudio encontraron que la tibolona mejora significativamente la viabilidad celular, reduce la producción de especies reactivas y preserva la funcionalidad mitocondrial, así como que también mantiene la integridad del material genético y protege proteínas sujetas a un alto estrés oxidativo en células microglia BV-2 expuestas al ácido palmítico. De acuerdo a lo descrito por Kloobstoer, el metabolismo de la tibolona origina metabolitos secundarios que son efectores de los receptores de estrógeno, andrógeno y progestágeno (Kloosterboer, 2004b). Particularmente los metabolitos de efecto estrogénico son los más representativos en la respuesta de la tibolona (Escande et al., 2009). La actividad estrogénica de los metabolitos de la tibolona podrían explicar varias de estas funciones protectoras, y más aún como se ha demostrado en este estudio en donde la actividad de la tibolona ha sido muy similar a la acción del agonista del RE β (DPN). Una gran cantidad de investigaciones han reportado que tanto la activación del RE α como el RE β contribuyen en mecanismos neuroprotectores en el tejido cerebral (Garcia-Segura et al., 1999) (Tskitishvili et al., 2017) (Borahay et al., 2016). Los receptores desencadenan la activación de diferentes factores de transcripción asociados a algunas vías de señalización, a partir de su mecanismo genómico como no genómico (Huang et al., 2015), además tienen un rol fundamental en la regulación de la respuesta neuroinflamatoria en el sistema nervioso (Govind & Thampan, 2003). Se ha encontrado que la activación del RE β participa en la actividad protectora de moléculas como el estradiol frente a una variedad de daños como la hipoxia, la privación de glucosa, el estrés oxidativo y la toxicidad por péptidos beta amiloide (De Marinis et al., 2013) (Avila-Rodriguez et al., 2016). Estos reportes están en concordancia con nuestros resultados en donde la actividad estrogénica de la tibolona protege la viabilidad celular, la función mitocondrial y redujo el estrés oxidativo de las células en el modelo inflamatorio. El agonista del receptor beta de estrógenos imitó de manera muy similar el efecto protector de la tibolona (Figura 11-15). Al evaluar la acción del agonista del receptor alfa no presentó ningún efecto

sobre los parámetros evaluados del modelo. Adicionalmente, el tratamiento con PHTTP (antagonista del receptor de estrógeno beta) redujo en un 60 % (Figura 12A) el efecto protector de la tibolona, así como también el efecto del DPN, sugiriendo la acción de la tibolona sobre el RE β . El efecto de la acción del RE α no fue significativo en el modelo en estudio, siendo el efecto de la tibolona más pronunciado al activarse el RE β . Diferentes estudios han demostrado en células gliales que bajo condiciones de daño como la hipoxia y la privación de glucosa incrementan la expresión del RE β en el núcleo como también en diversos compartimientos celulares como la mitocondria (Al-Bader, Malatiali, & Redzic, 2011). Otros estudios han observado una pérdida del potencial de membrana mitocondrial en neuronas primarias hipocámpales las cuales presentaban un silenciamiento (*knockout*) del RE β (Rzemieniec et al., 2015). Para el caso de nuestro estudio, los resultados sugieren que los efectos de la tibolona se desarrollan sobre el receptor beta, principalmente porque la línea BV-2 expresa predominantemente este receptor (ver evidencia en la expresión por Western Blot Figura 13

Debido a que los metabolitos producto del metabolismo de la tibolona también ejercen efectos sobre los receptores de andrógeno y progestágenos, hipotetizamos la posibilidad de detectar un efecto sobre estos receptores. Sin embargo, según la evidencia encontrada no hay una participación activa de estos receptores sobre el efecto de la tibolona en el modelo (Figura 14). Compilada esta evidencia, emulamos la actividad del receptor beta sobre los parámetros descritos anteriormente, observándose que el efecto protector sobre la viabilidad y la función mitocondrial está ligada a la activación del receptor beta en el modelo (Figura 15).

La tibolona preserva la viabilidad de las células en el modelo estimulado por palmitato, por otro lado, disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno (tanto la fracción de peróxido como la de superóxido) y protege el funcionamiento de la mitocondria mediante la conservación del potencial de membrana y masa mitocondrial. Parte de estas respuestas son explicadas en la literatura en otros modelos. Por ejemplo, Ávila y colaboradores (Avila Rodriguez et al., 2014), (Simpkins & Dykens, 2008) demostraron que en un modelo astrocitario de privación de glucosa estimulado por tibolona, las células exhibían características similares de protección disminuyendo la producción de ROS y la condensación

nuclear y preservando el potencial de membrana mitocondrial. En ese mismo estudio se demostró que los efectos protectores de la tibolona estaban asociados a la activación selectiva del receptor de estrógeno beta.

6.4. Respuesta del modelo estimulado con tibolona en la expresión de proteínas de efecto antioxidante

En principio evaluamos la expresión de las proteínas SOD, catalasa y GPX-1 a nivel basal, bajo estímulo con palmitato y tratadas con tibolona observándose una expresión significativa de SOD en respuesta a la estimulación con tibolona (Figura 16). SOD es una enzima mutasa que inicia la reorganización de los átomos en una molécula y su función primaria es convertir al radical libre superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno, un radical libre menos dañino (Ishihara, Takemoto, Itoh, Ishida, & Yamazaki, 2015). Entre los radicales libres, el superóxido es el más tóxico y peligroso (Javed, Azimullah, Abul Khair, Ojha, & Haque, 2016), que tiende a reequilibrarse así mismo rápidamente creando más superóxidos con el potencial de causar mucho más daño. La especie reactiva de oxígeno ha sido asociada con toda clase de enfermedades degenerativas, artritis, cáncer, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (O. Hwang, 2013). Así como también actualmente es aceptado en la literatura la fuerte relación de la producción de especies reactivas de oxígeno y el desarrollo de efectos inflamatorios en las células particularmente los astrocitos y la microglía (Yuan et al., 2014).

Varios estudios demuestran por otro lado la relación entre el incremento de la producción de EROs en modelos estimulados con palmitato (Tracy et al., 2013) (Little, Madeira, & Klegeris, 2012). Nosotros por primera vez demostramos en nuestro modelo estimulado por palmitato que la tibolona tiene la capacidad de disminuir el desbalance oxidante mediante la expresión significativa de la enzima SOD, lo cual potencialmente puede repercutir en una disminución de la respuesta inflamatoria como es demostrado por modelos similares (Maloney et al., 2009) (Michalska, Wolf, Walther, & Newsholme, 2010).

Una vez determinada la participación de la enzima SOD, hipotetizamos que las EROs producidas también podrían afectar otros componentes celulares como el núcleo y los lípidos y que esta afectación deletérea podría terminar afectando la viabilidad y desencadenando efectos

inflamatorios en nuestro modelo (L. Wang et al., 2015). Por tanto, evaluamos el daño en el ADN, los lípidos y las proteínas celulares. El 8-OHdG es una forma oxidada de la guanina y es considerada como el mayor inductor de daño oxidativo al ADN, que causa mutaciones de transversión de A:T a C:C o G:C a T:A, debido a su apareamiento con adenina o citosina (Kroese & Scheffer, 2014; Valavanidis, Vlachogianni, & Fiotakis, 2009). Por un lado, estas concentraciones elevadas podrían implicar una mayor exposición a especies reactivas de nitrógeno, mientras que por el otro podría indicar la presencia de un sistema de reparación completa del ADN que ha sido capaz de mitigar el daño (Moslemnezhad, Mahjoub, & Moghadasi, 2016). De manera interesante, hallamos que el palmitato incrementaba significativamente el daño en los ácidos nucleicos como un daño colateral asociado al incremento de EROs derivado del exceso de palmitato. La tibolona pudo revertir los efectos de la hidroxilación en el material genético, probablemente el aumento en la expresión de la enzima SOD y su capacidad de reducir la producción de las especies reactivas de oxígeno responsables de estos procesos oxidativos podrían explicarlo. Lo anterior es apoyado por nuestros resultados y la literatura (Sobocanec et al., 2015). La evidencia suministrada demostró que el modelo inflamatorio incrementó el daño en el ADN, el cual fue disminuido mediante el uso de la tibolona y el agonista del receptor de estrógeno beta DPN (Figura 17).

El efecto antioxidante de la tibolona y su actividad estrogénica asociado al RE β sigue estando presente en el mecanismo protector del modelo inflamatorio; sin embargo, el daño por otras especies también puede tener efectos deletéreos sobre algunas proteínas. Las especies reactivas de nitrógeno también tienen un papel importante en los procesos inflamatorios. El óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir de la L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (S. Shi et al., 2016). La isoforma óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se ha identificado en diferentes tipos celulares del sistema nervioso como astrocitos, microglía, neuronas, células del músculo liso y endotelio vascular (Abbasi Habashi, Sabouni, Moghimi, & Ansari Majd, 2016). La actividad de esta enzima está determinada por mediadores inflamatorios, provocando incrementos significativos en la concentración de NO que contribuyen de forma importante a la progresión del daño cerebral (Yadav, Rai, & Singh, 2016). El NO producido en grandes cantidades reacciona con el ión O $_2^-$, dando como producto el anión peroxinitrito (ONOO $^-$), que presenta una alta capacidad oxidante, produciendo entre

otros efectos peroxidación lipídica, nitración de grupos tirosina, oxidación y nitrosilación de grupos sulfidrilo y rotura del ADN (Scheschowitsch, de Moraes, Sordi, Barja-Fidalgo, & Assreuy, 2015). El NO también inhibe enzimas antioxidantes como el glutatión peroxidasa y la citocromo c oxidasa que se encuentra a nivel mitocondrial, alterando la cadena respiratoria (Blum et al., 2015). La inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial hace que se reduzca la producción de ATP (Hurtado et al; 2007).

