

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

IMPORTANCIA DEL INICIO DE LA TERAPIA HORMONAL
SUSTITUTIVA CON ESTRÓGENOS SOBRE PARÁMETROS
DE ESTRÉS OXIDATIVO Y CONSUMO DE GLUCOSA *IN*
VIVO.

RAÚL LÓPEZ GRUESO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 de gener de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Juan Viña Ribes
- Dr. Giovanni E. Mann
- Dr. Reinald Pamplona
- Dr. Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández
- Dra. M. Carmen Gómez Cabrera

Va ser dirigida per:

Dr. José Viña Ribes

Dra. Consuelo Borrás Blasco

Dr. Juan Gambini Buchón

©Copyright: Servei de Publicacions

Raúl López Grueso

Dipòsit legal: V-491-2012

I.S.B.N.: 978-84-370-8140-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



IMPORTANCIA DEL INICIO DE LA TERAPIA
HORMONAL SUSTITUTIVA CON ESTRÓGENOS
SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y
CONSUMO DE GLUCOSA *IN VIVO*

TESIS DOCTORAL presentada por:

Raúl López Grueso

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. Dña. Consuelo Borrás Blasco

Prof. D. Juan Gambini Buchón



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Prof. D. **José Viña Ribes**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. Dña. **Consuelo Borrás Blasco**, Profesora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. D. **Juan Gambini Buchón**, Profesor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que D. **Raúl López Grueso**, Licenciado en Ciencias de la Actividad Física y Deporte por la Universidad de Granada, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada

“IMPORTANCIA DEL INICIO DE LA TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA CON ESTRÓGENOS SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y CONSUMO DE GLUCOSA *IN VIVO*”

para la obtención del título de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a 6 de Septiembre de 2010

Fdo.D. José Viña Ribes Fdo.D. Consuelo Borrás Blasco Fdo.D. Juan Gambini Buchón

La realización de esta tesis ha sido financiada por:

- Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) adscrita al Proyecto (SAF2004-03755) “*Papel de los radicales libres en el envejecimiento y en enfermedades asociadas, particularmente en la enfermedad de Alzheimer y Sarcopenia senil. Prevención mediante la inducción de genes antioxidantes*” (Referencia de la Ayuda BES-2005-9599), concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

- Ayudas para Estancias Breves en España (2007) y en el extranjero (2009) correspondientes a los beneficiarios de ayudas predoctorales de FPI.

**A mis padres y mi hermano
Especialmente a Teresa Froio**

AGRADECIMIENTOS

“La vida es aquello que te ocurre mientras persigues tus sueños”

A mis directores:

Al Dr. José Viña, porque me abrió las puertas de su equipo sin conocerme. Día a día me he ido convenciendo de que un marinerito siempre llegará a buen puerto teniendo un gran capitán. Gracias “maestro” por tu apoyo en todo. Además, la antimateria ahora sé que existe.

A Chelo Borrás, Xel, siempre confiaste en mí para hacer experimentos que ni creía que pudiese hacer. Además, tu apoyo más como amiga y compañera que como jefa, ha sido fundamental para conseguir casi todo lo que he conseguido estos años. Gracias por tu amistad, cariño y esas “Franzis”...

A Juanito, Gambini. El mejor compañero y amigo (jefe nunca deja que le llamen) en un laboratorio y fuera de él. Mis conocimientos de laboratorio no serían casi nada sin las horas y horas que hemos pasado entre discos de la Forella. Épicos congresos, viajes, *menjars* con Alex y tus nanos, etc. hacen que siempre te recuerde como de las mejores personas que he conocido. ¡Qué grande!

A Fede Pallardó que, aunque no sea director mío, ha sido parte fundamental en estos años por su apoyo en todo lo que he necesitado. Siempre de buen humor! *Chacho*, el que más me recuerda a mi Andalucía.

A mi familia:

A mis padres Manuel y Manolita, y mi hermano Sergio (Chechi), porque siempre me han apoyado en todo lo que he hecho y en todas las aventuras en las que me he embarcado. Sé que soy un “enreas”, pero vuestro apoyo es el que sé que siempre ha estado ahí, teniéndoos lejos, cuando lo he necesitado. Ahora quiero que lo sepáis. Muchas gracias! También agradecérselo a mis

abuelos, tíos, primos y demás familiares que saben que “Raulito está haciendo cosas con ratones” y se sienten muy orgullosos de que consiga ser Doctor. En especial, a mi tío Jose Antonio y mis primas Roxie y Rocío. También a mi primita Ana y Rosa de Sevilla.

A Teresa Froio, una gran amiga, *güena* gente y, cómo no, científica. El tiempo que nos brindaste con tu compañía lo recuerdo con mucho cariño y plagado de buenos momentos. Al *piccolo* Rubén le recordaremos como eras y verás que orgulloso se sentirá. Le enseñaré *andalú* y Rubén español...jajaja. Te estimamos todos los amigos que dejaste en Valencia. *Molti baci* Teresita!

A mis amigos: “los naveros”, que siempre están para los buenos y malos momentos: Polonio, Carlitos, Robert, Manrique, Elías, Casti, PrimoMilio, Jordi, Rosita, Estela, Noelia, Bea y Eva, Macarena y todo la panda! A los atletas y ciclistas, sobre todo Curro, Joseda y Vitorino.

A Evita, porque las grandes cosas que hemos hecho juntos no se olvidan. Me hiciste crecer y mejorar cuando creía que no podía. Todas las personas buenas, al final consiguen aquello que persiguen. Y tú te lo mereces por todo lo que llevas luchando tanto. Verás cómo lo consigues. Si puedo ayudar, sabes que puedes contar conmigo. Recuerda canciones de Fito...

A Peter y Marisa, que sin su interés por los estudios, artículos e investigaciones no sé si hubiese llegado a internarme en este mundillo. Son a los que les debo que haya podido hacer esta tesis, que ya pensábamos hacer en 1º de carrera y cómo no, Marisa, cuando nos veíamos terminándola. Gracias. Un abrazo a Mariquilla y Alberto, mis amiguetes de INEF.

A Fran Ortega, Mesa, Jonathan, Tito Anselmo,... éramos los raros que entrenábamos, y asistíamos a pocas clases porque preferíamos leer artículos científicos para “criticar, saber y aprender” de que siempre se avanza formulando preguntas a las que intentamos dar respuestas. A Castillo y Ángel, que nos iniciaron en aquellos proyectos de investigación. Hoy

seguimos, afortunadamente, todos ahí, leyendo y pensando posibles respuestas.

A Eduardo y Loli, del Dpto de Nutrición de “Graná”. Mis primeros pinitos en un laboratorio, aparte de las pruebas de esfuerzo, los hice con ellos. Quedó incompleto mi doctorado por empezar esta tesis. Sin embargo, también creasteis el germen de mi bagaje experimentador y considero aquel laboratorio como una casa. Un abrazo para Jose “el doctor”, que en su Colombia natal nos recuerda y lo recordamos con cariño. Iré a verte amigo. También a mis “Ángeles” de Nutrición (Mely, Lupe, Cris, M^aCarmen, Laura), a Jesusillo, a Elena, Alba, M^a Jesús,... sé que seréis grandes dietistas y mis amigos siempre.

A RosaMarina y Miquel, que me acogieron a mi llegada a Valencia como un hijo más y siempre están para ayudar en lo que sea. A Isabelita, por su gran amistad.

A los del “labo” de Fisio, con los que he pasado tantos buenos momentos (que son al final los que se recuerdan):

A Rubén (Sindo), Javi Escobar y Marlene en especial, por los grandes momentos vividos estos años, también a Dani, Juan Sastre, Meri, Marya, Ricard, Vicente, Mar, Diana, Jose Manuel, Jesús y Bea, Alessandro, Marco, Ana Lloret, Jelena, Nancy, Fabián, Vladi, Ana Lucía, Soraya, Mar, Consuelo, Carmiña, Pili, Inma, Jessi, Javi Pereda y Pain, Lele, Salvita y Maria, Jose Luis, Gema, Carme, Ana, Isa, Bea y Rebeca, Helios, Sandra, los Edu, Esther, Teresa Fuentes, María Auzin, Ernesto y Enrique,... También a Stefan, quien empezó con los experimentos de ovariectomía.

A Marilyn, por su inestimable ayuda con el “inglis”. A Gloria, por su buen hacer en los papeleos.

A Ángel y Sonia, porque me han ayudado mucho en el laboratorio de isótopos y son mas “apañaos que ná”. A Asun, por supuesto. A Ana Díaz, por su paciencia y buen trato con “los animales”, incluidos los del animalario. A Inma Noguera, por su ayuda también.

A “las secres”, porque sin su colaboración y gran trabajo no habría terminado nunca esta tesis, además de todo lo que hacen por nosotros y lo bien que nos tratan siempre. En especial, a Mari (ese chocolate de Sueca bueno!!).

A Juan Viña y la Fundación por permitir que continúe mi trabajo con esta “top technology”. A Fanny.

A “los del PET”: Anto, Vicente, Correcher, Soriano, con los que tantas horas he pasado intentando entender el extraño y apasionante mundo de los positrones (y de los desayunos populares...). También a Jose María, Gabriel, Juan, Tino, Toni, Lucas, C.Vázquez, Abel, etc. A David Moratal y su equipo “politécnico”. A Orlanda y Fran por sus “no-llamadas” a las 7 de la mañana... A Jorge por los buenos ratos hablando de todo un poco. A Paco Moya y su equipo en Sevilla, en especial a Ana por los cafés, y por lo bien que me trataron además de lo que aprendí allí.

To Bárbara, Nuria, Xinghua, Sarah, Jesus&Ana and Palau for the great moments in London. GEM and Richard, Tabasum, Nan, Nasir, Fiona, Moji, Svetlana,... thanks too!

A mis amigos grandes deportistas, más que triatletas de Valencia: Rafa, Zori, Oscar, Manu, y un largo etc. A Josemi, Cejuela y Marta, Rafa Arjona y TN por contar conmigo en temas de Nutrición. A Karolina, Jorge y Marga.

Por último, agradecer esta tesis a Khirita. Esa *gran personita* especial que tanto me ha apoyado en los momentos más difíciles. Como decía Macaco: “...no dejes que este mundo roto estropee tu sonrisa...”. Con cariño ahora y siempre. *Xucran!* Con “C” de luna...

¡Gracias a todos de que hayais ocurrido en mi vida!

ÍNDICE

1. <u>INTRODUCCION</u>	1-134
1.1. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO	3
1.1.1. Concepto de envejecimiento	
1.1.2. Consecuencias del envejecimiento	
1.2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO	5
1.3. TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES EN EL ENVEJECIMIENTO	6
1.3.1. Radicales libres	
1.3.1.1. Concepto de radical libre	
1.3.1.2. Clases de Radicales libres	
1.3.2. Génesis de ROS	
1.3.2.1 Fuentes exógenas	
1.3.2.2. Fuentes endógenas	
1.3.3. Antioxidantes fisiológicos	
1.3.3.1. Antioxidantes enzimáticos	
1.3.3.2. Antioxidantes no enzimáticos	
1.3.4. Estrés oxidativo	
1.3.4.1. Concepto de estrés oxidativo	
1.3.4.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas	
1.3.4.3. Indicadores de estrés oxidativo	
1.4. TEORÍA MITOCONDRIAL DE LOS RADICALES LIBRES EN EL ENVEJECIMIENTO	30
1.4.1. La mitocondria	
1.4.1.1. La mitocondria: estructura y función	
1.4.1.2. Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales	
1.4.1.3. Otras acciones de las mitocondrias	
1.4.2. Acción de los estrógenos sobre las mitocondrias	

1.5. PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LAS DIFERENCIAS DE LONGEVIDAD ENTRE MACHOS Y HEMBRAS	42
1.5.1. Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento	
1.5.2. Envejecimiento, longevidad y género	
1.5.3. Estrés oxidativo mitocondrial en machos y hembras	
1.5.4. La ovariectomía supone un aumento de estrés oxidativo en las hembras. La reposición hormonal con estrógenos previene este aumento	
1.5.5. Los estrógenos inducen la expresión de genes de longevidad	
1.5.6. Parámetros de envejecimiento indican que las hembras poseen una edad biológica menor que los machos	
1.6. ESTRÓGENOS	51
1.6.1. Concepto	
1.6.2. Propiedades químicas	
1.6.3. Metabolismo del estradiol	
1.6.4. Acciones de los estrógenos	
1.6.5. Mecanismo de acción	
1.6.5.1. Receptores estrogénicos	
1.6.6. Acción de los estrógenos sobre las mitocondrias	
1.6.6.1 Localización de receptores estrogénicos en la mitocondria	
1.6.7. Propiedades antioxidantes de los estrógenos	
1.7. EFECTOS BENEFICIOSOS Y PERJUDICIALES DE LA TERAPÉUTICA HORMONAL SUSTITUTIVA	70
1.7.1. Terapéutica hormonal sustitutiva	
1.7.2. La doble cara de los estrógenos: efectos beneficiosos y perjudiciales	
1.7.3. SERMs: moduladores selectivos del receptor de estrógeno	

1.8. INICIO DE LA TERAPIA SUSTITUTIVA CON ESTRÓGENOS: HIPÓTESIS DEL TIEMPO CRÍTICO (“CRITICAL TIME”)	80
1.9. CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i>	81
1.9.1. Tomografía por emisión de positrones. Generalidades	
1.9.2. Evolución histórica de la tomografía por emisión de positrones	
1.9.3. Radionucleidos emisores de positrones	
1.9.4. Producción de radiofármacos PET: FDG	
1.9.4.1. Características de los radiofármacos	
1.9.4.2. Síntesis de FDG	
1.9.4.3. FDG como sustrato de vías metabólicas	
1.9.5. Detección de la distribución del radiofármaco en el organismo	
1.9.6. Evaluación del metabolismo de la FDG	
1.9.6.1. <i>Standard Uptake Value</i> (SUV)	
1.9.6.2. <i>Statistical Brain Mapping</i> (SBM o Mapeo Estadístico Cerebral)	
1.9.6.3. Curvas de actividad temporal	
1.9.7. Efecto del envejecimiento sobre el consumo cerebral de glucosa	
1.9.8. Terapéutica hormonal sustitutiva y consumo cerebral de glucosa	
1.10. METABOLÓMICA	107
1.10.1. PERFIL METABÓLICO MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹ H NMR). Generalidades	
1.10.2. ANÁLISIS DE DATOS (MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS)	
1.10.3. ESPECTROSCOPIA NMR: LOS PRINCIPIOS MÁS BÁSICOS	
1.10.4. MÉTODOS PARA LOS ENFOQUES METABÓLICOS POR HR-RMN	
1.10.5. RMN Y QUIMIOMETRÍA	
1.10.6. PERFIL METABÓLICO ENTRE GÉNEROS, MENOPAUSIA U OVARIECTOMÍA. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL O FITOESTRÓGENOS	

2. <u>OBJETIVOS</u>	135
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	139
3.1 MATERIALES	141
3.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	
3.1.2. APARATOS	
3.1.3. REACTIVOS	
3.2 MÉTODOS	147
3.2.1. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS. OVARIECTOMÍA	
3.2.2. TRATAMIENTO CON ESTRADIOL	
3.2.3. TRATAMIENTO CON VEHÍCULO	
3.2.4. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i> MEDIANTE TOMOGRAFÍA DE EMISIÓN DE POSITRONES (PET)	
3.2.5. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES. EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS	
3.2.6. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS HEPÁTICAS	
3.2.7. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	
3.2.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	
3.2.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA (GP _x)	
3.2.10. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS AISLADAS, TEJIDOS Y PLASMA	
3.2.11. DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO EN PLASMA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹ H NMR)	
3.2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	

4. <u>RESULTADOS</u>	175
4.1. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES	177
4.1.1 TASA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS	
4.1.1.1. Efecto de la ovariectomía	
4.1.1.2. Efecto de la reposición inmediata con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía	
4.1.1.3. Efecto de la reposición con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía	
4.1.1.4. Conclusión	
4.2 NIVELES DE ANTIOXIDANTES	183
4.2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS	
4.2.1.1. Efecto de la ovariectomía	
4.2.1.2. Efecto de la reposición inmediata con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía	
4.2.1.3. Efecto de la reposición con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía	
4.2.1.4. Conclusión	
4.3 DAÑO OXIDATIVO	188
4.3.1 NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS	
4.3.1.1. Efecto de la ovariectomía	
4.3.1.2. Efecto de la reposición inmediata con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía	
4.3.1.3. Efecto de la reposición con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía	

4.3.1.4. Conclusión

4.3.2 NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PLASMA DE RATAS HEMBRAS.

4.3.2.1. Efecto de la ovariectomía

4.3.2.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

4.3.2.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

4.3.2.4. Conclusión

4.3.3 NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CEREBRO DE RATAS HEMBRAS.

4.3.3.1. Efecto de la ovariectomía

4.3.3.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

4.3.3.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

4.3.3.4. Conclusión

4.3.4 NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HÍGADO DE RATAS HEMBRAS.

4.3.4.1. Efecto de la ovariectomía

4.3.4.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

4.3.4.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

4.3.4.4. Conclusión

4.3.5 NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CORAZÓN DE RATAS HEMBRAS.

4.3.5.1. Efecto de la ovariectomía

4.3.5.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

4.3.5.3. Efecto de la reposición con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía	
4.3.5.4. Conclusión	
4.4. CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i> MEDIANTE LA TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET)	210
4.4.1 EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA EN RATAS HEMBRAS	
4.4.2 EFECTO DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i> EN RATAS HEMBRAS	
4.4.3 EFECTO DE LA REPOSICIÓN INMEDIATA CON 17 β -ESTRADIOL DURANTE 3 SEMANAS TRAS LA OVARIECTOMÍA SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i> EN RATAS HEMBRAS	
4.4.4 EFECTO DE LA REPOSICIÓN CON 17 β -ESTRADIOL DURANTE 3 SEMANAS TRAS 3 Y 6 SEMANAS DE OVARIECTOMÍA SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i> EN RATAS HEMBRAS	
4.4.5 CONCLUSIÓN	
4.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO EN PLASMA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹ H NMR)	220
4.5.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) de espectro de RMN de PLASMA	
4.5.1.1. Efecto de la ovariectomía	
4.5.1.2. Efecto de la reposición inmediata con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía	
4.5.1.3. Efecto de la reposición con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía	
4.5.1.4. Conclusión	

- 4.5.2 METABOLITOS DE ESPECIAL RELEVANCIA
OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES
(PCA) de espectro de RMN de PLASMA.
- 4.5.2.1. Glicerol
- 4.5.2.2. Glucosa

5. <u>DISCUSIÓN</u>	231
5.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	233
5.2 LIMITACIONES DEL ESTUDIO	235
5.3 EFECTO DE LA OVARECTOMÍA SOBRE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO	237
5.4 EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS OVARECTOMIZADAS	238
5.5 EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE GLUTATION PEROXIDASA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS OVARECTOMIZADAS	241
5.6 EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS OVARECTOMIZADAS	243
5.7 EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PLASMA DE RATAS HEMBRAS OVARECTOMIZADAS	244
	X

5.8 EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CEREBRO DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS	246
5.9 EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HÍGADO DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS	247
5.10 EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CORAZÓN DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS	248
5.11 EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i> EN RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS	250
5.12 PERFIL METABÓLICO EN PLASMA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹ H-NMR) DE RATAS OVARIECTOMIZADAS Y EL EFECTO DE LA REPOSICIÓN CON ESTRADIOL	254
5.13 CUANTIFICACIÓN METABÓLICA EN PLASMA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹ H NMR) DE RATAS OVARIECTOMIZADAS Y EL EFECTO DE LA REPOSICIÓN CON ESTRADIOL	256
5.14 IMPORTANCIA DEL COMIENZO INMEDIATO DE LA TERAPÉUTICA HORMONAL SUSTITUTIVA TRAS LA MENOPAUSIA	258

6. <u>SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION</u>	261
6.1. SUMMARY	263
6.2. INTRODUCTION	264
6.3. CRITICAL EVALUATION OF THE METHODOLOGY: BENEFITS/LIMITATIONS OF THE TECHNIQUES	266
6.4. EFFECTS OF OVARECTOMY AND ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY ON THE OXIDANT PRODUCTION BY HEPATIC MITOCHONDRIA	267
6.5. EFFECTS OF OVARECTOMY AND ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY ON THE ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT ENZYME GLUTATHIONE PEROXIDASE IN HEPATIC MITOCHONDRIA	270
6.6. EFFECTS OF OVARECTOMY AND ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY ON THE OXIDATIVE DAMAGE IN TISSUES	272
6.7. AGING REDUCES THE CEREBRAL GLUCOSE UPTAKE MEASURED BY <i>IN VIVO</i> POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY (PET)	279
6.8. EFFECTS OF THE ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY ON CEREBRAL GLUCOSE UPTAKE <i>IN VIVO</i> IN OVARECTOMISED WISTAR RATS	282
6.9. IMMEDIATE ESTROGEN REPLACEMENT HAS THE BEST METABOLIC PROFILE IN PLASMA OF OVARECTOMIZED RATS BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (¹ H NMR)	284

6.10. IMPORTANCE OF INITIATION OF ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY AFTER MENOPAUSE IS ESTABLISHED: "CRITICAL TIME HYPOTHESIS"	290
7. <u>CONCLUSIONES</u>	295
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	297

***ÍNDICE DE
FIGURAS Y
TABLAS***

INTRODUCCIÓN

FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo redox del glutatión	24
Figura 1.2. Mecanismo de peroxidación lipídica	26
Figura 1.3. Estructura básica de las mitocondrias	33
Figura 1.4. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial	36
Figura 1.5. Control respiratorio mitocondrial	38
Figura 1.6. Número de mujeres y de hombres según su edad a partir de los 55 años en España	47
Figura 1.7. Estructura química del 17 β -estradiol	52
Figura 1.8. Distribución de receptores estrogénicos	56
Figura 1.9. Activación génica por los dímeros de receptor de estrógenos	57
Figura 1.10. Receptor de estrógeno de membrana en células MCF-7	61
Figura 1.11. Mecanismo de las vías de señalización genómica y “no genómica” mediada por estrógenos a través de los receptores de estrógenos clásicos y del GPR30	63
Figura 1.12 Mecanismo de la vía de señalización mediada por estrógenos del GPR30	65
Figura 1.13. Efectos beneficiosos y perjudiciales de los estrógenos	73
Figura 1.14. Mecanismo de acción del Tamoxifeno	78
Figura 1.15. Primer tomógrafo PET para estudios con humanos	83
Figura 1.16. Estudio PET-RM <i>in vivo</i>	86
Figura 1.17. (A) Rangos de movimiento de los positrones según el isótopo, (B) emisión de positrones y (C) esquema de aniquilación positrón-electrón	87
Figura 1.18. Síntesis de FDG	92
Figura 1.19. Metabolismo de FDG y Glucosa	93
Figura 1.20- Estudio cerebral con 18-FDG en humanos	95
Figura 1.21. Imagen del consumo corporal de un ratón de FDG mediante PET y de su morfología mediante TAC	97
Figura 1.22. Análisis cerebral mediante SPM de las diferencias regionales en el consumo de FDG	99
Figura 1.23. Modelo abierto 4K que describe la captación y metabolismo en el tejido de FDG	100

Figura 1.24. Curvas Actividad-Tiempo de plasma (ordenada izquierda) y cerebro completo, corteza, tálamo, cerebelo y tronco cerebral (ordenada derecha) de una rata	101
Figura 1.25. Estudio del envejecimiento sobre el consumo cerebral de glucosa (FDG-PET) en ratones envejecidos aceleradamente	102
Figura 1.26. Estudio longitudinal FDG-PET de un sujeto (mujer)	105
Figura 1.27: Comparación de la sensibilidad relativa de diversas herramientas de metabolómica	110
Figura 1.28: Análisis de datos de metabolómica: a, un procedimiento típico podría comenzar con el espectro de RMN	113
Figura 1.29: las dos matrices V y U	116
Figura 1.30: desplazamientos químicos de ^1H y de ^{13}C	120
Figura 1.31: el espectro de ^1H -RMN de acetato de metilo	122
Figura 1.32: métodos para trazar el perfil metabólico por RMN	126
Figura 1.33: normalización de un conjunto de espectros	128
Figura 1.34: binning en un espectro	130
Figura 1.35: mejora del análisis PC de acuerdo al procesados los datos del espectro de RMN	131

TABLAS

Tabla 1.1. Vida media de radicales libres	8
Tabla 1.2. Tipos de SOD y localización celular mayoritaria	21
Tabla 1.3. Esperanza de vida en Europa en el siglo XX	44
Tabla 1.4. Efecto antioxidante del estradiol	69
Tabla 1.5. Radionucleidos emisores de positrones de aplicación clínica más común. Se indican el periodo de semidesintegración en minutos, la energía máxima de emisión del positrón en KeV y las reacciones nucleares más habituales para la obtención de los radionucleidos correspondientes	89
Tabla 1.6: Comparación de diferentes tecnologías de la metabolómica	109
Tabla 1.7: Clasificación de los enfoques metabolómicos	124

MATERIAL Y MÉTODOS:

FIGURAS

Figura 3.1: Diseño del estudio. Grupos de experimentación en ratas hembras Wistar	143
Figura 3.2: Molécula de ^{18}F -FDG y esquema de su consumo en la célula	150
Figura 3.3: Esquema de detección de coincidencias por el equipo Albira PET	151
Figura 3.4: Rata Wistar hembra joven	153
Figura 3.5: Esquema de detección de peróxido de hidrógeno	159
Figura 3.6: Esquema del fundamento de la reacción enzimática (GPx)	165

TABLAS

Tabla 3.1.- Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos	161
--	-----

RESULTADOS

FIGURAS

Figura 4.1.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas	178
Figura 4.2.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas	179
Figura 4.3.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía	181
Figura 4.4.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía.	182

Figura 4.5.- Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas	184
Figura 4.6.- Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas	185
Figura 4.7.- Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía	186
Figura 4.8.- Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía	187
Figura 4.9.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas	189
Figura 4.10.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas	190
Figura 4.11.- Niveles de MDA de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente o tras 3 y 6 de ovariectomía	191
Figura 4.12.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía	192
Figura 4.13.- Niveles de MDA en plasma de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas	193
Figura 4.14.- Niveles de MDA en plasma de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas	194
Figura 4.15.- Niveles de MDA en plasma de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía	195

Figura 4.16 Niveles de MDA en plasma de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía	196
Figura 4.17.- Niveles de MDA en cerebro de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas	198
Figura 4.18.- Niveles de MDA en cerebro de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas	199
Figura 4.19.- Niveles de MDA de cerebro de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía	200
Figura 4.20.- Niveles de MDA de cerebro de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía	201
Figura 4.21.- Niveles de MDA en hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas	202
Figura 4.22.- Niveles de MDA en hígado de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas	203
Figura 4.23.- Niveles de MDA en hígado de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía	204
Figura 4.24.- Niveles de MDA en hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía	205
Figura 4.25.- Niveles de MDA en corazón de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas	206
Figura 4.26.- Niveles de MDA en corazón de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas	207
Figura 4.27.- Niveles de MDA en corazón de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía	208

Figura 4.28.- Niveles de MDA en corazón de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía	209
Figura 4.29.- Consumo cerebral de glucosa <i>in vivo</i> en ratas jóvenes (3-4 meses) y viejas (22-24 meses)	211
Figura 4.30.- Consumo cerebral de glucosa <i>in vivo</i> en ratas ovariectomizadas de 3 y 6 semanas	213
Figura 4.31.- Consumo cerebral de glucosa <i>in vivo</i> en ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas	215
Figura 4.32.- Consumo cerebral de glucosa <i>in vivo</i> en ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía	217
Figura 4.33.- Consumo cerebral de glucosa <i>in vivo</i> en ratas ovariectomizadas de 3 y 6 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía	219
Figura 4.34.- Superposición de la región alifática de todos los espectros de RMN estudiados con una indicación general de los metabolitos observados y una ampliación de regiones de interés	221
Figura 4.35.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metabonoma del plasma de ratas ovariectomizadas –OVX– (3, 6 y 9 semanas) respecto al grupo control	222
Figura 4.36.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metabonoma del plasma de ratas ovariectomizadas de 3 semanas (OVX 3) y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas (OVX 3E)	223
Figura 4.37.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metabonoma del plasma de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas (OVX 6 y OVX 9) y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía (OVX 3 +3E y OVX 6 +3E)	225
Figura 4.38.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metabonoma del plasma de ratas ovariectomizadas de 3 y 6 semanas, y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, tras 3 y 6 de ovariectomía	226

Figura 4.39.- Valores plasmáticos de espectro de RMN de Glicerol de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, tras 3 y 6 de ovariectomía	228
Figura 4.40.- Valores plasmáticos de espectro de RMN de Glucosa de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, tras 3 y 6 de ovariectomía	230

DISCUSIÓN

FIGURAS

Figura 5.1. Esquema del mecanismo de acción del estradiol	240
---	-----

SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

FIGURES

Figure 6.1.- Estrogen treatment against the increase of hydrogen peroxide produced in isolated hepatic mitochondria from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) is only effective if applied immediately, or three and six weeks after, ovariectomy	269
Figure 6.2.- Initiating ERT immediately after ovariectomy recovers the activity of antioxidant enzyme activity of GPx, but late treatment does not	271
Figure 6.3.- Oxidative damage produced at the beginning of ovariectomy and estradiol or reversed with longer ovariectomy periods	273
Figure 6.4. Systemic lipid peroxidation occurs when menopause is established	274
Figura 6.5.- Lipid peroxidation levels (MDA) in brain from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy	276

Figure 6.6.- The liver as an organ is not involved as mitochondria in lipid peroxidation levels (MDA) from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy	277
Figura 6.7.- Immediate ERT is beneficial respect to lipid peroxidation levels (MDA) in heart from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy	278
Figure 6.8.- Aging decreases the brain glucose uptake <i>in vivo</i> in young (3-4 months) and old (22-24 months) rats	281
Figure 6.9.- The cerebral metabolism of glucose matched the control group levels when ERT was initiated immediately after ovariectomy	283
Figure 6.10.- Similarity in metabolic profile between control rats and those replaced with estradiol immediately after ovariectomy	285
Figure 6.11.- Overlay of the aliphatic region of all NMR spectrum studied with a general indication of the metabolites observed and an expansion of areas of interest	286
Figura 6.12.- NMR spectrum of glycerol in plasma from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy	288
Figura 6.13.- NMR spectrum of glucose in plasma from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy	289

ABREVIATURAS

- $^1\text{O}_2$: Oxígeno singlete
- ADP: Adenosín difosfato
- ANT: *adenine nucleotide translocator*
- ATP: Adenosín trifosfato
- BGO: Oxido de Germanato de Bismuto
- BPDS: Baptholphenanthroline disulfonate
- BSA: Suero bovino albúmina
- BSA: Body surface area
- CTEM: Componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial
- CT: *computed tomography*
- DES: Dietilestilbestrol
- D₂O: Agua pesada (óxido de Deuterio)
- DCL: Deterioro cognitivo leve
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- E2: 17 β -estradiol
- ECAT II: Emission Computed Axial Tomograph
- EDTA: Ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetracético.
- EGTA: Etileno glicol-bis (aminoetil eter)- N,N,N',N'- ácido tetracético.
- ERE: Elementos de respuesta a estrógenos (Estrogen Responsive Elements)
- Erk1/2MAPK: Kinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2
- FDG: 2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa
- FWHM: *full width at half maximum*
- G6PDH: glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa
- GC-MS: Cromatografía de gases - Espectrometría de masas
- GPx: Glutación peroxidasa

- GPR30: Receptor huérfano acoplado a proteína G (del inglés *G-protein coupled receptor 30*)
- GSH: Glutación reducido
- GSSG: Glutación oxidado
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- HCl: Ácido clorhídrico
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad
- HEPES: N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico)
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- HSP90: *Heat shock protein 90*
- HTMPs: Estrategia de Perfiles de alto Rendimiento Molecular
- ID: Dosis inyectada
- IkB: Inhibidor de NF-κB
- IGF-1: Factor de crecimiento insulínico (del inglés *Insulin Growth Factor*)
- KeV: Kiloelectron Voltio
- KCl: Cloruro potásico
- KH₂PO₄: Fosfato monopotásico
- KOH: Hidróxido potásico
- LBM: Masa libre de grasa (del inglés *Lean Body Mass*)
- LC-MS: Cromatografía de líquidos - Espectrometría de masas
- LDA: Análisis Discriminativo Lineal
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad
- LRH-1: Receptor homólogo del hígado 1 (del inglés *Liver receptor homolog-1*)
- LSO: Oxiortosilicato de lutecio
- MAPK: Proteín kinasas activadas por mitógenos

MBq: Megabequerelios

mCi: MiliCurios

MDA: Malondialdehído

MLEM: *Maximum-likelihood expectation maximization algorithm*

MgCl₂: Cloruro magnésico

Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

MOPS: Tampón del ácido propanosulfónico (del inglés *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid buffer*)

MRGlc: Tasa Metabólica de Glucosa (del inglés *Glucose Metabolic rate*)

NADH: Nicotiamida adenín dinucleótido

NADPH: Nicotiamida adenín dinucleótido fosfato

NaHCO₃: Bicarbonato sódico

NaOH: Hidróxido sódico

NEM: N-etilmaleimida

NF-κB: Factor Nuclear kappa B

NO[•]: Óxido nítrico

NO₂[•]: Dióxido de nitrógeno

O₂^{•-}: Anión superóxido

OH[•]: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Anión peroxinitrito

OVX: Ovariectomía

Oxo8dG: 8-hidroxi-2' desoxi guanosina

p38 MAPK: Proteín kinasa activada por mitógenos

PBS: Fosfato tampón salino

PCA: Ácido perclórico (del inglés *Perchloric Acid*)

PCA: Análisis de Componentes Principales (del inglés *Principal*

Components Analysis)

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

PI3Ks: Fosfatidilinositol 3-kinasas (del inglés *Phosphoinositide 3-kinase*)

PLS: Cuadrados Parciales

PLS-DA: Análisis Discriminativo por Mínimos Cuadrados Parciales

RDS: *Radiopharmaceutical Delivery System*

RE: Receptores estrogénicos

RM: Resonancia magnética

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

ROI: Región de interés

ROO[•]: Radical peroxilo

ROS: Especies reactivas del oxígeno

RS[•]: Radicales de átomos derivados de azufre

RT-PCR: Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa

SAM: Ratones con envejecimiento acelerado (del inglés *Senescence accelerated mice*)

SBM: Mapeo Estadístico Cerebral (del inglés *Statistical Brain Mapping*)

SDS: Dodecil sulfato sódico

SERM: Modulador de los receptores de estrógenos

SF-1: Factor esteroideogénico 1 (del inglés *Steroidogenic factor 1*)

SHGB: Globulina unida a la hormona sexual

SOD: Superóxido dismutasa

SPECT: Tomografía Computerizada por Emisión de Fotones Individuales (del inglés *Single Photon Emission Computed Tomography*)

SUV: Standard uptake value

TAC: Tomografía axial computerizada

TAC: Curva de actividad temporal (del inglés *Time Activity Curve*)

TAF-1: *Transcription-activation function-1*

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS: Especies reactivas del tiobarbitúrico

TGF- α : Factor de crecimiento transformante (del inglés *Transforming Growth Factor alpha*)

TIM: *Translocase of the inner membrane*

TOM: *Translocase of the outer membrane*

TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

TSE: terapia sustitutiva con estrógenos (del inglés *ERT, estrogen replacement therapy*)

TSH: Terapia de sustitución hormonal (del inglés *HRT, hormonal replacement therapy*)

UV: Ultravioleta

VDAC: *voltage dependent anion channel*

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés *Vascular endothelial growth factor*)

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VOI: Volumen de interés

WHI: Iniciativa de salud en las mujeres (del inglés *Women's Health Initiative*)

INTRODUCCIÓN

1.1. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.

1.1.1. Concepto de envejecimiento

El término envejecimiento hace referencia a los procesos post-madurativos que conducen a una disminución de la eficacia de la homeostasia y a un incremento en la vulnerabilidad del organismo. No puede ser considerado propiamente como una enfermedad por lo que hay que distinguirlo de la muerte en edad avanzada, causada por enfermedades tales como aquéllas de tipo cardiovascular, cáncer, etc.

Hasta el momento no existe una definición única ampliamente aceptada para este término. Harman (Harman, 1956a) lo define como la acumulación progresiva de cambios con el tiempo, que provocan el aumento de probabilidad de enfermedad y muerte del individuo. Además, según Strehler (Strehler, 1985) reconocido gerontólogo americano, define el envejecimiento a través de cuatro postulados:

- El envejecimiento es **universal**, es decir, un fenómeno dado asociado al proceso de envejecimiento debe darse en menor o mayor medida en todos los individuos de una especie.
- El envejecimiento es **intrínseco**, es decir, las causas que lo provocan deben de ser de origen endógeno, no dependiendo de factores externos o de origen ambiental.
- El envejecimiento es **progresivo**, los cambios que conducen a envejecer se dan de manera paulatina a lo largo de la vida.

- El envejecimiento es **deletéreo**, es decir que un determinado fenómeno sólo se considerará parte del proceso de envejecer si es dañino.

No cabe duda de que la alteración de la homeostasia en el organismo envejecido es una consecuencia genética. Ésta determina la respuesta del individuo frente a las influencias exógenas, conduciendo a una mayor predisposición frente a patologías y finalmente la muerte (Ginaldi et al., 2000) determinando así la longevidad del individuo.

Aunque en un principio el componente genético recibió la mayor atención en las diferencias de longevidad entre individuos (Begun et al., 2000), los mecanismos epigenéticos han emergido contribuyendo claramente a las alteraciones de la estructura y función del genoma que acompañan al envejecimiento (Gonzalo S, 2010).

1.1.2. Consecuencias del envejecimiento

Prácticamente todas las funciones fisiológicas pierden eficiencia. En general, podemos afirmar que se produce la pérdida de la capacidad para mantener estable el medio interno del individuo frente a las perturbaciones del ambiente (pérdida de homeostasis). Un ejemplo de esto, es la menor capacidad de las personas mayores para soportar temperaturas extremas, infecciones y situaciones de estrés en general. Así pues, la fuerza y elasticidad en el sistema músculo-esquelético se deterioran, se produce un descenso de la filtración de los riñones, de la ventilación de los pulmones o del flujo máximo sanguíneo. Aparece un aumento de la intolerancia a la

glucosa, pérdida de visión, audición, memoria, coordinación motora y otras funciones fisiológicas de importancia.

La mayoría de los órganos vitales van a sufrir fenómenos de atrofia o degeneración. Esto es más notable en aquellos órganos compuestos por células postmitóticas como son las neuronas, células miocárdicas, musculares o las del parénquima renal. Además se da una degradación con la edad de los materiales que se encuentran entre las células. Esto ocurre debido al descenso en el número de fibras de elastina o al entrecruzamiento de las fibras de colágeno en la dermis.

También se puede apreciar asociado al envejecimiento, un aumento en la sensibilidad a los traumatismos, las infecciones y muchas formas de estrés, así como un funcionamiento deteriorado del sistema inmunitario que da lugar a enfermedades autoinmunes o amiloidosis.

Se dan más casos de cáncer y de enfermedades degenerativas en ancianos, que son la mayor causa de muerte y de pérdida de una buena calidad de vida.

1.2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO.

Existen muchas teorías para darle una explicación al fenómeno del envejecimiento y aun hoy en día no se sabe a ciencia cierta cuáles son las causas que lo provocan. Podemos dividirlos en:

- **Teorías Orgánicas:** Inmunológica, Neuroendocrina.
- **Teorías Celulares:** Límite de la Duplicación Celular.
- **Teorías de Envejecimiento Programado:** Programa Genético de Envejecimiento

- **Teorías Evolutivas.**
- **Teorías Moleculares:** Acumulación de Productos de Desecho, Entrecruzamientos, Mutaciones Somáticas, Errores Catastróficos, Teoría de los Radicales libres,...

Dada la relevancia en nuestro trabajo, nos centraremos en la Teoría de los Radicales Libres en el Envejecimiento.

1.3. TEORÍA DE LOS RADICALES LIBRES EN EL ENVEJECIMIENTO.

Una de las teorías más relevantes para explicar el envejecimiento es la Teoría del Envejecimiento por Radicales Libres, que fue propuesta inicialmente por Harman en la década de los años 50 (Harman, 1956a).

El desarrollo de este trabajo, se sustenta principalmente en esta teoría, por ello prestaremos una mayor atención a la misma.

La Teoría de los Radicales Libres enunciada por Harman en 1956 propone que los radicales libres derivados de oxígeno son los responsables del daño oxidativo asociado a la edad. Los sistemas antioxidantes no son capaces de hacer frente a todas las especies reactivas de oxígeno que se generan continuamente a lo largo de la vida de la célula, lo que acaba provocando un daño oxidativo en ella, y por extensión sobre los tejidos.

Existen muchas pruebas experimentales a favor de esta teoría. Los animales viejos presentan mayores índices de oxidación que los jóvenes y se acumulan proteínas oxidadas, formas oxidadas del DNA y de lípidos (Stadman, 1992, Sohal, 1993). En principio, esto podría atribuirse a una tasa mayor de radicales libres generados por los organismos viejos. Otras

evidencias experimentales que soportan esta teoría como posible causa del proceso de envejecimiento, son el aumento de la vida media obtenido incrementando las defensas antioxidantes y la implicación de las especies de oxígeno reactivas en los procesos degenerativos relacionados con la edad (Harman, 1978). Se ha comprobado que la administración de antioxidantes puede aumentar la vida media en moscas (Miquel et al., 1980, Vina et al., 1992). Así mismo, Orr y Sohal crearon un modelo transgénico de *Drosophila melanogaster* que sobreexpresaba dos enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa cobre/zinc y catalasa) y comprobaron como aumentó tanto su longevidad media como máxima (Orr and Sohal, 1994). Es decir, la protección frente al estrés oxidativo hace incrementar la longevidad de la mosca transgénica.

Por otra parte, los radicales libres de oxígeno y los peróxidos son generados continuamente en la cadena de transporte mitocondrial (Boveris and Chance, 1973, Chance et al., 1979). Además, cerca del 1-2% del oxígeno usado por la mitocondria de mamíferos en estado 4 no da lugar a agua, sino especies activadas del oxígeno (Boveris and Chance, 1973, Chance et al., 1979).

Para entender esta teoría pasamos, a continuación, a definir algunos conceptos y términos básicos.

1.3.1. Radicales libres

1.3.1.1. Concepto de radical libre

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, esto hace que estas especies

presenten una gran reactividad. Se caracterizan por su gran poder oxidante y porque su vida media es normalmente muy corta. La tabla 1.1 muestra ejemplos de la vida media de algunos radicales libres.

RADICAL	SUSTRATO	CONCENTRACIÓN	VIDA MEDIA (a 37°C)
HO [·]	LH	1 M	10 ⁻⁹ s
RO [·]	LH	100 Mm	10 ⁻⁶ s
ROO [·]	LH	1 mM	7 s
L [·]	O ₂	20 μM	10 ⁻⁸ s
Q [·]	--	--	Días

Tabla 1.1. Vida media de radicales libres

Estas especies químicas son abundantes en los sistemas vivos. Es más, algunos autores como Denham Harman en su estudio sobre el origen y evolución de la vida (Harman, 2001) proponen a los radicales libres como una de las causas del origen de la vida en nuestro planeta.

Así pues, por una parte da origen a la vida y por otra, por su capacidad de formar distintos radicales libres es capaz de dañar estructuras esenciales para el desarrollo de ésta, tales como DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos (Sies, 1983). Además los radicales libres intervienen en procesos fisiopatológicos como la diabetes y algunos tipos de cáncer (Takada et al., 1982, Okamoto, 1985). También intervienen en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Pacifci and Davies, 1991) y el ejercicio físico agotador (Davies et al., 1982, Sastre et al., 1992). El papel de los radicales en el envejecimiento es un tema que se comentará más adelante, debido a su relación con este trabajo.

En la naturaleza los radicales libres son mayoritariamente compuestos derivados del oxígeno y se denominan especies reactivas del

oxígeno (ROS). La base química por la cual el oxígeno se comporta de tal forma viene detallada en el siguiente apartado.

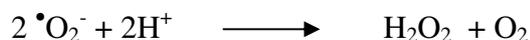
1.3.1.2. Clases de Radicales libres

Existen muchas clases de radicales libres, tanto especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) como las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Algunos de los radicales libres más importantes son:

1.3.1.2.1. Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Estado de reducción del oxígeno de un electrón, formado en reacciones catalizadas enzimáticamente, como producto en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. (Korycka-Dahi and Richardson, 1981), en las oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.), también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Viña et al., 1983) o la riboflavina (Barton and Parker, 1970). Asimismo en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris et al., 1972), siendo potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos.

Se ha estimado que una célula del cuerpo humano produce alrededor de unas 10^{10} moléculas de anión superóxido por día (Ames et al., 1993). Sin embargo el 99% de las moléculas que se producen se dismutan hacia peróxido de hidrógeno (Cheeseman and Slater, 1993).

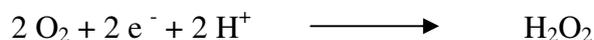


1.3.1.2.2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre como tal, pues no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Es la forma menos activa de las especies reactivas del oxígeno. Su importancia recae en el hecho de que atraviesa fácilmente las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción.

Se puede originar a partir de diversas fuentes:

- Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones (Sawyer, 1988, Fridovich, 1997).

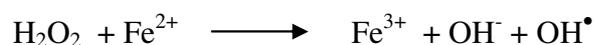


- Por dismutación del $\bullet\text{O}_2^-$ (Cheeseman and Slater, 1993, Frei, 1994a).
- Como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.) (Fridovich, 1986a, Fridovich, 1986b).
- Por reacciones químicas de autooxidación (Korycka-Dahi and Richardson, 1981).

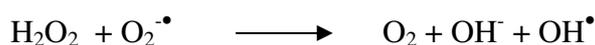
1.3.1.2.3. Radical hidroxilo (OH \bullet)

Estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno. Es la especie más reactiva con una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} s (Liochev and Fridovich, 1994). Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en

2 moléculas de radical hidroxilo. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton (Fenton, 1894).



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la reacción de Haber-Weiss (Haber and Weiss, 1934).



Esta reacción es catalizada por metales como hierro o cobre.

1.3.1.2.4. Radical peroxilo (ROO[•])

Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos por pérdida de hidrógeno. Tiene una vida media relativamente larga, del orden de segundos, ver tabla 1.1.

1.3.1.2.5. Oxígeno singlete (¹O₂)

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre como tal. Se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10⁻⁶ segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas o en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa,

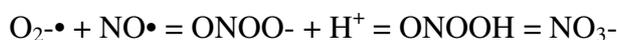
lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras (Kanofsky and Sima, 1993).

1.3.1.2.6. Óxido nítrico (NO•)

El óxido nítrico es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 s). Ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina, dando como subproducto NO• en numerosos tipos celulares (Moncada et al., 1991). Además lo producen los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria.

El óxido nítrico genera anión peroxinitrito (ONOO-) al reaccionar con el anión superóxido (Gryglewslí et al., 1986, Miles et al., 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



Interviene en numerosos procesos fisiológicos, actuando como regulador del flujo sanguíneo local, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotransmisor, etc. siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa (Czapski and Goldstein, 1995).

1.3.1.2.7. Dióxido de nitrógeno (NO₂[•])

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO[•] atmosférico (Postlethwait et al., 1995). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Postlethwait et al., 1995).

1.3.1.2.8. Radicales de átomos derivados de carbono (R[•])

Los radicales centrados en un átomo de carbono (R[•]) surgen del ataque de un radical oxidante sobre una molécula biológica. En el primer paso se arranca un átomo de hidrógeno (H[•]) de un grupo metileno situado entre dos enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un radical peróxido (ROO[•]). A su vez, estos radicales pueden participar en otras reacciones y generar otras especies radicales (Frei, 1994b).

1.3.1.2.9. Radicales de átomos derivados de azufre (RS[•])

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre (RS[•]) formado, por ejemplo, a partir de la cisteína. Ésta se autooxida con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiilo e hidroxilo (Estrela et al., 1983, Sparrow and Olszewski, 1993).

1.3.2. Génesis de ROS

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas como la dieta (en la que son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante), el

ozono, el humo del tabaco, la polución ambiental, etc. (Ames, 1983). Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman and Crapo, 1982, Frei, 1994b). Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Halliwell, 1991).

1.3.2.1 Fuentes exógenas

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son:

- Muchos agentes **antineoplásicos** tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos **antibióticos** (Doroshov and Hochstein, 1982) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- La irradiación de los organismos debido a las **radiaciones electromagnéticas** (rayos X y γ) o debido a **radiaciones de partículas** (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Bielsky and Gebieki, 1977).
- **Factores ambientales**, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se

convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason, 1982).

1.3.2.2. Fuentes endógenas

1.3.2.2.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en interior de la célula. Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada a la fosforilación oxidativa, en la cual se produce energía en forma de ATP.

Este sistema enzimático se comentará detalladamente en el apartado 1.4 de la introducción del presente trabajo.

1.3.2.2.2. Reacción de Fenton-Haber-Weiss

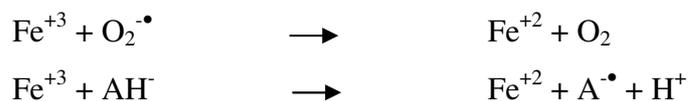
Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{+2}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones. El agua oxigenada (H_2O_2) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton (Fenton, 1894) descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss los que posteriormente comprobaron cómo el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en radical hidroxilo e ión hidroxilo (Haber and Weiss, 1932).



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell and Gutteridge, 1986). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Rawley and Halliwell, 1983, Sawyer, 1988) y por el radical superóxido (Frei, 1994a), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



1.3.2.2.3. Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila et al., 1981) y xenobióticos. Bajo la denominación de citocromos P450 se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidos entre los seres vivos. Son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de

radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988, Foster and Estabrook, 1993).

1.3.2.2.4. Microsomas o peroxisomas

Los microsomas o peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris et al., 1972). La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en ellos (Freeman and Crapo, 1982, Krinsky, 1994). Por otro lado, el citocromo P450 tiene un papel importante en los microsomas que detoxifican xenobiótico (Philpot, 1991).

1.3.2.2.5. Membrana plasmática

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio (Jones et al., 1994).

Cabe destacar el papel de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la

producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos(White, 1990).

1.3.3. Antioxidantes fisiológicos

Ya que los seres vivos han evolucionado en presencia de sustancias oxidantes, la evolución ha ido dotando a estos organismos de sistemas capaces de hacer frente a este tipo de sustancias tan reactivas. Halliwell en 1995 definió como antioxidante a “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Sies, 1993, Halliwell and Gutteridge, 1995, Halliwell, 1996).

Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ROS
- Interceptando el ataque de ROS
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS y, por último
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los *antioxidantes primarios* previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical OH^\bullet (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Los *antioxidantes secundarios* son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell and Gutteridge, 1990).

Los *antioxidantes terciarios* reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies et al., 1987b, Pacifici and Davies, 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Sevanian et al., 1985).

Otra forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

1.3.3.1. Antioxidantes enzimáticos

1.3.3.1.1. Superóxido dismutasa

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas (Hassan and Fridovich, 1977).

Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord and Fridovich, 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord, 1974, McCord et al., 1974).



Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando H_2O_2 . Sin embargo, la velocidad de dismutación espontánea no enzimática es relativamente baja (a pH fisiológico, está alrededor $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). La catálisis de la reacción de dismutación llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa incrementa esta velocidad del orden de 10.000 veces.

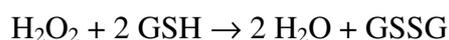
Hay descritas cuatro formas diferentes de superóxido dismutasas (Fridovich, 1974) según el grupo prostético metálico ligado al enzima (tabla 1.2).

ENZIMA	GRUPO PROSTÉTICO	LOCALIZACIÓN CELULAR
Cu,Zn-SOD	Cu, Zn	Citosol y Núcleo
Mn-SOD	Mn	Matriz mitocondrial y Citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

Tabla 1.2. Tipos de SOD y localización celular mayoritaria

1.3.3.1.2. Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es también un antioxidante primario. Convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance et al., 1979).

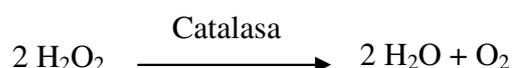


Hay dos tipos de glutación peroxidasa, y ambas requieren glutación reducido como dador de equivalentes reductores: *Glutación peroxidasa selenio dependiente*: es una proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986), además de intervenir en otros procesos como eliminación de xenobióticos (Sohn et al., 1999). Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom et al., 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).

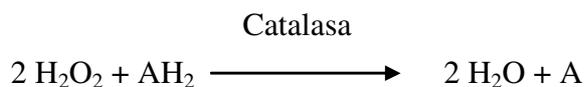
Glutación peroxidasa no selenio dependiente: sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986). La mayor parte de la actividad glutación peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

1.3.3.1.3. Catalasa

La catalasa participa en la eliminación de peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance et al., 1979).



También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Chance et al., 1979).



La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas (Tolbert and Essner, 1981), si bien en años recientes se ha descrito cierta actividad catalasa también en mitocondrias y citosol (Rodríguez et al., 2000).

1.3.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

1.3.3.2.1. El glutatión

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 (Hopkins, 1921) y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el glutatión tenga una funcionalidad amplia e importante en la célula.

Se puede encontrar en 2 formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado que está compuesto por 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas.

El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña, 1990), una de ellas es la de proteger a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones.

1.3.3.2.1.1. Papel antioxidante del glutatión: ciclo redox

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa.

Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (figura 1.1). Tanto la

glutación peroxidasa como la glutación reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria.

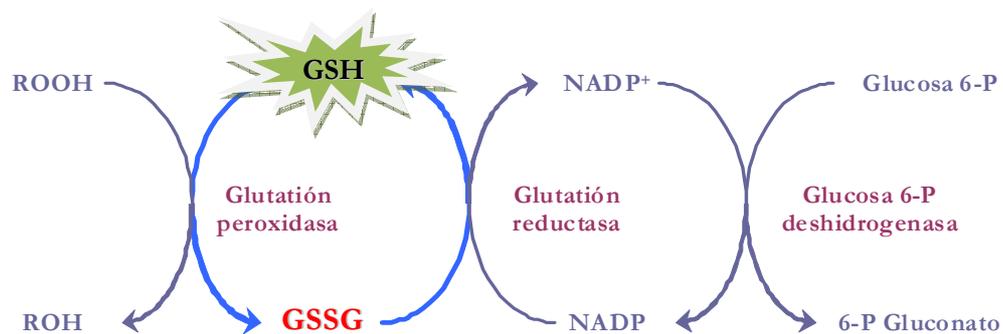


Figura 1.1 Ciclo redox del glutatión

1.3.3.2.2. Otros antioxidantes

Dada la importancia que adquieren en nuestro trabajo, destacaremos los estrógenos en su faceta de antioxidantes, que detallaremos más adelante.

1.3.4. Estrés oxidativo

1.3.4.1. Concepto de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986).

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies activadas de oxígeno, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell, 1996).

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes.

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas.

Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

1.3.4.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

1.3.4.2.1. Daño oxidativo a lípidos

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman and Slater, 1993) siendo el radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), el peróxido ($\text{ROO}\bullet$), el alcoxilo ($\text{RO}\bullet$) y el alquílico ($\text{R}\bullet$) los principales generadores de daño oxidativo a lípidos

El proceso de ataque oxidativo a lípidos (figura 1.2), denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Krinsky, 1994, Halliwell, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a

enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994).

De esta manera, un sólo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Cheeseman and Slater, 1993, Freeman and Crapo, 1982, Halliwell, 1991, Halliwell, 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Krinsky, 1994). La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman, 1985). El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga et al., 1994).

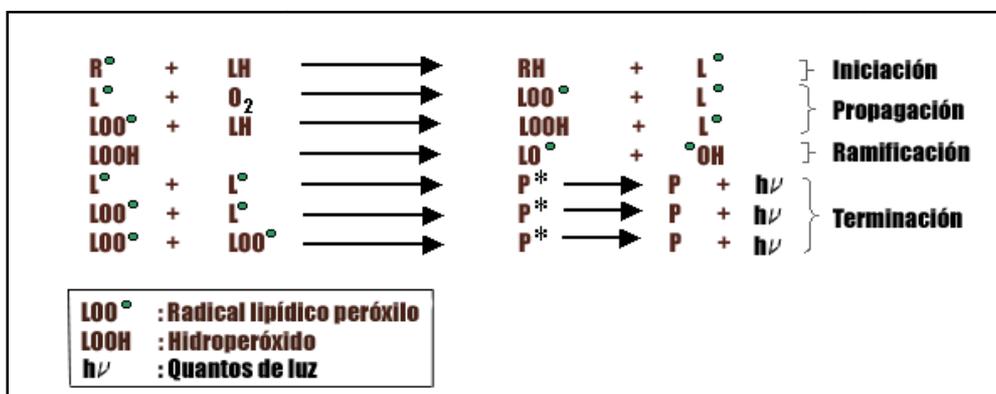


Figura 1.2. Mecanismo de peroxidación lipídica

1.3.4.2.2. Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadman, 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies et al., 1987a). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadman, 1992). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadman, 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean et al., 1993).

1.3.4.2.3. Daño oxidativo al ADN

El ADN también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. El oxígeno es capaz de atacar tanto a las bases como al azúcar.

Podemos encontrar más de veinte subproductos tras un ataque oxidativo al ADN. Entre ellos, la oxidación de la 2-desoxiguanosina a 8-hidroxi 2-desoxiguanosina es una de las lesiones más frecuentes, y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico, ya que durante la

replicación producirá transversiones de purinas (Kasai and Nishimura, 1984, Shibutani et al., 1992).

El daño oxidativo asociado a proteínas y ADN no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el ADN, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Breen and Murphy, 1995, Halliwell and Auroma, 1991). Por ello, las lesiones oxidativas al ADN parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada.

El ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear (Richter et al., 1988), ya que presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN (Donald and Johns, 1995); el sistema de reparación es menos efectivo (Suter and Richter, 1999, Shen et al., 1995) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi and Davies, 1993). Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de ADN codificante (Ames et al., 1993, Linnane et al., 1989) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

1.3.4.2.4. Daño oxidativo a glúcidos

Los glúcidos reaccionan con facilidad con el radical hidroxilo. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini et al., 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel et al., 1988) dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial (McCord, 1974). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald and Moy, 1980).

1.3.4.3. Indicadores de estrés oxidativo

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los indicadores propuestos, uno de los más relevantes es el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) característico de estrés oxidativo, de modo que un aumento en la concentración de glutatión oxidado produce una alteración del estado redox celular (Sies, 1986).

Además, como indicadores de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído y el hidroxinonenal son los más empleados, aunque también se pueden considerar los niveles de pentano y de etano. La 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina es un indicador de daño oxidativo al ADN, los grupos carbonilo y la 2-oxohistidina se utilizan como marcadores de daño en oxidativo en proteínas (Hageman et al., 1992), etc.

1.4. TEORÍA MITOCONDRIAL DE LOS RADICALES LIBRES EN EL ENVEJECIMIENTO.

Miquel y colaboradores proponen en 1980 la **Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular** (Miquel et al., 1980). Esta teoría sugiere que la senescencia es un producto derivado del ataque de los radicales de oxígeno al genoma mitocondrial en células postmitóticas fijadas (Miquel and Fleming, 1986). Las mitocondrias de las células postmitóticas consumen O₂ a velocidades altas, liberando entonces radicales de oxígeno que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes celulares (Miquel et al., 1980).

La Teoría Mitocondrial del Envejecimiento se ha probado recientemente en varios laboratorios, y existe en la bibliografía una gran cantidad de evidencias experimentales que la apoyan. Diversos autores han comprobado que las mitocondrias de animales viejos producen más radicales libres que las de los jóvenes (Sohal and Sohal, 1991, Sastre et al., 1996, Sastre et al., 1998). Además, existe una relación inversa entre la producción mitocondrial de peróxidos y la longevidad de los mamíferos (Sohal and Sohal, 1991, Barja et al., 1994, Ku et al., 1993). Estos resultados

apoyan la idea de que la generación de prooxidantes es un factor crítico en la velocidad del envejecimiento (Sohal and Sohal, 1991). Así mismo, se ha demostrado que el daño oxidativo al DNA mitocondrial, proteínas y lípidos sobrevienen a lo largo del envejecimiento (Richter et al., 1988, Shigenaga et al., 1994, Benzi and Moretti, 1995, García de la Asunción et al., 1996, Sastre et al., 1996, Sastre et al., 1998), y que la generación de peróxidos por la mitocondria aumenta con la edad (Sastre et al., 1996, Sastre et al., 1998). El papel de las mitocondrias viejas en el envejecimiento celular se ha demostrado microinyectando mitocondrias aisladas a partir de fibroblastos de ratas viejas, donde se veía que las células inducidas degeneraban (Corbisier and Remacle, 1990).

La generación continua de ROS por la mitocondria a lo largo de la vida celular, produce un estrés oxidativo mitocondrial “crónico” relacionado con la edad, que juega un papel clave en el envejecimiento. Más aún, la mitocondria de especies que viven periodos de tiempos más cortos produce relativamente cantidades más elevadas de ROS que aquella procedente de especies que viven más (Sohal et al., 1990, Sohal and Sohal, 1991, Barja et al., 1994). De este modo, la velocidad de producción de ROS aparece como determinante en el potencial de vida máxima (Perez-Campo et al., 1998).

El papel de la mitocondria en el envejecimiento celular también se ha relacionado con las pérdidas funcionales mitocondriales a lo largo del proceso de envejecimiento (Miquel et al., 1980, Shigenaga et al., 1994). Así, la actividad respiratoria de mitocondrias aisladas decrece con la edad en hígado, músculo esquelético y cerebro. Recientemente, en nuestro laboratorio demostramos que el potencial de membrana mitocondrial decrecía con la edad y que aumentaba el tamaño mitocondrial en el

envejecimiento (Sastre et al., 1996). También se ha publicado que existe una disminución de los transcritos mitocondriales relacionados con la edad en algunos tejidos de rata y en *Drosophila* (Calleja et al., 1993). Debemos tener en consideración la expresión del 16S rRNA mitocondrial, la cual se ve disminuida en los procesos de estrés oxidativo (Crawford et al., 1997). Además, la expresión de este gen mitocondrial disminuye con la edad, y esta disminución se correlaciona con la curva de supervivencia en *Drosophila* (Calleja et al., 1993). Así pues, la expresión del 16S rRNA puede ser considerada como un marcador de envejecimiento celular.

Para entender bien esta teoría del envejecimiento, se explica en el apartado de “el papel de la mitocondria como fuente y diana de radicales libres”.

1.4.1. La mitocondria

1.4.1.1. La mitocondria: estructura y función

Las mitocondrias son orgánulos celulares de forma ovalada, con una longitud de unas 2 μm y un diámetro de 0,5 μm , el tamaño aproximado de una bacteria.

Estudios de microscopia electrónica revelan la existencia de dos membranas, una externa y una interna muy extensa y con numerosos pliegues, llamados crestas. Por lo tanto existen dos compartimentos: (1) el espacio intermembranal, situado entre la membrana externa e interna y (2) la matriz que está rodeado de la membrana interna ver figura 1.3.

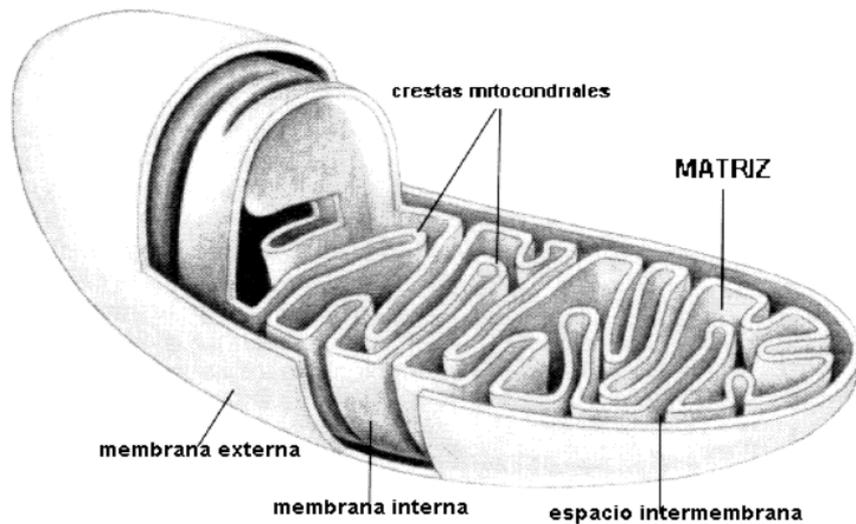


Figura 1.3. Estructura básica de las mitocondrias

En la matriz se localizan varias copias del genoma circular mitocondrial, los ribosomas y numerosos complejos enzimáticos necesarios tanto para las funciones energéticas, como para la expresión y la replicación de genes. En concreto el genoma mitocondrial humano contiene 16.569 pares de bases (pb) y codifica 13 proteínas de la cadena respiratoria así como los RNAs ribosómicos grande y pequeño y suficientes tRNAs como para traducir todos los codones. Sin embargo las mitocondrias también contienen muchas proteínas codificadas por el DNA nuclear.

En el espacio intermembranal se localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol, y alguno de estos complejos presenta actividad cinasa.

Del mismo modo, sus membranas ofrecen también diferencias significativas. La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas 'crestas', con multitud de

complejos enzimáticos (los componentes de la cadena transportadora de electrones –CTE–, la ATP sintasa) y proteínas que regulan el paso de metabolitos, como el traslocador de nucleótidos de adenina (ANT, del inglés *adenine nucleotide translocator*). La membrana mitocondrial interna resulta especialmente impermeable a iones gracias a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina, característica esencial que le permite soportar un gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas mitocondriales y, en condiciones fisiológicas, es permeable al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6.000 Da debido a la presencia de la proteína porina, conocida en la actualidad como canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, del inglés *voltage dependent anion channel*).

A pesar de la existencia de estos compartimentos, que a primera vista parecen estancos, la estructura mitocondrial permite el paso regulado de proteínas mediante procesos controlados por unos complejos proteicos transmembranales –TIM (del inglés, *translocase of the inner membrane*) en la membrana interna y TOM (del inglés, *translocase of the outer membrane*) en la externa– que son capaces de discriminar entre aquellas proteínas que deben dirigirse a la matriz y las que lo harán hasta el espacio intermembranal; en este proceso intervienen algunos miembros de la familia de las chaperonas que se inducen por calor (HSP, del inglés *heat shock proteins*), como la HSP 70 y la HSP 60 (Hood et al., 2003).

Existen zonas de contacto entre las membranas mitocondriales, las denominadas ‘zonas densas’, cuyos componentes proteicos son capaces de interaccionar y dar lugar a la formación de un canal, el PPTM (poro de

permeabilidad transitoria mitocondrial), del que también forman parte proteínas del citoplasma y de la matriz mitocondrial.

Entre las funciones que se realizan en la mitocondria cabe destacar, según la relación con el tema, la fosforilación oxidativa. La cual tiene lugar en la cadena de transporte electrónico, que es llevada a cabo por un complejo enzimático en el que se genera poder reductor –en forma de NADH y FADH_2^- , que se utiliza en la cadena respiratoria. Acoplado al transporte de los electrones por diferentes niveles redox, y gracias a la energía liberada, tiene lugar la salida de tres protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal, lo que origina un gradiente electroquímico entre los dos compartimentos; ello se traduce en una diferencia de pH de una unidad y en una diferencia de potencial eléctrico de 140 mV, lo que supone un incremento de energía libre (ΔG) de aproximadamente -5 Kcal. Esta energía la utiliza la ATP sintasa (complejo V), localizada en la membrana interna, para fosforilar moléculas de ADP, dando lugar a ATP, a la vez que los protones vuelven a la matriz a favor de gradiente. El funcionamiento correcto de este complejo enzimático es esencial para la vida de la célula, de forma que cualquier alteración en las enzimas que lo componen se puede traducir en enfermedades degenerativas. Son muchos los inhibidores que se conocen de los distintos componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEM), los cuales se utilizan en estudios sobre su funcionamiento.

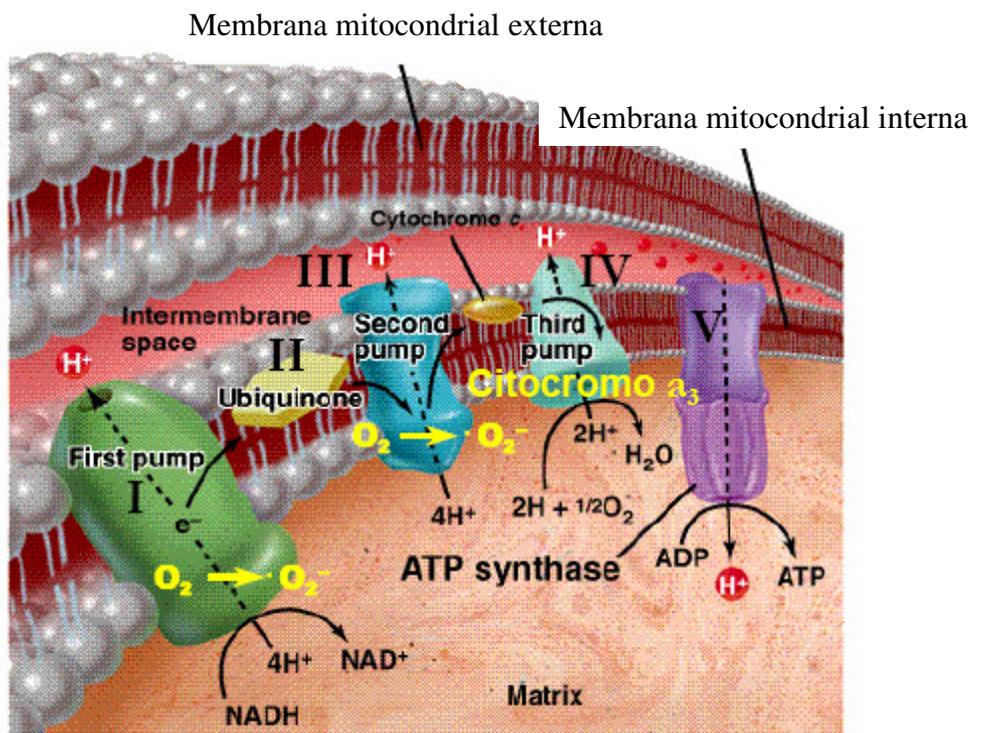


Figura 1.4. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

1.4.1.2. Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales

Se calcula que entre el 2 y el 3 % de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas et al., 1977, Frei, 1994a). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante.

El citocromo a₃ del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O₂ y con ello la formación de H₂O (Benzi and Moretti, 1995). Por tanto, la citocromo c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O₂, pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi and Moretti, 1995). Así pues, se produce $\bullet\text{O}_2^-$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris et al., 1972). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966 (Jensen, 1966). Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris et al., 1972).

Se ha estimado que se producen del orden de 10^{10} moléculas de $\bullet\text{O}_2^-$ por célula y por día (Ames et al., 1993).

Los procesos de formación de anión superóxido son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio.

Utilizando mitocondrias aisladas se puede determinar experimentalmente el consumo de oxígeno por la mitocondria, fenómeno denominado Control Respiratorio (Ver figura 1.5). En ausencia de sustrato o

de ADP, el consumo de oxígeno causado por la oxidación de sustratos endógenos es bajo. Este estado respiratorio se define como estado 1. Añadiendo un sustrato oxidable, como glutamato o malato, este consumo aumenta levemente (estado 2).

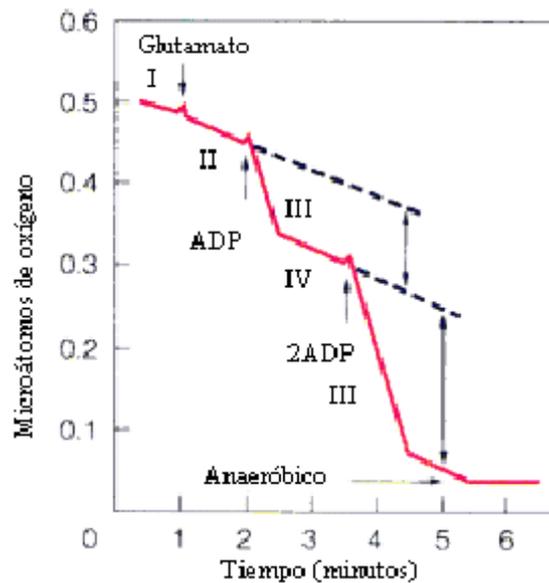


Figura 1.5. Control respiratorio mitocondrial

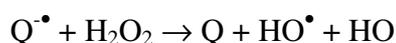
El estado 3 de la cadena de respiración mitocondrial se define como el consumo de oxígeno en presencia de sustrato y ADP, es decir, cuando tiene lugar transporte de electrones y síntesis de ATP. El estado 4 se alcanza cuando el ADP ha sido consumido, y el gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte electrónico no puede ser empleado en sintetizar ATP. El mantenimiento del Control Respiratorio depende de la integridad de la membrana mitocondrial, si ésta recibe algún daño, se desacopla el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Las mitocondrias que

consumen la misma cantidad de oxígeno en estado 3 que en estado 4 están desacopladas (Rickwood et al., 1987a, Rickwood et al., 1987b).