Partiendo de lo anterior se exploró el daño asociado al radical peroxinitrito (NOO^\cdot), en este estudio se encontró un incremento en la concentración de nitritos orgánicos por parte de la estimulación con ácido palmítico a partir de su cuantificación por la prueba de Griess, al evaluar el papel de la tibolona en esta prueba se encontró que este tratamiento disminuyó significativamente la producción de esta especie reactiva (Figura 18), de igual manera el tratamiento con el agonista del $\text{RE}\beta$ presentó un resultado similar a la tibolona, asociando la acción protectora al $\text{RE}\beta$. Al encontrar una alta producción de NO y teniendo en cuenta también las altas concentraciones de ion superóxido que se presentan en las células expuestas al ácido palmítico, se sugiere la presencia del radical peroxinitrito, una especie altamente reactiva capaz de dañar la integridad proteica (Scheschowitsch et al., 2015), para evaluar esto se determinó la expresión del 3-Nitrotirosina, un marcador de proteínas nitradas, en el cual la incorporación del grupo nitro al anillo fenólico de la tirosina produce cambios en ciertas propiedades del aminoácido (Batthyany et al., 2016). Como consecuencias de la nitración de tirosina, pueden presentarse tres efectos principales sobre la función de las proteínas, 1. Que no ocurran efectos en la función de la proteína, 2. Que ocurra una pérdida de función y 3. Que se presente una ganancia de función. Un ejemplo es la inactivación de la MnSOD por nitración de un residuo de tirosina clave de la misma (Radi, 2013). El ácido palmítico incrementó la expresión del 3-Nitrotirosina (Figura 19B), y el tratamiento con la tibolona disminuye significativamente la expresión (Figura 19C), las células tratadas con DPN presentaron un comportamiento similar a las tratadas con tibolona, la disminución de la presencia de proteínas que contienen 3- nitrotirosina por parte de la tibolona resulta convirtiendo a esta molécula, como una potencial estrategia terapéutica en varias patologías cerebrales.

Otro de los componentes que se ve afectado por el incremento del estrés oxidativo son los lípidos, este proceso hace referencia a un incremento en la degradación oxidativa de los

lípidos de membrana celular, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos. Para evaluar esto se realizó una inmucitoquímica contra el 4-hidroxynonenal (4-HNE) que identifica productos aldehícos de la peroxidación lipídica, nuestros resultados muestran que en las células sometidas al ácido palmítico la expresión de 4-HNE incrementa significativamente respecto a la condición control (Figura 20 A-B), la tibolona disminuye la expresión de 4-HNE alrededor de un 50 % (Figura 20C), de igual manera se presenta una disminución significativa al estimular el receptor de estrógenos beta con su agonista.

Para nuestro modelo fue evidente que la tibolona tiene una alta capacidad antioxidante que le permite a la célula disminuir la producción de ROS y por otro lado mostrar menos afectación por parte de estas especies al ADN, las membranas y las proteínas, cada uno de estos componentes es vital para el funcionamiento celular.

6.4.1 Efecto de la tibolona sobre la expresión de la proteína neuroglobina en células sometidas a ácido palmítico

Los resultados del estudio han encontrado el papel protector de la tibolona sobre el estrés oxidativo, cuando redujo los niveles de especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, así como también evitando un daño sobre el material genético y algunas modificaciones proteicas que contribuyen a la protección celular como consecuencia del daño con ácido palmítico. También se observó una asociación entre el mecanismo de la tibolona con la activación del receptor de estrógeno beta determinado a través del tratamiento farmacológico con agonistas y antagonistas del receptor. Estudios recientes han descrito que la proteína neuroglobina podría contribuir al mecanismo protector sobre el estrés oxidativo y además está regulada por la activación del RE β (Avila-Rodriguez et al., 2016), una proteína reportada con una acción protectora tanto células glía como también en neuronas (Baez et al., 2016) (De Marinis et al., 2013)

Debido a estas características particulares, se quiso determinar la posibilidad de que la neuroglobina estuviera involucrada en las funciones protectoras de la tibolona en células del

modelo inflamatorio (Ascenzi et al., 2016). Los resultados encontrados mostraron una pérdida significativa en la expresión de Ngb 1 en la células sometidas al ácido palmítico con respecto al control, pero por el contrario el tratamiento con tibolona incremento la expresión de neuroglobina posterior al daño. Teniendo en cuenta anteriores resultados y algunas de las funciones de la neuroglobina como la participación en la desintoxicación celular, la inhibición de la apoptosis y el mejoramiento de la funcionalidad mitocondrial (Sandhir, 2014), así como también su capacidad de detectar y almacenar oxígeno y actuar como un efector en la transducción de señales (Burmester & Hankeln, 2004), se podría sugerir la participación activa de la neuroglobina en el efecto de la tibolona sobre la reducción del estrés oxidativo en el modelo. Investigaciones previas han determinado que la neuroglobina tiene la potencialidad de ser una molécula señalizadora de hipoxia, eliminadora de radicales libres o con capacidad NADH oxidasa que permite sostener el glicólisis anaerobio (Anselmi, Brunori, Vallone, & Di Nola, 2007)). Adicionalmente, experimentos de fotoactivación de NADH/FMN que inducen un estado reductor en la neuroglobina, sugieren que esta proteína participa en la eliminación de radicales de oxígeno, principalmente mediante una reacción con el óxido nítrico NO formando radical peroxinitrito y estabilizándose en nitrito (Hua, Antao, Corbett, & Witting, 2010). El anterior mecanismo sugiere un rol protector de la neuroglobina en la regulación de especies muy reactivas como lo es el peroxinitrito (DellaValle, Hempel, Kurtzhals, & Penkowa, 2010). Otros estudios extienden la función de la neuroglobina con la neuroinflamación, en modelos de astrocitos primarios estimulados con lipopolisacáridos LPS o en modelos *in vivo* posterior al daño cerebral, los niveles de neuroglobina se incrementan significativamente (De Marinis et al., 2013).

El efecto protector de la tibolona lo hemos asociado a la activación del receptor de estrógeno beta, al evaluar la expresión de la Ngb 1 en células tratadas con el agonista del RE β se evidencio un comportamiento similar a la tibolona, por el contrario, el bloqueo con el antagonista del RE β redujo significativamente la expresión de la neuroglobina en los tratamientos con la tibolona y con el DPN. Este hallazgo sugiere que la tibolona incrementa la expresión de la neuroglobina por un mecanismo que involucra el RE β . Reciente evidencia indica que la neuroglobina interactúa tanto con el canal dependiente de voltaje VDAC y la

proteína Cyc1 en el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Yu, Zhang et al. 2015). Esta última evidencia podría explicar que una modificación en la expresión de neuroglobina interferiría directamente con la función mitocondrial. Además, De Marinis y colaboradores demostraron que la regulación al alta de neuroglobina secuestra el citocromo c (en un modelo de inducción de apoptosis por peróxido de hidrógeno) en células de neuroblastoma (De Marinis et al., 2013). Futuros experimentos *in vivo* se requieren para confirmar los hallazgos presentados en esta parte del estudio. Por otro lado, también es necesario determinar si el mecanismo protector mediado por la relación ER β /Ngb1 inducido por la tibolona involucra efectos directos de estas moléculas en la mitocondria.

6.5 Respuesta inflamatoria del modelo a la estimulación con palmitato y tratamiento con tibolona

El desarrollo de procesos inflamatorios como consecuencia de lesiones traumáticas o desordenes metabólicos entre otras, condicionan la respuesta celular frente a la condición del daño. Algunos de los componentes celulares del sistema nervioso como los astrocitos y la microglia tienen la capacidad de ejercer respuestas inflamatorias que incluyen la secreción de citoquinas, quemoquinas, activación de factores de transcripción, factores de crecimiento y moléculas moduladoras como las caspasas, NLRP3 y Aim2 (Garedeu et al., 2010; Heese et al., 1997). Por lo tanto, la modulación de esta respuesta inflamatoria podría contribuir a mejoras muchos de estas problemáticas (Leszek et al., 2016). La permeabilidad de la barrera hematoencefalica por parte de los ácidos grasos libres y el reconocimiento de estos por el componente celular del sistema nervioso desencadenan la activación de factores inflamatorios (Sandu et al., 2015). La degradación metabólica de estos ácidos grasos comprende la alteración de las funciones celulares, provocando cambios en el metabolismo que finalizan con la desregulación de procesos metabólicos y la producción de moléculas tóxicas para la célula, que exacerban aún más el proceso inflamatorio (Unger, 2002). La microglia es la célula encargada en gran parte de regular estos procesos inflamatorios en el sistema nervioso, su actividad inmunológica permite modular su respuesta a través de su espectro de activación (Perry et al., 2010), por un lado aumentando la secreción de mediadores inflamatorios que

incrementaran a un más el daño (Lanussa et al., 2016), así como también la secreción de moléculas anti-inflamatorias, esta condición es dependiente del ambiente cerebral, el tipo y alcance de la estimulación, la distribución espacio-temporal y el envejecimiento (Ganter et al., 1992). La respuesta inflamatoria puede ser modulada por diversos factores o moléculas, entre las que se encuentran las hormonas esteroideas, como el estradiol o los SERM (Arevalo et al., 2015). Diversas investigaciones han demostrado como la respuesta estrogénica está implicada en la regulación de la inflamación (Corrigan et al., 2016). En nuestros resultados encontramos como la tibolona tiene un efecto sobre la secreción de mediadores inflamatorios como las citoquinas a través de la activación de la respuesta estrogénica. En las células insultadas con el ácido palmítico se evidenció un incremento en las concentraciones de Interleuquinas 1 β (IL-1 β) y 6 (IL-6), como también del factor de necrosis tumoral (TNF- α), estos resultados son coherentes con lo reportados anteriormente por (Tracy et al., 2013), donde encontraron que el ácido palmítico en células microglia aumentaba los niveles de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como también reportaron un aumento en la producción y secreción de estas citoquinas. Con relación a nuestros resultados, observamos que la tibolona redujo significativamente las concentraciones de citoquinas. En las células estimuladas con el antagonista y posterior tratamiento con la tibolona se incrementó notablemente la concentración de estas tres citoquinas, sugiriendo que la respuesta estrogénica regula los procesos inflamatorios. Estudios en astrocitos han demostrado que la estimulación con SERM disminuyó la secreción de citoquinas como la IL-6, IP-10 y el TNF α , disminuyendo la reactividad astrocitaria indicando el papel regulador de la actividad estrogénica sobre la inflamación (Guida & Stewart, 1998) (Arevalo et al., 2012). Por otra parte evaluamos la secreción de la interleuquina 10 (IL-10) una citoquina reportada con una acción anti-inflamatoria (Zhu, Chen, Liu, Peng, & Qiu, 2015), Encontramos que ante el insulto con palmitato sus niveles son inferiores con respecto a la condición control, pero por el contrario en la células estimuladas con la tibolona se observó un aumento muy marcado en producción de esta citoquina, y el bloqueo del RE β inhibe notablemente el efecto de la tibolona sobre el modelo inflamatorio. Ladeboer y colaboradores reportaron que la IL-10 secretada por la microglia activa modula la respuesta inflamatoria, como también inhibe la expresión de la IL-1 β (Ledeboer et al., 2002). Otros estudios encontraron que la IL-10 juega un papel crucial en

la regulación inflamatoria y la respuesta inmune del sistema nervioso central, a través de su regulación después de varios insultos como la excitotoxicidad y lesión traumática cerebral (Villacampa et al., 2015). En conjunto estos resultados podrían dilucidar el efecto protector que tiene la tibolona y su actividad estrogenica sobre los procesos inflamatorios. Nuestros resultados sugieren que el ácido palmítico puede activar la microglia a un estado pro-inflamatorio, además de un aumento significativo de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). Partiendo de lo anterior quisimos indagar acerca del mecanismo de señalización intracelular que precede a la liberación de estos mediadores inflamatorios en la microglia activa, por lo que se determinó evaluar la expresión del factor de transcripción Kappa B (NF- κ B) y su translocación al núcleo.