La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno aumenta cuando el aporte de sustratos a la cadena de transporte electrónico mitocondrial excede la demanda energética, es decir, en condiciones cercanas al estado 4, en las cuales el cociente ATP/ADP es elevado. En estas condiciones, aumentan la presión parcial de O₂ y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II, y III, con el consiguiente incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Así pues, el estado reducido de los elementos redox de los complejos I y III también contribuyen al aumento de la velocidad de generación de [•]O₂⁻ (Skulachev, 1996). Puesto que se postula que las mitocondrias se encuentran en un estadio intermedio entre el estado 3 y el estado 4 (Brand and Murphy, 1987), la generación de especies reactivas de oxígeno por los complejos I y III puede ser de gran importancia en el envejecimiento mitocondrial.

Experiencias *in vitro* demuestran que formas solubles de la semiquinona son capaces de producir O₂^{•-} por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas et al., 1977). Sin embargo, consideraciones termodinámicas descartan un papel directo de la dismutación de la ubisemiquinona en la producción de este radical *in vivo*, porque el ciclo redox de la ubiquinona tiene lugar enteramente en la fase apolar de la membrana, y en tales condiciones la autooxidación de las quinonas se ve desfavorecida (Benzi and Moretti, 1995). La ubisemiquinona, en cambio, podría estar implicada en la formación de HO[•] a partir de H₂O₂. Puesto que el peróxido de hidrógeno puede atravesar

fácilmente las membranas biológicas puede entrar en contacto con la ubisemiquinona y producirse la reacción siguiente (Boveris et al., 1972):



1.4.1.3. Otras acciones de las mitocondrias

Se sabe que la mitocondria desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis (Nilsen et al., 2006) modulando la homeostasia del calcio intracelular, por ejemplo, además de ser la central metabólica para la vía de los ácidos grasos, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la urea, biosíntesis de aminoácidos, purinas, esteroides, etc.

Por lo tanto el contenido mitocondrial y la actividad de la cadena respiratoria es susceptible de ser regulada en función de las condiciones celulares. De modo que deberían de responder a los distintos cambios fisiológicos producidos tanto por hormonas, como por factores de crecimiento, cambios en la actividad fisiológica, etc.

1.4.2. Acción de los estrógenos sobre las mitocondrias

Como veremos en el apartado 1.6 y 1.7 de esta Introducción, los estrógenos parecen tener bastante influencia en la diferencia de longevidad entre machos y hembras, ya sea por su acción hormonal o por su acción antioxidante, etc. El estradiol desencadena numerosos efectos, mediados tanto por receptores estrogénicos genómicos como de membrana (Nilsen et al., 2006). Además de estos efectos ya conocidos, hoy en día existen

numerosas líneas de investigación que presentan a la mitocondria como una nueva diana para los estrógenos, regulando factores como la apoptosis y crecimiento, entre otros (Nilsen et al., 2006). Se ha visto cómo en ratas ovacteriomizadas la estructura y función de las mitocondrias del corazón se encontraba alterada, siendo revertido el efecto por la adición de estrógenos y fitoestrógenos (Zhai et al., 2000, Zhai et al., 2001).

Además, nuestro grupo ha publicado muy recientemente, como el estradiol protege la integridad mitocondrial, indicado por un aumento en el potencial de membrana mitocondrial. Previene la formación de especies reactivas de oxígeno y también la salida apoptogénica de citocromo C de la mitocondria, por lo que el contenido mitocondrial de citocromo C se mantiene elevado (Borras et al., 2010).

Estos hechos sugieren que el estradiol y sus receptores están directamente implicados en la conservación y regulación de la estructura de la mitocondria y de la cadena de transporte mitocondrial.

La Teoría del Envejecimiento por Radicales Libres y la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento resultan especialmente atractivas debido a que permiten una intervención racional, por ejemplo, la administración de antioxidantes como los estrógenos o análogos de éstos podría retardar el daño que acompaña al proceso de envejecer. Además, se trata de dos teorías que podrían explicar prácticamente todos los fenómenos descritos en el resto de teorías de envejecimiento propuestas.

1.5. PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LAS DIFERENCIAS DE LONGEVIDAD ENTRE MACHOS Y HEMBRAS.

1.5.1. Papel de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento

Cutler observó que diversos antioxidantes tales como la vitamina E, el urato, la ceruloplasmina y la actividad superóxido dismutasa en diferentes organismos muestran una correlación con la tasa metabólica multiplicada por la longevidad máxima de cada especie (Cutler, 1991). Consecuentemente, propuso que la duración de la vida se debería correlacionar con la capacidad de protección antioxidante. En esta línea, como hemos comentado anteriormente, Orr y Sohal crearon moscas *Drosophila melanogaster* doblemente transgénicas, que sobre expresaban superóxido dismutasa Cu, Zn-dependiente y catalasa, y vieron que la disminución del estrés oxidativo se correlaciona con el aumento de la longevidad media y máxima de las moscas (Orr and Sohal, 1994). Además, se enlentece el proceso de envejecimiento ya que las moscas transgénicas presentan un retraso en la pérdida de la capacidad física y niveles inferiores de daño oxidativo a proteínas. Sin embargo, no se observó efecto en la elongación de la vida con la sobreexpresión de estas enzimas por separado (Orr and Sohal, 1993).

Un punto a destacar de gran importancia es la interrelación de los antioxidantes celulares. Personas con defectos en la absorción de vitamina E o niveles bajos de GSH muestran diversas patologías, pero no un

envejecimiento acelerado. El grupo de Barja observó que inhibiendo la actividad catalasa en ranas, se induce una mayor actividad superóxido dismutasa, glutatión reductasa y aumenta la síntesis de glutatión y de ácido ascórbico. Esto daba lugar a un aumento en la longevidad media de las ranas (Lopez-Torres et al., 1993). Es decir, los organismos tienden a mantener la homeostasis de sus defensas antioxidantes y es difícil que los antioxidantes celulares actúen por separado, ya que en realidad se encuentran tan íntimamente relacionados que los cambios en un antioxidante afectarían al resto (Cutler, 1991, Lopez-Torres et al., 1993).

1.5.2. Envejecimiento, longevidad y género

Uno de los mayores logros del siglo XX es el aumento de la esperanza de vida de la población humana. En Europa, ésta se ha duplicado entre 1900 y 1992 (Fernandez Ballesteros 1999, Wilmoth et al., 2000). En todos los casos la esperanza de vida de las mujeres supera a la de los hombres. Es más, el porcentaje de diferencia entre ambos géneros se ha incrementado junto con el aumento de la esperanza de vida, y las muertes se deben más frecuentemente al envejecimiento que a enfermedades no relacionadas con el mismo. De hecho, en España en 1900, la esperanza de vida para los hombres era de 33.7 años y para las mujeres de 35.1, es decir, un 3.8% superior en mujeres frente a hombres. En 1992 la esperanza de vida de los hombres era de 73.7 años, mientras que la de las mujeres era 83.8, lo cual supone un 9.9% más en las mujeres que en los hombres (ver tabla 1.3).

Año	Hombres	Mujeres	% aumento mujeres/hombres
1900	33.8	35.1	3.8
1960	67.4	72.2	7.1
1980	72.5	78.6	8.1
1992	73.7	81.0	9.9
2020	77.7	83.8	7.8

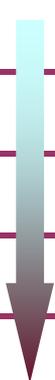


Tabla 1.3. Esperanza de vida en Europa en el siglo XX (modificada de Fernandez Ballesteros 1999)

Durante 1999 se celebró el Año Internacional de las Personas Mayores. Este tiempo sirvió para reflexionar y comprobar que la esperanza de vida en la mayoría de los países ha aumentado más de 30 años en el siglo XX. Hasta hace poco tiempo cumplir 65 años se consideraba el principio de la vejez, pero hoy ya se sube esta marca a los 85 años. En este contexto, se sabe que se ha alargado la edad de las mujeres 8 años más que en los varones, aunque conforme envejece la población femenina también se acrecienta el riesgo de sufrir enfermedades antes más frecuentes en los hombres: accidentes cardíacos y cerebro-vasculares, cáncer, infecciones, etc. Los expertos señalan que lo más importante es dar vida a los años y no sólo años a la vida.

La base de la diferencia de esperanza de vida entre machos y hembras está aún por esclarecer y además, el envejecimiento de la población se percibe de diferente manera si la persona que entra en años es de un sexo u otro. En el caso de las mujeres dos hechos fisiológicos fundamentales condicionan su vida y su madurez: la menarquia, por un lado, y la menopausia y el climaterio en un segundo momento.

Con la menopausia, y como consecuencia de la disminución de los niveles de estrógenos, se producen unas alteraciones hormonales en la mujer que supera los 50 años que pueden provocar un deterioro de su salud, aunque no necesariamente. Hasta ese momento los estrógenos han jugado un papel fundamental en su organismo, previniendo accidentes cardiovasculares, osteoporosis, etc. Sin embargo, cuando alcanza la menopausia, es cuando está más expuesta a padecer osteoporosis, infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares, artritis y artrosis, problemas de comunicación (oído, habla) y, en última instancia, demencia senil y Alzheimer.

Así pues, las mujeres gozan de buena salud durante su etapa juvenil y adulta, pero conforme alcanzan el climaterio y bajan los niveles de estrógenos, llegan a estar más expuestas a sufrir las enfermedades que los varones de su edad.

Sin embargo, viven más años, ¿cómo se comprende este fenómeno? No debemos olvidar ciertos aspectos que aventajan a la mujer en cuanto a su perduración en el tiempo:

1. El sistema inmunológico femenino produce mayor cantidad de anticuerpos que protegen mejor ante determinadas enfermedades (Krishnaraj, 1992).

2. Además, en la edad madura la mujer conserva un mayor porcentaje de la fuerza que tenía en su juventud, respecto al varón (Sinaki et al., 2001).
3. De igual manera, los estrógenos contribuyen a proteger a la mujer al actuar a diferentes niveles:
 - 3.1 Frente a la osteoporosis, actuando a diferentes niveles
 - 3.2 Frente a los accidentes cardíacos, al disminuir los niveles de LDL, aumentar los niveles de HDL, etc.
 - 3.3 Frente al daño oxidativo ocasionado por los radicales libres induciendo la expresión de enzimas antioxidantes
 - 3.4 A otros niveles (efectos sobre proteínas, etc.)

Por estas y otras razones parece que la mujer vive durante más tiempo que el hombre.

Además, si nos fijamos en la población de centenarios, podemos comprobar que la mayoría son mujeres.

La gerontóloga de la Universidad de Harvard (EEUU), Margery Silver, ha realizado un estudio sobre centenarios entre una población de 460.000 ancianos de seis ciudades de Massachusetts. Este estudio revela que un 80% son mujeres, y el 20% restante hombres (Silver et al., 2001).

Cumplir los cien años ya no es una meta insalvable para las mujeres. En España ya se contabilizan varios casos que se aproximan a la barrera mítica de los 125 años (límite biológico del ser humano). La figura 1.6 muestra el número de mujeres y de hombres según su edad a partir de los 55 años en España (datos del Instituto Nacional de Estadística, año 2001).

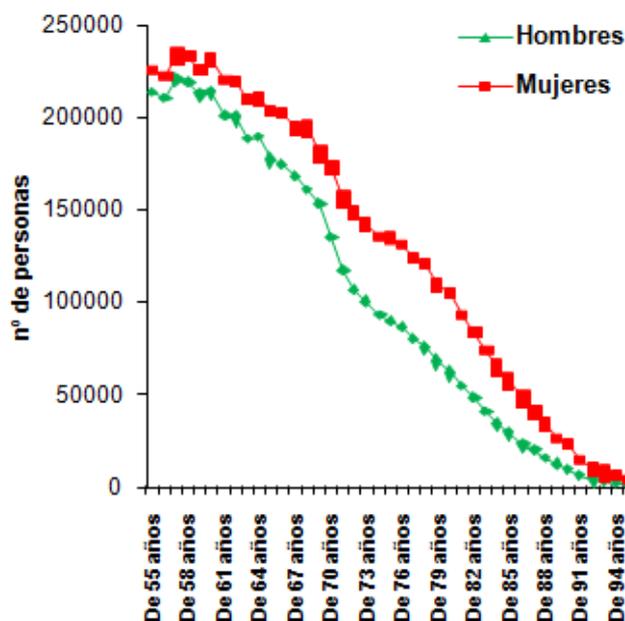


Figura 1.6. Número de mujeres y de hombres según su edad a partir de los 55 años en España. Los datos de la misma han sido extraídos del Instituto Nacional de Estadística (2001)

En la gráfica no aprecia claramente, pero el número de centenarios en España es de 5296 personas, de las cuales 3890 son mujeres y 1406 hombres.

Así pues, la mujer no sólo posee una esperanza de vida más larga, sino que también alcanza una vida máxima mayor que el hombre.

Este fenómeno no es atribuible a diferencias sociológicas, puesto que también se reproduce en otras especies. En nuestro laboratorio, las ratas hembras muestran un 16% más de vida media que las ratas machos (Borras

et al., 2003). En dicho estudio se demostró que las diferencias de longevidad entre machos hembras tienen una base biológica: los estrógenos suponen una ventaja para la supervivencia de las hembras, puesto que inducen la expresión de enzimas antioxidantes, y ello las protege frente al estrés oxidativo y, por tanto, les confiere una mayor longevidad (Asdell et al., 1967).

1.5.3. Estrés oxidativo mitocondrial en machos y hembras

El estrés oxidativo mitocondrial encontrado en los machos es superior al de las hembras. Se determinó la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas y cerebrales (sinápticas y no sinápticas) aisladas de machos y hembras y observamos que las procedentes de los machos producen una cantidad significativamente superior de peróxido de hidrógeno. Asimismo, los niveles del antioxidante endógeno glutatión reducido son mayores en las mitocondrias procedentes de las hembras que en las de los machos (Borras et al., 2003).

El DNA mitocondrial sufre daño oxidativo durante el envejecimiento. Nuestro grupo ha mostrado recientemente que la oxidación del glutatión mitocondrial que ocurre en el envejecimiento y en la apoptosis está relacionada con el daño oxidativo al DNA mitocondrial (García de la Asunción et al., 1996, Esteve et al., 1999). Determinamos este daño por medio de la medida del nivel de 8-hydroxydeoxyguanosina (8-oxodG). A consecuencia del mayor estrés oxidativo en los machos, el DNA mitocondrial de los mismos está hasta cuatro veces más oxidado que el de

las hembras. El aumento de este parámetro, como ha sido anteriormente señalado, está asociado a una menor longevidad.

1.5.4. La ovariectomía supone un aumento de estrés oxidativo en las hembras. La reposición hormonal con estrógenos previene este aumento

La ovariectomía en ratas conduce a un incremento de la producción de peróxidos por las mitocondrias hepáticas, hasta alcanzar los niveles producidos por las mitocondrias de las ratas machos. El tratamiento de las ratas ovariectomizadas con 1 µg/kg/día de estradiol, revierte los niveles de peróxidos a los producidos por las ratas hembras controles. Asimismo, los niveles de glutatión reducido en mitocondrias hepáticas disminuyen después de la ovariectomía, y regresan a los valores de las hembras controles cuando se les administra terapia de sustitución hormonal con estrógenos. Así pues, la terapia hormonal con estrógenos disminuye la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno y aumenta los niveles de glutatión reducido. Los estrógenos juegan un papel protector muy importante frente al daño oxidativo mitocondrial asociado al envejecimiento (Borras et al., 2003).

1.5.5. Los estrógenos inducen la expresión de genes de longevidad

La cantidad de estrógenos empleada en las terapias sustitutivas de estrógenos es probablemente insuficiente para que los estrógenos actúen como antioxidantes *per se*. Por ejemplo, en seres humanos, se recomienda una dosis diaria de 50µg de estrógenos, mientras que de vitamina E se

requieren 400mg para ser efectivos como antioxidantes, es decir, una dosis 8000 veces mayor que de estrógenos. Por ello, nuestro grupo estudió cómo los estrógenos actúan como antioxidantes de modo indirecto, por medio de la inducción de la expresión de las enzimas antioxidantes manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). La expresión génica y la actividad de estas enzimas son mayores en mitocondrias hepáticas de hembras frente a machos de la misma edad (Vina et al., 2005). Esto puede explicar la menor tasa de producción de peróxidos por la mayor actividad de las enzimas antioxidantes. Trabajos anteriores demuestran que la sobreexpresión de SOD o catalasa solas, no aumenta la vida media, pero sí lo consigue la sobreexpresión de ambas enzimas conjuntamente (Orr and Sohal, 1994).

Por tanto, la mayor longevidad de las hembras con respecto a los machos, se puede explicar porque las hembras se comportan como dobles transgénicos, que sobreexpresan las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y manganeso superóxido dismutasa (Vina et al., 2005).

1.5.6. Parámetros de envejecimiento indican que las hembras poseen una edad biológica menor que los machos

La expresión del gen 16S rRNA mitocondrial disminuye significativamente con la edad, y esta disminución se correlaciona con la curva de supervivencia de la mosca *Drosophila* (Calleja et al., 1993). Además, el estrés oxidativo también causa la disminución de la expresión del 16S rRNA (Crawford et al., 1997). La expresión de este marcador de envejecimiento está disminuida en los machos en comparación con las

hembras, lo cual supone que con una misma edad cronológica, las hembras poseen una edad biológica menor que los machos, es decir, las hembras son biológicamente más jóvenes que los machos (Borras et al., 2003).

1.6. ESTRÓGENOS.

Antes de analizar la capacidad antioxidante de los estrógenos se hace necesaria una reseña sobre su definición, mecanismo de síntesis y propiedades químicas, así como de su metabolismo y acciones/efectos que pueden ejercer sobre el organismo humano.

1.6.1. Concepto

Los estrógenos son moléculas pertenecientes a la familia de las hormonas esteroideas, su precursor es el colesterol.

Los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes en mujeres premenopáusicas. En varones y en mujeres postmenopáusicas, la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo, donde se sintetiza estrona a partir de deshidroepiandrosterona, secretada por la corteza suprarrenal. De este modo, la concentración de estrógenos está regulada en parte por la disponibilidad de precursores androgénicos (Mendelson et al., 1987).

Las concentraciones de estradiol en plasma en el hombre son bajas, siendo variable en el caso de la mujer. En concreto, los niveles plasmáticos aumentan en las niñas en la pubertad alcanzando valores de 30 pg/ml al llegar a las fases II y III de desarrollo mamario y niveles de tipo adulto que oscilan entre los 10 y 200 pg/ml al llegar la menarquia o poco después.

1.6.2. Propiedades químicas

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17β -estradiol (figura 1.7), seguido de la estrona y el estriol. Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos (Wawrzak et al., 1988).

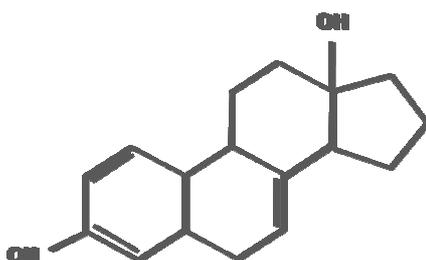


Figura 1.7. Estructura química del 17β -estradiol

1.6.3. Metabolismo del estradiol

El estradiol se fija a la globulina fijadora de 17β -estradiol en el plasma circulante, no siendo así en el caso de la estrona y el estriol que sólo se fijan débilmente. Así mismo el estradiol experimenta un complejo metabolismo en los tejidos periféricos y en el hígado que comprende una oxidación reversible a estrona y una hidroxilación irreversible en C-2 y C-16.

Los metabolitos se conjugan con ácido sulfúrico o glucurónico y se excretan por orina o bilis. Los metabolitos biliares pueden sufrir más

transformaciones metabólicas por acción de la flora intestinal siendo reabsorbidos en la circulación portal.

Entre los metabolitos del estradiol estaría el derivado 2-hidroxílico, derivados que en conjunto reciben el nombre de catecol-estrógenos. La conversión en catecol-estrógenos tiene lugar en diferentes tejidos, entre ellos el cerebro.

1.6.4. Acciones de los estrógenos

Los estrógenos poseen acciones vinculadas con el aparato reproductor, y acciones relacionadas con el metabolismo.

Dada la relación con el trabajo únicamente hablaremos de algunos de los efectos de los estrógenos a nivel metabólico.

Los estrógenos afectan a muchos tejidos y tienen muchas acciones metabólicas en seres humanos y animales. No está claro en todas las circunstancias si los efectos dependen de manera directa de acciones de las hormonas sobre los tejidos en cuestión, o de manera secundaria a efectos en otros sitios. Sin embargo, en la actualidad está claro que muchos tejidos no reproductores como el hueso, endotelio vascular, hígado, sistema nervioso central y corazón expresan cifras bajas de receptores de estrógenos. De este modo, es posible que muchas acciones metabólicas de los estrógenos sean un resultado directo de fenómenos mediados por receptor en los órganos afectados.

Puesto que los estrógenos producen muchas respuestas metabólicas, sus efectos sobre fenómenos particulares del metabolismo de minerales, lípidos, carbohidratos y proteínas tienen importancia especial para entender sus acciones farmacológicas. Sin embargo, en este trabajo no nos

adentraremos en su contenido pues nos vamos a centrar en su capacidad antioxidante particularmente.

1.6.5. Mecanismo de acción

Se cree que los estrógenos, al igual que otras hormonas esteroides, actúan principalmente por medio de regulación de la expresión de genes. Los receptores de estrógenos se encuentran en las vías reproductoras femeninas, mamas, la hipófisis, el hipotálamo, hueso, hígado y otros órganos, así como en diversos tejidos en varones.

El receptor interactúa con secuencias de nucleótido específicas denominadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE) presentes en genes precondicionados, y esta interacción incrementa, o en algunas situaciones disminuye, la transcripción de genes regulados por hormonas. Además de los elementos de respuesta a estrógenos, muchos genes con capacidad de respuesta a estrógenos contienen elementos que median las acciones de otros factores reguladores. Esto puede proporcionar un mecanismo mediante el cual las señales provenientes de estrógenos y otros compuestos convergen en sitios genómicos comunes para integrar respuestas celulares a múltiples estímulos.

Además existen receptores estrogénicos de membrana, los cuales a su vez son estimulados por estrógenos y median respuestas indirectas a través de cascadas de señalización.

1.6.5.1. Receptores estrogénicos

Los receptores estrogénicos (RE) juegan un papel central en el proceso de activación de la transcripción génica por los estrógenos (Osborne

et al., 2001). Existen dos tipos de RE, alfa y beta ($RE\alpha$ y $RE\beta$), que se diferencian tanto en sus propiedades como en su distribución tisular (Gruber et al., 2002) (ver figura 1.8) de los que entre un 5-10% se localizarían en la membrana asociados a caveolas y que, también, podrían encontrarse como formas truncadas (Razandi et al., 2002, Pedram et al., 2006b, Pedram et al., 2006a). La estructura de ambos en cuanto a sus propiedades de reconocimiento de los estrógenos, unión al ADN y activación de la expresión génica permite suponer que actúan de manera similar (Palmieri et al., 2002). Sin embargo, hay bastantes estudios que asocian el “receptor huérfano acoplado a proteína G (GPR30) a los rápidos efectos de los estrógenos (Filardo et al., 2000, Revankar et al., 2005), existiendo la controversia de si funcionaría independientemente o en colaboración con los receptores clásicos.

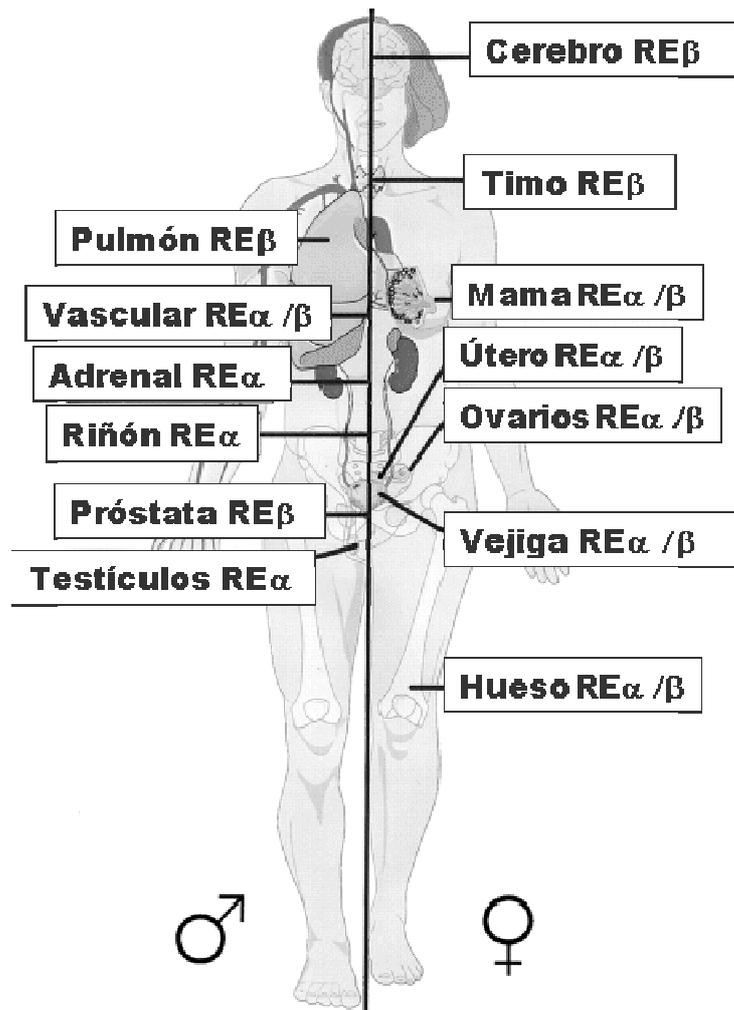


Figura 1.8. Distribución de receptores estrogénicos (Setchell and Cassidy, 1999)

1.6.5.1.1. Receptores estrogénicos nucleares

El RE es una proteína monocatenaria, que en su estado nativo está unida a otras proteínas, como HSP90, que actúan como chaperonas y la mantienen en estado inactivo. La llegada del estradiol al dominio de unión a la hormona del RE hace que se produzca interacción entre el esteroide y al

menos tres aminoácidos del receptor. El resultado es que se produce un cambio conformacional en el RE que le hace perder afinidad por las proteínas que le acompañaban en su estado nativo, y se forma de un monómero estradiol-RE. El cambio de conformación del receptor conlleva que nuevas regiones de la proteína puedan llevar a cabo interacciones proteína-proteína y proteína. Los receptores estrogénicos, como los de andrógenos y otras hormonas esteroides, interaccionan con una gran variedad de proteínas con diferentes funciones. La primera reacción que se produce es una dimerización del RE: dos monómeros estradiol-RE reaccionan para constituir el homodímero o forma activa del receptor estrogénico. La consecuencia de ello es que el dímero es más nucleofílico que el receptor inactivo, y se localiza en el núcleo celular. El RE tiene dos dedos de zinc por los que es capaz de interactuar con regiones específicas del ADN denominadas Elementos de Respuesta Estrogénica (ERE). Los ERE están formados por dos secuencias de cinco nucleótidos específicos, separadas por tres nucleótidos indiferentes. La secuencia consenso del ERE es palindrómica, de modo que se lee indistintamente en ambas cadenas complementarias del ADN.

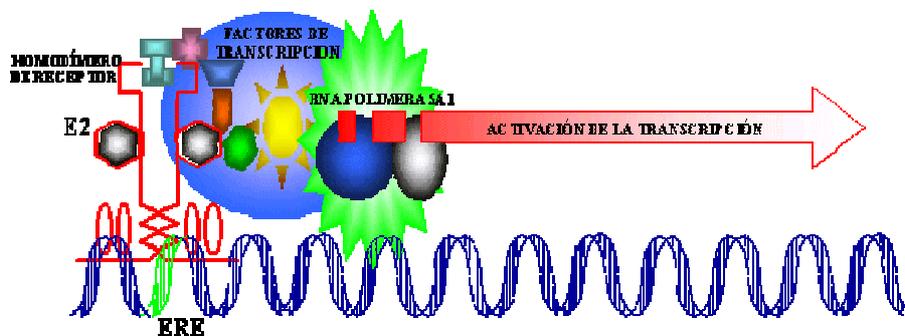


Figura 1.9. Activación génica por los dímeros de receptor de estrógenos

Los genes cuya transcripción es activada (o reprimida) por los estrógenos contienen uno o más ERE en su región promotora.

El RE contiene además dos dominios por los cuales es capaz de interactuar con las proteínas coactivadoras o corepresoras de la transcripción: TAF-1 (transcription-activation function-1), que está en la región aminoterminal y es activa en ausencia de hormona; y TAF-2, que se encuentra solapada con el dominio de unión a la hormona y sólo se activa cuando el RE se une al estradiol y forma homodímeros.

El reconocimiento de las secuencias ERE en el promotor del gen regulado por estrógenos por el homodímero de RE atrae sobre él a las proteínas coactivadoras. Éstas conectan el homodímero con el de transcripción, situado en la región rica en TA del promotor. Como consecuencia de esta interacción la RNA-polimerasa acelera su actividad transcritora y se acumulan en la célula múltiples copias del ARN-mensajero específico del gen regulado por estrógenos.

Cabe destacar que aunque el receptor alfa y el receptor beta guarden homología en su dominio de unión al DNA, tienen diferencias importantes en el sitio de unión a la hormona. Esto hace que posean afinidad de unión diferente por los diversos compuestos esteroideos, por ejemplo, el receptor β tiene mayor afinidad por el dietilestilbestrol (DES) que por el 17β -estradiol y a su vez por un modulador de receptores de estrógenos como es el tamoxifeno. El receptor β es más afín por el fitoestrógeno genisteína que por el tamoxifeno. Esto implica que de acuerdo a la distribución de los receptores en los tejidos, su acción será diferente (Kuiper et al., 1998).

Como hemos señalado anteriormente, los estrógenos ejercen acciones a través de la unión con receptores localizados en el interior del

núcleo. El efecto final de la unión de la hormona con el receptor es la transcripción de RNA mensajero y por lo tanto, la síntesis proteica. Hoy se sabe que entre estos dos extremos hay una serie de pasos intermedios que explican por qué un compuesto esteroideo puede tener diferentes acciones en diversos tejidos. Al unirse la hormona a su receptor se produce un cambio importante en la conformación espacial del mismo. A su vez, para que se logre la acción, deberá formarse un dímero de complejos hormona-receptor (ver figura 1.9). Este dímero se une a un péptido llamado proteína adaptadora (represora o activadora) y todo este complejo se fijará al DNA para iniciar la transcripción. Si el esteroide que se ha unido al receptor es diferente, la conformación espacial que adquiera el complejo hormona - receptor será distinta y, por lo tanto, se unirá a otra proteína adaptadora; el resultado es que se fijará de manera diferente al DNA de modo que la acción biológica resultante no será la misma.

En los últimos años se ha descrito otro tipo de receptores, denominados “receptores relacionados con el receptor de estrógenos”, de los cuales se han localizado dos isoformas en el cerebro de rata. Se denominan **receptores γ** y forman parte de la superfamilia de receptores nucleares. Se expresan especialmente durante el desarrollo prenatal. La expresión de estos receptores podría estar relacionada con las diferencias que se observan en el desarrollo de áreas específicas del sistema nervioso central entre ambos sexos.

1.6.5.1.2. Receptores estrogénicos de membrana

Algunos de los efectos que ejercen los estrógenos sobre el aparato cardiovascular y sobre la activación del sistema nervioso son muy rápidos y

no pueden ser explicados por su acción a través de receptores nucleares. Se ha postulado que existe otra vía por la cual pueden actuar los estrógenos, la "no genómica"; en este caso la presencia de canales de calcio en la superficie celular medió el efecto de los estrógenos (Lobaton et al., 2005, Chaban et al., 2004).

El modo de acción "no-genómico" del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es pues un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su efecto primario, por esta razón debe ser mediado por un receptor localizado en la membrana. 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, todos estos procesos ocurren en unos pocos segundos o minutos (Nemere and Farach-Carson, 1998, Watson et al., 1999, Schmidt et al., 2000).

Este fenómeno de respuesta fisiológica rápida ante un esteroide fue descrito por primera vez en 1942, cuando el Dr. Hans Seyle observó en pacientes efectos anestésicos casi inmediatos después de la administración de progesterona. En 1967, Szego y Davis describieron por primera vez la idea de que el estrógeno podía inducir efectos rápidos, "no-genómicos", al demostrar el aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP) *in vivo*, pocos segundos después del tratamiento con estradiol (Szego and Davis, 1967). En 1977 Pietras y Szego demostraron la presencia de sitios específicos de unión a estrógeno en la superficie de células endometriales y más tarde lograron purificar receptores de estrógeno de membranas celulares provenientes de hepatocitos (Pietras and Szego, 1977, Pietras and

Szego, 1979, Pietras and Szego, 1980). Sin embargo, a pesar que estos efectos rápidos mediados por esteroides fueron descritos hace ya algún tiempo, la mayor atención en los últimos 30 años ha sido dedicada a estudiar los efectos genómicos mediados por estos receptores, parte de esto se debe al hecho de no haberse podido aislar hasta el momento y de esta manera caracterizar tanto estructural como funcionalmente estos receptores de membrana que median los efectos rápidos debidos a hormonas esteroideas.

Hasta el momento, utilizando diferentes procedimientos se ha demostrado la presencia de receptores estrogénicos de membrana (REm) en distintos tejidos y líneas celulares. En la bibliografía existen trabajos publicados, utilizando E2-BSA-FITC (17β -estradiol acoplado a albúmina y a fluoresceína), un compuesto impermeable, incapaz de penetrar la membrana, que demuestran la presencia de receptores de membrana estrogénicos en una línea celular de adenocarcinoma de mama, MCF-7 (ver figura 1.10) (Berthois et al., 1986, Marquez and Pietras, 2001).

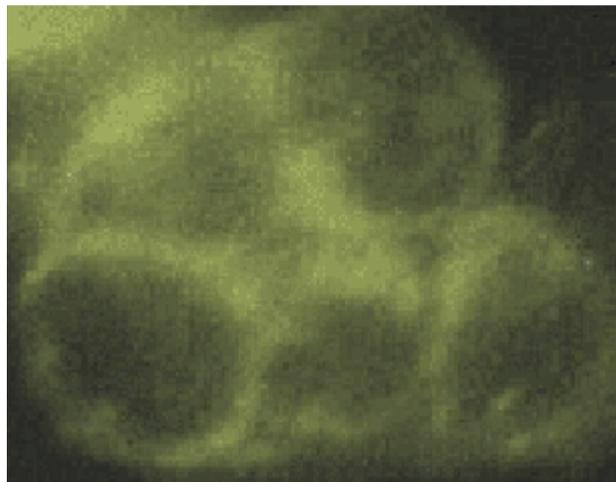


Figura 1.10. Receptor de estrógeno de membrana en células MCF-7

También, utilizando el mismo compuesto se demostró la presencia de REm en células endoteliales (Russell et al., 2000) y en células CHO (células de ovario de Hamster) transfectadas con el gen del RE- β o RE nuclear (Razandi et al., 1999) lo que sugirió que el REm podría originarse del mismo gen del receptor nuclear, sin embargo no se describió en este estudio por medio de cuáles mecanismos o modificaciones el receptor es dirigido hacia la membrana (Razandi et al., 1999).

Así, la denominación de “no genómica” para nombrar los efectos que ejercen los estrógenos es poco apropiada. De ahí que aparezca el término “acciones esteroideas iniciadas en la membrana”, ya que la idea principal es que estas acciones son generadas en a partir de segundos mensajeros y kinasas que están, fundamentalmente, organizados en la membrana celular (Vasudevan and Pfaff, 2007).

El estrógeno es la hormona esteroide mejor estudiada respecto a sus efectos “no genómicos”, y está descrito que los receptores implicados en dichos efectos serían los receptores clásicos (RE α y RE β), de los que entre un 5-10% se localizarían en la membrana asociados a caveolas y que, también, podrían encontrarse como formas truncadas (Razandi et al., 2002, Pedram et al., 2006b, Pedram et al., 2006a).

Sin embargo, hay bastantes estudios que asocian el “receptor huérfano acoplado a proteína G” (GPR30) a los rápidos efectos de los estrógenos (Filardo et al., 2000, Revankar et al., 2005), existiendo la controversia de si funcionaría independientemente o en colaboración con los receptores clásicos (figuras 1.11 y 1.12).