La activación de NF- κ B es una de las vías más importantes en la regulación de la expresión génica pro-inflamatoria. Se ha reportado que una variedad de señales puede activar esta vía (Pesce et al., 2017), como las que involucran citoquinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α o relacionadas con agentes infecciosos como el LPS (Bittencourt-Mernak et al., 2016; Khan et al., 2016), de igual manera también puede ser activado por eventos relacionados con el daño celular como estrés oxidativo o un aumento en los niveles de calcio citoplasmático (Lv et al., 2016).

Varios estudios han demostrado que la estimulación con el ácido palmítico desencadenan la activación de este factor de transcripción en células microglia, mediada por la unión a los receptores TLR y más específicamente al TLR 4 (Unger, 2002), dando lugar a la producción de mediadores pro-inflamatorios (Z. Wang et al., 2012). De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio, se observó en una curva de tiempo como la exposición de las células al ácido palmítico incremento la expresión y la translocación de la sub unidad p65 del NF- κ B al núcleo, lo que indica que el factor de transcripción Kappa B (NF- κ B) pudiera ser el efector que activara la respuesta inflamatoria en nuestro modelo. Al evaluar el efecto de la tibolona sobre la expresión de P65 se encontró que esta disminuía la translocación nuclear de NF- κ B a partir de la 4 hora de daño con palmitato (Figura 23 F), sugiriendo que la tibolona actúa como

una molécula anti-inflamatoria que a su vez participa en la modulación de la secreción de citoquinas.

La acción estrogénica de la tibolona asociada a la activación del receptor beta de estrógenos redujo la expresión de factores inflamatorios (citoquinas). De igual manera se demostró que el factor de transcripción Kappa B está implicado en regulación de la respuesta inflamatoria en el modelo, por lo que se determinó si esta expresión de p65 también estaba modulada por la activación del RE β . Para ello en nuestro estudio evidencio que el bloqueo del RE β aumento la expresión de p65; inhibiendo notablemente la acción de la tibolona. Por otro lado se encontró que el tratamiento con el DPN presento un comportamiento similar a la tibolona en cuanto a la expresión de la sub unidad p65; por su vez, al momento de bloquear con el antagonista del RE β la acción del DPN también fue inhibida. Estos resultados se apoyan en la reportado por Frasor y colaboradores que describieron una asociación entre los RE y NF-kB planteando que pueden reprimirse entre sí (Frasor et al., 2009). De igual manera, Biswas y colaboradores describen que mientras se han observado efectos anti-inflamatorios de la activación de los RE, también se ha dilucidado un efecto no clásico y no genómico de la activación de los receptores de estrógeno que inhibe la activación de NF-kB y su respuesta inflamatoria, sugiriendo que moléculas que se unan a los RE y bloqueen selectivamente la activación de NF-kB podrían tener un potencial efecto terapéutico (Biswas, Singh, Shi, Pardee, & Iglehart, 2005).

7. CONCLUSIONES

- La caracterización del modelo inflamatorio de ácido palmítico permitió establecer un curso temporal de los principales eventos que ocurren durante el daño metabólico, con el principal objeto de intervenir en los aspectos más críticos, permitiendo evaluar la protección hormonal.
- El mecanismo de acción de la tibolona favorece la supervivencia microglial mediante la disminución de especies reactivas de oxígeno, reducción de la condensación nuclear y sostenimiento de la función mitocondrial en el modelo.
- El efecto protector de la tibolona está asociado al receptor de estrógeno beta. Este estudio sugiere que el mecanismo de protección frente al daño metabólico con ácido palmítico está más vinculado a la acción estrogénica de la tibolona sobre el receptor de estrógeno beta.
- La tibolona pueden modular la expresión de proteínas responsables del estrés oxidativo, lo cual puede explicar la reducción del daño oxidativo y la preservación de la función mitocondrial.
- La tibolona disminuye la secreción de citoquinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β) y aumentan la secreción de la citoquina IL-10 (anti-inflamatoria) en las células sometidas a daño metabólico. De igual manera disminuye la translocación de la subunidad p65 del factor de transcripción kappa B (NF κ B), lo cual sugiere una posible relación entre la actividad estrogénica de la tibolona y el mecanismo protector sobre el proceso inflamatorio.
- Las células microgliales BV-2 expresan neuroglobina, y su expresión se ve aumentada cuando las células son tratadas con tibolona.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abbasi Habashi, S., Sabouni, F., Moghimi, A., & Ansari Majd, S. (2016). Modulation of Lipopolysaccharide Stimulated Nuclear Factor kappa B Mediated iNOS/NO Production by Bromelain in Rat Primary Microglial Cells. *Iran Biomed J*, 20(1), 33-40.
- Al-Bader, M. D., Malatiali, S. A., & Redzic, Z. B. (2011). Expression of estrogen receptor alpha and beta in rat astrocytes in primary culture: effects of hypoxia and glucose deprivation. *Physiol Res*, 60(6), 951-960.
- Alvarado-Garcia, A., Hernandez-Quijano, T., Hernandez-Valencia, M., Negrin-Perez, M. C., Rios-Castillo, B., Valencia-Perez, G. U., . . . Montano-Uscanga, A. (2015). [Clinical practice guideline. Diagnosis and treatment of postmenopausal and perimenopausal]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 53(2), 214-225.
- Amor, S., Peferoen, L. A., Vogel, D. Y., Breur, M., van der Valk, P., Baker, D., & van Noort, J. M. (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology*, 142(2), 151-166. doi: 10.1111/imm.12233
- Amri, F., Ghouili, I., Amri, M., Carrier, A., & Masmoudi-Kouki, O. (2016). Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptotic cell death. *J Neurochem*. doi: 10.1111/jnc.13876
- Anitua, E., Pascual, C., Perez-Gonzalez, R., Orive, G., & Carro, E. (2015). Intranasal PRGF-Endoret enhances neuronal survival and attenuates NF-kappaB-dependent inflammation process in a mouse model of Parkinson's disease. *J Control Release*, 203, 170-180. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.02.030
- Anselmi, M., Brunori, M., Vallone, B., & Di Nola, A. (2007). Molecular dynamics simulation of deoxy and carboxy murine neuroglobin in water. *Biophys J*, 93(2), 434-441. doi: 10.1529/biophysj.106.099648
- Arevalo, M. A., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci*, 16(1), 17-29. doi: 10.1038/nrn3856
- Arevalo, M. A., Diz-Chaves, Y., Santos-Galindo, M., Bellini, M. J., & Garcia-Segura, L. M. (2012). Selective oestrogen receptor modulators decrease the inflammatory response of glial cells. *J Neuroendocrinol*, 24(1), 183-190. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02156.x
- Arevalo, M. A., Santos-Galindo, M., Acas-Fonseca, E., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2013). Gonadal hormones and the control of reactive gliosis. *Horm Behav*, 63(2), 216-221. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.021
- Arnold, S., Victor, M. B., & Beyer, C. (2012). Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 131(1-2), 2-9. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.01.012
- Ascenzi, P., di Masi, A., Leboffe, L., Fiocchetti, M., Nuzzo, M. T., Brunori, M., & Marino, M. (2016). Neuroglobin: From structure to function in health and disease. *Mol Aspects Med*. doi: 10.1016/j.mam.2016.10.004
- Audy, M. C., Vacher, P., & Duly, B. (1996). 17 beta-estradiol stimulates a rapid Ca²⁺ influx in LNCaP human prostate cancer cells. *Eur J Endocrinol*, 135(3), 367-373.

- Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., Hidalgo-Lanussa, O., Baez, E., Gonzalez, J., & Barreto, G. E. (2016). Tibolone protects astrocytic cells from glucose deprivation through a mechanism involving estrogen receptor beta and the upregulation of neuroglobin expression. *Mol Cell Endocrinol*, *433*, 35-46. doi: 10.1016/j.mce.2016.05.024
- Avila Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., Cabezas, R., Torrente, D., Capani, F., Gonzalez, J., & Barreto, G. E. (2014). Tibolone protects T98G cells from glucose deprivation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *144 Pt B*, 294-303. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.07.009
- Baez, E., Echeverria, V., Cabezas, R., Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., & Barreto, G. E. (2016). Protection by Neuroglobin Expression in Brain Pathologies. *Front Neurol*, *7*, 146. doi: 10.3389/fneur.2016.00146
- Barger, S. W., Chavis, J. A., & Drew, P. D. (2000). Dehydroepiandrosterone inhibits microglial nitric oxide production in a stimulus-specific manner. *J Neurosci Res*, *62*(4), 503-509.
- Barnard, N. D., Bunner, A. E., & Agarwal, U. (2014). Saturated and trans fats and dementia: a systematic review. *Neurobiol Aging*, *35 Suppl 2*, S65-73. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.030
- Barreto, G., Santos-Galindo, M., Diz-Chaves, Y., Pernia, O., Carrero, P., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2009). Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured brain: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones. *Endocrinology*, *150*(11), 5010-5015. doi: 10.1210/en.2009-0352
- Barreto, G., Veiga, S., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L. M., & Garcia-Ovejero, D. (2007). Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *Eur J Neurosci*, *25*(10), 3039-3046. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05563.x
- Batthyany, C., Bartesaghi, S., Mastrogiovanni, M., Lima, A., Demicheli, V., & Radi, R. (2016). Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. *Antioxid Redox Signal*. doi: 10.1089/ars.2016.6787
- Baulieu, E. E., & Robel, P. (1995). Non-genomic mechanisms of action of steroid hormones. *Ciba Found Symp*, *191*, 24-37; discussion 37-42.
- Baulieu, E. E., Robel, P., & Schumacher, M. (2001). Neurosteroids: beginning of the story. *Int Rev Neurobiol*, *46*, 1-32.
- Beauvoit, B., & Rigoulet, M. (2001). Regulation of cytochrome c oxidase by adenylic nucleotides. Is oxidative phosphorylation feedback regulated by its end-products? *IUBMB Life*, *52*(3-5), 143-152. doi: 10.1080/152165401317316545
- Begin, M. E., Plourde, M., Pifferi, F., & Cunnane, S. C. (2010). What Is the Link between Docosahexaenoic Acid, Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease in the Elderly? In J. P. Montmayeur & J. le Coutre (Eds.), *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. Boca Raton (FL).
- Beltran-Campos, V., Diaz-Ruiz, A., Padilla-Gomez, E., Aguilar Zavala, H., Rios, C., & Diaz Cintra, S. (2015). Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus. *Neurologia*, *30*(7), 401-406. doi: 10.1016/j.nrl.2014.03.002
- Bessesen, D. H., Cox-York, K. A., Hernandez, T. L., Erickson, C. B., Wang, H., Jackman, M. R., & Van Pelt, R. E. (2015). Postprandial triglycerides and adipose tissue storage of