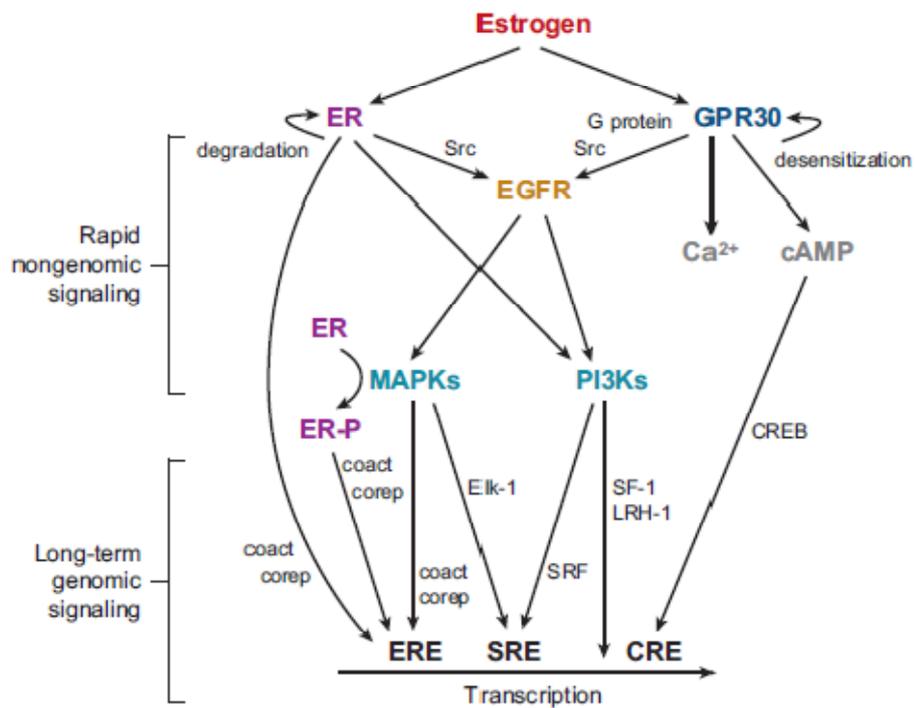


Figura 1.11. Mecanismo de las vías de señalización genómica y “no genómica” mediada por estrógenos a través de los receptores de estrógenos clásicos y del GPR30 (tomada de Prossnitz et al., 2008).

Los estrógenos pueden activar directamente los ER clásicos que, junto con coactivadores y correpresores (coact, corep), regulan directamente los acontecimientos de la transcripción. Tanto los ER como el GPR30 pueden activar múltiples vías celulares quinasa que pueden conducir a la fosforilación de los ER, alterando las interacciones de los ER con coreguladores. La activación de las proteínas quinasa activadas por

mitógenos (MAPK) y las fosfatidilinositol 3-kinasas (PI3Ks) también da lugar a la fosforilación y la activación de factores de transcripción (por ejemplo, Elk-1 y MER). La producción de PIP3 por PI3K también puede conducir a la activación de otros miembros de la familia de receptores nucleares (por ejemplo, factor esteroideogénico 1 (SF-1) y el receptor homólogo del hígado 1 (LRH-1)).

Es probable que, tanto los ER como el GPR30, estén también sujetos a procesos de regulación. La unión del ligando a un ER inicia la degradación final de la proteína, mientras que la mayoría de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) están sujetos a los mecanismos de desensibilización. Todas las vías han demostrado el potencial de interactuar, ya sea positiva o negativamente, lo que lleva a altos niveles de complejidad; la salida final depende de la dotación de señalización de los componentes presentes en una célula dada. Además de los estrógenos, los ligandos para otros receptores de esteroides, los receptores del factor de crecimiento, y GPCRs son capaces de alimentar a las vías de señalización que aparecen en la figura anterior, así como otras vías reguladoras que no son mostradas.

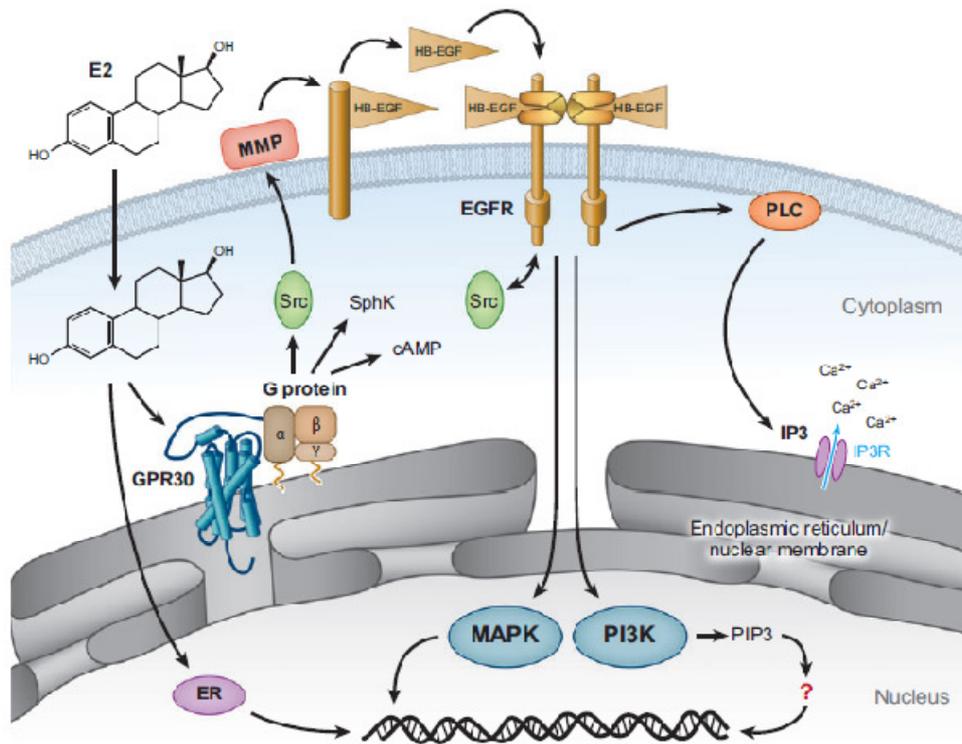


Figura 1.12. Mecanismo de la vía de señalización mediada por estrógenos del GPR30 (tomada de Prossnitz et al., 2008).

El estrógeno es libremente permeable en la célula, con acceso a los receptores estrogénicos intracelulares (ER y GPR30). En las células capaces de expresar en su superficie celular el GPR30 o ER, el estrógeno no tendría que cruzar la membrana plasmática. La unión del estrógeno al clásico ER conduce a la activación transcripcional directa, así como eventos de transducción de señales. Tras la unión agonista, GPR30 activa las proteínas G heterotrómicas, que a su vez pueden activar efectores múltiples,

incluyendo la adenilato ciclasa (que resulta en la producción de AMPc), Src, y la esfingosina quinasa (SphK). Las últimas dos vías parecen estar implicadas en la activación de las metaloproteinasas de matriz (MMP), que desdoblan a favor de HB-EGF, liberando HB-EGF libre, que luego puede transactivar receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La activación del EGFR da lugar a múltiples acontecimientos posteriores, incluida la activación de fosfolipasa C (PLC), MAPKs y PI3K. La activación de PLC conduce a la movilización del calcio intracelular a través de las acciones del inositol trifosfato (IP3). La activación de las MAPKs y de PI3K resulta en la activación de una serie de vías citosólicas, así como la activación de las proteínas nucleares que son ellas mismas o que regulan factores de transcripción. Por lo tanto, la estimulación estrogénica puede dar lugar a la transcripción de genes cuyos promotores no contienen elementos de respuesta esteroideos. Los efectos combinados de estas señales citosólicas y eventos de transcripción nuclear a menudo resultan en la proliferación celular (Prossnitz et al., 2008).

1.6.6. Acción de los estrógenos sobre las mitocondrias

El estradiol desencadena numerosos efectos sobre la mitocondria, mediados tanto por receptores estrogénicos genómicos como de membrana (Nilsen et al., 2006). Como se citó en dicho apartado, parece ser que el estradiol y sus receptores están directamente implicados en la conservación y regulación de la estructura de la mitocondria y de la cadena de transporte mitocondrial.

1.6.6.1 Localización de receptores estrogénicos en la mitocondria

Recientes estudios demuestran la existencia de la unión de estrógenos a proteínas mitocondriales (Chen et al., 2004b, Chen et al., 2004a). Moats y Ramirez investigando la estereoespecificidad de unión de estrógenos en úteros de ratas, mediante fraccionamientos celulares, comprobaron que la fracción subcelular de las mitocondrias contenía estrógenos unidos (Moats and Ramirez, 2000).

Además, Grossman (Grossman and Traish, 1992) corroboró los mismos resultados, encontrando la presencia de proteínas unidas a estrógenos (BEPs) dentro de las mitocondrias de células acinares pancreáticas y vieron cómo un anticuerpo anti-BPS reaccionó específicamente con una doble banda de proteínas de 66 y 64 KD, similar a los receptores estrogénicos alfa y beta. Ese parecido entre los receptores estrogénicos y las BEPs sugieren la existencia en la mitocondria de unas proteínas que se comportarían como los clásicos receptores estrogénicos.

Otra demostración de la presencia de receptores estrogénicos en la mitocondria fue realizada por Chen y cols. mediante técnicas de fraccionamiento subcelular y western blott demostraron la presencia de éstos y mediante inmunohistoquímica y microscopia confocal localizaron los receptores en la matriz mitocondrial (Chen et al., 2004b, Chen et al., 2004a).

Además, se ha demostrado la existencia en otros tipos celulares, como en neuronas, células murinas del hipocampo y en células de corazón humano, confirmando que se encuentran entre 50 y 65 kD de peso molecular (Yang et al., 2004).

Hasta la fecha no se conocen efectos directos del E₂ sobre la estructura y función de las mitocondrias, sin embargo si que hay evidencias que sugieren que el estradiol actúa de forma directa sobre las mitocondrias.

Estudios en ratones knock-out del REbeta muestran disfunciones en los canales de iones K⁺ voltaje dependientes de Ca²⁺ y anomalías en la contracción vascular (Korte et al., 2005). Existen asimismo evidencias en las que se relaciona efectos sobre la cadena de transporte mitocondrial (Chen et al., 2005a; Borrás et al., 2010).

Según los datos existentes en la bibliografía podemos concluir que existen unas proteínas presentes en las mitocondrias con capacidad de unirse específicamente a compuestos estrogénicos. Éstas tendrían acciones directas y rápidas sobre funciones mitocondriales.

1.6.7. Propiedades antioxidantes de los estrógenos

Uno de los primeros trabajos que relaciona el estradiol directamente como una molécula con actividad antioxidante se publicó en 1993 (Ruiz-Larrea et al., 1993), los resultados mostraron una disminución, causada por el estradiol, de la lipoperoxidación en microsomas hepáticos de rata.

Sin embargo, estudios aún anteriores a este muestran diferentes actividades en enzimas relacionadas con el estrés oxidativo. Concretamente, Pinto y Bartley (Pinto and Bartley, 1969) vieron como las actividades de glutathion peroxidasa y glutathion reductasa eran distintas entre ratas de distinto sexo.

Además, según Deroo et al. (Deroo et al., 2004) el estradiol regula la expresión de ciertas tioredoxinas, enzimas que juegan un importante papel en la protección contra el estrés oxidativo, en la regulación de la actividad

de factores de transcripción y proliferación. Esta regulación fue mediada por receptores estrogénicos alfa. También, en determinados órganos como el cerebro, se ha comprobado la protección de los estrógenos frente a daños causados por el estrés oxidativo (Behl et al., 1997). La siguiente tabla (tabla 1.4) muestra algunas de las publicaciones más relevantes en este tema.

Efecto del 17β-estradiol	Referencia
Efecto favorable sobre la lipoperoxidación en microsomas de hígado de ratas	(Ruiz-Larrea et al., 1993) (J Biochem)
Aumento de la actividad de la glutatión peroxidasa en eritrocitos	(Massafra et al., 1996) (Gyneco Endocrinol)
Efecto antioxidante in vivo e in vitro	Ayres (Ayres et al., 1996) (J Lab Clin Med)
Protección neuronal	Dulzen (Dulzen and McDermott, 2004) (Brain research)
Protección frente a la oxidación de las LDL	Shwaery (Shwaery et al., 1997) (Circulation)
Regulación de tioredoxinas	(Deroo et al., 2004) (Endocrinology)

Tabla 1.4. Efecto antioxidante del estradiol

Más recientemente, nuestro grupo ha demostrado que los estrógenos no son antioxidantes fisiológicamente por su estructura química fenólica, porque sus bajas concentraciones fisiológicas no explican este efecto, sino que actúan mediante la inducción de la expresión de genes antioxidantes: la Mn-SOD y la GPx. Además, se ha observado que el mecanismo por el cual inducen la expresión de estas enzimas es mediante la activación de receptores estrogénicos, que activan a su vez las vías de señalización de las MAPK y de NF κ B (Borras et al., 2005).

1.7. EFECTOS BENEFICIOSOS Y PERJUDICIALES DE LA TERAPÉUTICA HORMONAL SUSTITUTIVA.

1.7.1. Terapéutica hormonal sustitutiva

La menopausia es un período natural en el envejecimiento de la mujer. En él, debido al cese de la función ovárica, el cuerpo deja poco a poco de producir óvulos y hormonas sexuales femeninas (entre ellas estrógenos y progesterona), que son las encargadas de regular el ciclo menstrual. La carencia de estrógenos hace que aumente el riesgo de enfermedades de gran importancia con respecto a la premenopausia, entre ellas la osteoporosis y las enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular, nervioso central, etc.

Para contrarrestar el descenso natural de estrógenos y así prevenir los problemas asociados a él, durante la menopausia se prescriben *terapias hormonales sustitutivas*, por vía oral o subcutánea (a modo de parches), así como tratamientos basados en sustancias que modulan el receptor de estrógeno.

1.7.2. La doble cara de los estrógenos: efectos beneficiosos y perjudiciales

La figura 1.13 resume los efectos de los estrógenos sobre la mayoría de los tejidos sobre los que actúa.

Múltiples estudios demuestran el impacto negativo del hipoestrogenismo sobre distintos órganos y tejidos y a su vez demuestran el efecto beneficioso del reemplazo hormonal.

Los beneficios de la terapia hormonal sustitutiva (THS) son bien

documentados y pueden considerarse a corto, medio y largo plazo. A corto plazo la acción de la terapia de reemplazo se hace notoria en la disminución de los síntomas vasomotores (sofocos) y en el control de los trastornos de la menstruación, mejoras a nivel urogenital y en la función sexual.

A medio plazo se encuentra disminución de la pérdida de la masa ósea y mejoría de la relación del colesterol HDL/LDL lo cual se traduce a largo plazo en disminución del riesgo de fracturas y de padecer enfermedad cardiovascular. También se ha documentado su utilidad como preventivo de la enfermedad de Alzheimer y el cáncer de colon.

Varios estudios prospectivos han demostrado que la THS aumenta la esperanza de vida, se ha estudiado que el riesgo de la mortalidad por diversas causas en usuarias de terapia de reemplazo se reduce en un 20 a 50% en comparación con aquellas que no la reciben.

La terapia hormonal persigue los siguientes objetivos:

- 1- Tratar los síntomas vasomotores.
- 2- Evitar o revertir la atrofia urogenital y de piel.
- 3- Tratar y prevenir los síntomas de la esfera psíquica atribuibles al hipoestrogenismo.
- 4- Mejorar la disfunción sexual.
- 5- Prevenir la pérdida acelerada de masa ósea, reducir el riesgo de fracturas y osteoporosis.
- 6- Disminuir la morbimortalidad cardiovascular (prevención primaria y secundaria).

Al cumplir estos objetivos se estaría interviniendo en conseguir mejor calidad de vida. Así pues, la THS representa de verdad la primera intervención humana exitosa que modifica favorablemente el proceso fisiológico del envejecimiento.

Hemos señalado algunos de los efectos beneficiosos de los estrógenos a diferentes niveles. No obstante, como puede observarse en la figura 1.13, los estrógenos también ejercen algunos efectos no deseables en el organismo.

Efectos Positivos del Estrógeno

Efectos Negativos del Estrógeno

En el Cerebro

- El estrógeno ayuda a mantener la temperatura corporal.
- El estrógeno puede retrasar la pérdida de la memoria.
- El estrógeno ayuda a regular las partes del cerebro que preparan el cuerpo para su desarrollo sexual y reproductivo.

En el Hueso

- El estrógeno ayuda a preservar la densidad del hueso.

En el Seno

- El estrógeno estimula el desarrollo de los senos en la pubertad y prepara las glándulas para la producción de leche en el futuro.

En el Corazón y el Hígado

- El estrógeno ayuda a regular la producción de colesterol del hígado, de este modo, disminuyendo la acumulación de placa en las arterias coronarias y robajando el riesgo de un ataque cardíaco.

En el Ovario

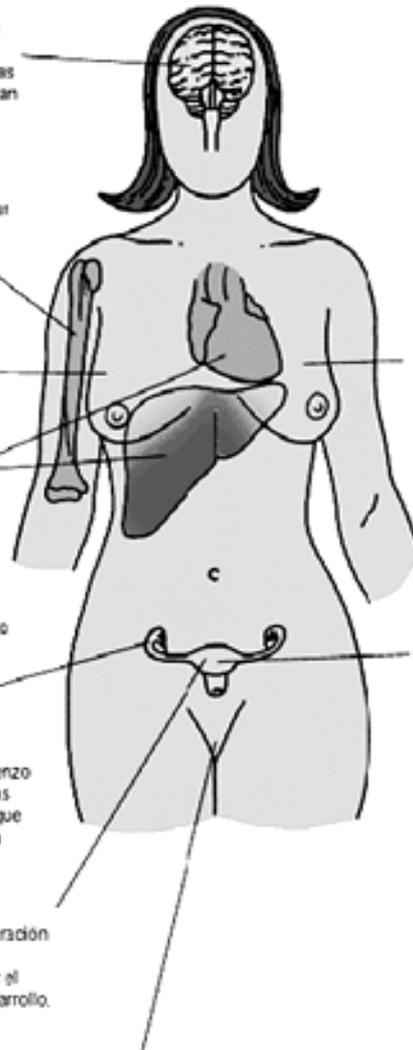
- El estrógeno estimula la maduración de los ovarios.
- El estrógeno estimula el comienzo de los ciclos menstruales de las mujeres -- una indicación de que el sistema reproductivo de una niña a madurado.

En el Útero

- El estrógeno estimula la maduración del útero.
- El estrógeno ayuda a preparar el útero para nutrir el feto en desarrollo.

En la Vagina

- El estrógeno estimula la maduración de la vagina.
- El estrógeno ayuda a mantener el revestimiento de la vagina lubricado y grueso



En el Seno

- Algunas investigaciones han indicado que la exposición prolongada al estrógeno puede aumentar el riesgo de una mujer de cáncer del seno.

En el Útero

- Algunas investigaciones han indicado que la exposición prolongada al estrógeno puede aumentar el riesgo de una mujer de cáncer uterino.

Figura 1.13. Efectos beneficiosos y perjudiciales de los estrógenos

Los efectos desfavorables de los estrógenos son relativamente pocos, se pueden agrupar así:

- Efectos sobre la coagulación: aumento de factores VII y X, aumento del fibrinógeno, disminución de la antitrombina III, y aumento de agregación plaquetaria, dichos fenómenos traerían un mayor aumento de la enfermedad trombo-embólica. Las pacientes con antecedentes de enfermedad trombo-embólica tendrían una contraindicación para uso de estrógenos, aunque existen estudios contradictorios al respecto.
- Efecto sobre el sistema renina/angiotensina, los cuales causarían un discreto aumento de la hipertensión.
- Efecto mineralocorticoide asociado con retención hídrica y aumento de peso. Al normalizarse el equilibrio hidrosalino se normaliza el peso ganado. Los estrógenos vuelven la mujer más activa y rápidamente el peso vuelve a lo normal.
- Efecto oncogénico (riesgo de cáncer endometrial y cáncer de mama). En este sentido cabe destacar el estudio publicado en JAMA “Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial”, en el que concluyen que los riesgos de la terapia hormonal sustitutiva exceden a los beneficios de la misma en mujeres postmenopáusicas, si bien es de destacar, que la terapia hormonal sustitutiva suele incluir además de estrógenos, progesterona (Rossouw et al., 2002).

Existen otras desventajas menos frecuentes que reajustando la dosis y controlando otros factores pueden volverse insignificantes:

- Hemorragias uterinas: es la más frecuente, aparece habitualmente en el período de descamación del tratamiento cíclico y más raramente durante el curso del mismo. La intensidad de la hemorragia disminuye al avanzar la edad y disminuye con el uso de la terapia continua.

- Aumento en la frecuencia de la histerectomía: se ha calculado una frecuencia mayor de histerectomía en mujeres con terapia frente a mujeres postmenopáusicas sin terapia.

- Colelitiasis: Estudios recientes no han demostrado aumento en incidencia de colelitiasis. Se ha dicho que los estrógenos se eliminan por la bilis, lo que unido a cierto grado de colestasis puede predisponer a litiasis.

Sin embargo, los efectos de estas terapias son controvertidos, ya que no existen conclusiones definitivas sobre su utilidad. Desde 2002, tras la publicación del estudio comentado anteriormente, está aumentando la duda de si los riesgos asociados a la terapia hormonal sustitutiva exceden a los beneficios (Rossouw et al., 2002). Así, muy recientemente, se ha publicado otro artículo en el que se informa de los riesgos y beneficios para la salud 3 años después de la suspensión de aquel estudio del tratamiento con estrógenos más progesterona vs placebo por dicho motivo (Heiss et al., 2008).

1.7.3. SERMs: moduladores selectivos del receptor de estrógeno

En el tratamiento de los síntomas asociados con la menopausia se han utilizado medicinas que contienen estrógenos desde hace más de 50 años. Actualmente, es sorprendente que a pesar de los beneficios que ofrece la terapia hormonal sustitutiva, es relativamente bajo el número de mujeres que inicia esta terapia y la que la inicia, usualmente no permanece en ella por más de un año, esto es en gran parte debido a que los estrógenos incrementan significativamente el riesgo a desarrollar cáncer de mama y útero.

En consecuencia, nació la necesidad de crear drogas que conserven la función beneficiosa del estrógeno en los sistemas cardiovascular, nervioso y hueso, pero sin la función negativa que ejercen sobre la mama y útero, a estos compuestos se les llamó SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) o moduladores selectivos de los receptores de estrógeno. El entendimiento de las bases moleculares del funcionamiento de los receptores esteroideos, en este caso del receptor de estrógeno, fue lo que permitió el desarrollo de este concepto. Desdichadamente no se ha encontrado el SERM ideal, pero algunos están siendo utilizados actualmente para el tratamiento de distintas patologías tales como el cáncer de mama y la osteoporosis.

· Tamoxifeno: Es utilizado actualmente como tratamiento hormonal del cáncer de mama, es el SERM más conocido y estudiado. Fue descubierto hace 40 años en un momento en que no se conocía la posibilidad que algún químico o droga podía tener una función estrogénica en un tejido y antiestrogénica en otro, el concepto de SERM no existía ya

que las bases moleculares de acción de los receptores esteroideos o de este tipo de drogas todavía no habían sido definidas.

El tamoxifeno, al igual que la mayoría de los SERMs, ejerce su acción primariamente al competir con el estradiol en la unión al RE y alterar su conformación (ver figura 1.14).

- *In vitro*, causa estancamiento de células de cáncer de mama que expresan RE, en la fase G1 del ciclo celular (Sutherland et al., 1983) y disminuye los niveles de la ciclina D1 (Watts et al., 1994). También, disminuye la expresión del factor de crecimiento tumoral transformante (TGF- α) y aumenta la expresión de TGF- α 1 y TGF- α 2 (Salomon et al., 1999). En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, el tamoxifeno inhibe la fosforilación del receptor de crecimiento del factor semejante a la insulina (*Insuline-like growth factor receptor*) IGF-I (Guvakova and Surmacz, 1997), pero en una línea celular endometrial (Ishikawa et al., 1986) produce el efecto contrario, es decir, induce la fosforilación del receptor, actuando de manera similar al estrógeno (Kleinman et al., 1996).
- *In vivo*, inhibe el crecimiento de tumores de células MCF-7 implantados en ratones y previene el desarrollo de tumores mamarios en los modelos de ratones NMU y DMBA (Gottardis and Jordan, 1987, Jordan et al., 1987). Similar al estradiol, en el útero, estimula la síntesis de IGF-I y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Huynh et al., 1993, Hyder et al., 1996).

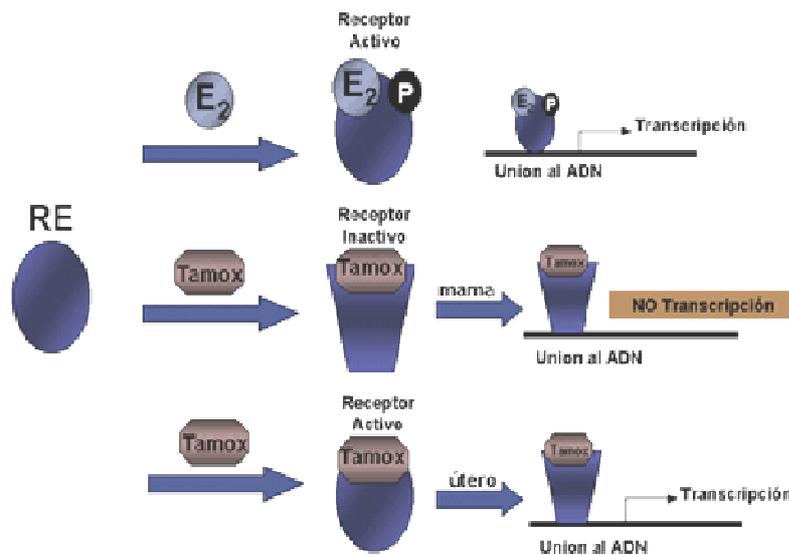


Figura 1.14. Mecanismo de acción del Tamoxifeno

El uso clínico del tamoxifeno ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de tumores de mama que expresan RE (aproximadamente el 60-70% de los tumores al momento del diagnóstico) y si es tomada durante 5 años consecutivos previene la aparición de recurrencia del cáncer en un 42%.

Además esta droga fue aprobada recientemente para la prevención primaria de la aparición de cáncer de mama. Estudios clínicos demostraron que 20 mg de tamoxifeno diarios reducen en un 49% a 55% la incidencia de cáncer de mama.

Entre los efectos secundarios del tamoxifeno al que mayor importancia se le ha dado es el aumento en la incidencia de cáncer endometrial, debido al efecto agonista, tipo estrógeno que tiene el

tamoxifeno en el útero (Fisher et al., 1999). Otros efectos son los sofocos, pólipos endometriales, quistes, procesos tromboembólicos, etc. A pesar de los efectos secundarios de esta droga, entre ellos el más importante ha sido el del riesgo a desarrollar cáncer de útero, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (perteneciente a la OMS) recomendó que las mujeres recibiendo tamoxifeno no deben parar su tratamiento por este efecto secundario, ya que los beneficios en la sobrevida que esta droga ofrece son mucho mayores al riesgo a desarrollar cáncer de endometrio.

Por esta razón, esta droga ha sido utilizada exitosamente por más de 20 años en el tratamiento del cáncer de mama, y aunque ha existido la preocupación de diseñar otras drogas mucho más selectivas sin estos efectos negativos, hasta el momento no se ha aprobado ninguna que pueda sustituirla.

- Raloxifeno: Esta droga comenzó a ser estudiada cuando se descubrieron los efectos no deseados del tamoxifeno, surgió la necesidad de utilizar otros moduladores selectivos que no tuvieran estos efectos negativos. El raloxifeno fue aprobado hace unos pocos años para el tratamiento de la osteoporosis por el efecto que ejerce en el mantenimiento de la densidad ósea en mujeres postmenopáusicas. Esta droga tiene efecto en la mama antiestrogénico también, pero sin el efecto estrogénico sobre el útero. Así como el tamoxifeno, disminuye la síntesis de LDL, sin afectar la de HDL y no tiene efectos negativos sobre la memoria.

- Fitoestrógenos: son compuestos de origen vegetal con actividad estrogénica. Hoy en día, es aconsejable su administración como terapia hormonal sustitutiva en la menopausia, debido a su inocuidad. Además, se han encontrado otras actividades entre las que cabe destacar, debido a la

relación con el presente trabajo, su actividad antioxidante (Borras et al., 2006).

1.8. INICIO DE LA TERAPIA SUSTITUTIVA CON ESTRÓGENOS: HIPÓTESIS DEL TIEMPO CRÍTICO (“CRITICAL TIME”).

Existen muchos estudios que relacionan el consumo cerebral de glucosa con diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, especialmente la enfermedad de Alzheimer (Small et al., 2006b, de Leon et al., 2007).

Por ese motivo, se han realizado varios estudios evaluando los efectos que podría tener la reposición con estrógenos en mujeres postmenopáusicas y la incidencia o no, sobre todo, en demencia o enfermedad de Alzheimer (Eberling et al., 2000, Eberling et al., 2003, Rasgon et al., 2005, Rasgon et al., 2001, Ohkura et al., 1995, Resnick et al., 1998, Waring et al., 1999, Schonknecht et al., 2003, Maki and Resnick, 2000).

En este sentido, el estudio de Rasgon (Rasgon et al., 2005) concluyen que los estrógenos preservan el metabolismo cerebral de aquellas regiones que se ven disminuidas en las fases tempranas y más avanzadas de la enfermedad de Alzheimer, protegiendo también el descenso que hay en las mujeres postmenopáusicas, especialmente en la corteza cingulada posterior.

Recientemente, se ha publicado un estudio sobre el efecto a corto plazo del cese de la función hormonal en animales de mediana edad con o sin terapéutica hormonal con estrógenos y la capacidad de regular los niveles proteicos de acetiltransferasa en el hipocampo y corteza prefrontal en ratas (Bohacek et al., 2008).

En él se recuerda que el papel que juega la reposición con estrógenos en la prevención o retrasos de los cambios en el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer es controvertido. Sin embargo, como se aboga en el anterior estudio (Bohacek et al., 2008), son varios grupos de investigación los que creemos que su éxito puede depender, críticamente, del **tiempo de inicio** del tratamiento una vez se produce la menopausia (Resnick and Henderson, 2002, Maki, 2006b, Maki, 2006a, Sherwin, 2007), lo que se ha denominado como “Hipótesis del Tiempo Crítico” (Critical Time).

1.9. CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA IN VIVO.

1.9.1. Tomografía por emisión de positrones. Generalidades

La Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una técnica de Medicina Nuclear con características claramente diferenciadas respecto a otros métodos de diagnóstico por la imagen. La información que proporciona la PET es de tipo molecular, constituyendo un perfecto complemento de otras técnicas de imagen, tanto funcionales (SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*) como morfoanatómicas (RMN, TAC, RX convencional, etc.). Al poder incorporar trazadores a cualquier

sustrato biológico permite estudiar y cuantificar regionalmente fenómenos biológicos, fisiológicos, bioquímicos y farmacológicos, de forma inocua en la práctica clínica habitual.

Sus principales indicaciones tienen su ámbito dentro de la oncología (Chen et al., 2005b), la neurología (Kepe et al., 2006) y la cardiología (Goodman et al., 1981, Schelbert et al., 1982), aunque se está incrementando su uso en investigación y desarrollo de nuevos fármacos, genética, etc. (Gambhir et al., 1998).

En la fisiopatología de todas las enfermedades, las alteraciones metabólicas son más precoces que los cambios anatómicos, por lo que disciplinas como la biología molecular y los métodos de imagen metabólica (entre los que se incluye la PET), deben indicar la presencia de determinadas enfermedades con más precocidad que las técnicas de estudio anatómicas, como la tomografía axial computerizada (TAC) o la resonancia magnética (RM) (Gámez C and Cantero M, 2000).

La PET utiliza moléculas marcadas con isótopos radioactivos, administradas a pacientes en vivo para su posterior detección externa, representando en imágenes la distribución corporal de dichas moléculas. Este mismo principio es aplicado, igualmente, en equipos diseñados específicamente para animales de investigación.

1.9.2. Evolución histórica de la tomografía por emisión de positrones

El desarrollo de la PET ha estado marcado por importantes avances tecnológicos, algunos de los cuales mencionamos a continuación (Nutt,

2002). La primera aplicación médica usando el fundamento de la PET estaba relacionada con la detección de tumores cerebrales y fue descrita por dos autores diferentes durante el año 1951 (Sweet, 1951, Wrenn et al., 1951). En 1973, en el Brookhaven National Laboratory se construye el primer tomógrafo de anillo (Robertson, 2005), el cual disponía de 32 detectores.

A finales de 1974, Phelps y Hoffman de la Universidad de Washington construyen el primer tomógrafo PET para estudios con humanos (figura 1.15), el cual disponía de 48 detectores de NaI(Tl) distribuidos hexagonalmente, y fue denominado PET III (Phelps et al., 1975).

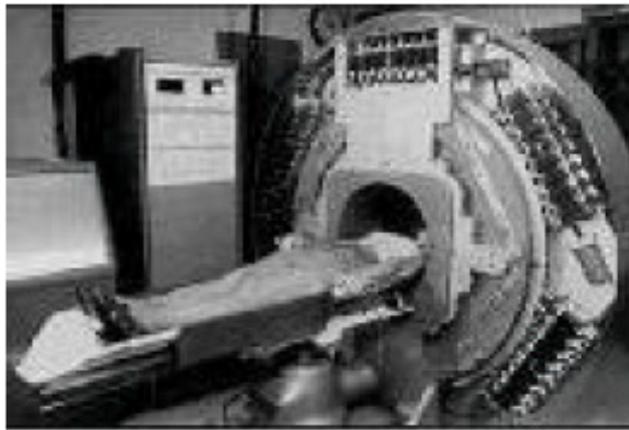


Figura 1.15. Primer tomógrafo PET para estudios con humanos (Phelps et al., 1975)

El primer tomógrafo PET comercial fue desarrollado por EG&G ORTEC en colaboración con Phelps y Hoffman, fue denominado ECAT II (Emisión Computed Axial Tomograph), y disponía de 96 detectores de NaI(Tl). Otro avance tecnológico importante ocurrió en 1975 cuando Nester

y Huang caracterizaron las propiedades como centelleador del Oxido de Germanato de Bismuto (BGO) (Nester OH and Huang CY, 1975). El material usado como detector de los fotones gamma de 511 KeV generados en la aniquilación del positrón es un factor clave que afecta a la sensibilidad y la resolución de la imagen obtenida con PET. Hasta entonces, el único material utilizado era el NaI(Tl), el cual presentaba una serie de inconvenientes como su naturaleza higroscópica, y su baja densidad y número atómico efectivo, lo que limitaba la eficiencia para la detección de los fotones gamma de alta energía que se generan en la PET.

El siguiente avance importante ocurrió en 1978 cuando el grupo de Wolf y Fowler del Brookhaven National Laboratory describió primera síntesis del trazador 2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG) (Ido et al., 1978), radiofármaco con el que se realizan en la actualidad la mayoría de estudios PET. La primera imagen de PET con FDG fue obtenida por Phelps y col. (Phelps et al., 1979). Más tarde, Hamacher y cols. del Institut für Nuklearchemie de Jülich en Alemania, desarrollaron un nuevo método de síntesis para la FDG mediante una reacción de sustitución nucleofílica (Hamacher et al., 1986), que es el método de elección en la actualidad.

Entre 1984 y 1985 apareció otro avance tecnológico importante relacionado con la obtención de las imágenes en los tomógrafos, que fue el detector de bloque. Esto permitió la creación de tomógrafos PET con una alta resolución y eficiencia a un coste reducido. Este primer bloque contenía 32 cristales del centelleador BGO para 4 fotomultiplicadores (Cassey M and Nutt R, 1986). En la actualidad, los tomógrafos disponen de 144 cristales por fotomultiplicador.

Entre 1984 y 1986 ocurrieron varios acontecimientos importantes. Por un lado, la creación del primer mini-ciclotrón para uso médico: el RDS (Radiopharmaceutical Delivery System).

Además, se desarrolló el primer “target” de alto rendimiento en miniatura (el “target” es el espacio dentro del ciclotrón donde ocurre la reacción nuclear generadora del radioisótopo). Finalmente, el grupo de Barrio desarrolló el primer módulo de síntesis química automatizado para FDG y otros trazadores (Padgett et al., 1989).

Entre los avances más recientes destacan la aparición de un nuevo material centelleador, el oxiortosilicato de lutecio (LSO), que presenta mejores propiedades para la detección de la radiación gamma de 511 KeV que el BGO. Por último, la aparición de modernos equipos PET/CT que combinan la excelente resolución y el gran detalle anatómico de la Tomografía Axial Computerizada (TAC) con la imagen funcional y metabólica del PET han dado un nuevo impulso a la PET.

Actualmente, se está investigando la creación de equipos híbridos de PET/RM (figura 1.16) en animales de investigación para aprovechar la mejor y mayor información que proporciona la RM respecto al CT (Pichler et al., 2008, Catana et al., 2008, Judenhofer et al., 2008).