- dietary fatty acids: impact of menopause and estradiol. *Obesity (Silver Spring)*, 23(1), 145-153. doi: 10.1002/oby.20935
- Bhardwaj, P., Du, B., Zhou, X. K., Sue, E., Giri, D., Harbus, M. D., . . . Dannenberg, A. J. (2015). Estrogen Protects against Obesity-Induced Mammary Gland Inflammation in Mice. *Cancer Prev Res (Phila)*, 8(8), 751-759. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0082
- Biagini, G., Marinelli, C., Panuccio, G., Puia, G., & Avoli, M. (2012). Glia-Neuron Interactions: Neurosteroids and Epileptogenesis. In J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen & A. V. Delgado-Escueta (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (4th ed.). Bethesda (MD).
- Biswas, D. K., Singh, S., Shi, Q., Pardee, A. B., & Iglehart, J. D. (2005). Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Sci STKE*, 2005(288), pe27. doi: 10.1126/stke.2882005pe27
- Bittencourt-Mernak, M. I., Pinheiro, N. M., Santana, F. P., Guerreiro, M. P., Saraiva-Romanholo, B. M., Grecco, S. S., . . . Prado, C. M. (2016). Prophylactic and therapeutic treatment with flavonone sakuranetin ameliorates LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, ajplung 00444 02015. doi: 10.1152/ajplung.00444.2015
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., & Bistoni, F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol*, 27(2-3), 229-237.
- Blum, A., Ginat-Maimon, L., Yehuda, H., Geron, N., Ben Ami, M., & Tamir, S. (2015). Inhibition of inflammation may enhance nitric oxide availability in patients undergoing bariatric surgery for weight loss. *J Intern Med*, 278(4), 401-409. doi: 10.1111/joim.12379
- Borahay, M. A., Asoglu, M. R., Mas, A., Adam, S., Kilic, G. S., & Al-Hendy, A. (2016). Estrogen Receptors and Signaling in Fibroids: Role in Pathobiology and Therapeutic Implications. *Reprod Sci*. doi: 10.1177/1933719116678686
- Bowling, M. R., Xing, D., Kapadia, A., Chen, Y. F., Szalai, A. J., Oparil, S., & Hage, F. G. (2014). Estrogen effects on vascular inflammation are age dependent: role of estrogen receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(7), 1477-1485. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303629
- Broe, G. A., Grayson, D. A., Creasey, H. M., Waite, L. M., Casey, B. J., Bennett, H. P., . . . Halliday, G. M. (2000). Anti-inflammatory drugs protect against Alzheimer disease at low doses. *Arch Neurol*, 57(11), 1586-1591.
- Bruce-Keller, A. J., Keeling, J. L., Keller, J. N., Huang, F. F., Camondola, S., & Mattson, M. P. (2000). Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*, 141(10), 3646-3656. doi: 10.1210/endo.141.10.7693
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., . . . Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652), 753-758. doi: 10.1038/39645
- Burmester, T., & Hankeln, T. (2004). Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News Physiol Sci*, 19, 110-113.

- Cardona-Gomez, G. P., Mendez, P., DonCarlos, L. L., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2001). Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Brain Res Rev*, *37*(1-3), 320-334.
- Carswell, H. V., Macrae, I. M., Gallagher, L., Harrop, E., & Horsburgh, K. J. (2004). Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *287*(4), H1501-1504. doi: 10.1152/ajpheart.00227.2004
- Castello-Porcar, A. M., & Martinez-Jabaloyas, J. M. (2016). Testosterone/estradiol ratio, is it useful in the diagnosis of erectile dysfunction and low sexual desire? *Aging Male*, 1-5. doi: 10.1080/13685538.2016.1253672
- Catalano, S., Giordano, C., Panza, S., Chemi, F., Bonofiglio, D., Lanzino, M., . . . Barone, I. (2014). Tamoxifen through GPER upregulates aromatase expression: a novel mechanism sustaining tamoxifen-resistant breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res Treat*, *146*(2), 273-285. doi: 10.1007/s10549-014-3017-4
- Colombo, D., Ferraboschi, P., Franchini, L., Nishino, H., Takayasu, J., & Tokuda, H. (2008). Anti-tumor-Promoting activity of tibolone and its metabolites. *Arzneimittelforschung*, *58*(2), 86-90. doi: 10.1055/s-0031-1296473
- Colton, C. A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, *4*(4), 399-418. doi: 10.1007/s11481-009-9164-4
- Combs, C. K., Bates, P., Karlo, J. C., & Landreth, G. E. (2001). Regulation of beta-amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Neurochem Int*, *39*(5-6), 449-457.
- Corrigan, F., Mander, K. A., Leonard, A. V., & Vink, R. (2016). Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation*, *13*(1), 264. doi: 10.1186/s12974-016-0738-9
- Crespi, E., Bottai, G., & Santarpia, L. (2016). Role of inflammation in obesity-related breast cancer. *Curr Opin Pharmacol*, *31*, 114-122. doi: 10.1016/j.coph.2016.11.004
- Cuenca-Lopez, M. D., Brea, D., Segura, T., Galindo, M. F., Anton-Martinez, D., Agulla, J., . . . Jordan, J. (2010). [Inflammation as a therapeutic agent in cerebral infarction: cellular inflammatory response and inflammatory mediators]. *Rev Neurol*, *50*(6), 349-359.
- Cheng, H. Y., Hung, S. H., & Chu, P. J. (2016). Rescue from Sexually Dimorphic Neuronal Cell Death by Estradiol and PI3 Kinase Activity. *Cell Mol Neurobiol*, *36*(5), 767-775. doi: 10.1007/s10571-015-0259-6
- Das, U. N. (2001). Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition*, *17*(11-12), 953-966.
- de Gooyer, M. E., Kleyn, G. T., Smits, K. C., Ederveen, A. G., Verheul, H. A., & Kloosterboer, H. J. (2001). Tibolone: a compound with tissue specific inhibitory effects on sulfatase. *Mol Cell Endocrinol*, *183*(1-2), 55-62.
- De Marinis, E., Acaz-Fonseca, E., Arevalo, M. A., Ascenzi, P., Fiocchetti, M., Marino, M., & Garcia-Segura, L. M. (2013). 17beta-Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor beta-mediated neuroglobin up-regulation. *J Neuroendocrinol*, *25*(3), 260-270. doi: 10.1111/jne.12007
- De Zwaan, M., Mitchell, J. E., Howell, L. M., Monson, N., Swan-Kremeier, L., Roerig, J. L., . . . Crosby, R. D. (2002). Two measures of health-related quality of life in morbid obesity. *Obes Res*, *10*(11), 1143-1151. doi: 10.1038/oby.2002.155

- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., . . . Meissner, W. G. (2015). Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol*, *14*(8), 855-866. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00006-X
- DellaValle, B., Hempel, C., Kurtzhals, J. A., & Penkowa, M. (2010). In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury, cerebral malaria, and autoimmune encephalitis. *Glia*, *58*(10), 1220-1227. doi: 10.1002/glia.21002
- Deshpande, R., Khalili, H., Pergolizzi, R. G., Michael, S. D., & Chang, M. D. (1997). Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol*, *38*(1), 46-54.
- Diep, C. H., Ahrendt, H., & Lange, C. A. (2016). Progesterone induces progesterone receptor gene (PGR) expression via rapid activation of protein kinase pathways required for cooperative estrogen receptor alpha (ER) and progesterone receptor (PR) genomic action at ER/PR target genes. *Steroids*, *114*, 48-58. doi: 10.1016/j.steroids.2016.09.004
- Drew, P. D., Chavis, J. A., & Bhatt, R. (2003). Sex steroid regulation of microglial cell activation: relevance to multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, *1007*, 329-334.
- Dubrovsky, B. (2006). Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacol Biochem Behav*, *84*(4), 644-655. doi: 10.1016/j.pbb.2006.06.016
- Eikelenboom, P., & van Gool, W. A. (2004). Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, *111*(3), 281-294. doi: 10.1007/s00702-003-0055-1
- El Akoum, S., Lamontagne, V., Cloutier, I., & Tanguay, J. F. (2011). Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. *Diabetol Metab Syndr*, *3*, 34. doi: 10.1186/1758-5996-3-34
- Engler-Chiurazzi, E. B., Brown, C. M., Povroznik, J. M., & Simpkins, J. W. (2016). Estrogens as neuroprotectants: Estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. *Prog Neurobiol*. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.12.008
- Escande, A., Servant, N., Rabenoelina, F., Auzou, G., Kloosterboer, H., Cavailles, V., . . . Maudelonde, T. (2009). Regulation of activities of steroid hormone receptors by tibolone and its primary metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *116*(1-2), 8-14. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.03.008
- Fan, R., Yu, T., Lin, J. L., Ren, G. D., Li, Y., Liao, X. X., . . . Jiang, C. H. (2016). Remote ischemic preconditioning improves post resuscitation cerebral function via overexpressing neuroglobin after cardiac arrest in rats. *Brain Res*, *1648*(Pt A), 345-355. doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.002
- Farlow, M. R., Andreasen, N., Riviere, M. E., Vostiar, I., Vitaliti, A., Sovago, J., . . . Graf, A. (2015). Long-term treatment with active Abeta immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, *7*(1), 23. doi: 10.1186/s13195-015-0108-3
- Feng, L., Li, W., Liu, Y., Jiang, W. D., Kuang, S. Y., Jiang, J., . . . Zhou, X. Q. (2016). Protective role of phenylalanine on the ROS-induced oxidative damage, apoptosis and tight junction damage via Nrf2, TOR and NF-kappaB signalling molecules in the gill of fish. *Fish Shellfish Immunol*. doi: 10.1016/j.fsi.2016.11.048