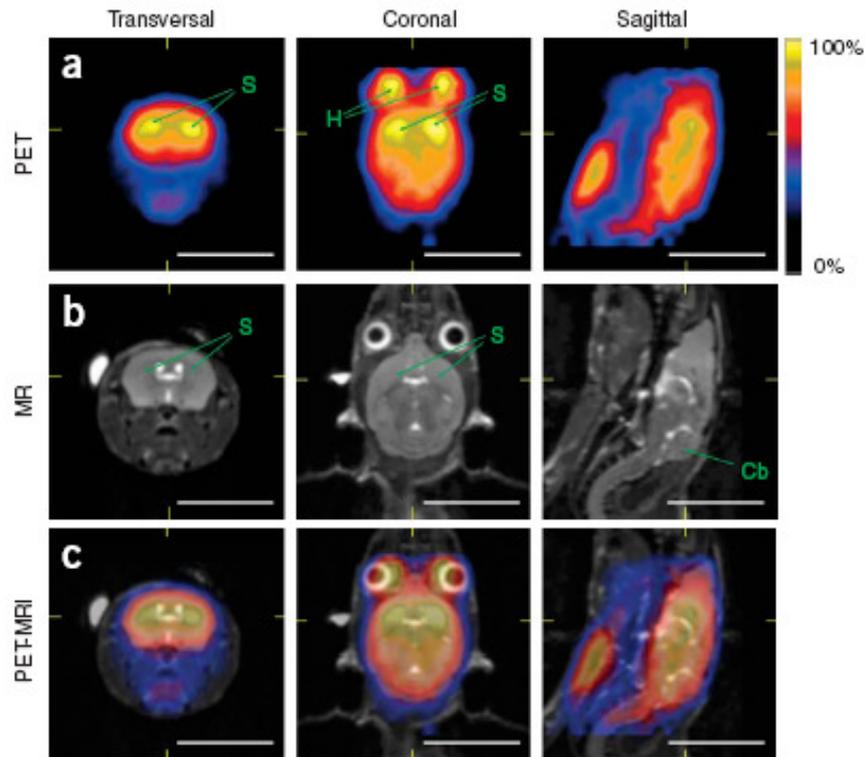


Figura 1.16. Estudio PET-RM in vivo. (a) Imagen PET de ratón C57BL/6 inyectado con ^{11}C -d-threo-methylphenidate. (b) Imagen de resonancia magnética (RM) usando una secuencia 3D TSE. (c) Imágenes fusionadas de la captación del trazador y la morfología (tomado de Judenhofer et al., 2008).

1.9.3. Radionucleidos emisores de positrones

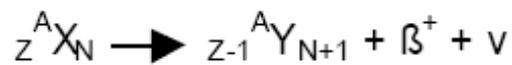
Los isótopos utilizados en PET son emisores de positrones (β^+ , antimateria del electrón o electrón positivo). Estos, tras un breve recorrido en la materia se aniquilan al combinarse con un electrón negativo de la misma. La pequeña masa de ambos se convierte en energía electromagnética

en forma de un par de fotones emitidos en la misma dirección y sentido contrario (figura 1.17).

A

ISÓTOPO	RANGO MÁXIMO DEL POSITRÓN (mm)
^{18}F	2.6
^{11}C	3.8
^{68}Ga	9.0
^{82}Rb	16.5

B



C

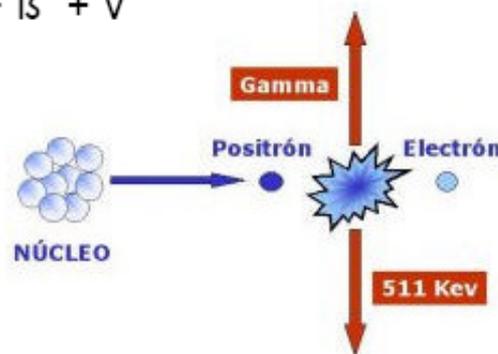


Figura 1.17. (A) Rangos de movimiento de los positrones según el isótopo, (B) emisión de positrones y (C) esquema de aniquilación positrón-electrón

La energía de estos fotones es siempre la misma (± 511 KeV) si no se ve atenuada al atravesar la masa corporal del sujeto o animal, por lo que los sistemas de detección son idénticos para cualquier isótopo. La mayor parte de los estudios PET se llevan a cabo con radiofármacos marcados con

emisores de positrones denominados “orgánicos” (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O y ^{18}F), y de estos el ^{18}F es con diferencia el más empleado. Las características particulares del átomo de flúor hacen que su inclusión en moléculas análogas a las naturales haga de ellas verdaderos antimetabolitos. Estos compuestos son incorporados por la célula debido a su analogía con el sustrato natural, e inician las vías metabólicas correspondientes, pero la presencia del átomo de flúor provoca de uno u otro modo un bloqueo metabólico que facilita el estudio diagnóstico.

Todos ellos poseen un período físico de semidesintegración corto, que oscila entre los 2 minutos del ^{15}O y los 109.6 minutos del ^{18}F (Peñuelas, 2001) (ver tabla 1.5). Estos períodos tan cortos ofrecen ventajas desde el punto de vista de la Protección Radiológica, siendo sometidos los pacientes y los animales a dosis de radiación más bajas que con otras técnicas radiológicas. El inconveniente que presentan, sin embargo, es que sólo pueden utilizarse en centros que dispongan de un ciclotrón de uso propio o que esté muy próximo a él, especialmente diseñado para la producción de isótopos emisores de positrones (salvo el ^{18}F que sí puede transportarse a otros centros satélites equipados con PET).

ISÓTOPO	T _{1/2}	E β ⁺	Reacción Nuclear
¹¹ C	20.4	960	¹⁴ N(p, \square) ¹¹ C
¹³ N	9.9	1198	¹⁶ O(p, \square) ¹³ N
¹⁸ O	2.0	1732	¹⁴ N(d, n) ¹⁵ O
¹⁸ F	109.6	634	¹⁸ O(p, n) ¹⁸ F

Tabla 1.5. Radionucleidos emisores de positrones de aplicación clínica más común. Se indican el periodo de semidesintegración en minutos, la energía máxima de emisión del positrón en KeV y las reacciones nucleares más habituales para la obtención de los radionucleidos correspondientes.

La obtención del ¹⁸F se realiza en un ciclotrón, a partir de un isótopo estable mediante una reacción nuclear. El marcaje se realiza habitualmente mediante módulos automáticos situados en el interior de celdas calientes plomadas. Debido a que los radiofármacos PET son considerados medicamentos, la producción de radiofármacos PET se lleva a cabo en laboratorios farmacéuticos sometidos a un estricto control por parte de las autoridades sanitarias (RD 53/92 que aprueba el Reglamento sobre Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes). Una vez marcadas las moléculas son sometidas a un exhaustivo control de calidad radioquímico y farmacéutico (esterilidad, ausencia de pirógenos, etc.) (NCF, 1999) previo a la administración al paciente o animal (Ley 25/90 del Medicamento, RD 479/93 por el que se regula los medicamentos radiofármacos de uso humano, y Normas de Correcta Fabricación).

Con estos isótopos (que forman parte de la mayoría de las moléculas más abundantes en los medios biológicos) se pueden marcar una multitud de sustancias de interés en Investigación y/o diagnóstico clínico, sin modificar su comportamiento. La molécula más comúnmente utilizada es la flúor-2-deoxi-D-glucosa (FDG) marcada con ^{18}F .

1.9.4. Producción de radiofármacos PET: FDG

Actualmente, existen muchos radiofármacos con aplicación en PET, ya que cualquier molécula marcada con un isótopo emisor de positrones puede ser utilizada en este tipo de estudios (Peñuelas, 2001).

1.9.4.1. Características de los radiofármacos

Para su aplicación *in vivo*, las características ideales que debe presentar un radiofármaco PET son (Peñuelas, 2001):

- Fácil penetración en el tejido diana
- Baja absorción inespecífica
- Elevada afinidad por su sitio de unión
- Disociación suficientemente lenta del lugar de unión como para detectar dicha unión tras la eliminación del compuesto unido inespecíficamente y del presente en el “pool” vascular.

- Metabolización escasa para facilitar el modelado matemático. La PET permite estudiar, visualizar y cuantificar múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos tales como el metabolismo glicídico (con FDG), la tasa de síntesis proteica, la proliferación celular, la actividad enzimática, la tasa de consumo de oxígeno, el metabolismo beta-oxidativo, el pH intracelular, el flujo sanguíneo, la transmisión de señales e incluso la

expresión génica y su regulación. Además, es posible analizar la densidad de receptores de una zona concreta, la cinética de la unión receptor-ligando o enzima-sustrato, la afinidad de un compuesto por un receptor determinado, o el efecto de un fármaco en cualquiera de los procesos fisiológicos previamente referidos.

Los radiofármacos PET pueden clasificarse en tres grandes grupos (Peñuelas, 2001):

- Sustratos de vías metabólicas (donde se encontraría la FDG)
- Ligandos que interactúan selectivamente en un proceso de neurotransmisión
- Radiofármacos para la medida del flujo sanguíneo regional

1.9.4.2. Síntesis de FDG

Para realizar la síntesis de la FDG, se sigue una modificación del procedimiento descrito por Hamacher et al. (Hamacher et al., 1986), que consiste en la sustitución nucleofílica con transferencia de fase catalizada del 1,3,4,6-tetra-Oacetil-2-trifluorometanosulfonil-β-D-manopiranososa con ^{18}F fluoruro. El fluoruro procedente del ciclotrón, se adsorbe sobre una resina de intercambio aniónico y después se eluye con una disolución de carbonato de potasio que posteriormente se evapora a sequedad. Las propiedades nucleofílicas del ^{18}F fluoruro se potencian mediante la adición del catalizador de transferencia de fase Kryptofix 222 [4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo (8,8,8) hexacosano]. La hidrólisis en medio alcalino del compuesto acetilado produce 2- ^{18}F fluoro-2-desoxi- D-glucosa o FDG (figura 1.18.).

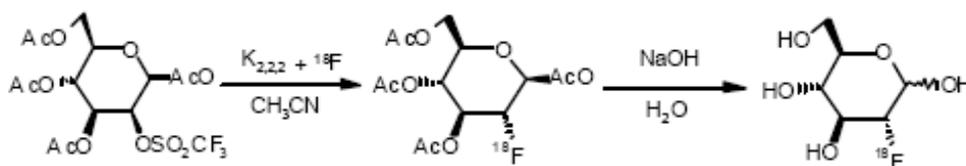


Figura 1.18. Síntesis de FDG (Hamacher et al., 1986)

1.9.4.3. FDG como sustrato de vías metabólicas

La FDG es sin duda el radiofármaco PET más importante. Esto se debe no sólo a su aplicación al estudio de patologías muy diversas, sino también a sus características metabólicas y a la rapidez de su síntesis. El fundamento metabólico para el uso de la FDG es el siguiente (figura 1.19):

La FDG es un análogo de la glucosa. La FDG se administra por vía intravenosa (en humanos y animales de investigación) y/o intraperitoneal (en animales).

Tanto la glucosa como la FDG atraviesan la barrera hematoencefálica y entran fácilmente en las células empleando los transportadores de glucosa. Tras su entrada, ambos compuestos inician la vía glicolítica siendo la FDG fosforilada a FDG-6-fosfato por la hexoquinasa. La presencia del átomo de flúor, sustituyendo al grupo OH en el carbono 2 de la molécula de glucosa, impide su isomerización a fructosa-6-fosfato, por lo que la FDG no participa ni en la glucólisis ni en la síntesis de glucógeno. Queda atrapada en el interior de la célula tras ese primer paso de la glucólisis y la retención de FDG-6-fosfato es proporcional al consumo tisular de glucosa.

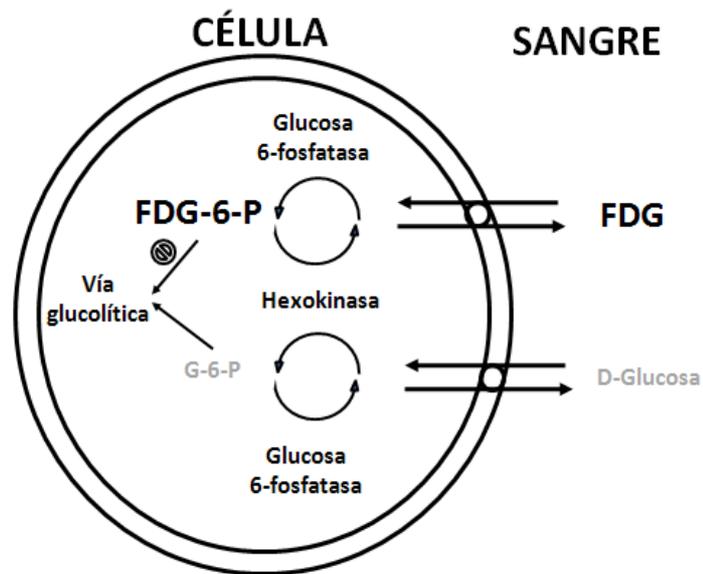


Figura 1.19. Metabolismo de FDG y Glucosa

A pesar de la amplia utilización de la FDG como radiofármaco principal en el estudio de la patología tumoral, debe quedar claro que este radiofármaco no es un marcador de proliferación celular, sino del metabolismo glicídico. El acúmulo de FDG en las células tumorales es consecuencia de un incremento del metabolismo glicídico en éstas, debido a tres factores:

- El incremento en el número de transportadores de membrana para la glucosa (GLUT 1 a GLUT 9) (Aloj et al., 1999).
- El aumento de la actividad de varias enzimas de la vía glicolítica (Smith, 1998) (hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato deshidrogenasa).
- La degradación de la glucosa en las células tumorales tiene lugar mediante una vía anaeróbica.

Debe medirse la glucemia antes de la inyección de FDG. Ante glucemias elevadas (> 160-180 mg/dL) se recomienda normalizar sus niveles ya que la influencia de una concentración sanguínea elevada de insulina sobre el consumo cerebral de glucosa no tiene significado en los estudios clínicos y con animales de investigación.

1.9.5. Detección de la distribución del radiofármaco en el organismo

Tras la inyección de la FDG, se obtienen las imágenes tomográficas de su distribución orgánica utilizando, para ello, unos detectores específicos o anillos. Este conjunto de anillos están formados por múltiples cristales de centelleo, que llevan acoplados fotomultiplicadores para la conversión de la luz del centelleo en un impulso eléctrico y su posterior amplificación.

Los pacientes o animales de investigación, tras un período de espera variable que puede oscilar entre 20 y 120 minutos, son colocados en una camilla situada en la línea que pasa por el centro de los anillos. Posteriormente un ordenador reconstruye imágenes tomográficas (transversales, coronales, sagitales y oblicuas) a partir de los datos recogidos. Estas imágenes describen la distribución tisular de la molécula marcada, previamente administrada (en este caso, la FDG).

1.9.6. Evaluación del metabolismo de la FDG

La evaluación del metabolismo de la FDG en las imágenes PET se puede realizar mediante análisis visual y mediante análisis cuantitativo o semicuantitativo (figura 1.20). El análisis visual de las imágenes es la

técnica más usada en la práctica clínica, si bien es necesario un conocimiento del patrón normal de captación y sus variantes, así como las posibles fuentes de error. En otras ocasiones y, especialmente en el caso de los tumores y las investigaciones con animales, es más específico el análisis semicuantitativo.

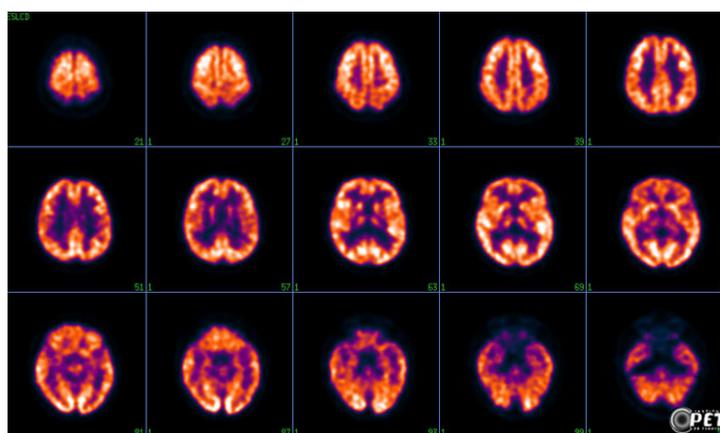


Figura 1.20- Estudio cerebral con 18-FDG en humanos (tomado de www.petfocuscan.com. Instituto PET Dr. Carreras).

En el caso de imágenes PET se dispone de muchos métodos de cuantificación, desde los sencillos *Standard Uptake Value* (SUV) hasta los complicados modelos farmacocinéticos. Sin embargo, la cuantificación de PET no siempre constituye un paso imprescindible, aunque a menudo se da mayor credibilidad a los resultados si van acompañados de parámetros numéricos.

En el ámbito de la investigación esto es fundamental e imprescindible.

Debido a que, actualmente, existe un gran número de métodos de cuantificación, no existe un consenso sobre cuál es el óptimo en cada caso desde un punto de vista coste/beneficio. Los modelos más sencillos resultan menos precisos, empeorando la potencia estadística del estudio, y los más complejos y repetibles pueden resultar muy caros o imposibles de llevar a la práctica.

Para decidir qué método puede ser adecuado para una aplicación concreta, deberíamos saber si la medida que se va a extraer contiene la información de interés. Cuando se utilizan métodos de análisis estadístico sofisticado, es de elevada importancia el conocimiento detallado de sus condiciones de aplicabilidad, así como todos sus detalles técnicos.

Si bien la posibilidad de cuantificar los estudios PET de forma precisa constituye una herramienta de gran utilidad para la investigación de los procesos biológicos in vivo, es conveniente recordar que los números no reemplazan al sentido común.

Entre los modelos de cuantificación de FDG más utilizados están:

1.9.6.1. Standard Uptake Value (SUV)

El método de cuantificación más simple utiliza el número de cuentas absoluto. Debido a la variabilidad de esta medida con factores como el peso, la dosis de radiotrazador inyectada y el tiempo de adquisición, se utiliza frecuentemente el valor SUV (figura 1.21), que se calcula como:

$$\text{SUV} = \frac{\text{actividad captada en el volumen de interés o tejido} \times \text{peso}}{\text{ID}}$$

$$\text{SUV} = \frac{\text{VOI} \times \text{Peso}}{\text{ID}} = \frac{(\text{mCi}/\text{cm}^3) \times \text{g}}{\text{mCi}}$$

NOTA: ID: dosis inyectada. El peso pueden expresarse en kg (humanos) o g (animales o tejidos) y la dosis inyectada/cuantificada en mCi, μCi , etc.

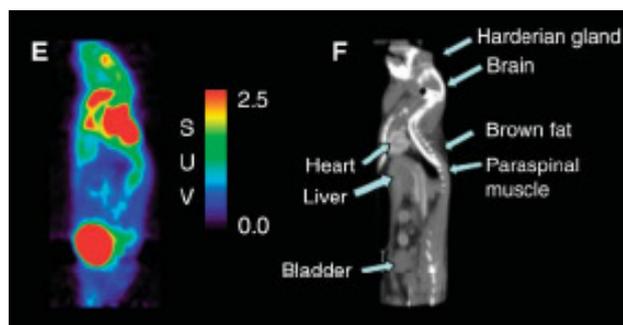


Figura 1.21. Imagen del consumo corporal de un ratón de FDG mediante PET y de su morfología mediante TAC (tomado de Fueger et al., 2006).

Esta medida de SUV no se comporta de forma lineal con el peso del paciente, por lo que se han propuesto otros modelos de SUV corregidos, que sustituyen el valor del peso del paciente por otra medida, como el área de superficie corporal (*Body Surface Area*, BSA en m^2). La BSA se calcula a partir del peso y la altura. La fórmula más habitual es (Graham et al., 2000):

$$\text{BSA} = 0.007184 \times \text{Peso (kg)}^{0.425} \times \text{Altura (cm)}^{0.725}$$

Otra posibilidad para corregir los valores SUV es utilizar el valor de masa corporal magra (LBM; Lean Body Mass). De forma similar al cálculo de la BSA y sustituyendo su valor en la anterior fórmula, calcularíamos la LBM:

$$\text{LBM} = 45.5 + 0.91 \times [\text{altura (cm)} - 152] \text{ en mujeres}$$

$$\text{LBM} = 48.0 + 1.06 \times [\text{altura (cm)} - 152] \text{ en hombres}$$

1.9.6.2. *Statistical Brain Mapping* (SBM o Mapeo Estadístico Cerebral)

Consiste en una metodología de cuantificación de estudios que no requiere la segmentación previa de regiones de interés. Esto es posible gracias a una etapa de procesamiento de las imágenes, previa al análisis estadístico, llamada normalización espacial.

Esta normalización consiste en una deformación elástica de la anatomía cerebral propia de cada sujeto hasta que concuerde con un PET promedio que se denomina patrón o “template”. Sólo se modifica la anatomía subyacente en las imágenes PET conservando las características funcionales (actividad emitida) de cada región del cerebro.

Una vez que todos los cerebros concuerdan se comparan vóxel a vóxel para efectuar los estudios estadísticos (figura 1.22). Este análisis permite estandarizar los datos estadísticos de las imágenes PET y hacerlas comparables con otros estudios.

Hoy día, existen bastantes tipos de programas informáticos para este análisis estadístico, siendo el SPM (*Statistical Parametric Mapping*; www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm) uno de los más utilizados.

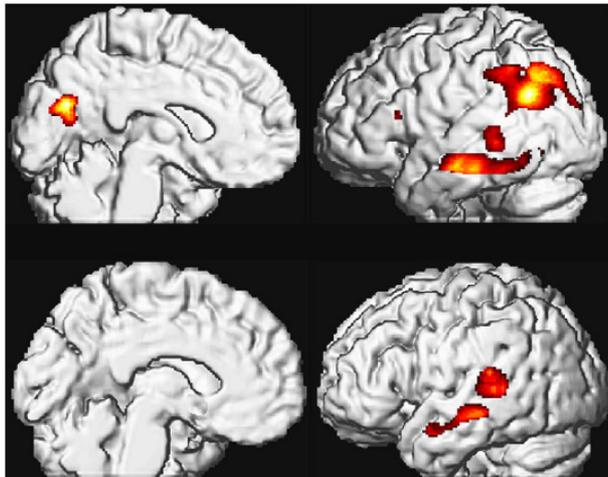


Figura 1.22. Análisis cerebral mediante SPM de las diferencias regionales en el consumo de FDG (tomado de Mosconi et al., 2008).

1.9.6.3. Curvas de actividad temporal

El modelo de Sokoloff/Phelps representa la farmacocinética de la FDG en el tejido a partir de la actividad presente en el torrente sanguíneo. Una vez inyectada en la sangre, la FDG penetra en los tejidos que consumen glucosa y se fosforila a FDG-6-P. Por lo tanto, la concentración total de FDG en el tejido (C_i) es igual a la suma de FDG sin metabolizar (C_e) y metabolizada (C_m):

$$C_i(t) = C_e(t) + C_m(t)$$

Para ser capaces de estimar el valor de la concentración de radiotrazador en cada instante a lo largo del tiempo de adquisición, es preciso derivar la ecuación anterior.

Conociendo la curva de actividad temporal (TAC) en el plasma sanguíneo (C_p) y definiendo las constantes k_1 y k_2 como las tasas directa e

inversa, respectivamente, de transporte capilar de FDG al tejido, y las constantes k_3 y k_4 como las tasas de fosforilación y defosforilación de la FDG dentro del tejido, es posible modelar el cambio en las concentraciones de trazador metabolizado y no metabolizado:

$$dC_e(t)/dt = k_1 C_p(t) - (k_2 + k_3) \cdot C_e(t) + k_4 C_m(t)$$

$$dC_m(t)/dt = k_3 C_e(t) - k_4 C_m(t)$$

La solución de este sistema de ecuaciones determina los valores de las constantes k_1 , k_2 , k_3 y k_4 , y las curvas de concentración de radiotrazador a lo largo del periodo de adquisición, permitiendo el cálculo de la tasa de utilización de glucosa por parte del tejido como:

$$MRGlc = C_p/LC \cdot [(k_1 \cdot k_3)/(k_2 + k_3)]$$

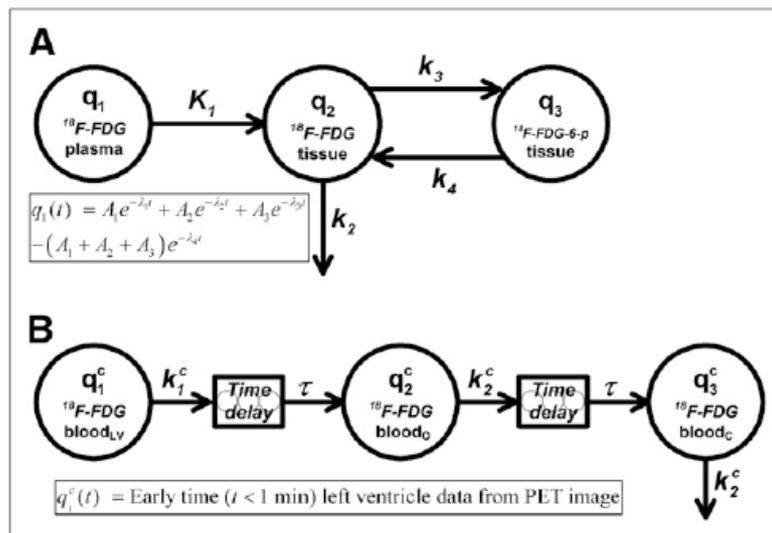


Figura 1.23. Modelo abierto 4K que describe la captación y metabolismo en el tejido de FDG (tomado de Ferl et al., 2007).

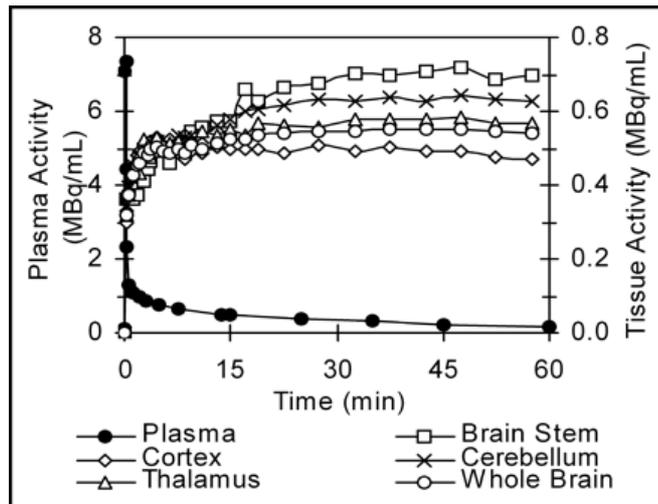


Figura 1.24. Curvas Actividad-Tiempo de plasma (ordenada izquierda) y cerebro completo, corteza, tálamo, cerebelo y tronco cerebral (ordenada derecha) de una ratona (tomado de Shimoji et al., 2004).

Para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales hay varios métodos: *Linear* y *Non-Linear Least Squares*, el Patlak o *Weighted Integration Projection* (Peters AM and Myers M, 1998), o también para la práctica clínica el SPAMALIZE

http://tezpur.keck.waisman.wisc.edu/~oakes/spam/spam_frames.htm)

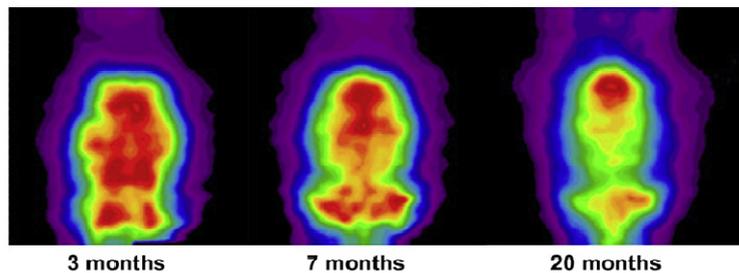
1.9.7. Efecto del envejecimiento sobre el consumo cerebral de glucosa

Existen numerosos datos en la bibliografía que sugieren que el consumo cerebral de glucosa se incrementa durante el crecimiento (Chugani et al., 1987, Chugani, 1998), pero disminuye considerablemente a partir de la etapa adulta con el envejecimiento. Así pues, existen datos en humanos

desde hace más de dos décadas aunque estos estudios no son muy detallados por la calidad y resolución de los equipos (Chugani and Phelps, 1986). No obstante, estos estudios ya nos sirven de partida para establecer el descenso de consumo cerebral de glucosa con el envejecimiento.

Además, nuestro grupo de investigación publicó recientemente (figura 1.25) como en un modelo de ratones que envejecen aceleradamente, se constata este descenso en el consumo cerebral de glucosa con la edad (Borras et al., 2009).

(a) Brain glucose consumption in vivo measured by Positron Emission Tomography



(b) Qualification of brain glucose consumption

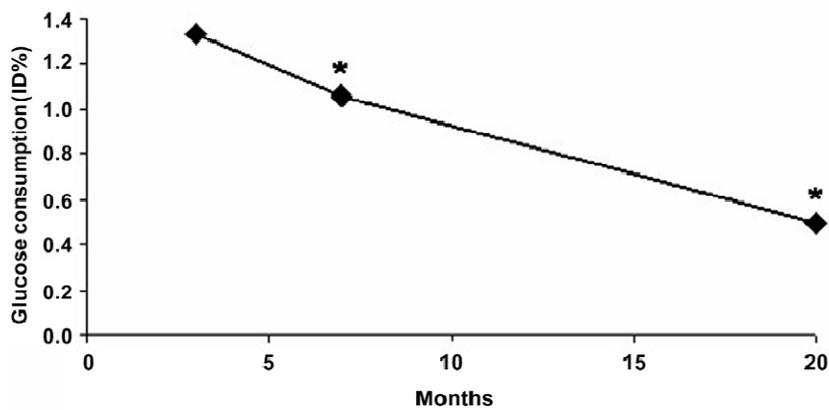


Figura 1.25. Estudio del envejecimiento sobre el consumo cerebral de glucosa (FDG-PET) en ratones envejecidos aceleradamente (tomado de Borras et al., 2009).

Sin embargo, se han observado algunas inconsistencias entre los diferentes estudios con respecto a las áreas más afectadas. Algunos autores han observado mayor compromiso de la región frontal y corteza somatosensorial (Chawluk et al., 1987; Weiss et al., 1990) y otros sugieren además una disminución de la actividad metabólica temporal con la edad. También se ha observado que existen diferencias entre hombres y mujeres (Newberg et al., 2002). En contraposición a lo anterior, otros autores (Yoshii et al., 1988) no encontraron diferencias significativas entre el metabolismo de la glucosa a diferentes edades o entre hombres y mujeres, cuando los datos fueron corregidos por el grado de atrofia cortical.

Uno de los mayores focos de interés sobre el consumo cerebral de glucosa con el envejecimiento es el campo de las enfermedades neurodegenerativas, especialmente, la enfermedad de Alzheimer (EA).

El criterio clínico para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer fue definido en 1984 por el NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984) (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders*). En él se establece que para el diagnóstico de la enfermedad se requiere demostrar la existencia de deterioro cognitivo crónico y progresivo en pacientes adultos o ancianos, sin otras causas subyacentes que puedan explicar este fenómeno. El problema es que, usando este criterio, es difícil diferenciar entre enfermedad de Alzheimer y otras causas de deterioro, como el deterioro cognitivo leve (DCL), en etapas tempranas de la enfermedad. Las imágenes funcionales de cerebro tendrían un rol en este sentido para establecer el diagnóstico diferencial y ayudar a entender los mecanismos subyacentes de la enfermedad (Newberg et al., 2002).

En los primeros estudios con PET en pacientes con enfermedad de Alzheimer, se observó que éstos presentaban una disminución global del metabolismo de la glucosa del orden de 20 a 30% con relación a los controles de edad equivalente (Newberg et al., 2002). En otros estudios se observó además del hipometabolismo global, un mayor compromiso bilateral de la región temporo-parietal (Bonte et al., 1990).

El volumen del hipocampo con resonancia magnética y el metabolismo de la glucosa de la región entorrinal con PET-FDG son dos excelentes marcadores para diferenciar entre ancianos sanos y con DCL. Sin embargo, para diferenciar entre pacientes con DCL y EA creen que es mejor la región neocortical temporal (De Santi et al., 2001). Mosconi et al. (Mosconi et al., 2008, Mosconi et al., 2004a) recientemente han publicado un estudio en el que el hipometabolismo de FDG en el hipocampo predice el descenso cognitivo hacia enfermedad de Alzheimer diferenciándolo del correspondiente al envejecimiento normal (figura 1.26).

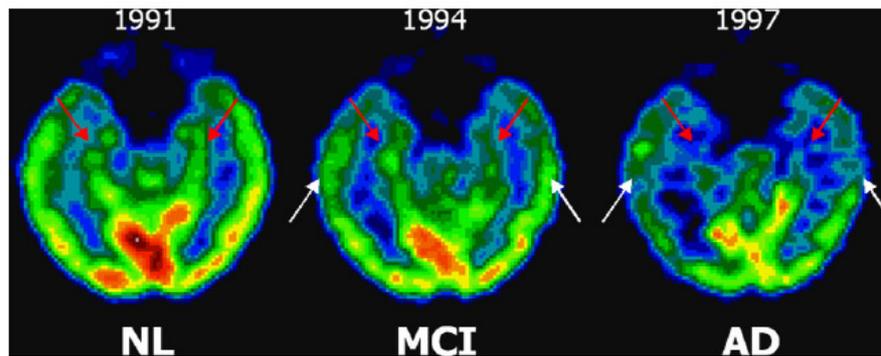


Figura 1.26. Estudio longitudinal FDG-PET de un sujeto (mujer, edad al inicio: 73 años; enseñanza: 12 años; MMSE al inicio: 30/30) que disminuyó desde *normal* o NL (en 1991) a *mild cognitive impairment* o MCI (1994) y después a *Alzheimer* o AD (1997), y tuvo la confirmación post-mortem de AD (2000). Imágenes axiales dispuestas en una angulación negativa paralela al plano del hipocampo. Los estudios muestran las reducciones metabólicas progresivas en el hipocampo (flechas rojas) y en la corteza temporal (flechas blancas) (tomada de Mosconi et al., 2008).

Esto es lo que se denomina el patrón típico de la enfermedad de Alzheimer y puede ser especialmente pronunciado en pacientes menores de 65 años.

Este patrón es altamente predictivo de esta enfermedad, sin embargo, no es patognomónico: puede verse en enfermedad de Parkinson, hematoma subdural parietal bilateral, infarto parietal bilateral y radioterapia parietal bilateral (Mazziota et al., 1992).

El patrón típico antes descrito es similar tanto para SPECT como para PET, pero con éste último método la sensibilidad y la especificidad sería mayor especialmente en las etapas tempranas de la enfermedad,

probablemente por un mayor contraste entre la captación de la corteza sensoriomotora versus la temporo-parietal (Ishii et al., 1999).

Así, recientemente se están usando diferentes moléculas buscando más especificidad para este deterioro cognitivo y no solamente FDG como recoge de Leon (de Leon et al., 2007).

1.9.8. Terapéutica hormonal sustitutiva y consumo cerebral de glucosa

Como se comentó en el punto 1.6 y 1.7 de esta Introducción, los estrógenos pueden actuar como antioxidantes y, de hecho, la terapia hormonal sustitutiva parece disminuir el estrés oxidativo sufrido como consecuencia de la menopausia.

Del mismo modo, al suponer este periodo en las mujeres un cambio drástico fisiológico se ha generado una gran controversia en la utilización o no de este tratamiento. De hecho, hay estudios realizados con humanos en los que se evalúa el efecto del tratamiento con estrógenos sobre diferentes funciones orgánicas y su posible mejora (Arnal et al., 1996, Tang et al., 1996, Henderson et al., 2000, Irwin et al., 2008). También, es de destacar que la mujer tiene mayor disposición a sufrir enfermedad de Alzheimer tras este periodo (Andersen et al., 1999, Azad et al., 2007).

Por ello, han sido varios los estudios llevados a cabo para ver si la terapéutica hormonal sustitutiva mejoraba o no la incidencia de la enfermedad de Alzheimer tras la menopausia (Eberling et al., 2003, Eberling et al., 2000, Small et al., 2000, Rasgon et al., 2001, Rasgon et al., 2005) evaluando su consumo cerebral de glucosa mediante PET,

centrándose en aquellas regiones que generalmente presentan hipometabolismo.

Sin embargo, no existen referencias que relacionen el estrés oxidativo producido por la menopausia, el efecto antioxidante de los estrógenos, el inicio y duración de la terapéutica hormonal sustitutiva y el metabolismo cerebral en este periodo crucial en el sexo femenino.

1.10. METABOLÓMICA.

1.10.1. Perfil metabólico mediante resonancia magnética nuclear (^1H NMR). Generalidades

Como complemento a la proteómica y la genómica, la metabonomía ha sido, por primera vez, ampliamente aplicada a un amplio rango de problemas en diversas áreas de investigación biomédica con el objetivo de entender el comportamiento de los metabolitos bajo ciertas condiciones exógenas. Han sido documentadas diferentes aplicaciones del enfoque metabonómico, especialmente en la detección de toxicidad, el metabolismo de fármacos (Keun, 2006) y la genómica funcional (Gavaghan et al., 2002). En resumen, la “Metabonomía permite observaciones médicas que están relacionadas con los datos de todas las demás tecnologías “ómicas”, las cuales están, directamente, menos relacionadas con los resultados biológicos reales de su metabolismo” (Nicholson and Lindon, 2008).