- Fernandez-Quintela, A., Churrua, I., & Portillo, M. P. (2007). The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr*, *10*(10A), 1126-1131. doi: 10.1017/S1368980007000602
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., . . . Sczufca, M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, *366*(9503), 2112-2117. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67889-0
- Formoso, G., Perrone, E., Maltoni, S., Balduzzi, S., Wilkinson, J., Basevi, V., . . . Maestri, E. (2016). Short-term and long-term effects of tibolone in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*, *10*, CD008536. doi: 10.1002/14651858.CD008536.pub3
- Frasor, J., Weaver, A., Pradhan, M., Dai, Y., Miller, L. D., Lin, C. Y., & Stanculescu, A. (2009). Positive cross-talk between estrogen receptor and NF-kappaB in breast cancer. *Cancer Res*, *69*(23), 8918-8925. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2608
- Fujita, H., Tanaka, J., Toku, K., Tateishi, N., Suzuki, Y., Matsuda, S., . . . Maeda, N. (1996). Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. *Glia*, *18*(4), 269-281.
- Fumagalli, S., Perego, C., Pischiutta, F., Zanier, E. R., & De Simoni, M. G. (2015). The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front Neurol*, *6*, 81. doi: 10.3389/fneur.2015.00081
- Gajulapalli, V. N., Malisetty, V. L., Chitta, S. K., & Manavathi, B. (2016). Estrogen receptor negativity in breast cancer: A cause or consequence? *Biosci Rep*. doi: 10.1042/BSR20160228
- Gambacciani, M., & Levancini, M. (2014). Hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Prz Menopauzalny*, *13*(4), 213-220. doi: 10.5114/pm.2014.44996
- Ganter, S., Northoff, H., Mannel, D., & Gebicke-Harter, P. J. (1992). Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res*, *33*(2), 218-230. doi: 10.1002/jnr.490330205
- Garcia-Segura, L. M., Naftolin, F., Hutchison, J. B., Azcoitia, I., & Chowen, J. A. (1999). Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol*, *40*(4), 574-584.
- Garedew, A., Henderson, S. O., & Moncada, S. (2010). Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, *17*(10), 1540-1550. doi: 10.1038/cdd.2010.27
- Giatti, S., Romano, S., Pesaresi, M., Cermenati, G., Mitro, N., Caruso, D., . . . Melcangi, R. C. (2015). Neuroactive steroids and the peripheral nervous system: An update. *Steroids*, *103*, 23-30. doi: 10.1016/j.steroids.2015.03.014
- Gong, Z. G., Zhang, J., & Xu, Y. J. (2016). Metabolomics Reveals that Momordica charantia Attenuates Metabolic Changes in Experimental Obesity. *Phytother Res*. doi: 10.1002/ptr.5748
- Goujon, E., Laye, S., Parnet, P., & Dantzer, R. (1997). Regulation of cytokine gene expression in the central nervous system by glucocorticoids: mechanisms and functional consequences. *Psychoneuroendocrinology*, *22 Suppl 1*, S75-80.
- Govind, A. P., & Thampan, R. V. (2003). Membrane associated estrogen receptors and related proteins: localization at the plasma membrane and the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem*, *253*(1-2), 233-240.

- Gries, F. A., & Oberdisse, K. (1970). [Lipid metabolism disorders and diabetes mellitus]. *Dtsch Med Wochenschr*, *95*(14), 727-734. doi: 10.1055/s-0028-1108532
- Growdon, M. E., Schultz, A. P., Dagley, A. S., Amariglio, R. E., Hedden, T., Rentz, D. M., . . . Marshall, G. A. (2015). Odor identification and Alzheimer disease biomarkers in clinically normal elderly. *Neurology*, *84*(21), 2153-2160. doi: 10.1212/WNL.0000000000001614
- Guida, E., & Stewart, A. (1998). Influence of hypoxia and glucose deprivation on tumour necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in human cultured monocytes. *Cell Physiol Biochem*, *8*(1-2), 75-88.
- Han, S., Zhao, B., Pan, X., Song, Z., Liu, J., Gong, Y., & Wang, M. (2015). Estrogen receptor variant ER-alpha36 is involved in estrogen neuroprotection against oxidative toxicity. *Neuroscience*, *310*, 224-241. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.024
- Hasebe, N., Fujita, Y., Ueno, M., Yoshimura, K., Fujino, Y., & Yamashita, T. (2013). Soluble beta-amyloid Precursor Protein Alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. *PLoS One*, *8*(12), e82321. doi: 10.1371/journal.pone.0082321
- Haslund-Vinding, J., McBean, G., Jaquet, V., & Vilhardt, F. (2016). NADPH oxidases in Microglia oxidant production: Activating Receptors, Pharmacology, and Association with Disease. *Br J Pharmacol*. doi: 10.1111/bph.13425
- Hauck, A. K., & Bernlohr, D. A. (2016). Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res*, *57*(11), 1976-1986. doi: 10.1194/jlr.R066597
- Haversen, L., Danielsson, K. N., Fogelstrand, L., & Wiklund, O. (2009). Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis*, *202*(2), 382-393. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.033
- Heese, K., Fiebich, B. L., Bauer, J., & Otten, U. (1997). Nerve growth factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. *Neurosci Lett*, *231*(2), 83-86.
- Henkel, A., & Green, R. M. (2013). The unfolded protein response in fatty liver disease. *Semin Liver Dis*, *33*(4), 321-329. doi: 10.1055/s-0033-1358522
- Heo, Y. R., Claycombe, K., Jones, B. H., Wright, P., Truett, G. E., Zemel, M., . . . Moustaid-Moussa, N. (2002). Effects of fatty (fa) allele and high-fat diet on adipose tissue leptin and lipid metabolism. *Horm Metab Res*, *34*(11-12), 686-690. doi: 10.1055/s-2002-38264
- Herzog, R., Zendedel, A., Lammerding, L., Beyer, C., & Slowik, A. (2016). Impact of 17beta-estradiol and progesterone on inflammatory and apoptotic microRNA expression after ischemia in a rat model. *J Steroid Biochem Mol Biol*. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.11.018
- Hill, D. A., Crider, M., & Hill, S. R. (2016). Hormone Therapy and Other Treatments for Symptoms of Menopause. *Am Fam Physician*, *94*(11), 884-889.
- Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R., & Hager, G. L. (1999). Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell*, *10*(2), 471-486.
- Hua, S., Antao, S. T., Corbett, A., & Witting, P. K. (2010). The significance of neuroglobin in the brain. *Curr Med Chem*, *17*(2), 160-172.
- Huang, W., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Q., Yu, Z., Mou, L., . . . Gui, Y. (2015). Roles of ERbeta and GPR30 in Proliferative Response of Human Bladder Cancer Cell to Estrogen. *Biomed Res Int*, *2015*, 251780. doi: 10.1155/2015/251780

- Hwang, D. H., Kim, J. A., & Lee, J. Y. (2016). Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosaheptaenoic acid. *Eur J Pharmacol*, 785, 24-35. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.024
- Hwang, O. (2013). Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol*, 22(1), 11-17. doi: 10.5607/en.2013.22.1.11
- Ishihara, Y., Takemoto, T., Itoh, K., Ishida, A., & Yamazaki, T. (2015). Dual role of superoxide dismutase 2 induced in activated microglia: oxidative stress tolerance and convergence of inflammatory responses. *J Biol Chem*, 290(37), 22805-22817. doi: 10.1074/jbc.M115.659151
- Jacob, J., & Grimmer, G. (1968). Structure and amount of positional isomers of monounsaturated fatty acids in human depot fat. *J Lipid Res*, 9(6), 730-732.
- Javed, H., Azimullah, S., Abul Khair, S. B., Ojha, S., & Haque, M. E. (2016). Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. *BMC Neurosci*, 17(1), 58. doi: 10.1186/s12868-016-0293-4
- Jump, D. B. (2004). Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 41(1), 41-78. doi: 10.1080/10408360490278341
- Karelina, K., Sarac, B., Freeman, L. M., Gaier, K. R., & Weil, Z. M. (2016). Traumatic brain injury and obesity induce persistent central insulin resistance. *Eur J Neurosci*, 43(8), 1034-1043. doi: 10.1111/ejn.13194
- Karelis, A. D., Faraj, M., Bastard, J. P., St-Pierre, D. H., Brochu, M., Prud'homme, D., & Rabasa-Lhoret, R. (2005). The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(7), 4145-4150. doi: 10.1210/jc.2005-0482
- Karve, I. P., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*, 173(4), 692-702. doi: 10.1111/bph.13125
- Katsyv, I., Wang, M., Song, W. M., Zhou, X., Zhao, Y., Park, S., . . . Irie, H. Y. (2016). EPRS is a critical regulator of cell proliferation and estrogen signaling in ER+ breast cancer. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.11870
- Kaur, C., & Ling, E. A. (2008). Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem*, 15(29), 3068-3080.
- Khan, M. S., Ali, T., Kim, M. W., Jo, M. H., Jo, M. G., Badshah, H., & Kim, M. O. (2016). Anthocyanins protect against LPS-induced oxidative stress-mediated neuroinflammation and neurodegeneration in the adult mouse cortex. *Neurochem Int*, 100, 1-10. doi: 10.1016/j.neuint.2016.08.005
- Kim, H. N., Lee, S. J., & Koh, J. Y. (2012). The neurosteroids, allopregnanolone and progesterone, induce autophagy in cultured astrocytes. *Neurochem Int*, 60(2), 125-133. doi: 10.1016/j.neuint.2011.11.015
- Kingsbury, K. J., Heyes, T. D., Morgan, D. M., Aylot, C., Burton, P. A., Emmerson, R., & Robinson, P. J. (1962). The effect of dietary changes on the fatty acid composition of normal human depot fat. *Biochem J*, 84, 124-133.
- Kloosterboer, H. J. (2004a). Tissue-selective effects of tibolone on the breast. *Maturitas*, 49(1), S5-S15. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.06.022
- Kloosterboer, H. J. (2004b). Tissue-selectivity: the mechanism of action of tibolone. *Maturitas*, 48 Suppl 1, S30-40. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.02.012

- Korach, K. S. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, 266(5190), 1524-1527.
- Kroese, L. J., & Scheffer, P. G. (2014). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep*, 16(11), 452. doi: 10.1007/s11883-014-0452-y
- Kurkowska-Jastrzebska, I., Wronska, A., Kohutnicka, M., Czlonkowski, A., & Czlonkowska, A. (1999). MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 59(1), 1-8.
- Lanussa, O. H., Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., Gonzalez, J., Echeverria, V., Aliev, G., & Barreto, G. E. (2016). Microglial dependent protective effects of neuroactive steroids. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 15(2), 242-249.
- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., & Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*, 30(4), 294-309.
- Ledeboer, A., Breve, J. J., Wierinckx, A., van der Jagt, S., Bristow, A. F., Leysen, J. E., . . . Van Dam, A. M. (2002). Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci*, 16(7), 1175-1185.
- Lee, J. H., Wei, Z. Z., Cao, W., Won, S., Gu, X., Winter, M., . . . Yu, S. P. (2016). Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice. *Neurobiol Dis*, 96, 248-260. doi: 10.1016/j.nbd.2016.09.013
- Lee, J. U., Kang, D. I., Zhu, W. L., Shin, S. Y., Hahm, K. S., & Kim, Y. (2007). Solution structures and biological functions of the antimicrobial peptide, arenicin-1, and its linear derivative. *Biopolymers*, 88(2), 208-216. doi: 10.1002/bip.20700
- Lee, J. Y., Zhao, L., Youn, H. S., Weatherill, A. R., Tapping, R., Feng, L., . . . Hwang, D. H. (2004). Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem*, 279(17), 16971-16979. doi: 10.1074/jbc.M312990200
- Lei, B., Mace, B., Dawson, H. N., Warner, D. S., Laskowitz, D. T., & James, M. L. (2014). Anti-inflammatory effects of progesterone in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *PLoS One*, 9(7), e103969. doi: 10.1371/journal.pone.0103969
- Lei, B., Peng, W., Xu, G., Wu, M., Wen, Y., Xu, J., . . . Wang, Y. (2016). Activation of G protein-coupled receptor 30 by thiodiphenol promotes proliferation of estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells. *Chemosphere*, 169, 204-211. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.066
- Leszek, J., Barreto, G. E., Gasirowski, K., Koutsouraki, E., Avila-Rodrigues, M., & Aliev, G. (2016). Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 15(3), 329-336.
- Li, K., Wahlqvist, M. L., & Li, D. (2016). Nutrition, One-Carbon Metabolism and Neural Tube Defects: A Review. *Nutrients*, 8(11). doi: 10.3390/nu8110741
- Lieberman, B. A. (1997). The estrogen receptor activity cycle: dependence on multiple protein-protein interactions. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 7(1-2), 43-59.
- Linsinger, G., Wilhelm, S., Wagner, H., & Hacker, G. (1999). Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal. *Mol Cell Biol*, 19(5), 3299-3311.

- Little, J. P., Madeira, J. M., & Klegeris, A. (2012). The saturated fatty acid palmitate induces human monocytic cell toxicity toward neuronal cells: exploring a possible link between obesity-related metabolic impairments and neuroinflammation. *J Alzheimers Dis*, *30 Suppl 2*, S179-183. doi: 10.3233/JAD-2011-111262
- Lopategui Cabezas, I., Herrera Batista, A., & Penton Rol, G. (2014). The role of glial cells in Alzheimer disease: potential therapeutic implications. *Neurologia*, *29*(5), 305-309. doi: 10.1016/j.nrl.2012.10.006
- Luterman, J. D., Haroutunian, V., Yemul, S., Ho, L., Purohit, D., Aisen, P. S., . . . Pasinetti, G. M. (2000). Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Arch Neurol*, *57*(8), 1153-1160.
- Luth, H. J., Munch, G., & Arendt, T. (2002). Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res*, *953*(1-2), 135-143.
- Lv, B., Chen, T., Xu, Z., Huo, F., Wei, Y., & Yang, X. (2016). Crocin protects retinal ganglion cells against H₂O₂-induced damage through the mitochondrial pathway and activation of NF-kappaB. *Int J Mol Med*, *37*(1), 225-232. doi: 10.3892/ijmm.2015.2418
- Machacek, T., Panska, L., Dvorakova, H., & Horak, P. (2016). Nitric oxide and cytokine production by glial cells exposed in vitro to neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Parasit Vectors*, *9*(1), 579. doi: 10.1186/s13071-016-1869-7
- Madan, K., Bhardwaj, P., Thareja, S., Gupta, S. D., & Saraya, A. (2006). Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol*, *40*(10), 930-935. doi: 10.1097/01.mcg.0000212608.59090.08
- Mak, P., Li, J., Samanta, S., & Mercurio, A. M. (2015). ERbeta regulation of NF-kB activation in prostate cancer is mediated by HIF-1. *Oncotarget*, *6*(37), 40247-40254. doi: 10.18632/oncotarget.5377
- Maloney, E., Sweet, I. R., Hockenbery, D. M., Pham, M., Rizzo, N. O., Tateya, S., . . . Kim, F. (2009). Activation of NF-kappaB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(9), 1370-1375. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.188813
- Marques-Deak, A., Cizza, G., & Sternberg, E. (2005). Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol Psychiatry*, *10*(3), 239-250. doi: 10.1038/sj.mp.4001643
- Martin-Jimenez, C. A., Gaitan-Vaca, D. M., Echeverria, V., Gonzalez, J., & Barreto, G. E. (2016). Relationship Between Obesity, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: an Astrocentric View. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-016-0193-8
- Martins, I. V., Rivers-Auty, J., Allan, S. M., & Lawrence, C. B. (2016). Mitochondrial Abnormalities and Synaptic Loss Underlie Memory Deficits Seen in Mouse Models of Obesity and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. doi: 10.3233/JAD-160640
- Mattson, M. P., Chan, S. L., & Duan, W. (2002). Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev*, *82*(3), 637-672. doi: 10.1152/physrev.00004.2002
- Maurice, T., Urani, A., Phan, V. L., & Romieu, P. (2001). The interaction between neuroactive steroids and the signal receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res Brain Res Rev*, *37*(1-3), 116-132.

- McCluskey, L. P., & Lampson, L. A. (2000). Local neurochemicals and site-specific immune regulation in the CNS. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(3), 177-187.
- McGeer, P. L., Rogers, J., & McGeer, E. G. (2006). Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis*, 9(3 Suppl), 271-276.
- Melton, L. M., Keith, A. B., Davis, S., Oakley, A. E., Edwardson, J. A., & Morris, C. M. (2003). Chronic glial activation, neurodegeneration, and APP immunoreactive deposits following acute administration of double-stranded RNA. *Glia*, 44(1), 1-12. doi: 10.1002/glia.10276
- Menegaut, L., Thomas, C., Lagrost, L., & Masson, D. (2016). Fatty acid metabolism in macrophages: a target in cardio-metabolic diseases. *Curr Opin Lipidol*. doi: 10.1097/MOL.0000000000000370
- Michalska, M., Wolf, G., Walther, R., & Newsholme, P. (2010). Effects of pharmacological inhibition of NADPH oxidase or iNOS on pro-inflammatory cytokine, palmitic acid or H₂O₂-induced mouse islet or clonal pancreatic beta-cell dysfunction. *Biosci Rep*, 30(6), 445-453. doi: 10.1042/BSR20090138
- Miller, A. A., & Spencer, S. J. (2014). Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun*, 42, 10-21. doi: 10.1016/j.bbi.2014.04.001
- Millington, C., Sonogo, S., Karunaweera, N., Rangel, A., Aldrich-Wright, J. R., Campbell, I. L., . . . Munch, G. (2014). Chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease: new perspectives on animal models and promising candidate drugs. *Biomed Res Int*, 2014, 309129. doi: 10.1155/2014/309129
- Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, Souza, S. C., Shen, W. J., Zhang, H. H., Stancheva, Z. S., . . . Greenberg, A. S. (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem*, 282(2), 996-1002. doi: 10.1074/jbc.M605770200
- Moslemnezhad, A., Mahjoub, S., & Moghadasi, M. (2016). Altered plasma marker of oxidative DNA damage and total antioxidant capacity in patients with Alzheimer's disease. *Caspian J Intern Med*, 7(2), 88-92.
- Nakamura, I., Kusakabe, M., Swanson, P., & Young, G. (2016). Regulation of sex steroid production and mRNAs encoding gonadotropin receptors and steroidogenic proteins by gonadotropins, cyclic AMP and insulin-like growth factor-I in ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at two stages of vitellogenesis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 201, 132-140. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.06.035
- Nasaruddin, M. L., Holscher, C., Kehoe, P., Graham, S. F., & Green, B. D. (2016). Wide-ranging alterations in the brain fatty acid complement of subjects with late Alzheimer's disease as detected by GC-MS. *Am J Transl Res*, 8(1), 154-165.
- NHANES. (2015). Encuesta nacional de salud y nutricion. from <https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/>
- Nilsen, J., & Brinton, R. D. (2004). Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3(4), 297-313.
- Niu, G., Li, J., Wang, H., Ren, Y., & Bai, J. (2016). Associations of A-FABP with Anthropometric and Metabolic Indices and Inflammatory Cytokines in Obese Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Biomed Res Int*, 2016, 9382092. doi: 10.1155/2016/9382092

- Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., . . . Bhattacharya, S. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med*, *18*(8), 1279-1285. doi: 10.1038/nm.2851
- Pedraza-Alva, G., Perez-Martinez, L., Valdez-Hernandez, L., Meza-Sosa, K. F., & Ando-Kuri, M. (2015). Negative regulation of the inflammasome: keeping inflammation under control. *Immunol Rev*, *265*(1), 231-257. doi: 10.1111/imr.12294
- Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*, *94*(4), 1077-1098. doi: 10.1152/physrev.00041.2013
- Perillo, B., Sasso, A., Abbondanza, C., & Palumbo, G. (2000). 17beta-estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol Cell Biol*, *20*(8), 2890-2901.
- Perry, V. H., Nicoll, J. A., & Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, *6*(4), 193-201. doi: 10.1038/nrneuro.2010.17
- Pesce, M., Franceschelli, S., Ferrone, A., Patruno, A., Grilli, A., De Lutiis, M. A., . . . Speranza, L. (2017). The NF-kB regulates the SHP-1 expression in monocytes in congestive heart failure. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *22*, 757-771.
- Peters, M. E. (2016). Traumatic brain injury (TBI) in older adults: aging with a TBI versus incident TBI in the aged. *Int Psychogeriatr*, *28*(12), 1931-1934. doi: 10.1017/S1041610216001666
- Petrone, A. B., Simpkins, J. W., & Barr, T. L. (2014). 17beta-estradiol and inflammation: implications for ischemic stroke. *Aging Dis*, *5*(5), 340-345. doi: 10.14336/AD.2014.0500340
- Ponnusamy, S., Tran, Q. T., Harvey, I., Smallwood, H. S., Thiyagarajan, T., Banerjee, S., . . . Narayanan, R. (2016). Pharmacologic activation of estrogen receptor beta increases mitochondrial function, energy expenditure, and brown adipose tissue. *FASEB J*. doi: 10.1096/fj.201600787RR
- Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P., & Faraone, S. V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry*, *67*(6), 505-512. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.02.013
- Pupo, M., Maggiolini, M., & Musti, A. M. (2016). GPER Mediates Non-Genomic Effects of Estrogen. *Methods Mol Biol*, *1366*, 471-488. doi: 10.1007/978-1-4939-3127-9_37
- Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J. W., Kellum, J. M., & Sanyal, A. J. (2008). Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, *134*(2), 568-576. doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.039
- Radi, R. (2013). Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res*, *46*(2), 550-559. doi: 10.1021/ar300234c
- Radowicki, S., Arsoba, J., & Dubrawski, W. (1988). [Tibolone (Livial) in the treatment of disorders of the postmenopausal period (preliminary report)]. *Ginekol Pol*, *59*(11), 705-708.
- Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., & Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, *1*(7285), 785-789.
- Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, *353*(6301), 777-783. doi: 10.1126/science.aag2590