Las diferentes plataformas que se han empleado para investigar sobre los perfiles de los metabolitos han sido algunos como:

- Resonancia Magnética Nuclear (RMN);
- Cromatografía de gases - Espectrometría de masas (GC-MS);
- Cromatografía de líquidos - Espectrometría de masas (LC-MS).

En la tabla 1.6 se enumeran las principales ventajas y desventajas que pueden ser detectadas utilizando las técnicas de análisis mencionadas anteriormente, mientras que en la figura 1.27 se ilustra la sensibilidad de dichas técnicas.

En particular, la técnica de NMR tiene la ventaja de proporcionar información detallada sobre la estructura molecular del material biológico observado, lo que refleja al final el estado metabonómico de un sistema biológico vivo sin perder información importante sobre dicho sistema.

Tecnologías de Metabolómica		
Tecnología	Ventajas	Desventajas
NMR	<ul style="list-style-type: none"> · Cuantitativa · No destructiva/invasiva · Rápida (2-3 min/muestra) · No requiere derivatización · No requiere separación · Detecta todas las clases de orgánicos · Permite la identificación de productos químicos nuevos · Tecnología robusta · Puede ser usado para imagen metabólica (fMRI) · Amplia gama de softwares y base de datos para la identificación de metabolitos · Compatible con líquidos y sólidos 	<ul style="list-style-type: none"> · No muy sensible · Instrumentación cara · Gran instrumento de "huella" · No se pueden detectar o identificar sales eiones inorgánicos · No se pueden detectar compuesto no-protonados · Requiere muestras más grandes (0,5 mL)
GC - MS	<ul style="list-style-type: none"> · Tecnología robusta · Relativamente barata · Cuantitativa (con calibración) · Se necesita tamaño de muestra razonable · Buena sensibilidad · Amplia gama de softwares y base de datos para la identificación de metabolitos · Detecta la mayoría de moléculas orgánicas y algunas inorgánicas · Excelente reproducibilidad en la separación 	<ul style="list-style-type: none"> · Muestra no recuperable · Requiere derivatización de la muestra · Requiere separación · Lenta (20-30min/muestra) · No se puede utilizar en imagen · Es difícil la identificación de nuevos compuestos
LC - MS	<ul style="list-style-type: none"> · Excelente sensibilidad · Tecnología muy flexible · Detecta la mayoría de moléculas orgánicas y algunas inorgánicas · Tamaño de muestra mínimo · Se puede utilizar en imagen metabólica (MALDI) · Se puede utilizar sin separación (inyección directa) · Tiene potencial para detectar la mayor parte del metaboloma 	<ul style="list-style-type: none"> · Muestra no recuperable · No muy cuantitativo · Instrumentación cara · Lento (20-30min/muestra) · Pobre resolución en la separación y reproducibilidad (vs. GC) · Instrumentación menos robusta que NMR o GC-MS · Gama limitada de softwares y base de datos para la identificación de metabolitos · Es difícil la identificación de nuevos compuestos

Tabla 1.6. Comparación de diferentes tecnologías de la metabolómica (tomada de Wishart, 2008).

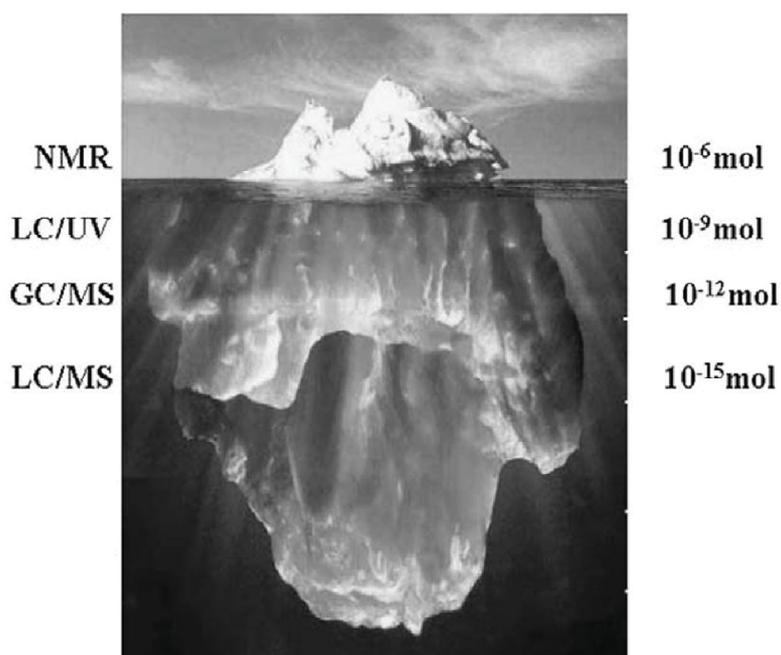


Figura 1.27. Comparación de la sensibilidad relativa de diversas herramientas de metabolómica. La RMN tiene tiempos de análisis rápidos, pero sufre de una sensibilidad más baja, lo que permite la visualización sólo de los metabolitos más concentrados (es decir, la punta del iceberg). GC / MS y HPLC / MS proporcionan buena selectividad y sensibilidad (Figura adaptada de Summer et al., 2002).

La RMN se utiliza, generalmente, para detectar los átomos de hidrógeno en metabolitos (^1H RMN), por lo que en una muestra típica (líquido biológico en la investigación médica) todas las moléculas que contienen hidrógeno (casi todos los metabolitos) darán un espectro de RMN

de ^1H , siempre y cuando estén presentes en concentraciones superiores al límite de detección.

Una ventaja de la RMN es que la muestra no requiere ningún tratamiento físico o químico previo al análisis, sólo las condiciones de la solución como la temperatura, el pH y la concentración de sal tiene que ser ajustada de manera que imiten muy de cerca un fluido fisiológico dado, especialmente en el caso de estudiar “proteínas” (Wüthrich, 2002).

1.10.2. Análisis de datos (métodos quimiométricos)

Como se ha dicho en el párrafo anterior, un estudio de metabonómica puede proporcionar resultados significativos si los cambios metabólicos en un grupo objetivo es significativamente diferente de la variación biológica del grupo de control relativo (Abdel-Farid et al., 2007). Esto significa que los espectros de las muestras de interés se comparan con los de los controles, por lo que las características espectrales causadas por factores externos puedan ser determinadas.

Este enfoque lleva a ignorar la importancia de la concentración de los metabolitos. Esto es en parte cierto: las concentraciones precisas de los metabolitos no siempre son necesarias para formular hipótesis sobre el mecanismo de los cambios, especialmente cuando se habla de enfermedades, de modo que el análisis de metabonómica se convierte en una forma de “agrupar” o clasificar (Wang, 2004) sobre la base de las diferencias (en términos de presencia o no de sus metabolitos) entre el control y las muestras objetivos.

El reconocimiento de patrones (Jain, 2000) es el nombre común utilizado para identificar los métodos que conducen a organizar los datos de la metabonomía con el fin de clasificar las muestras en clases y predecir o clasificar muestras desconocidas en una de las clases conocidas sobre la base de su patrón de medición (Berrueta et al., 2007).

Se basa principalmente en procedimientos matemáticos y estadísticos (análisis multivariable o quimiometría) que permiten analizar gran cantidad de información a partir de unas pocas muestras (variables o rasgos), producida por los modernos instrumentos de análisis (como la resonancia magnética nuclear) en un tiempo relativamente corto (Duarte et al., 2004).

Al final, desde una medición espectroscópica, por ejemplo un espectro de RMN de ^1H , es posible seleccionar una o varias regiones espectrales o señales específicas que a menudo proporcionan mejores resultados en las clasificaciones o predicciones que el uso del espectro completo (Figura 1.28).

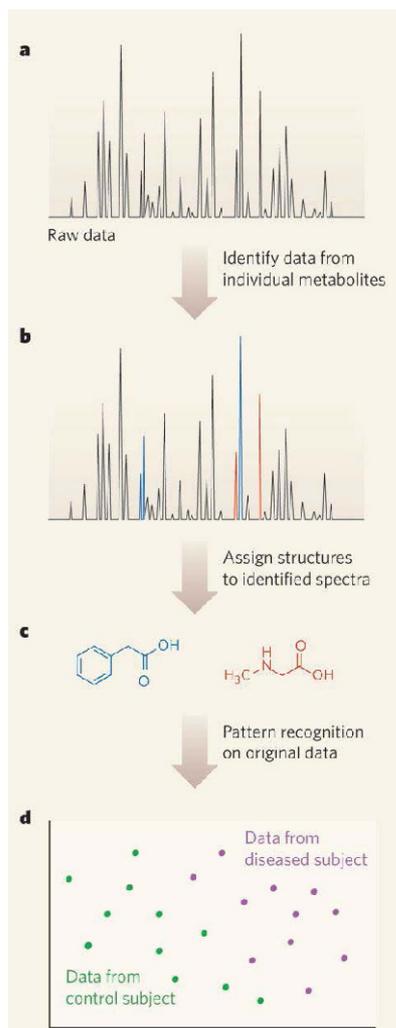


Figura 1.28: Análisis de datos de metabonómica: (a) un procedimiento típico podría comenzar con el espectro de RMN de una muestra, que contiene las señales de cientos de metabolitos. (b) se identifican los espectros individuales para cada metabolito. (c) esto permite que la estructura de los metabolitos sea determinada. (d) las técnicas de reconocimiento de patrones se pueden utilizar para averiguar cómo los espectros de dos grupos difieren entre sí (figura adaptada del artículo: Nicholson and Lindon, 2008).

Estas técnicas de comparaciones estadísticas o estadísticas multivariadas y de identificación de características implican generalmente agrupaciones sin supervisión como el **Análisis de Componentes Principales** (PCA), o la clasificación supervisada como **Análisis Discriminativo Lineal** (LDA) (Dixon et al., 2007), **Análisis Discriminativo por Mínimos Cuadrados Parciales** (PLS-DA) (Westerhuis et al., 2008) o **Mínimos Cuadrados Parciales** (PLS) (Pirouz et al., 2006).

Formalmente, el **PCA** es una forma de identificar patrones en los datos, expresándolos de tal manera que se destacan sus similitudes y/o diferencias (Rodríguez-Delgado et al., 2002; Silva et al., 2006). La ventaja de esta técnica es la capacidad de reducir el conjunto de datos multidimensionales (una matriz de datos) en un nuevo conjunto de variables no correlacionadas (es decir, ortogonales) mediante la realización de un análisis de covarianza (ANCOVA) entre los factores.

El PCA trabaja por la descomposición de la matriz X (que contiene el conjunto de datos original) como el producto de dos matrices más pequeñas, que se denominan matrices de **carga** y de **puntuación** (figura 1.29).

La matriz de carga (V) contiene información sobre las variables: se compone de unos pocos vectores (Componentes Principales, **PCs**), que son (que se obtienen como) combinaciones lineales de las variables X originales.

La matriz de puntuación (**U**) contiene información sobre los objetos. Cada objeto se describe en términos de sus proyecciones sobre los PCs, (en lugar de las variables originales) (Ecuación 1.1).

$$X = VT*U \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

La información no contenida en estas matrices se mantiene como “varianza X inexplicable” en una matriz residual (**E**), que tiene exactamente la dimensionalidad idéntica a la matriz **X** original.

Los PCs, entre muchas otras, tienen dos propiedades interesantes:

1. que se extraen en orden decreciente de importancia. El primer PC siempre contiene más información que el segundo, el segundo más que el tercero y así sucesivamente.
2. son ortogonales entre sí. No hay absolutamente ninguna correlación entre la información contenida en los diferentes PCs.

En el PCA es posible decidir cuántos PCs deben ser extraídos (el número de componentes principales, es decir, la dimensionalidad del modelo).

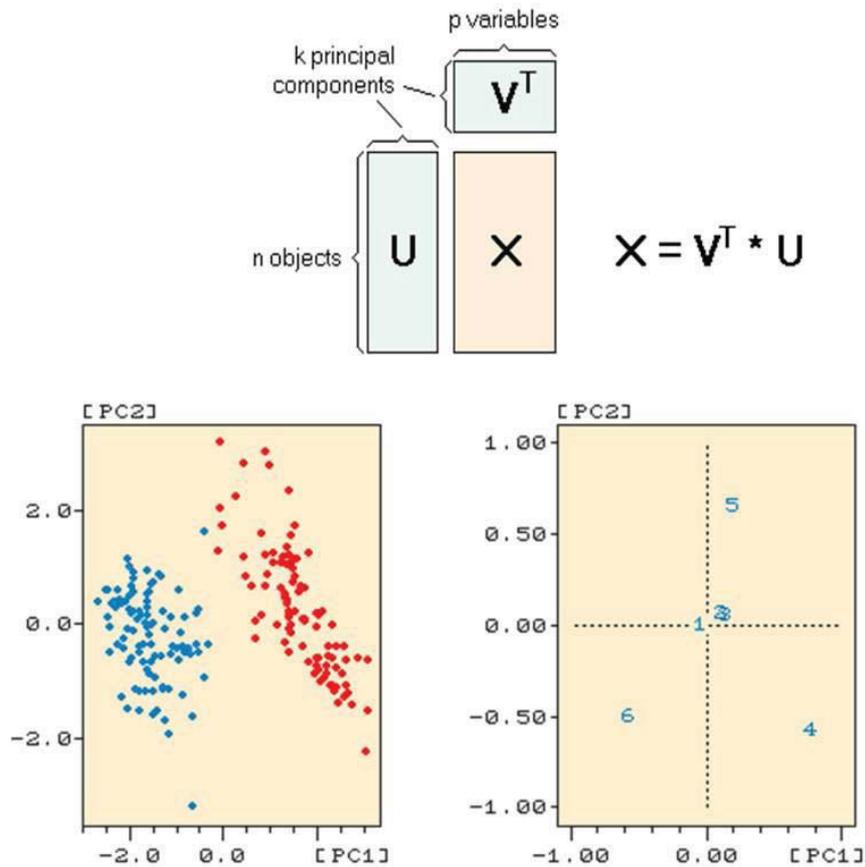


Figura 1.29. Las dos matrices V y U son ortogonales. La matriz V se suele llamar matriz de carga y la matriz U se llama la matriz de puntuación. Hay unas pocas parcelas comunes que se utilizan siempre en relación con el PCA: 1) los puntajes/parcela de puntuaciones (izquierda de la figura) y 2) la carga correspondiente/parcela de carga (parte derecha de la figura) (Figuras adaptadas de Lohninger, 1999).

Cada nuevo PC extraído aumenta aún más la cantidad de información (varianza) explicada por el modelo. Sin embargo, por lo

general los primeros cuatro de cada cinco PCs explican más del 90% de la varianza X. Desde que los patrones de datos pueden ser difíciles de encontrar en los datos de alta dimensión, como los espectroscópicos, donde la mayoría de las veces la información es redundante, el PCA es una poderosa herramienta para el análisis de los mismos. En la $^1\text{H-RMN}$, redundancia significa que algunas de las variables se correlacionan entre sí, porque están midiendo el mismo constructo (selecciones diferentes para una misma molécula).

De esta manera, mediante el uso de unos pocos componentes, cada muestra (espectro) puede ser representado por un número relativamente pequeño y no por los valores de miles de variables (puntos espectrales de datos).

Como técnica de agrupación, el PCA se usa más comúnmente para identificar cómo una muestra es diferente de otra, qué variables contribuyen más a esta diferencia, y si esas variables contribuyen de la misma manera (es decir, están correlacionadas) o de forma independiente (es decir, no correlacionadas) de cada una de las otras. Al contrario que el PCA, la **LDA**, **PLS** y **PLS-DA** (De Noord, 1994; Kleinbaum et al., 1988; Martens and Naes, 1989) son técnicas de clasificación supervisada que se pueden utilizar para aumentar la separación entre grupos de observaciones de los componentes rotatorios del PCA, de tal modo, que se obtiene una separación máxima entre las clases (Chevallier S, 2006). Sin embargo, las técnicas de análisis multivariable supervisado pueden fácilmente dar lugar al sobreajuste debido al gran número de variables disponibles y el número reducido de grupos a clasificar. Para evitar esto, es necesario validar extensivamente los resultados tanto experimental como estadísticamente.

Esto requiere un número muy elevado de muestras. Por otra parte, en muchas ocasiones, el interés del análisis quimiométrico es encontrar patrones globales de los datos y no la clasificación 'per se'.

Como se ha dicho en el principio del párrafo, los enfoques quimiométricos como el PCA y PLS-DA, por su propia cuenta, no permiten la identificación directa o cuantificación de los compuestos. En el enfoque de la metabonomía (metabolómica cuantitativa o perfiles específicos) la atención se centra en tratar de identificar y/o cuantificar todos los compuestos en la muestra como sea posible.

Esto, generalmente, se realiza mediante la comparación de los datos espectroscópicos (obtenidos a partir de RMN de la muestra o los MS) o librerías de referencia de datos espectroscópicos obtenidos a partir de compuestos puros (Serkova et al., 2007; Weljie et al., 2006; Wishart, 2001). Una vez que los compuestos constitutivos se identifican y cuantifican, los datos son después procesados estadísticamente (con PCA o PLS-DA) para identificar los biomarcadores más importantes o las vías metabólicas informativas (Weljie, 2006).

Dependiendo de los objetivos y la capacidad instrumental, la metabolómica cuantitativa puede ser específica (selectiva a ciertas clases de compuestos) o completa (que abarca todos o casi todos los metabolitos detectables).

1.10.3. Espectroscopia NMR: los principios más básicos

Los principios de la espectroscopia de RMN son bien conocidos hoy en día y está fácilmente disponible en muchos libros de texto (Gerothanassis IP et al., 2002), por lo que no se profundizará aquí muy a fondo, tan sólo los principales parámetros que se utilizan en el tratamiento de los datos de RMN. Los parámetros relevantes de RMN son:

1. desplazamiento químico (δ) (Abraham et al., 2005);
2. tiempos de relajación.

Los desplazamientos químicos, generalmente referidos a términos de ppm, describen la dependencia de los niveles de energía magnética nuclear en el entorno electrónico de una molécula. El rango habitual para el protón se sitúa entre 0 y 12 ppm, que se refiere al TMS (tetrametilsilano). Otros núcleos como ^{13}C , ^{31}P y ^{15}N tienen ventajas evidentes en términos de desplazamientos químicos en orden de rango superior a 100 ppm (figura 1.30) pero también una desventaja debido a su sensibilidad mucho más débil.

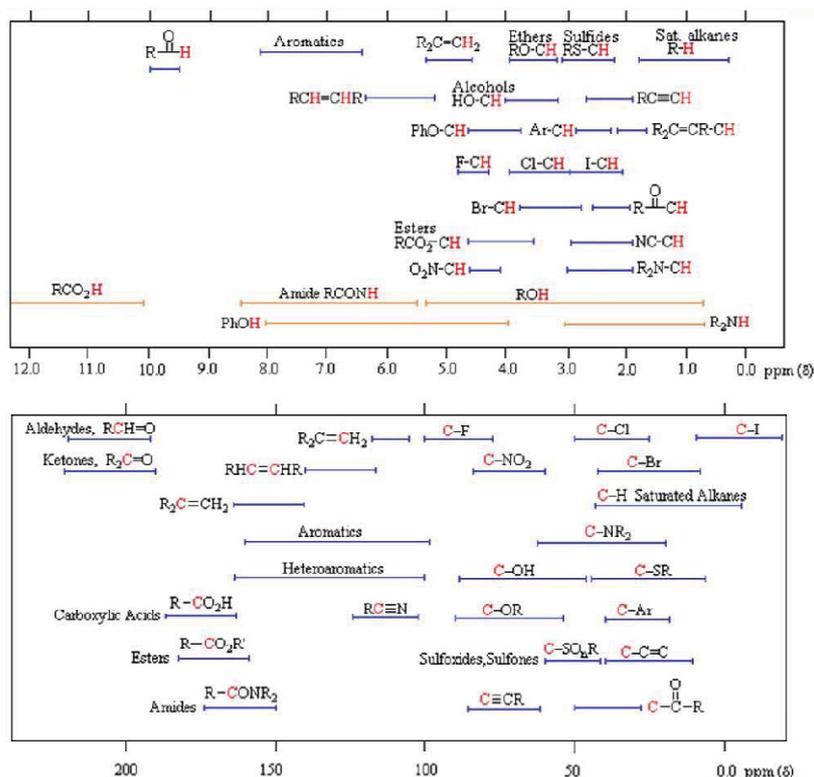


Figura 1.30. Desplazamientos químicos de ^1H (espectro superior) y de ^{13}C (parte inferior del espectro). Las referencias son de muestras en solución CDCl_3 . La escala δ (ppm) es relativa a TMS en $\delta=0$ ppm.

Para el espectro ^1H : los rangos amplios que se muestran en la parte inferior de la figura (color naranja) son típicas de los protones de hidrógeno en condiciones de servidumbre (OH y NH). Estas señales son dependientes de concentración y de temperatura. Hay que tener en cuenta que en la solución de DMSO-d_6 , las señales de alcohol OH se desplazan al campo más bajo (δ 4.0 a 6.0 ppm), y suelen mostrar acoplamiento vecinal.

Para el espectro de ^{13}C : la conjugación de un doble enlace con un grupo carbonilo perturba las resonancias de carbono de ambos grupos. El β -carbono del doble enlace se desplaza a un campo menor de 20 a 30 ppm, y el carbono carbonilo se desplaza a un campo mayor de 5 a 15 ppm (la figura es una adaptación de www.cem.msu.edu)

En el espectro de RMN de un compuesto orgánico, los picos aparecen en las posiciones de absorción, llamadas también **posiciones de resonancia o frecuencias de precisión**, de diferentes núcleos en la molécula. El desplazamiento químico exacto de un determinado núcleo en una molécula da información acerca de cómo el átomo está con el núcleo en condiciones de servidumbre en la molécula. El eje X del espectro se conoce como la escala delta (δ) con unidades de ppm, y el eje y es una escala de intensidad (figura 1.31).

La altura del pico en el eje Y es proporcional al número de núcleos ^1H en la molécula con el mismo desplazamiento químico. La intensidad de una resonancia ^{13}C no es, sin embargo, proporcional al número de carbonos.

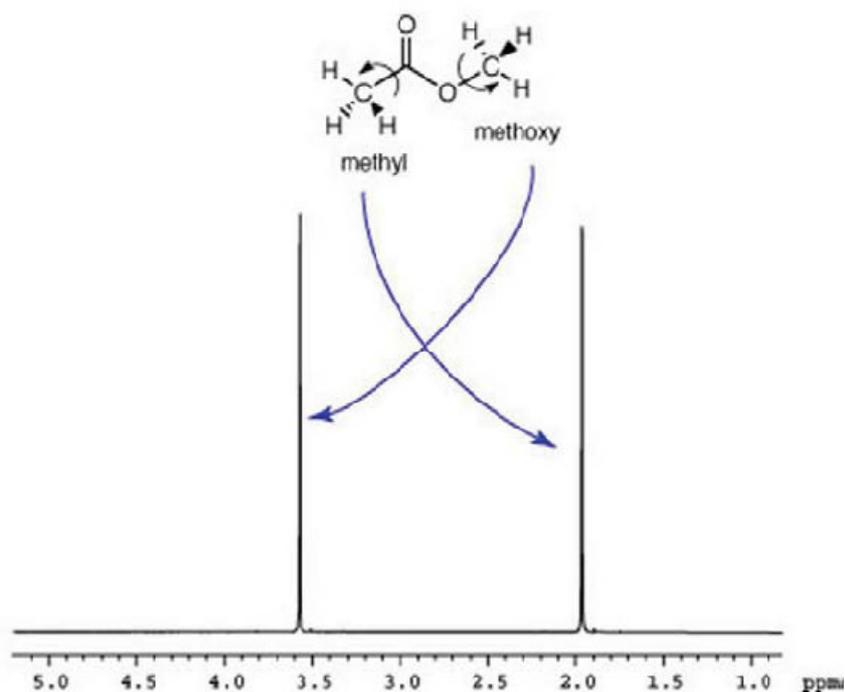


Figura 1.31. El espectro de ^1H -RMN de acetato de metilo muestra dos picos: uno a $\delta = 2.1$ ppm para los tres protones metilo equivalentes y uno a $\delta = 3.7$ ppm para los tres protones metoxy equivalentes. Los protones metoxy se dice que resuenan a bajocampo desde los protones metilo. Cada uno de los tres protones metilo son equivalentes entre sí y cada uno de los tres protones metoxy son equivalentes a cada uno debido a la rotación rápida sobre los enlaces simples carbono-carbono y carbono-oxígeno. Se dice que los núcleos ^1H o ^{13}C son equivalentes de desplazamiento químico si tienen exactamente el mismo desplazamiento químico (la figura es una adaptación de <http://orgchem.colorado.edu>).

El desplazamiento químico es un parámetro relevante, especialmente en RMN de alta resolución (HR-RMN). Entre todas las técnicas de RMN, la HR-NMR tiene una sensibilidad muy alta y hace uso del campo magnético alto que permite la observación de parámetros muy detallados. Estos dos factores son en realidad bastante importantes en la asignación de los componentes y la medición de su relación de intensidades.

Desde el punto de vista **cualitativo**, en términos de linealidad y selectividad, la RMN es definitivamente el mejor método de análisis. Así, desde el punto de vista de la linealidad, la intensidad de la resonancia es estrictamente proporcional al número de núcleos de resonancia a una frecuencia determinada.

La selectividad es también buena porque la RMN diferencia todos los isótopos de los elementos e, incluso para un isótopo dado, es capaz de producir diferencias medibles en el desplazamiento químico para un ambiente químico diferente.

Desde el punto de vista **cuantitativo**, la sensibilidad depende de la relación señal-ruido, que puede considerarse aceptable cuando es superior a 10. La precisión y la exactitud se puede determinar a partir de la desviación estándar de las medias sobre duplicados.

1.10.4. Métodos para los enfoques metabólicos por HR-RMN

En la Tabla 1.7 se enumeran los principales enfoques metabólicos posibles basados en la espectroscopia de HR-RMN en la ciencia de los alimentos.

ENFOQUE	FUNCIÓN
Perfil de metabolitos	El análisis se centró en un grupo de metabolitos, por ejemplo, una clase de compuestos como los carbohidratos, aminoácidos, o los asociados con una vía específica (F. D. Gunstone, 1994)
Metabolómica	Análisis exhaustivo de toda la metaboloma bajo un conjunto determinado de condiciones (H. Vidarto et al, 2006).
“Huella dactilar” metabólica	Clasificación de las muestras sobre la base de procedencia de cualquiera de su importancia biológica u origen (C. Hyung-kyoon et al., 2004)
Perfil metabólico	A menudo se usa indistintamente con “perfil de metabolitos”
Metabonomía	Medida de la “huella dactilar” de las perturbaciones causadas por los cambios bioquímicos naturales o debidos al técnico (C. Xiao et al., 2008)

Tabla 1.7. Clasificación de los enfoques metabolómicos (tabla adaptada de Goodacre et al., 2004).

Todos estos enfoques se centran en el contenido metabólico de las muestras, desplazando la atención desde el nivel de la transcripción génica (transcriptoma) y la modificación de proteínas (proteoma) hacia la determinación y evaluación (en términos de concentración) de los metabolitos (moléculas).

Pero, como se ha dicho, mientras que la **metabolómica** conduce a obtener un conjunto “completo de metabolitos o productos intermedios de

bajo peso molecular que son dependientes del contexto, variando de acuerdo a la fisiología, al estado de desarrollo o patológico de la célula, tejido, órgano u organismo” (Oliver, 2002), la **metabonómica** mide la respuesta metabólica dinámica multiparamétrica de los sistemas vivos a los estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas.

Tanto los enfoques de la metabolómica como los de la metabonómica pueden coexistir en un mismo investigador y una está estrechamente ligada a la otra en un doble sentido: la exploración metabolómica (**perfil de la metabolómica**) puede ayudar a entender la respuesta de un sistema biológico a los estímulos externos (**perfil de la metabonómica**) y viceversa.

Anteriormente ha sido ilustrado también el rango de sensibilidad de las técnicas espectroscópicas utilizadas en investigaciones de metabonómica, sin embargo, la metabonómica basada en la RMN ha demostrado ser especialmente apropiada para el análisis rápido de muestras biológicas complejas. El espectro de RMN produce así, en el rendimiento generado, una huella dactilar metabólica única para cada mezcla biológica compleja: si en su estado, la “huella dactilar” o la firma metabólica refleja este cambio.

El método de perfil molecular de una muestra, técnica basada en la RMN, se representa esquemáticamente en la figura 1.32, en el que un cuadrado rojo señala los posibles resultados que pueden obtenerse a partir del método.

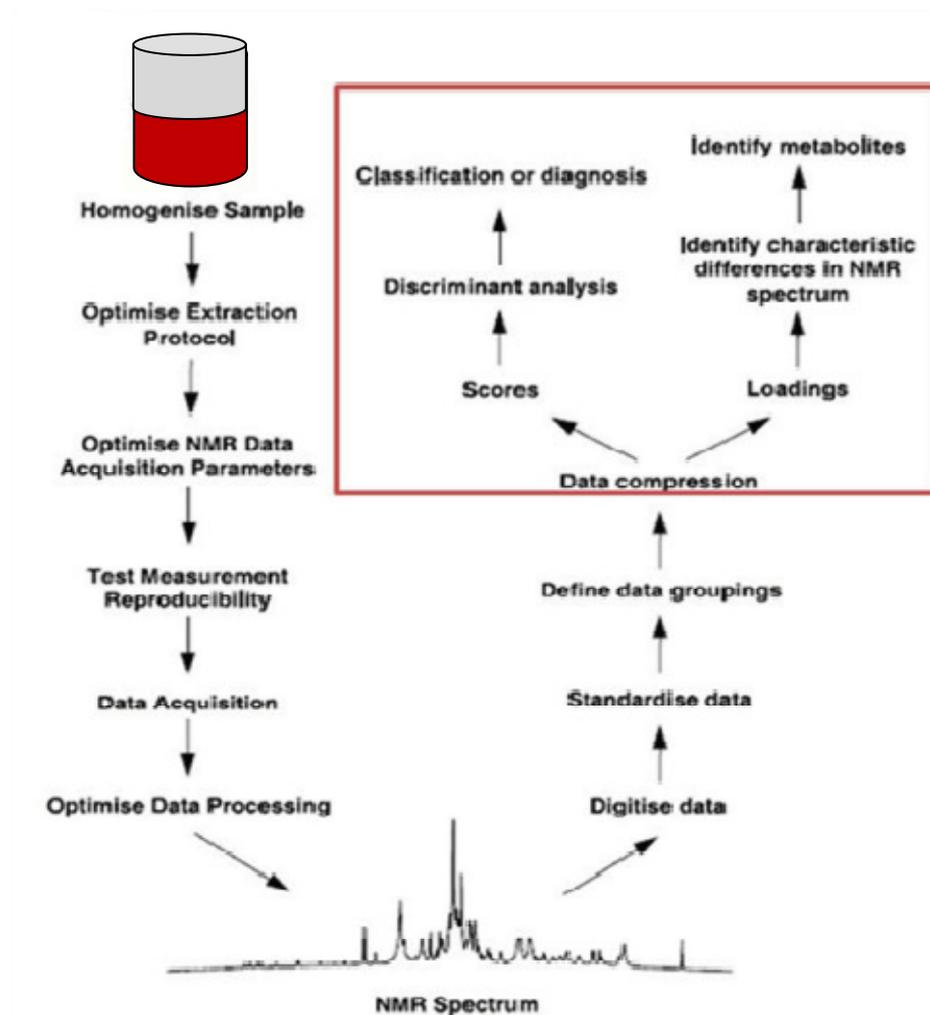


Figura 1.32. Métodos para trazar el perfil metabólico por RMN. En rojo las vías de perfil molecular (figura tomada de Charlton et al., 2004).

1.10.5. RMN y quimiometría

Una vez más, es importante matizar sobre la evidencia que la metabon(1)ómica combina las técnicas de RMN de alta resolución con tecnología de reconocimiento de patrones para evaluar rápidamente el estado metabólico de la matriz biológica. Al usar técnicas espectroscópicas para la cuantificación de productos químicos, se han utilizado los datos de los métodos de análisis univariable, esta aplicación se llama **quimiometría**. Para poder aplicar técnicas quimiométricas a los datos de RMN es necesario realizar unos pasos previos de preprocesado:

- Normalización de los datos (figura 1.33).

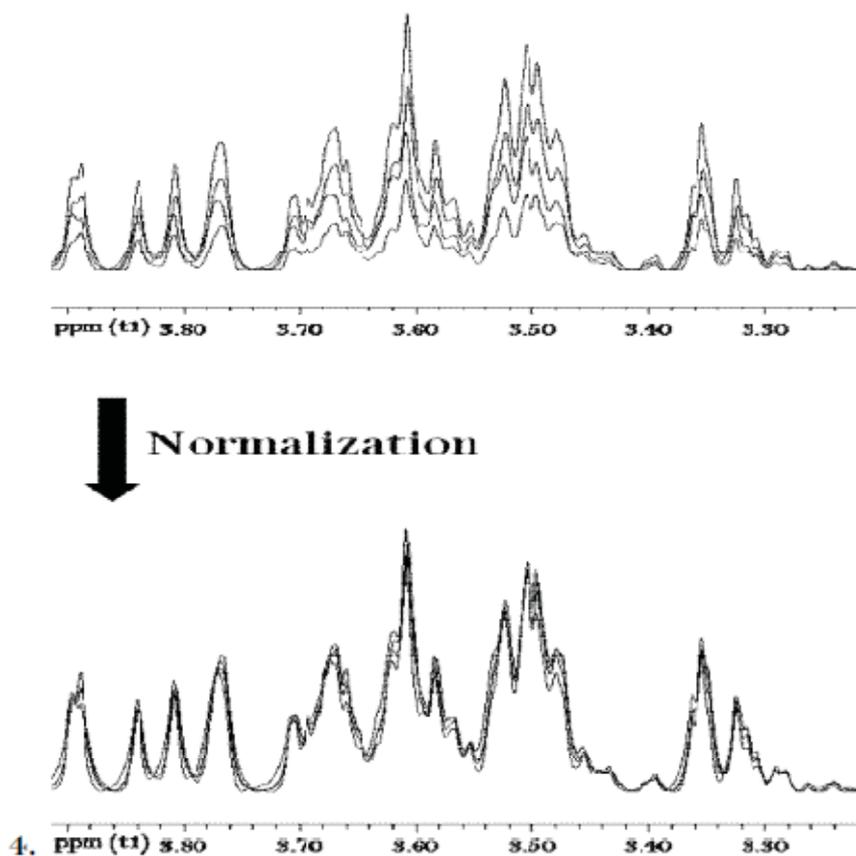


Figura 1.33. Normalización de un conjunto de espectros obtenidos de una muestra. En esta figura se muestra parte de la región de mediocampo ^1H -NMR (5.2 a 2.8 ppm). Los espectros de ^1H -RMN se registró a $T = 300\text{ K}$ en un espectrómetro Varian Mercuryplus, que opera en frecuencia ^1H de 400 MHz; se adquirieron 2048 exploraciones, con los datos recogidos en los puntos de datos de 16K con un ancho espectral de 16 ppm, un ángulo de pulso de 60° , un retraso de reciclaje de 1.0 s, y el tiempo de adquisición de 2.561 s con una ganancia del receptor constante. La normalización se hizo con el Software MestReC (<http://www.mestrec.com>)

La **normalización** de datos es un paso importante para cualquier análisis estadístico. El objetivo es la normalización de los datos para hacer comparaciones significativas de las muestras en el conjunto de datos.

- **Corregir variaciones en el desplazamiento químico:** Las variaciones generales de muestra a muestra se deben a pequeñas variaciones en la frecuencia del espectrómetro, mientras que las variaciones de desplazamiento químico pico a pico se deben a cambios en, por ejemplo, el pH. En este último caso, una reducción de datos en la forma llamado *binning* (Craig et al., 2006) es una solución pragmática al problema.

- **Espectral binning** (figura 1.34): es una técnica ampliamente utilizada en el que se efectúa el reparto del espectro en una serie de regiones, y la superficie total dentro de cada caja se usa como una representación abstracta del espectro original.

Un espectro típico de RMN de 64k se reduciría con anchuras de bin de 0.04 ppm, dando lugar a valores integrales de ~ 250 bin.