- Reddy, D. S. (2016). Neurosteroids for the potential protection of humans against organophosphate toxicity. *Ann N Y Acad Sci*, 1378(1), 25-32. doi: 10.1111/nyas.13160
- Reed, M. J., & Kloosterboer, H. J. (2004). Tibolone: a selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR). *Maturitas*, 48 Suppl 1, S4-6. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.02.013
- Reyes-Garcia, M. G., & Garcia-Tamayo, F. (2009). A neurotransmitter system that regulates macrophage pro-inflammatory functions. *J Neuroimmunol*, 216(1-2), 20-31. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.06.024
- Ritzel, R. M., Patel, A. R., Pan, S., Crapser, J., Hammond, M., Jellison, E., & McCullough, L. D. (2015). Age- and location-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging*, 36(6), 2153-2163. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.016
- Rogawski, M. A., Loya, C. M., Reddy, K., Zolkowska, D., & Lossin, C. (2013). Neuroactive steroids for the treatment of status epilepticus. *Epilepsia*, 54 Suppl 6, 93-98. doi: 10.1111/epi.12289
- Ruiz-Ramirez, A., Lopez-Acosta, O., Barrios-Maya, M. A., & El-Hafidi, M. (2016). Cell Death and Heart Failure in Obesity: Role of Uncoupling Proteins. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 9340654. doi: 10.1155/2016/9340654
- Russo, M. A., Ravenna, L., Pellegrini, L., Petrangeli, E., Salvatori, L., Magrone, T., . . . Tafani, M. (2016). Hypoxia and Inflammation in prostate cancer progression. Cross-talk with androgen and estrogen receptors and cancer stem cells. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*.
- Rzemieniec, J., Litwa, E., Wnuk, A., Lason, W., Golas, A., Krzeptowski, W., & Kajta, M. (2015). Neuroprotective action of raloxifene against hypoxia-induced damage in mouse hippocampal cells depends on ERalpha but not ERbeta or GPR30 signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 146, 26-37. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.05.005
- Said, M. M., & Bosland, M. C. (2016). The anti-inflammatory effect of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, against estradiol-induced nonbacterial inflammation in the rat prostate. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. doi: 10.1007/s00210-016-1325-4
- Salud, M. d. (2015). Analisis de situacion de salud (ASIS). *Direccion de epidemiologia y demografia*.
- Sampath, H., & Ntambi, J. M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 25, 317-340. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.051804.101917
- Sandhir, R. (2014). Neuroglobin increases brain fitness: Commentary to: "Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury". *Neurosci Lett*, 577, 123-124. doi: 10.1016/j.neulet.2014.06.005
- Sandu, R. E., Buga, A. M., Uzoni, A., Petcu, E. B., & Popa-Wagner, A. (2015). Neuroinflammation and comorbidities are frequently ignored factors in CNS pathology. *Neural Regen Res*, 10(9), 1349-1355. doi: 10.4103/1673-5374.165208
- Scheschowitsch, K., de Moraes, J. A., Sordi, R., Barja-Fidalgo, C., & Assreuy, J. (2015). Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Res*, 100, 73-84. doi: 10.1016/j.phrs.2015.08.001

- Schonfeld, P., & Reiser, G. (2016). Inhibition of beta-oxidation is not a valid therapeutic tool for reducing oxidative stress in conditions of neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab*. doi: 10.1177/0271678X16642448
- Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, F., Franklin, R. J., Garcia-Segura, L. M., . . . Akwa, Y. (2003). Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol*, *71*(1), 3-29.
- Shahed, A., Simmons, J. J., Featherstone, S. L., & Young, K. A. (2015). Matrix metalloproteinase inhibition influences aspects of photoperiod stimulated ovarian recrudescence in Siberian hamsters. *Gen Comp Endocrinol*, *216*, 46-53. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.04.010
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, *116*(11), 3015-3025. doi: 10.1172/JCI28898
- Shi, S., Liang, D., Chen, Y., Xie, Y., Wang, Y., Wang, L., . . . Qiao, Z. (2016). Gx-50 reduces beta-amyloid-induced TNF-alpha, IL-1beta, NO, and PGE2 expression and inhibits NF-kappaB signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Immunol*, *46*(3), 665-676. doi: 10.1002/eji.201545855
- Shinozaki, Y., Nomura, M., Iwatsuki, K., Moriyama, Y., Gachet, C., & Koizumi, S. (2014). Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Sci Rep*, *4*, 4329. doi: 10.1038/srep04329
- Simpkins, J. W., & Dykens, J. A. (2008). Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev*, *57*(2), 421-430. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.04.007
- Sinchak, K., Mills, R. H., Tao, L., LaPolt, P., Lu, J. K., & Micevych, P. (2003). Estrogen induces de novo progesterone synthesis in astrocytes. *Dev Neurosci*, *25*(5), 343-348. doi: 73511
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R. K., Tripathi, D. K., Singh, V. P., . . . Prasad, S. M. (2016). Reactive Oxygen Species (ROS): Beneficial Companions of Plants' Developmental Processes. *Front Plant Sci*, *7*, 1299. doi: 10.3389/fpls.2016.01299
- Sjogren, L. L., Morch, L. S., & Lokkegaard, E. (2016). Hormone replacement therapy and the risk of endometrial cancer: A systematic review. *Maturitas*, *91*, 25-35. doi: 10.1016/j.maturitas.2016.05.013
- Slepko, N., & Levi, G. (1996). Progressive activation of adult microglial cells in vitro. *Glia*, *16*(3), 241-246. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199603)16:3<241::AID-GLIA6>3.0.CO;2-4
- Sobocanec, S., Saric, A., Macak Safranko, Z., Popovic Hadzija, M., Abramic, M., & Balog, T. (2015). The role of 17beta-estradiol in the regulation of antioxidant enzymes via the Nrf2-Keap1 pathway in the livers of CBA/H mice. *Life Sci*, *130*, 57-65. doi: 10.1016/j.lfs.2015.03.014
- Sochocka, M., Diniz, B. S., & Leszek, J. (2016). Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-016-0297-1
- Spence, R. D., & Voskuhl, R. R. (2012). Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Front Neuroendocrinol*, *33*(1), 105-115. doi: 10.1016/j.yfrne.2011.12.001

- Sribnick, E. A., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2006). Estrogen prevents glutamate-induced apoptosis in C6 glioma cells by a receptor-mediated mechanism. *Neuroscience*, *137*(1), 197-209. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.074
- Srivastava, D. P. (2012). Two-step wiring plasticity--a mechanism for estrogen-induced rewiring of cortical circuits. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *131*(1-2), 17-23. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.01.006
- Steckelbroeck, S., Jin, Y., Oyesanmi, B., Kloosterboer, H. J., & Penning, T. M. (2004). Tibolone is metabolized by the 3 α /3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four human isozymes of the aldo-keto reductase 1C subfamily: inversion of stereospecificity with a $\delta^5(10)$ -3-ketosteroid. *Mol Pharmacol*, *66*(6), 1702-1711. doi: 10.1124/mol.104.004515
- Stein, D. G. (2008). Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res Rev*, *57*(2), 386-397. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.012
- Strauss, J. F., 3rd, Christenson, L. K., Devoto, L., & Martinez, F. (2000). Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side-chain cleavage system. *J Reprod Fertil Suppl*, *55*, 3-12.
- Streit, W. J., Graeber, M. B., & Kreutzberg, G. W. (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*, *1*(5), 301-307. doi: 10.1002/glia.440010502
- Strle, K., McCusker, R. H., Tran, L., King, A., Johnson, R. W., Freund, G. G., . . . Kelley, K. W. (2007). Novel activity of an anti-inflammatory cytokine: IL-10 prevents TNF α -induced resistance to IGF-I in myoblasts. *J Neuroimmunol*, *188*(1-2), 48-55. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.05.003
- Susin, S. A., Zamzami, N., & Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*, *1366*(1-2), 151-165.
- Szego, C. M., & Davis, J. S. (1967). Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *58*(4), 1711-1718.
- Tabarestani, S., Motallebi, M., & Akbari, M. E. (2016). Are Estrogen Receptor Genomic Aberrations Predictive of Hormone Therapy Response in Breast Cancer? *Iran J Cancer Prev*, *9*(4), e6565. doi: 10.17795/ijcp-6565
- Takuma, K., Baba, A., & Matsuda, T. (2004). Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*, *72*(2), 111-127. doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.02.001
- Tapia-Gonzalez, S., Carrero, P., Pernia, O., Garcia-Segura, L. M., & Diz-Chaves, Y. (2008). Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *J Endocrinol*, *198*(1), 219-230. doi: 10.1677/JOE-07-0294
- Taylor, L. E., & Sullivan, J. C. (2016). Sex Differences in Obesity-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction: A Protective Role for Estrogen in Adipose Tissue Inflammation? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, ajpgu 00202 02016. doi: 10.1152/ajpregu.00202.2016
- Teismann, P., & Schulz, J. B. (2004). Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res*, *318*(1), 149-161. doi: 10.1007/s00441-004-0944-0
- Tiwari-Woodruff, S., Morales, L. B., Lee, R., & Voskuhl, R. R. (2007). Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER) α and