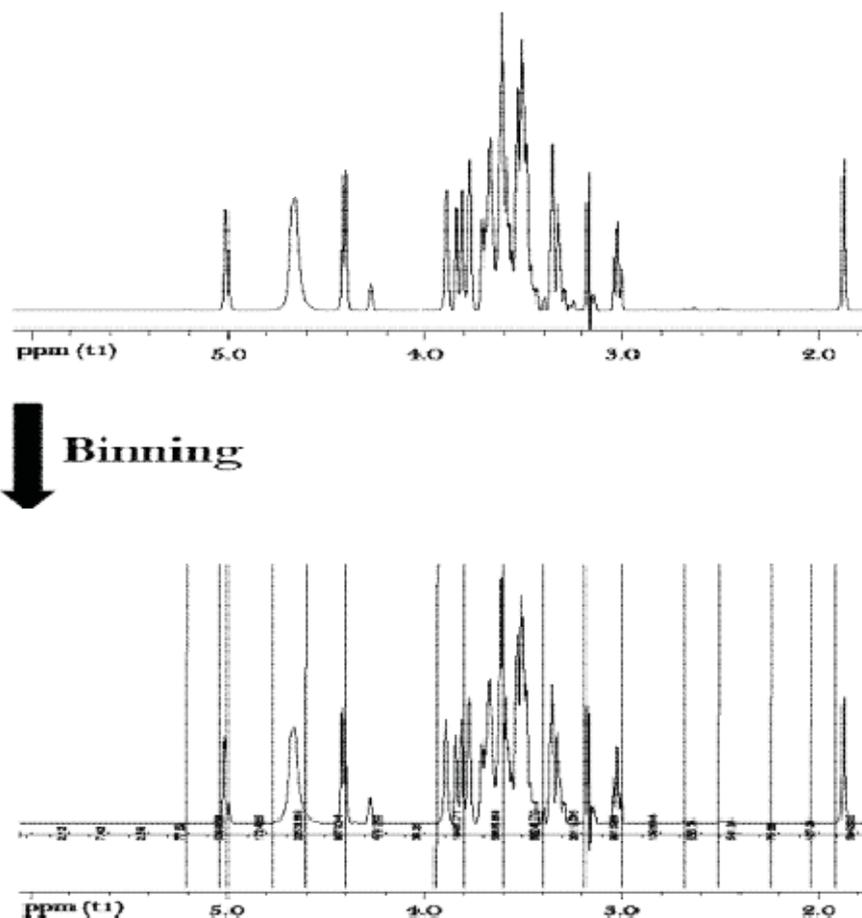


Figura 1.34. Binning en un espectro obtenido de una muestra. En esta figura se muestra parte de la región de mediocampo ^1H -NMR (5.2 a 2.8 ppm). Los espectros de ^1H -RMN se registró a $T = 300\text{ K}$ en un espectrómetro Varian Mercuryplus, que opera en frecuencia ^1H de 400 MHz; se adquirieron 2048 exploraciones, con los datos recogidos en los puntos de datos de 16K con un ancho espectral de 16 ppm, un ángulo de pulso de 60° , un retraso de reciclaje de 1.0 s, y el tiempo de adquisición de 2.561 s con una ganancia del receptor constante. El binning se hizo con el Software MestReC (<http://www.mestrec.com/>)

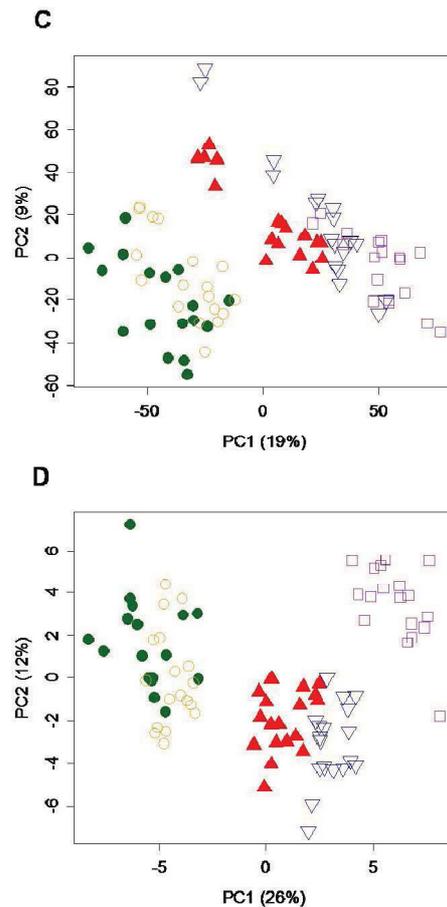


Figura 1.35. Mejora del análisis PC de acuerdo al procesados los datos del espectro de RMN debido a la normalización (C) y binned (D) del conjunto de datos espectrales, incluyendo todas las muestras. Las muestras han sido etiquetadas de la siguiente manera: ● A tipo salvaje 1 (WT-A), ○ A Genéticamente Modificados (A-GM1), ▲ B tipo salvaje (WT-B), ▽ B Genéticamente Modificados 1 (B-GM1) y □ B Genéticamente Modificados 2 (B-GM2). De acuerdo a la variación total (Tv), PC1 y PC2 explican el 19% y el 9%, respectivamente, en la trama de datos normalizados para PC, mientras que en los datos binned, los valores de ambos equipos son 26% y 12%. Como puede verse, ambas muestras y genotipos, con excepción de WT-A y A-GM1 se diferencian.

1.10.6. Perfil metabólico entre géneros, menopausia u ovariectomía. Efecto del tratamiento con estradiol o fitoestrógenos.

Como se ha intentado hacer ver en los apartados anteriores, la Metabolómica nos proporcionaría muchísima y valiosa información acerca de los perfiles metabólicos de las muestras, sean del origen que sea, que queramos investigar.

Así, en relación con la presente tesis, nos interesaría saber que en el caso de humanos, por ejemplo, dicho perfil estaría influenciado por multitud de variables metabólicas interindividuales que derivan de factores ambientales, genéticos y nutricionales. De hecho, aunque se tengan en cuenta los requerimientos necesarios para la población en general, cada vez se está focalizando más la atención en las necesidades individuales, entendiendo las diferencias existentes entre individuos, incluyendo también aquellos efectos producidos por factores fisiológicos como la edad y el género.

Por ejemplo, y considerando parámetros metabólicos en plasma en relación con el género, Bertram y cols. (Bertram et al., 2009) encontraron recientemente que el género tiene un fuerte efecto sobre el metabolismo plasmático medido por NMR, donde no tuvieron ningún efecto el peso, altura ni el índice de masa corporal en jóvenes escandinavos.

Del mismo modo, estudios previos encontraron también efectos del género sobre perfiles plasmáticos usando fluidos biológicos y NMR (Kochhar et al., 2006). Son numerosos los estudios que se han centrado en analizar diferentes parámetros metabólicos entre hombres y mujeres, como son el metabolismo proteico, glucosa y ácidos libres en plasma,

fosfatidilcolina localizada en la membrana de las lipoproteínas y también en ratones.

Ya que una de las principales diferencias entre género es el de las hormonas sexuales y como se ha explicado anteriormente en otros apartados de la Introducción, la ovariectomía reproduce la pérdida de estrógenos que se da en las mujeres con la menopausia. Así, podemos evaluar qué efectos pueden atribuirse a la acción de dichas hormonas para explicar las diferencias entre sexos. Concretamente, en relación con los perfiles metabólicos y su modificación por la menopausia, está ampliamente descrito el efecto de los estrógenos sobre parámetros lipídicos (Lipoproteínas de Baja Densidad –LDL– y Muy Baja Densidad –VLDL–), que tienen una incidencia mayor a partir de la aparición de la menopausia (Campos et al., 1997). La administración de estradiol también está asociada a una menor aparición de enfermedades cardiovasculares y la acción positiva sobre los parámetros antes comentados. La búsqueda para mimetizar los efectos positivos del estradiol pero que no lleven parejos los negativos ha hecho que también se analice por ¹H-NMR los efectos bioquímicos de las isoflavonas sobre perfiles plasmáticos en premenopausicas (Solanky et al., 2003).

De hecho, en animales hembra de laboratorio (ratas Long-Evans y ratones C57BL/6) exhiben respuestas metabólicas específicas de cada especie ante la ovariectomía. Los ratas responden a esta menopausia inducida con una ganancia de peso por hiperfagia y una menor actividad locomotriz, mientras que en ratones esta mediada por un menor gasto metabólico y actividad motriz también (Witte et al., 2010). En base a estudios como este es importante tener en cuenta que tanto la dieta como la

actividad van a determinar el perfil metabólico que después vamos a analizar.

Sin embargo, se hace necesaria la investigación sobre los efectos de la ovariectomía y los tratamientos con estrógenos a diferentes periodos de iniciarse esta menopausia inducida en animales, ya que pocos estudios hay que evalúen las modificaciones que también se producen en los perfiles metabólicos.

OBJETIVOS

→ El OBJETIVO GENERAL de este trabajo es estudiar si la terapéutica hormonal sustitutiva con estrógenos es efectiva tras varias semanas después de instaurarse la menopausia en ratas.

→ Los OBJETIVOS CONCRETOS son:

1.- Determinar la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas aisladas en los siguientes grupos experimentales:

- Ratas control
- Ratas ovariectomizadas durante 3 semanas
- Ratas ovariectomizadas durante 3 semanas con reposición inmediata de estradiol
- Ratas ovariectomizadas durante 6 semanas
- Ratas ovariectomizadas durante 3 semanas seguidas de 3 semanas con reposición de estradiol
- Ratas ovariectomizadas durante 9 semanas
- Ratas ovariectomizadas durante 6 semanas seguidas de 3 semanas con reposición de estradiol

2.- Determinar la actividad glutatión peroxidasa en mitocondrias hepáticas aisladas en los grupos experimentales señalados en el objetivo 1.

- 3.- Determinar los niveles de peroxidación lipídica (MDA) en mitocondrias hepáticas aisladas, en plasma, cerebro, hígado y corazón en los grupos experimentales señalados en el objetivo 1.
- 4.- Determinar el efecto del envejecimiento sobre el consumo cerebral de glucosa *in vivo*.
- 5.- Determinar el consumo cerebral de glucosa *in vivo* en los grupos experimentales señalados en el objetivo 1
- 6.- Determinar el perfil metabólico en plasma mediante Resonancia Magnética Nuclear (^1H NMR) en los grupos experimentales señalados en el objetivo 1

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Animales de experimentación

Para todos los experimentos se emplearon ratas Wistar hembras de edades comprendidas entre los 4 y 7 meses. Para los experimentos de determinación del consumo de glucosa *in vivo* se empleó también un grupo de ratas de entre 22 y 24 meses.

Los animales se estabularon en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12/12 h) constantes. Se alimentaron con una dieta de laboratorio estándar (que contenía 590 g de carbohidratos, 30 g de lípidos, y 160 g de proteínas por kilogramo de dieta) y agua del grifo sin restricción en la ingesta.

Los animales se dividieron en los siguientes grupos de experimentación (ver figura 3.1):

- Grupo **Control (Sham)**: se realizó la cirugía de manera similar a los grupos de ovariectomía, pero sin llegar a retirar los ovarios. Se mantienen los animales durante 3 semanas antes de su sacrificio.

- Grupo **Ovariectomía 3, 6 y 9 semanas:**

· **Ovariectomía (OVX 3, OVX 6 y OVX 9):** tras realizar la ovariectomía, se mantienen los animales durante 3 semanas

· **Estradiol (OVX 3E) o Vehículo (OVX 3V):** tras realizar la ovariectomía, se administró estradiol o vehículo durante 3 semanas

· **Estradiol (OVX 3 + 3E) o Vehículo (OVX 3 + 3V):** tras realizar la ovariectomía se mantuvieron 3 semanas sin ningún tratamiento, y tras dicho periodo se administró estradiol o vehículo durante otras 3 semanas.

· **Estradiol (OVX 6 + 3E) o Vehículo (OVX 6 + 3V):** tras realizar la ovariectomía se mantuvieron 6 semanas sin ningún tratamiento, y tras dicho periodo se administró estradiol o vehículo durante otras 3 semanas.

- Grupo **ratas Viejas:** se utilizaron ratas Wistar hembras (n=5) de 22-24 meses de edad para evaluar su consumo cerebral de glucosa *in vivo*.

En todos los casos, los animales fueron tratados de acuerdo con los principios que marca el RD 1201/2005 sobre protección de los animales para experimentación y otros fines científicos.

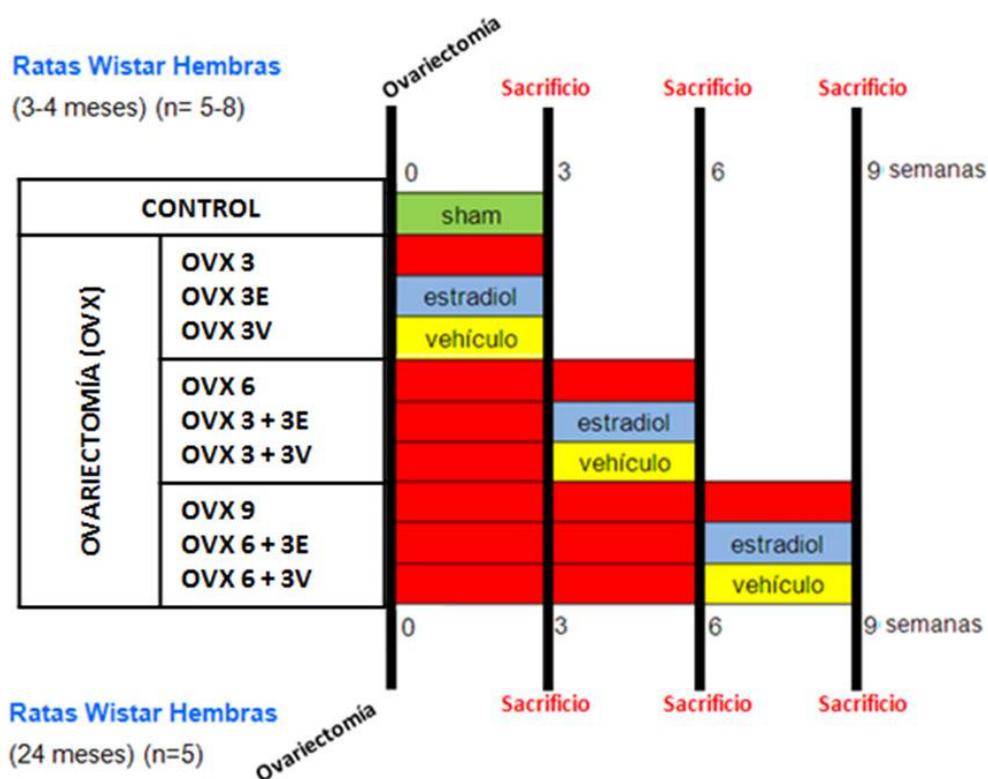


Figura 3.1.- Diseño del estudio. Grupos de experimentación en ratas hembras Wistar.

3.1.2. Aparatos

• Centrífugas

Para las centrifugaciones a baja velocidad se utilizó una centrífuga de la firma SORVALL, modelo GLC-1.

Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS, modelo Sepatech Biofuge 17RS.

- **Balanzas**

Balanza de precisión SARTORIUS, modelo TECATOR 6110, con una sensibilidad de ± 0.0001 g. También utilizamos una balanza SARTORIUS modelo PT 1200, con una sensibilidad de ± 0.1 g

- **Espectrofotómetro**

Se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON modelo Uvikon 810 termostatzado.

- **Sistema de purificación de agua**

Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.

- **pHmetro**

El pHmetro empleado es de la marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

- **Agitador magnético**

Marca Selecta, modelo Agimatic-S

- **Baño termostatzado**

Se utilizó un baño provisto de agitación automática regulable, marca SBS modelo BT.

- **Fluorímetro**

Marca Perkin Elmer, modelo LS 50B.

- **Homogeneizador**

Marca IKA-WERK, modelo Janke y Kunkel RW 20 DZH.

- **Autoclave**

Marca Selecta, modelo Autester-G.

• **Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de MDA**

El cromatógrafo DIONEX modelo Ultimate 3000 está compuesto por los siguientes elementos:

- Bomba
- Autoinyector
- Detector UV
- Detector de fluorescencia RF 2000
- Controlador del equipo: software Chromoleon.
- Columna TEKNOKROMA de fase reversa, modelo Spherisorb C18 cuyas dimensiones son 15 x 0,46 cm y de un tamaño de partícula de 5 µm.

• **Equipo de Tomografía de Emisión de Positrones (PET)**

- Cámara PET para animales pequeños de 4 módulos marca Albira (GEM Imaging – Oncovision).

- Equipo de anestesia por vía inhalatoria (Cibertec) con vaporizador Fortec (Cyprane Keighley) para isoflurano-oxígeno y eliminador de gases Fluovac

- Actímetro Dose calibrator ISOMED 1010 (Nuklear Medizintechnik Dresden GmbH)

• **Glucosímetro “Accutrend GC”. Roche**

Marca Roche, modelo Accutrend GC

• **Material quirúrgico**

- Hilo de seda (Silkam ®, Braun-Aesculap, Alemania)
- Hilo de seda (Safil ®, Braun-Aesculap, Alemania)
- Grapas metálicas (Medicon, Instrumente, Alemania)

- *Pinzas, tijeras y resto de material quirúrgico corriente (Galerías Sanitarias)*

- **Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de 14.1 Teslas** Bruker Avance DRX 600 (Bruker Biospin GmbH) equipado con sondas de 5mm (500 uL de muestra) y de 1mm (20 uL de muestra) con capacidad de detección de $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$.

- **Robot SampleJet** (Bruker Biospin GmbH) con capacidad para muestreo automático de 480 tubos.

3.1.3. Reactivos

• **Determinación de proteínas**

Se empleó el “Protein ASSAY Kit” de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin.

• **Enzimas**

Peroxidasa de rábano, glutatión disulfuro reductasa.

• **^{18}F -Fluorodesoxiglucosa (18F-FDG)**

^{18}F -Fluorodesoxiglucosa (18F-FDG) “Fluodos” proporcionada por Redpet Ibérica, S.A.

• **Anestesia**

- *Isoflo®*, Veterinaria Esteve

• **Analgesia**

- *Ketoprofeno (Ketofen 1%®)*, Merial, Francia)

• **Otros reactivos**

Ácido perclórico 60%, acetato sódico, BPDS, NEM, KOH, CHES, ácido iodoacético, púrpura de m-cresol, FDNB, GSH, GSSG, γ -Glu-Glu, MDA, H_2O_2 , fosfato potásico, CDNB, cloruro sódico, EDTA, EGTA,

MOPS, HEPES, tris, glicina, acrilamida, bisacrilamida, ácido acético, sacarosa, ácido clorhídrico, SDS, azul de bromofenol, azul comassie, PMSF, aprotina, leupeptina, pepstatina, etc.

El resto de reactivos se obtuvieron de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac, Merck Biochemica (Alemania).

- D_2O (un 10% del volumen total) para poder optimizar la homogeneización del campo magnético y bloquear y detectar la frecuencia fundamental del espectrómetro durante las medidas

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Técnicas quirúrgicas. Ovariectomía

La ovariectomía se llevó a cabo en ratas hembras de entre 4 y 7 meses de edad. Para ello, se anestesiaron mediante la administración de Isoflurano vaporizado con oxígeno al 2% (Isoflo®, Veterinaria Esteve).

Tras anestesiar a los animales, se realizan dos pequeñas incisiones longitudinales (8 mm) en el lomo de las ratas, a unos 2 cm de la línea media a través de la piel y la pared muscular. Una vez localizados los ovarios, se procedió a su disección. Para ello, se realizó el pinzamiento, ligadura (sutura de seda -Silkam®, Braun-Aesculap, Alemania-) y sección del pedículo vascular de cada ovario.

Al grupo control (Sham) se le realiza el mismo procedimiento pero sin el pinzamiento, ligadura y disección de los ovarios.

A continuación, se sutura la pared muscular con una sutura sintética reabsorbible (Safil®, Braun-Aesculap, Alemania), y se cierra la piel con grapas metálicas (Medicon, Instrumente, Alemania). Todos los animales reciben analgesia post-operatoria mediante la administración subcutánea de 0.1 mL de Ketoprofeno (Ketofen 1%®, Merial, Francia).

3.2.2. Tratamiento con estradiol

El β -Estradiol-3-Benzoato (Sigma) se administra a una dosis de 1 μ g/kg/día via subcutánea. Ésta se prepara cada dos semanas disolviéndolo en una mezcla de aceites (Castor 60% y Sésamo 40%). Para facilitar la disolución del estradiol en el aceite, se agita en un vórtex y, posteriormente, se introduce el recipiente en un baño de ultrasonidos (Selecta, España). Cada mañana, entre las 9.00 h y las 10.00 h, se inyecta la dosis de estradiol según el grupo experimental.

3.2.3. Tratamiento con vehículo

A los grupos correspondientes se les inyectó la solución vehículo compuesta por la mezcla de aceites.

Al igual que en el grupo con estradiol, el vehículo se inyecta cada mañana entre las 9.00 h y las 10.00 h.

3.2.4. Determinación del consumo de glucosa *in vivo* mediante Tomografía de Emisión de Positrones (PET)

A todos los animales se les realizó un estudio PET entre 3 y 5 días antes del sacrificio, utilizando como radiotrazador la ^{18}F -Fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG).

3.2.4.1. Fundamento

El estudio del metabolismo glucídico a nivel fisiológico y/o fisiopatológico mediante PET- ^{18}F -FDG proporciona importante información acerca del estado de salud de los órganos estudiados, además de ser una buena herramienta para detectar la aparición o avance de un proceso tumoral (como se ha expuesto en la introducción).

La ^{18}F -FDG es un análogo de la glucosa, con la salvedad de que el isótopo radiactivo ^{18}F sustituye, tras un procedimiento de marcación y síntesis de la molécula ^{18}F -FDG, el grupo OH del carbono 2 de la molécula de glucosa. De este modo, la base teórica para su utilización es que compite con la molécula por entrar en las células para ser consumida y generar ATP, en el proceso de la glucólisis. Sin embargo, y por esa modificación en el carbono 2, una vez que entra en la célula y se fosforila a glucosa-6-fosfato, no puede seguir la reacción y pasar a fructosa-6-fosfato. De este modo, queda atrapada en la célula donde se había iniciado su consumo (figura 3.2).

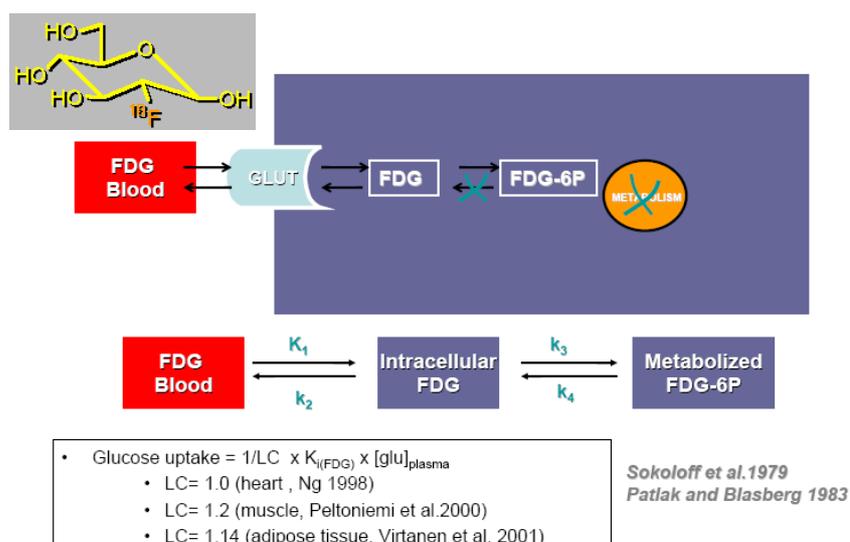


Figura 3.2.- Molécula de ^{18}F -FDG y esquema de su consumo en la célula.

Al ser el ^{18}F un isótopo emisor de positrones (antimateria de los electrones), habrá una emisión más alta allí donde se haya acumulado más esta molécula, es decir, en aquellas regiones donde el consumo de glucosa sea más elevado. Los positrones al encontrarse con los electrones se aniquilarán y emitirán dos fotones de alta energía (± 511 KeV) a $\pm 180^\circ$ que serán detectados por los módulos de la cámara PET (figura 3.3). Estos fotones pasan un filtro temporal y energético para ser aceptados como “verdaderos”, es decir, provienen del mismo punto de origen.

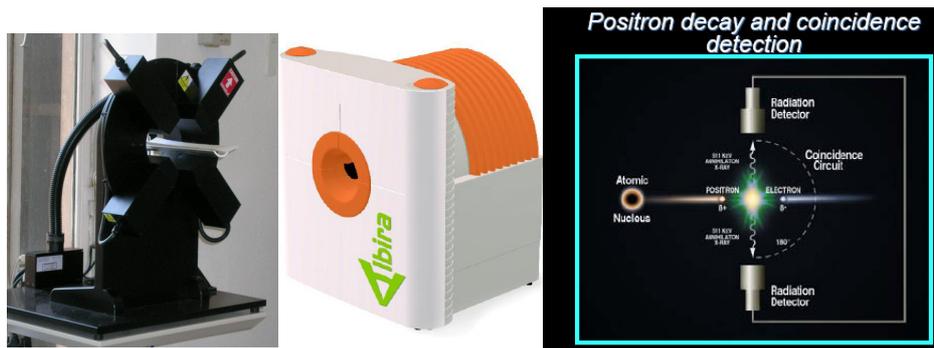


Figura 3.3.- Esquema de detección de coincidencias por el equipo Albira PET.

Esta “ventana temporal” se establece en 2-3 nanosegundos, por lo que un fotón que incide en el cristal detector se asocia a otro fotón detectado en el lado opuesto en ese mismo espacio de tiempo. Es necesario además que ambos lleguen dentro del rango de energías del equipo (400-600 KeV), lo cual depende a su vez de la sensibilidad (0,7 %). Esta señal luminosa se amplifica a través de unos fotomultiplicadores insertados en cada uno de los módulos de la cámara PET, con lo que al final se transforma en una señal eléctrica proporcional a la intensidad con la que llegaron los fotones y proporcionando información acerca de su punto de origen, o sea, dónde fue consumida la ^{18}F -FDG.

Para discriminar la captación de las diferentes regiones de interés, un aspecto también importante es la resolución espacial. Ella nos permitirá diferenciar zonas con distintos valores de captación pero muy próximos. En el equipo Albira PET es de 1.5 mm (FWHM = 1.6 mm, con una reconstrucción MLEM y una ventana de coincidencias de 3 ns).

Por ello, y teniendo en cuenta que es una técnica no invasiva, se ha optado por analizar el consumo de glucosa fisiológico a nivel cerebral de los grupos experimentales aquí estudiados. Varios estudios previos se han realizado para intentar estandarizar los métodos y protocolos para animales de investigación (Schiffer et al., 2007, Fueger et al., 2006, Kim et al., 2006, Laforest et al., 2005, Huang et al., 2004, Shimoji et al., 2004, Green et al., 1998). Considerando las características del equipo PET Albira y la bibliografía existente se determinó el consumo cerebral de glucosa en los grupos estudiados como se expone en el apartado de Procedimiento.

3.2.4.2. Reactivos

- Fluodos, 1110 MBq/mL, solución inyectable (18F-Fluorodesoxiglucosa) RedPet Ibérica, S.A.
- Isoflo ®, Veterinaria Esteve
- Oxígeno comprimido medicinal $\geq 99,5$ %. Praxair, S.A.
- Salina fisiológica, Grifols ®

3.2.4.3. Procedimiento

En primer lugar, se mantiene a los animales 8 horas en ayuno (agua *ad libitum*) antes de realizar el estudio PET-¹⁸F-FDG. Tras pesar al animal y comprobar su temperatura rectal y niveles de glucemia, se introduce en una cámara de anestesia durante un mínimo de 5 minutos con oxígeno e Isoflurano al 1-2% a un flujo constante de 1.5 L/min. A continuación, se inyecta 30-40 MBq de ¹⁸F-FDG vía intravenosa y rápidamente se coloca en la camilla de la cámara PET en la posición establecida previamente para escanear el cerebro (figura 3.4).

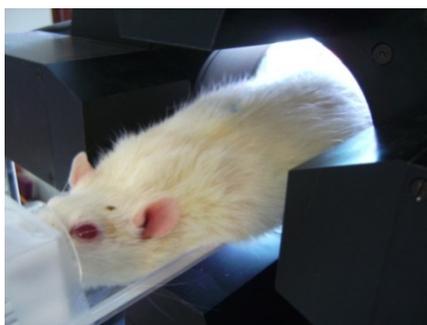


Figura 3.4.- Rata Wistar hembra joven.

Se controla al animal en todo momento manteniendo su temperatura corporal mediante una lámpara, manta térmica y/o lámpara de infrarrojos.

Se realiza un protocolo dinámico de adquisición de eventos por secuencias de 1, 2 y 5 minutos hasta completar un periodo de distribución del radiotrazador por todo el cuerpo de 30 minutos.

Seguidamente, el escáner inicia automáticamente otra adquisición dinámica por secuencias, hasta completar 20 minutos, que será la medida tomada para cuantificar el consumo cerebral de glucosa de cada animal estudiado.

La suma de estos paquetes de datos (10x2 minutos) genera un nuevo archivo de datos que es reconstruido por el *software* que proporciona la casa comercial del aparato, mediante un algoritmo MLEM de 12 iteraciones en el cual se hace una corrección por decaimiento (puesto que la ^{18}F -FDG tiene una vida media 109.8 minutos). No se hizo corrección por coincidencias aleatorias, dispersión y atenuación.

Tras reconstruir el archivo de datos se genera un archivo de imagen “img.hdr” el cual se utiliza para cuantificar las regiones de interés (ROI) o volúmenes de interés (VOI). En nuestro estudio se ha analizado el volumen cerebral de cada rata por completo, por lo que se realizó un VOI en el cual quedaba excluida la parte correspondiente al cerebelo y el resto de regiones con hipercaptación de la cabeza (P.ej: glándulas de Harder,...).

El VOI construido para cada cerebro es analizado mediante el *software* comercial PMOD 2.8 (2006, Suiza).

Una vez terminado el estudio, se mantuvo 12 horas (para asegurar que toda la radiación había decaído) a cada animal en sus jaulas con comida y agua *ad libitum*, antes de devolverlas a las jaulas con el resto de su grupo.

3.2.4.4. Cálculos

La actividad cuantificada en cada uno de los VOIs analizados es la suma de todos los eventos captados por cada uno de ellos en ese periodo de tiempo (20 minutos) expresada en miliCurios (mCi) por unidad de volumen (cm^3). Esta captación de ^{18}F -FDG (SUV) es corregida por la dosis inyectada (ID) y el peso del animal (g), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SUV} = \frac{\text{actividad captada en el volumen de interés (mCi/cm}^3\text{) x peso (g)}}{\text{ID (mCi)}}$$

$$\text{SUV} = \frac{\text{VOI x Peso}}{\text{ID}} = \frac{(\text{mCi/cm}^3) \text{ x g}}{\text{mCi}}$$

3.2.5. Sacrificio de los animales. Extracción y conservación de muestras

Los animales se sacrificaron entre las 9:00 y 10:00 horas de la mañana del día correspondiente. El sacrificio se realizó por dislocación cervical del animal, sin utilizar ninguna sustancia anestésica y/o tranquilizante.

Una vez sacrificado el animal, se procedió inmediatamente a la recogida de la mayor cantidad posible de sangre en un tubo heparinizado.

- 0.2 mL de sangre se depositaron en un tubo Eppendorff con 0.2 mL de ácido perclórico al 12 %, BPDS 2 mM., NEM 40 mM. La mezcla se agitó en vórtex y seguidamente se centrifugó a 15000g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a -80 °C. Este sobrenadante se utilizó para la determinación de GSSG en sangre.
- 0.2 mL de sangre se depositaron en una alícuota con 0.2 mL de ácido perclórico al 12 %, BPDS 2 mM. La mezcla se agitó y posteriormente se centrifugó a 15000g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a -80 °C. Este sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de GSH en sangre.

El resto del volumen de sangre se centrifugó a 1500g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma. Seguidamente, éste

se congeló en alíquotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior determinación de MDA (GSH, GSSG, niveles de Estradiol y Metabolómica).

Posteriormente, se procedió a la apertura del cráneo, para la extracción del cerebro, y de la cavidad abdominal para extraer el hígado (y aislar mitocondrias hepáticas), así como el resto de órganos de interés de los animales. Los órganos fueron congelados inmediatamente mediante la técnica del *freeze-clamping* en nitrógeno líquido para su posterior conservación a -80°C .

3.2.6. Aislamiento de mitocondrias hepáticas

3.2.6.1. Reactivos

Solución de lavado: NaCl 0.9%

Tampón de aislamiento de mitocondrias, cuya composición es: Sacarosa 0.3M, EGTA 1mM, MOPS 5mM, BSA 15 μM , KH_2PO_4 5mM. El pH del tampón se ajusta añadiendo KOH al 20% (p/v) hasta alcanzar pH=7.4.

3.2.6.2. Procedimiento

Una vez extraído el hígado, se introduce en una placa Petri para lavarlo en presencia de NaCl 0.9% (el último lavado debe realizarse con tampón de aislamiento). Se elimina el exceso de agua y seguidamente se pesa. Una vez pesado se trocea y se introduce en el homogeneizador de vidrio, donde se añade tampón de aislamiento a razón de 2 mL/g de tejido. Tras homogeneización a 980 rpm de velocidad, para disgregar el tejido y romper las células, obtenemos un homogenado del tejido, que introducimos

en uno o varios tubos de centrífuga según el volumen obtenido. (NOTA: todo este proceso se debe realizar a 4°C). Seguidamente procedemos al aislamiento mitocondrial propiamente dicho, que está basado en el método publicado por Rickwood y colaboradores en 1987 (Rickwood et al., 1987b). Este método consiste en una centrifugación diferencial que comprende dos partes principales: en una primera parte se centrifuga el homogenado a 1000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejido y el debris celular. A continuación se recoge el sobrenadante, y el precipitado se resuspende en 3 mL de tampón de aislamiento y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones para obtener un óptimo rendimiento del proceso. Se juntan los dos sobrenadantes obtenidos y se centrifuga de nuevo para eliminar posibles contaminaciones con restos celulares. Una vez recogido el sobrenadante, que contiene las mitocondrias, pasamos a la segunda parte del aislamiento, que comprende tres centrifugaciones a 10000g durante 10 minutos a 4°C. Esta alta velocidad de centrifugación conlleva la precipitación de las mitocondrias, obteniendo por tanto un precipitado rico en mitocondrias que lavamos en sucesivas centrifugaciones. Tras la tercera centrifugación, el precipitado mitocondrial obtenido se resuspende en tampón de aislamiento o en tampón para la determinación de peróxidos, a razón de 2 µL/mg de precipitado mitocondrial o 20 µL/mg de precipitado mitocondrial respectivamente. De este modo obtenemos una suspensión mitocondrial más o menos diluida en función de la determinación a realizar.

En este caso se tomaron las siguientes alíquotas (en tubos eppendorf):

- 200 µL para medir **GSH**. Añadir 50 µL de PCA al 30% con BPDS 5 mM.

- 400 μL para medir **GSSG**. Añadir 100 μL de PCA al 30% con BPDS 5 mM y NEM 100 mM.
- 100 μL para medir **MDA**. Congelar a -80°C .
- 50 μL para medir **Proteínas**. Congelar a -20°C .
- 250 μL para medir la **Producción de Peróxido de Hidrógeno** (se mide el mismo día).

Las alícuotas tratadas con ácido (para GSH y GSSG), se agitan en el vórtex y se centrifugan a 15000g durante 15 min a 4°C . A continuación, se congela el sobrenadante a -80°C (durante este proceso de homogenado debe trabajarse en frío –hielo–).

3.2.7. Determinación de la tasa de producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno

3.2.7.1. Fundamento

Utilizamos un método modificado a partir del desarrollado por Barja G. en 1999 (Barja de Quiroga, 1999). Esta técnica se fundamenta en la medida de la fluorescencia emitida (a 420 nm) por el dímero formado entre el peróxido de hidrógeno producido por las mitocondrias en estado 4 y el ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético), al ser excitado por una haz de luz de una longitud de onda de 312 nm. La catálisis de la reacción de dimerización la lleva a cabo la enzima peroxidasa a medida que se va formando el peróxido de hidrógeno (ver figura 3.5).

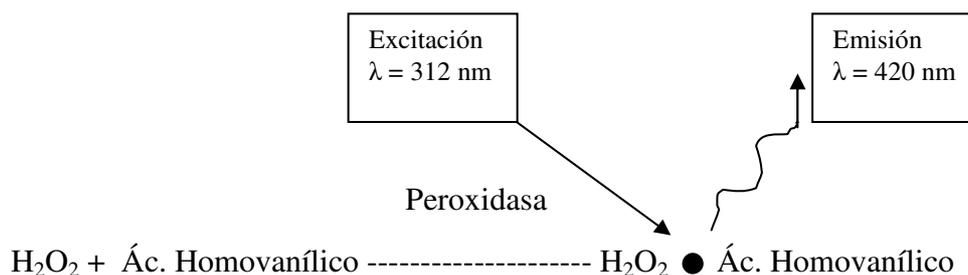


Figura 3.5.- Esquema de detección de peróxido de hidrógeno.