- ERbeta ligand treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(37), 14813-14818. doi: 10.1073/pnas.0703783104
- Toro-Urrego, N., Garcia-Segura, L. M., Echeverria, V., & Barreto, G. E. (2016). Testosterone Protects Mitochondrial Function and Regulates Neuroglobin Expression in Astrocytic Cells Exposed to Glucose Deprivation. *Front Aging Neurosci*, 8, 152. doi: 10.3389/fnagi.2016.00152
- Tracy, L. M., Bergqvist, F., Ivanova, E. V., Jacobsen, K. T., & Iverfeldt, K. (2013). Exposure to the saturated free fatty acid palmitate alters BV-2 microglia inflammatory response. *J Mol Neurosci*, 51(3), 805-812. doi: 10.1007/s12031-013-0068-7
- Tskitishvili, E., Pequeux, C., Munaut, C., Viellevoys, R., Nisolle, M., Noel, A., & Foidart, J. M. (2017). Estrogen receptors and estetrol-dependent neuroprotective actions: a pilot study. *J Endocrinol*, 232(1), 85-95. doi: 10.1530/JOE-16-0434
- Turakulov Ia, K., Gainutdinov, M., Salikhov, R. S., Gizatullina, Z. Z., & Lavina, II. (1976). [Regulation of mitochondrial membrane permeability by a factor from mitochondrial interaction]. *Biull Eksp Biol Med*, 81(4), 411-413.
- Turnbull, A. V., & Rivier, C. L. (1999). Sprague-Dawley rats obtained from different vendors exhibit distinct adrenocorticotropin responses to inflammatory stimuli. *Neuroendocrinology*, 70(3), 186-195. doi: 54475
- Turpie, B., Yoshimura, T., Gulati, A., Rios, J. D., Dartt, D. A., & Masli, S. (2009). Sjogren's syndrome-like ocular surface disease in thrombospondin-1 deficient mice. *Am J Pathol*, 175(3), 1136-1147. doi: 10.2353/ajpath.2009.081058
- Unger, R. H. (2002). Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, 53, 319-336. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104057
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 27(2), 120-139. doi: 10.1080/10590500902885684
- van Dijk, G., van Heijningen, S., Reijne, A. C., Nyakas, C., van der Zee, E. A., & Eisel, U. L. (2015). Integrative neurobiology of metabolic diseases, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Front Neurosci*, 9, 173. doi: 10.3389/fnins.2015.00173
- Varin, A., Thomas, C., Ishibashi, M., Menegaut, L., Gautier, T., Trousson, A., . . . Masson, D. (2015). Liver X receptor activation promotes polyunsaturated fatty acid synthesis in macrophages: relevance in the context of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(6), 1357-1365. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305539
- Villacampa, N., Almolda, B., Vilella, A., Campbell, I. L., Gonzalez, B., & Castellano, B. (2015). Astrocyte-targeted production of IL-10 induces changes in microglial reactivity and reduces motor neuron death after facial nerve axotomy. *Glia*, 63(7), 1166-1184. doi: 10.1002/glia.22807
- Walker, D. G., & Lue, L. F. (2013). Understanding the neurobiology of CD200 and the CD200 receptor: a therapeutic target for controlling inflammation in human brains? *Future Neurol*, 8(3). doi: 10.2217/fnl.13.14
- Wang, L., Hagemann, T. L., Kalwa, H., Michel, T., Messing, A., & Feany, M. B. (2015). Nitric oxide mediates glial-induced neurodegeneration in Alexander disease. *Nat Commun*, 6, 8966. doi: 10.1038/ncomms9966

- Wang, M. J., Huang, H. M., Chen, H. L., Kuo, J. S., & Jeng, K. C. (2001). Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. *J Neurochem*, *77*(3), 830-838.
- Wang, S., Wang, B., Feng, Y., Mo, M., Du, F., Li, H., & Yu, X. (2015). 17beta-estradiol ameliorates light-induced retinal damage in Sprague-Dawley rats by reducing oxidative stress. *J Mol Neurosci*, *55*(1), 141-151. doi: 10.1007/s12031-014-0384-6
- Wang, Z., Liu, D., Wang, F., Liu, S., Zhao, S., Ling, E. A., & Hao, A. (2012). Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF-kappaB signalling. *Br J Nutr*, *107*(2), 229-241. doi: 10.1017/S0007114511002868
- Wang, Z. F., Pan, Z. Y., Xu, C. S., & Li, Z. Q. (2016). Activation of G-protein coupled estrogen receptor 1 improves early-onset cognitive impairment via PI3K/Akt pathway in rats with traumatic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.138
- Welboren, W. J., Stunnenberg, H. G., Sweep, F. C., & Span, P. N. (2007). Identifying estrogen receptor target genes. *Mol Oncol*, *1*(2), 138-143. doi: 10.1016/j.molonc.2007.04.001
- Welsh, A. W., Lannin, D. R., Young, G. S., Sherman, M. E., Figueroa, J. D., Henry, N. L., . . . Rimm, D. L. (2012). Cytoplasmic estrogen receptor in breast cancer. *Clin Cancer Res*, *18*(1), 118-126. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1236
- Wessels, J. M., Leyland, N. A., Agarwal, S. K., & Foster, W. G. (2015). Estrogen induced changes in uterine brain-derived neurotrophic factor and its receptors. *Hum Reprod*, *30*(4), 925-936. doi: 10.1093/humrep/dev018
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., & Lucius, R. (2003). Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J*, *17*(3), 500-502. doi: 10.1096/fj.02-0314fje
- Wilms, H., Zecca, L., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., & Lucius, R. (2007). Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des*, *13*(18), 1925-1928.
- Windler, E., Zyriax, B. C., Eidenmuller, B., & Boeing, H. (2007). Hormone replacement therapy and risk for coronary heart disease. Data from the CORA-study--a case-control study on women with incident coronary heart disease. *Maturitas*, *57*(3), 239-246. doi: 10.1016/j.maturitas.2007.01.004
- Wolf, L., Bauer, A., Melchner, D., Hallof-Buestrich, H., Stoertebecker, P., Haen, E., . . . Nothdurfter, C. (2015). Enhancing neurosteroid synthesis--relationship to the pharmacology of translocator protein (18 kDa) (TSPO) ligands and benzodiazepines. *Pharmacopsychiatry*, *48*(2), 72-77. doi: 10.1055/s-0034-1398507
- Wright, S. L., & Diaz, F. (2014). Neuroscience research on aging and implications for counseling psychology. *J Couns Psychol*, *61*(4), 534-540. doi: 10.1037/cou0000024
- Wu, S. Z., Bodles, A. M., Porter, M. M., Griffin, W. S., Basile, A. S., & Barger, S. W. (2004). Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *J Neuroinflammation*, *1*(1), 2. doi: 10.1186/1742-2094-1-2
- Wyss-Coray, T., Yan, F., Lin, A. H., Lambris, J. D., Alexander, J. J., Quigg, R. J., & Masliah, E. (2002). Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(16), 10837-10842. doi: 10.1073/pnas.162350199

- Xiong, X., Barreto, G. E., Xu, L., Ouyang, Y. B., Xie, X., & Giffard, R. G. (2011). Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, *42*(7), 2026-2032. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.593772
- Xu, C., & Xu, G. H. (2008). [Adipose triglyceride lipase regulates adipocyte lipolysis]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, *39*(1), 10-14.
- Yadav, S. K., Rai, S. N., & Singh, S. P. (2016). Mucuna pruriens reduces inducible nitric oxide synthase expression in Parkinsonian Mice Model. *J Chem Neuroanat*. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.11.009
- Yang, N. C., Jeng, K. C., Ho, W. M., Chou, S. J., & Hu, M. L. (2000). DHEA inhibits cell growth and induces apoptosis in BV-2 cells and the effects are inversely associated with glucose concentration in the medium. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *75*(2-3), 159-166.
- Yasrebi, A., Rivera, J. A., Krumm, E. A., Yang, J. A., & Roepke, T. A. (2016). Activation of Estrogen Response Element-independent ERalpha signaling protects female mice from diet-induced obesity. *Endocrinology*, en20161535. doi: 10.1210/en.2016-1535
- Yesilova, Z., Ozata, M., Oktenli, C., Bagci, S., Ozcan, A., Sanisoglu, S. Y., . . . Dagalp, K. (2005). Increased acylation stimulating protein concentrations in nonalcoholic fatty liver disease are associated with insulin resistance. *Am J Gastroenterol*, *100*(4), 842-849. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.40838.x
- Yesilova, Z., Yaman, H., Oktenli, C., Ozcan, A., Uygun, A., Cakir, E., . . . Dagalp, K. (2005). Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*, *100*(4), 850-855. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.41500.x
- Yi, H., Bao, X., Tang, X., Fan, X., & Xu, H. (2016). Estrogen modulation of calretinin and BDNF expression in midbrain dopaminergic neurons of ovariectomised mice. *J Chem Neuroanat*, *77*, 60-67. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.05.005
- Yousuf, S., Atif, F., Sayeed, I., Wang, J., & Stein, D. G. (2016). Neuroprotection by progesterone after transient cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Horm Behav*, *84*, 29-40. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.06.002
- Yuan, L., Wu, Y., Ren, X., Liu, Q., Wang, J., & Liu, X. (2014). Isoorientin attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of ROS-related MAPK/NF-kappaB signaling pathway in BV-2 microglia. *Mol Cell Biochem*, *386*(1-2), 153-165. doi: 10.1007/s11010-013-1854-9
- Zarate, A., Hernandez-Valencia, M., Saucedo, R., Basurto, L., & Manuel-Apolinar, L. (2014). [Current position about the use of estrogen therapy in women during the climacteric period]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, *52*(1), 66-69.
- Zecca, L., Wilms, H., Geick, S., Claasen, J. H., Brandenburg, L. O., Holzknecht, C., . . . Lucius, R. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, *116*(1), 47-55. doi: 10.1007/s00401-008-0361-7
- Zhang, L. N., Hu, S. B., Deng, S. Y., Chen, C. X., Wu, L., Peng, Q. Y., . . . Ai, Y. H. (2016). [Influences of DNA methylation upon neuroglobin sustained expression in oxygen-glucose deprivation model]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, *96*(39), 3164-3169. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.39.011

- Zhou, Y., Wu, Z., Cao, X., Ding, L., Wen, Z., & Bian, J. S. (2016). HNO suppresses LPS-induced inflammation in BV-2 microglial cells via inhibition of NF-kappaB and p38 MAPK pathways. *Pharmacol Res*, *111*, 885-895. doi: 10.1016/j.phrs.2016.08.007
- Zhu, Y., Chen, X., Liu, Z., Peng, Y. P., & Qiu, Y. H. (2015). Interleukin-10 Protection against Lipopolysaccharide-Induced Neuro-Inflammation and Neurotoxicity in Ventral Mesencephalic Cultures. *Int J Mol Sci*, *17*(1). doi: 10.3390/ijms17010025
- Zlobine, I., Gopal, K., & Ussher, J. R. (2016). Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, *1860*(10), 1555-1568. doi: 10.1016/j.bbaliip.2016.02.011