Las mitocondrias, una vez aisladas del tejido correspondiente, se incuban con sustratos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial como el succinato 10 mM, que es sustrato del complejo II. Se realizan determinaciones por duplicado de la cantidad de dímero H_2O_2 -ácido homovanílico a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

3.2.7.2. Reactivos

- Tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno: EGTA 0.1 mM, KH_2PO_4 5 mM, MgCl_2 3 mM, KCl 145 mM, HEPES 30 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta 7.4.
- Solución Glicina-EDTA: Glicina 2 mM, EDTA 50 mM, NaOH 2.2 mM, enrasar con agua. El pH se ajusta con KOH al 20% hasta ≥ 11 .
- Succinato potásico 10 mM (concentración final en el tubo): Neutralizar ácido succínico con KOH 20% hasta alcanzar pH=7.4. Enrasar con tampón para la determinación de H_2O_2 .

- Ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético) 0.1 mM (concentración final en el tubo) disuelto en tampón para la determinación de H₂O₂.
- Peroxidasa de rábano 6 U/mL.

3.2.7.3. Procedimiento

Una vez aisladas las mitocondrias, el precipitado mitocondrial se resuspende en tampón para la determinación de peróxido de hidrógeno a razón de 20 µL/mg de precipitado.

Por otro lado, realizamos la mezcla de reactivos que previamente habremos preparado. Dicha mezcla contiene las siguientes cantidades de reactivo por cada determinación: 5 µl de peroxidasa de rábano 6 U/mL, 20 µL de ácido homovanílico 1 mM, 20 µL de succinato 0,1 M pH 7,4 y hasta 1.5 mL del tampón para la determinación de H₂O₂ previamente burbujeado con aire durante 5 minutos. Dicha mezcla se utilizará para medir la producción de peróxido de hidrógeno en la cadena de transporte electrónico mitocondrial aportando como donante de sustancias reductoras el succinato (complejo II).

A continuación se preparan tubos de polipropileno aptos para centrifugar. Necesitaremos dos tubos por cada tiempo de incubación a realizar (5, 10, 15, 20 minutos). Se añade a cada tubo 1.5 mL de la mezcla de reacción.

Preincubamos a 37°C durante 5 minutos en agitación la suspensión mitocondrial y los tubos con la mezcla de reacción. Transcurrido ese período de tiempo, añadimos 500 µL de suspensión mitocondrial respetando los tiempos de incubación a realizar. (Separamos una pequeña cantidad de

suspensión mitocondrial para determinar el contenido proteico de la muestra).

Detenemos la reacción de dimerización aumentando el pH por medio de la adición de 1 mL de tampón Glicina-EDTA pH=12.7. A medida que paramos la reacción, guardamos los tubos en hielo, y seguidamente centrifugamos a 15000 g durante 15 minutos a 4°C.

Recogemos los sobrenadantes que contienen el dímero H₂O₂-homovanílico y medimos con un fluorímetro la fluorescencia que emite a 420 nm de longitud de onda tras excitación con un haz de luz de 312 nm.

3.2.7.4. Cálculos

La fluorescencia emitida por los sobrenadantes se valora frente a una recta patrón construida con peróxido de hidrógeno en presencia de ácido homovanílico y peroxidasa. La recta patrón se realiza añadiendo a una misma cantidad de ácido homovanílico y peroxidasa, distintas cantidades de peróxido de hidrógeno, como se indica en la tabla adjunta (tabla 3.1):

TUBO	PEROXIDAS (μL)	AC. HOMOVANÍLICO (μL)	TAMPÓN PERÓXIDOS (μL)	H₂O₂ (nmol/mL)
1	5	20	1975	0
2	5	20	1975	1.0
3	5	20	1975	1.5
4	5	20	1975	2.0

Tabla 3.1.- Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos.

Para realizar la determinación fluorimétrica, se añaden los reactivos que indica la tabla adjunta a los tubos, y a continuación se añaden 1000 μL de tampón glicina-EDTA a cada uno de los tubos y a partir de ese momento se procede igual que con las muestras.

Los patrones de H_2O_2 se realizan a partir de una solución comercial de peróxido de hidrógeno al 33,3%. Primero se realiza una dilución $1/10^3$ del peróxido de hidrógeno comercial en el mismo tampón que utilizamos para las muestras, y, a partir de ésta se obtiene una dilución $1/10^5$ de la comercial (también en este tampón). Esta será la solución que se utilizará para realizar los patrones de H_2O_2 .

Para calcular con exactitud la concentración de la solución comercial de peróxido de hidrógeno debe medirse la absorbancia de la dilución $1/10^3$ a una longitud de onda de 230 nm (A_{230}) y, utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) del H_2O_2 a esa longitud de onda ($72,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) y, mediante la siguiente ecuación, puede conocerse la concentración de H_2O_2 en cada tubo de la recta patrón:

$$\frac{A_{230} \times \mu\text{L H}_2\text{O}_2 \times 10^4}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times 1000 \mu\text{L}} = \text{nmoles H}_2\text{O}_2/\text{mL}$$

3.2.8. Determinación de la concentración de proteínas

3.2.8.1. Fundamento

Se toma una cantidad de suspensión mitocondrial comprendida entre 50 y 100 mL y se conserva a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior utilización. Empleamos el “Protein Assay Kit” de Sigma-Aldrich Química, basado en

una modificación de Peterson del método de Lowry (Lowry et al., 1951, Peterson, 1977). El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. El método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo de Folin, dando un complejo coloreado. Este reactivo es una disolución de tungstato sódico y molbidoato sódico en ácido fosfórico y clorhídrico. El mecanismo del proceso es el siguiente: el Cu^{2+} , en medio alcalino, forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas reduciéndose a Cu^+ . Este ión, así como los grupos R de los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, reaccionan con el reactivo de Folin, produciéndose inicialmente un producto inestable que se reduce para formar un compuesto coloreado azul.

La intensidad del color depende de la cantidad presente en las proteínas de estos aminoácidos aromáticos y será proporcional a la concentración de proteínas de la disolución.

La concentración de una disolución no conocida se calcula extrapolando en una recta patrón la absorbancia obtenida a $\lambda=660\text{nm}$.

3.2.8.2. Procedimiento

Añadir 25 μL de muestra (previa dilución 1/8 en el caso de mitocondrias resuspendidas en tampón de aislamiento) a un tubo de ensayo. Completar con agua hasta 1 mL.

Preparar un blanco con 1 mL de agua y, además, un blanco que contenga el mismo volumen que las muestras de una dilución 1/8 del

tampón utilizado el aislamiento de las mitocondrias, ya que este tampón contiene seroalbúmina bovina.

Añadir 1 mL del reactivo de Lowry a cada tubo, agitar en el vórtex e incubar 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

Añadir 500 mL del reactivo de Folin, agitar en el vórtex e incubar 30 minutos en oscuridad.

Realizar una lectura espectrofotométrica a 660 nm de longitud de onda.

3.2.8.3. Cálculos

Restar a cada muestra la absorbancia del blanco realizado con tampón utilizado para el aislamiento de mitocondrias, y se valoran frente a una recta patrón construida con seroalbúmina bovina en cantidades comprendidas entre 0,01 y 0,1 mg/mL.

3.2.9. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)

3.2.9.1. Fundamento

La actividad de la glutatión peroxidasa se determinó según el método propuesto por Flohe and Gunzler en 1984 (Flohe and Gunzler, 1984). La reacción que permite su análisis es la siguiente:

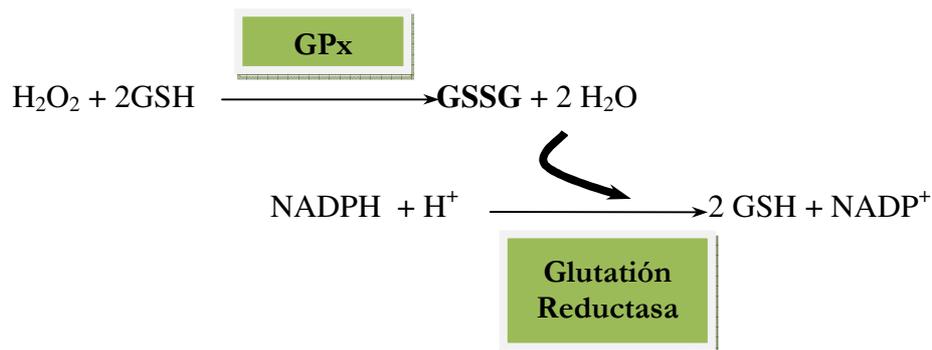


Figura 3.6.- Esquema del fundamento de la reacción enzimática.

De este modo, el glutatión oxidado generado en la reacción catalizada por la GPx, como consecuencia de la reducción del peróxido de hidrógeno, es a su vez reducido en la reacción catalizada por la glutatión reductasa, que utiliza NADPH como cofactor. La desaparición de NADPH puede monitorizarse espectrofotométricamente a 340 nm de longitud de onda.

3.2.9.2. Reactivos

- Tampón fosfato potásico 0.1 M, EDTA 1 mM, azida sódica 1 mM, pH=7 (Tampón Kpi - azida Na)
- Glutatión disulfuro reductasa 2.4 U/mL
- GSH 10 mM
- NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO₃ 0.1%
- Peróxido de hidrógeno 1.5 mM

3.2.9.3. Procedimiento

Preparar la siguiente mezcla de reactivos en la microcubeta, que contiene:

- 590 μL del tampón Kpi-azida Na (fosfato potásico 0.1 M, EDTA 1mM, azida sódica 1mM, ph=7)
- 10 μL de la suspensión mitocondrial

Después añadimos sucesivamente:

- 100 μL de la solución de glutatión reductasa
- 100 μL de la solución de glutatión

Preincubar a 37°C durante 5 minutos. Seguidamente añadir 100 μL de la solución de NADPH. Monitorizar durante 3 minutos la oxidación de NADPH hasta línea de base estable.

La reacción se desencadena al añadir a la solución el peróxido de hidrógeno, momento en el cual registramos durante 3 minutos la disminución de la absorbancia a 340 nm de longitud de onda, resultado de la oxidación del NADPH.

3.2.9.4. Cálculos

La cantidad de NADPH oxidado por unidad de tiempo (c), se calcula según la expresión siguiente:

$$c = \frac{V_f}{\epsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Siendo:

Vf = volumen final (mL)

Vm = volumen de muestra (mL)

ε = coeficiente de extinción molar (para el NAPDH = 6.22
 $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = paso de luz de la cubeta

ΔA = incremento de los valores de absorbancia

Δt = incremento de tiempo

3.2.10. Determinación de los niveles de peroxidación lipídica en mitocondrias hepáticas aisladas, tejidos y plasma

Para la determinación de los niveles de peroxidación lipídica utilizamos como marcador de daño oxidativo a lípidos el malondialdehído (MDA), el cual se determinó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

3.2.10.1. Fundamento

Se ha seguido el método descrito por Young y colaboradores (Young et al., 1987). Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (TBA-MDA₂). Puesto que el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además, de con el malondialdehído, se

realiza una separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa del aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras.

Debido a que el malondialdehído proviene de los lipoperóxidos presentes en el medio y, éstos se cuantifican según el aducto TBA-MDA₂, es conveniente hablar de niveles de lipoperóxidos cuantificados como TBA-MDA₂ en lugar de niveles de MDA.

3.2.10.2. Procedimiento

3.2.10.2.1. Homogenados

- Para **MITOCONDRIAS**: 10% p/v (100 mg tejido + 1 mL tampón fosfato 50mM + EDTA 1mM)

- Para **TEJIDOS**: 10% p/v (100 mg tejido + 1 mL tampón fosfato 50mM + EDTA 1mM)

- Para **PLASMA**: la muestra se toma directamente.

NOTA para las muestras de plasma. Si las muestras de plasma están hemolizadas, la hemoglobina debe retirarse ya que interfiere en el análisis; para ello, antes de preparar las muestras debe hacerse lo siguiente:

· Tomar 100 µL de plasma y añadir 100 µL de una solución de cloroformo/isopropanol (2/1).

· Agitar en vórtex durante 2 minutos y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente; después centrifugar durante 10 minutos a 10000g a 4°C.

· Tomar 75 µL del sobrenadante y añadir 75 µL de la solución

formada por cloroformo e isopropanol.

- Agitar en vórtex durante 2 minutos y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente; después centrifugar durante 10 minutos a 10000g a 4°C.

- Del sobrenadante tomar 20 µL siguiendo, de este modo, el protocolo de derivatización.

3.2.10.2.2. Derivatización

1. A 20 µL de muestra (o patrón) se le añaden 480 µL de Acetato Sódico 2M pH 3.5 + TBA 0.2%; se agita y se mantiene 60 minutos en un baño a 95 °C.

2. Una vez transcurrido ese tiempo se pone en hielo y se añaden 500 µL de la solución neutralizante (KH₂PO₄ 60 mM pH 6.8).

3. Se centrifuga a 13000 g durante 5 minutos a 4 °C.

4. Tomar 200 µL del sobrenadante y mezclar con 200 µL de tampón KH₂PO₄ 50mM pH 3.5.

3.2.10.2.3. Técnica cromatográfica

Se inyectan 50 µL del sobrenadante obtenido en el H.P.L.C. Debe tenerse en cuenta que el aducto ácido 2-tiobarbitúricomalondialdehído es estable a pH neutro-básico un máximo de 20 minutos, por lo que se debe operar con rapidez.

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 mL/minuto. La elución del aducto TBA-MDA₂ se realiza en condiciones isocráticas:

- 0-13 minutos: Fase A: KH₂PO₄ 50 mM pH=6,8 y acetonitrilo (83/17)

- 13-24 minutos: Fase B: Acetonitrilo/H₂O₂ (70:30)
- 24-45 minutos: Fase A: KH₂PO₄ 50 mM pH=6,8 y acetonitrilo (83/17)

El tiempo de retención del aducto TBA-MDA₂ es aproximadamente de 3.5 minutos.

La detección del aducto TBA-MDA₂ se realizó con un detector ultravioleta visible a una longitud de onda de 532 nm.

3.2.10.4. Cálculos

El área del pico correspondiente al aducto TBA-MDA₂ se valora frente a una recta patrón construida con MDA-bis. En la construcción de la recta patrón debe incluirse un blanco. La recta patrón se hace a partir de las siguientes soluciones de MDA-bis: blanco; 0,6 μM; 1,5 μM; 6,0 μM; 15 μM y 60 μM.

3.2.11. Determinación del perfil metabólico en plasma mediante resonancia magnética nuclear (¹H NMR)

Con el plasma de todos los grupos de animales se procedió a realizar un estudio metabólico mediante espectroscopía de ¹H RMN y análisis multivariable y analizar cuantitativamente los niveles de diferentes metabolitos implicados en procesos bioquímicos y celulares diferenciales.

3.2.11.1. Fundamento

La metabolómica tiene como objetivo el análisis, en la muestra biológica analizada (en este caso plasma), de las pequeñas moléculas que son producto del metabolismo. Esta información puede resultar fundamental para la comprensión de las rutas metabólicas y procesos bioquímicos característicos del sistema en estudio, ya que habitualmente los compuestos medidos representan los productos finales del metabolismo (Robertson, 2005, Robertson et al., 2005, Lenz and Wilson, 2007). La espectroscopia de RM permite medir el contenido de protones en muestras biológicas complejas de moléculas de pequeño peso molecular. El espectro de ^1H da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalaramente.

3.2.11.2. Procedimiento

La preparación de la muestra para realizar la espectrometría de RM consistió en descongelar una alícuota de 25 μL de plasma (que estaba congelado a -80°C). A cada muestra de plasma se le añaden 5 μL de D_2O y se centrifugan a 10000 rpm durante 10 minutos a 20°C .

Una alícuota de 20 μL fue tomada del sobrenadante y colocada en un tubo de 1 mm para NMR de alta resolución (Bruker Biospin GmbH). Todos los espectros fueron obtenidos con un Espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Valencia, España) operando a una frecuencia ^1H de 600.13 MHz. El instrumento fue equipado con una sonda de 1mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$.

Las muestras se colocaron en un Robot SampleJet con control de temperatura que mantuvo las mismas a 4°C hasta el momento de su medida (no más de 1 hora de espera). Una vez en el espectrómetro, se esperó un tiempo total de 3 minutos para que la temperatura de la muestra alcanzase 37°C estables antes de que los espectros fueran adquiridos.

Se midió un experimento de pulso-adquisición con pre-saturación del agua para todas las muestras. Para evitar efectos sobre la intensidad de la señal diferente de la cantidad de metabolito, se prefirieron experimentos de un solo pulso sin filtrar antes que secuencias de pulso filtradas.

Se usó una pre-saturación durante 1 segundo a lo largo del periodo de reciclado para la supresión de la señal del disolvente. La anchura de todos los espectros fue 8000 Hz para ^1H . Antes de la transformación de Fourier, la FID (free induction decay) se multiplicó por una ventana exponencial de 0.3 Hz. Se realizó un referenciado del desplazamiento químico sobre la señal del doblete CH₃ de la alanina a 1.475 ppm en todos los espectros.

3.2.11.3. Análisis de datos y cálculos

Todos los espectros fueron procesados usando MNOVA (MestreLab S.A., 2008, Santiago de Compostela) y transferidos a MATLAB (MathWorks Inc, 2006) usando sus secuencias para el análisis de datos. Se investigó la región de desplazamiento químico incluyendo las resonancias entre 0.50 y 4.70 ppm (región alifática) y 5.20 a 10.00 ppm (región aromática). Los espectros fueron normalizados al área espectral total alifática para eliminar las diferencias en la concentración de las muestras. Los espectros fueron diezmados en cubos de 0.01 ppm y se realizó el

análisis estadístico usando las secuencias propias de MATLAB y la librería de análisis estadístico multivariable PLS_Toolbox. Las columnas fueron centradas a la media antes del análisis multivariable. Un Análisis de Componentes Principales (PCA) fue aplicado al conjunto de vectores espectrales, ya que es capaz de representar estructuras de datos multivariable complejas en un espacio de dimensionalidad reducida conservando la estructura de los datos. Los componentes principales fueron elegidos para explicar, al menos, el 45.2% de la varianza. Se usaron los diagramas de carga de los componentes principales correspondientes para detectar las posiciones de los metabolitos más relevantes. El método de selección para las posiciones relevantes incluyó una comparación entre la carga de cada columna y el valor medio en todos los espectros. Las columnas con factores de carga más grandes que los valores espectrales medios fueron seleccionados como relevantes. Las señales de estos metabolitos señalados fueron integrados y cuantificados usando secuencias de ajuste de picos semi-automáticas de MATLAB. Estas secuencias de ajuste se basan en los procedimientos de optimización de Lavenberg-Marquardt. La función objetivo para la optimización incluyó medidas de espectros experimentales para soluciones estándar de los metabolitos seleccionados con patrones de multiplete complejo y señales de curva Lorentziana generadas teóricamente para aquellos metabolitos con patrones espectrales más simples. Se usó el análisis de varianza de una cola para determinar la significatividad estadística de las integrales correspondientes a la media de los grupos controles y experimentales.

3.2.12. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realizó un análisis de la varianza. La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de aquellos grupos en los cuales F no fue significativa para un valor $p \leq 0.05$. Luego, el grupo de datos para los que F fue significativa fueron analizados por el test de la t de Student. La simbología empleada en el presente trabajo es la siguiente: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

RESULTADOS

4.1. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la ovariectomía durante 4 semanas supone un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas en comparación con las ratas control. Así mismo, se ha demostrado que la reposición inmediata con estradiol en ratas ovariectomizadas previene este aumento de producción de peróxido de hidrógeno (Borras et al., 2003).

**4.1.1. TASA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE
HÍGADO DE RATAS HEMBRAS**

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si el tiempo transcurrido tras la ovariectomía podría influir sobre la producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas. Como hemos señalado en el apartado de Material y Métodos, diseñamos un estudio en el que sacrificamos las ratas a distintos tiempos tras la ovariectomía, concretamente tras 3, 6 y 9 semanas. Aislamos mitocondrias hepáticas y determinamos la producción de peróxido de hidrógeno.

4.1.1.1. Efecto de la ovariectomía

La figura 4.1 muestra que la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas, aportando sustratos del complejo II (succinato) de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, de ratas

hembra con ovariectomía fue significativamente mayor en comparación con las ratas control, y que esta tasa aumentó conforme aumentaron las semanas de ovariectomía a las que se sometieron los diferentes grupos (OVX 3 $p < 0.05$; OVX 6 $p < 0.01$; OVX 9 $p < 0.001$).

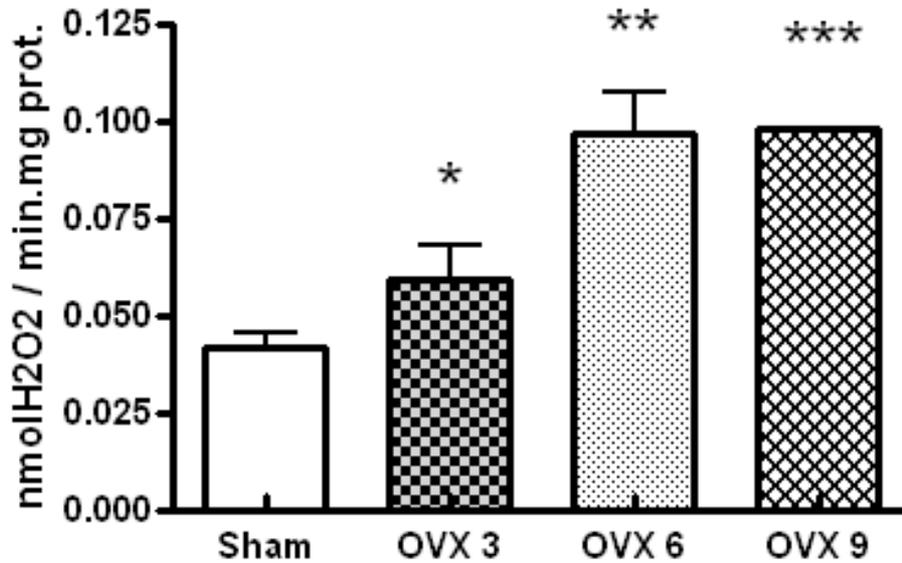


Figura 4.1.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n = 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p < 0.05$ vs control; ** $p < 0.01$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control.

Por tanto, podemos afirmar que el tiempo transcurrido tras la ovariectomía influye significativamente sobre la tasa de producción de peróxido de hidrógeno.

4.1.1.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

La figura 4.2 muestra que la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias hepáticas aumentó tras tres semanas de ovariectomía ($p < 0.05$, Sham vs OVX 3), efecto que fue revertido al iniciar la reposición inmediata con estrógenos tras la ovariectomía ($p < 0.05$, OVX 3 vs OVX 3E).

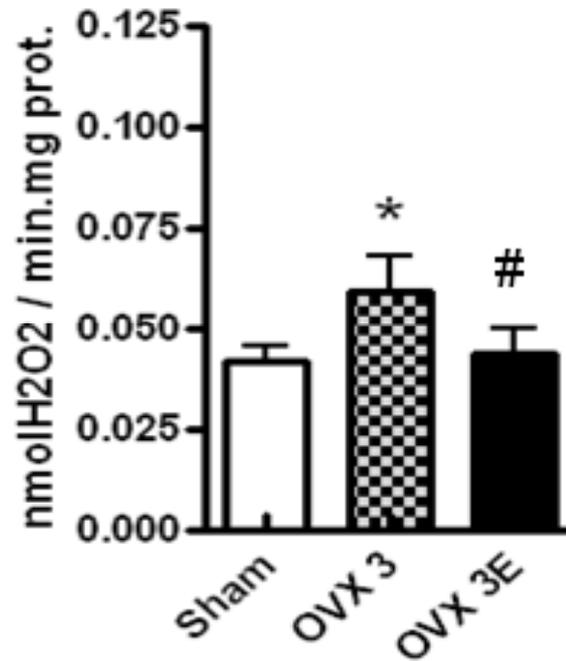


Figura 4.2.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n = 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs OVX 3.

Este dato confirma lo anteriormente publicado por Borrás y cols. (Borras et al., 2003). El tratamiento inmediato con estradiol tras la ovariectomía restaura los niveles de producción de peróxido de hidrógeno por las mitocondrias aisladas de hígado.

4.1.1.3. Efecto de la reposición con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

Como hemos visto en la figura 4.2, la reposición inmediata con estrógenos tras la ovariectomía previno el aumento en la producción de peróxidos.

Así pues, nos planteamos también determinar si el retraso del tratamiento con estradiol en 3 ó 6 semanas tras la ovariectomía era o no efectivo para prevenir el aumento en la producción de peróxidos asociado a la ovariectomía.

La figura 4.3 refleja los resultados obtenidos en la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en los grupos de 6 semanas de ovariectomía (OVX 6), de 3 semanas de ovariectomía seguido por un periodo de 3 semanas con tratamiento con estradiol (OVX3 +3E), de ovariectomía de 9 semanas (OVX 9) y de 6 semanas de ovariectomía seguido de 3 semanas con tratamiento con estradiol (OVX 6 +3E).

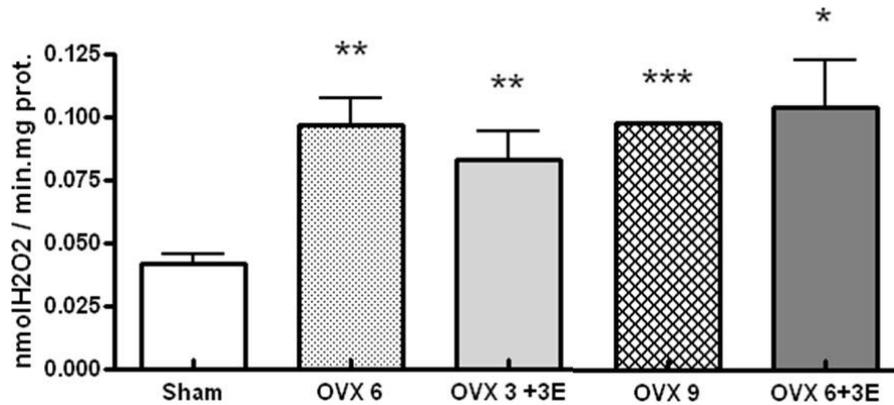


Figura 4.3.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p < 0.05$ vs control; ** $p < 0.01$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control.

Como se puede apreciar, todos los grupos aumentaron significativamente sus tasas de producción respecto a los controles ($p < 0.01$ en OVX 6 y OVX 3 +3E; $p < 0.001$ en OVX 9 y $p < 0.05$ en OVX 6 +3E). El tratamiento con estradiol a partir de 3 semanas tras la ovariectomía no es efectivo en la protección de las mitocondrias hepáticas frente a la producción de radicales libres. El grupo de ratas vehículo no mostró ninguna diferencia con respecto al grupo de ovariectomía (resultados no mostrados).

4.1.1.4. Conclusión

Por tanto, el tratamiento de reposición con estradiol es inefectivo en la protección frente a la producción de peróxido de hidrógeno si se instaura a partir de 3 semanas tras la ovariectomía en ratas.

En la figura 4.4 aparecen reflejados los valores de la tasa de producción de peróxido de hidrógeno de todos los grupos experimentales, en los que puede verse que el tratamiento con estradiol no provoca ninguna mejora significativa respecto a los grupos ovariectomía excepto cuando la reposición se establece inmediatamente tras la ovariectomía.

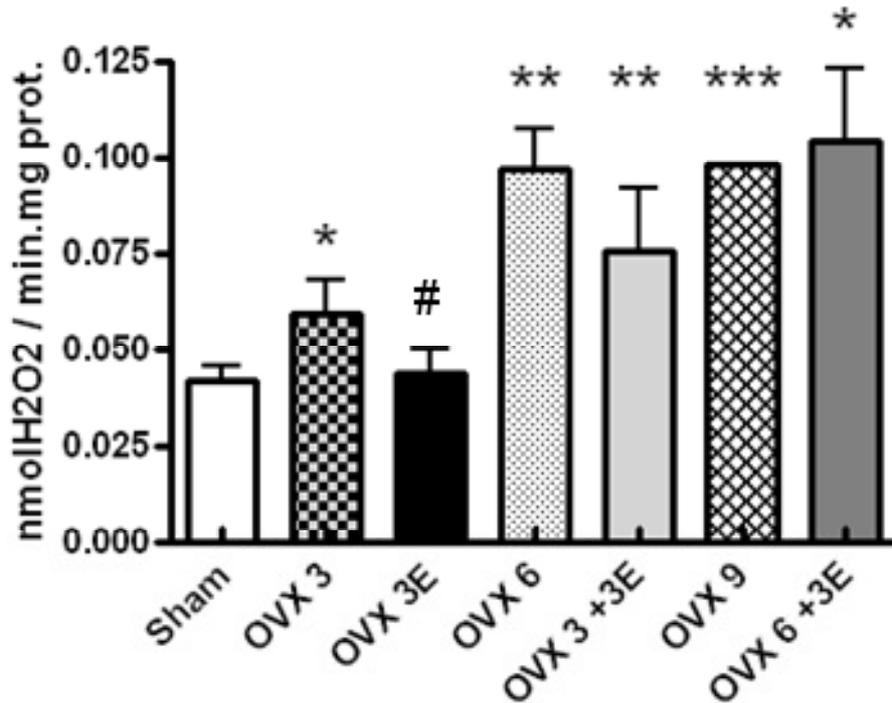


Figura 4.4.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p<.05$ vs control; ** $p<.01$ vs control; *** $p<.001$ vs control; # $p<.05$ vs OVX 3.

4.2. NIVELES DE ANTIOXIDANTES.

Como hemos señalado en la Introducción, el estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de radicales libres y los niveles de antioxidantes, a favor de los primeros (Sies, 1986). Las figuras anteriores muestran la producción de peróxido de hidrógeno, y en las siguientes mostramos los niveles de antioxidantes para poder establecer si existen diferencias de estrés oxidativo entre los diversos grupos de estudio.

4.2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS.

Determinamos la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa, una de las enzimas antioxidantes presente en las mitocondrias y que detoxifica el peróxido de hidrógeno.

4.2.1.1. Efecto de la ovariectomía

Aislamos mitocondrias de hígado y determinamos su actividad, comprobando (figura 4.5) que la ovariectomía de 3 semanas disminuía su actividad ($p<0.001$), al igual que la de 6 ($p<0.001$) y 9 semanas ($p<0.01$) respecto al grupo control.

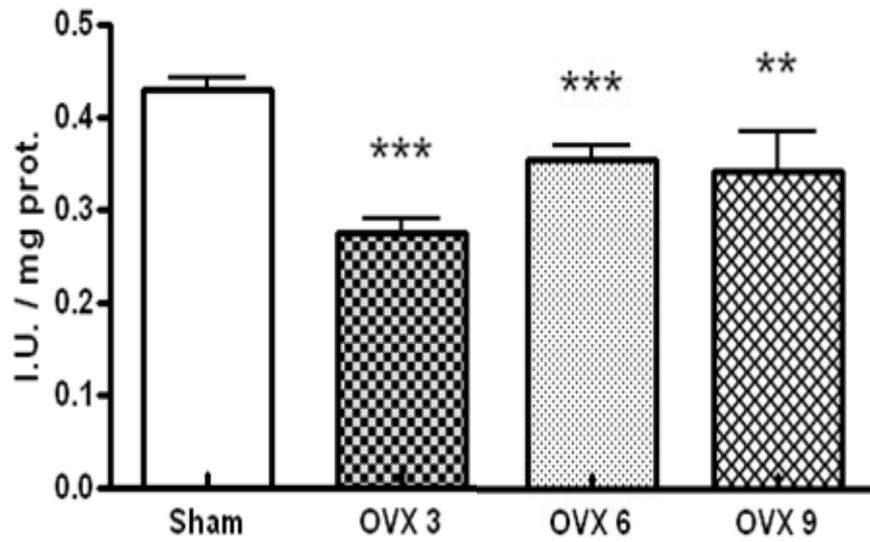


Figura 4.5.- Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: ** $p<.01$ vs control; *** $p<.001$ vs control.

4.2.1.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

Del mismo modo que determinamos qué ocurría en la tasa de producción de peróxido de hidrógeno tras la ovariectomía y la reposición inmediata con estrógenos, quisimos determinar el efecto sobre la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.

Como muestra la figura 4.6, el tratamiento inmediato con estradiol durante las 3 semanas (OVX 3E) revertía este descenso de actividad

($p < 0.05$) observado en la ovariectomía de 3 semanas (OVX 3). El grupo de ratas vehículo no mostró ninguna diferencia con respecto al grupo de ovariectomía.

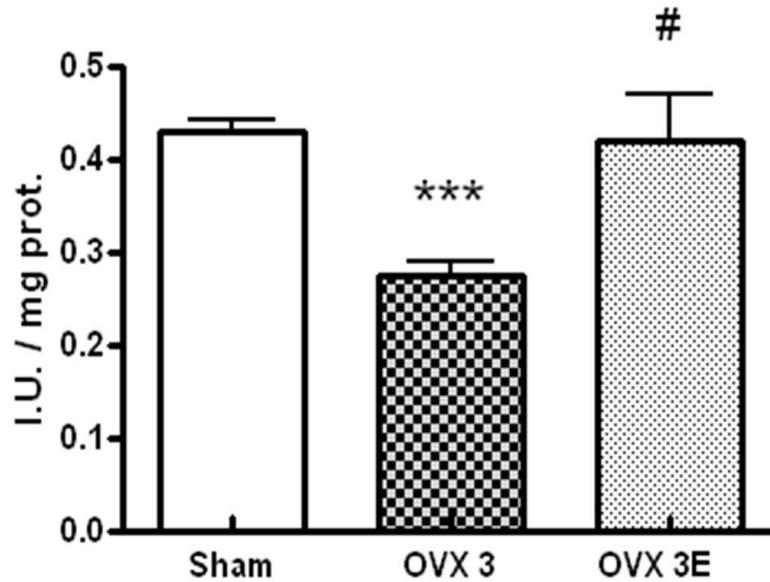


Figura 4.6.- Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n = 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: *** $p < .001$ vs control; # $p < .05$ vs OVX 3.

4.2.1.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

Posteriormente, y para ver si los diferentes tiempos de aplicación del tratamiento influían en la actividad de dicha enzima, también se

determinó en el grupo de 6 y 9 semanas de ovariectomía y en los grupos de reposición tardía (3 y 6 semanas).

Los resultados muestran en la figura 4.7 cómo la actividad de la glutatión peroxidasa descendió muy significativamente ($p < 0.001$ en OVX 6; $p < 0.01$ en OVX 9) en el grupo de ratas ovariectomizadas y, en menor medida, en el grupo tratado con estradiol ($p < 0.01$ en OVX 3 +3E; $p < 0.01$ en OVX 6 +3E). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre estos dos grupos. El grupo de ratas vehículo no mostró ninguna diferencia con respecto al grupo de ovariectomía.

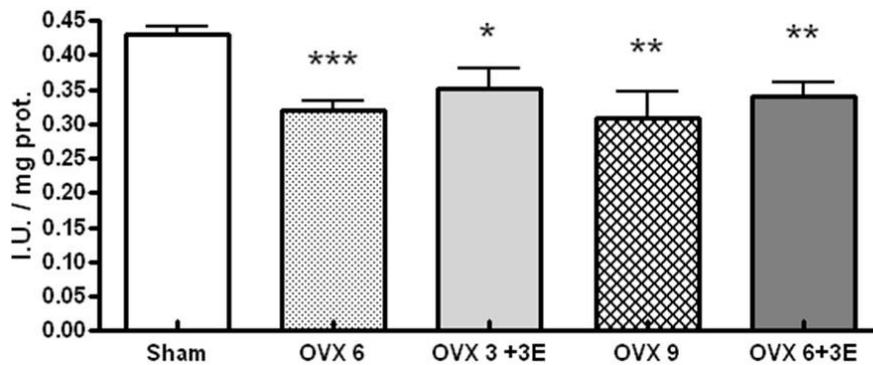


Figura 4.7.- Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n = 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p < 0.05$ vs control; ** $p < 0.01$ vs control; *** $p < 0.001$ vs control.

Por tanto, el tratamiento con estradiol tras 3 ó 6 semanas de instaurarse la ovariectomía no es efectivo sobre la recuperación de la actividad glutatión peroxidasa.

4.2.1.4. Conclusión

En la figura 4.8 se muestran todos los grupos experimentales en los que se aprecia que el tratamiento con estradiol tras la ovariectomía es efectivo a nivel de actividad enzimática antioxidante mitocondrial solamente al iniciarlo inmediatamente, no consiguiéndose mejoras en periodos más tardíos.

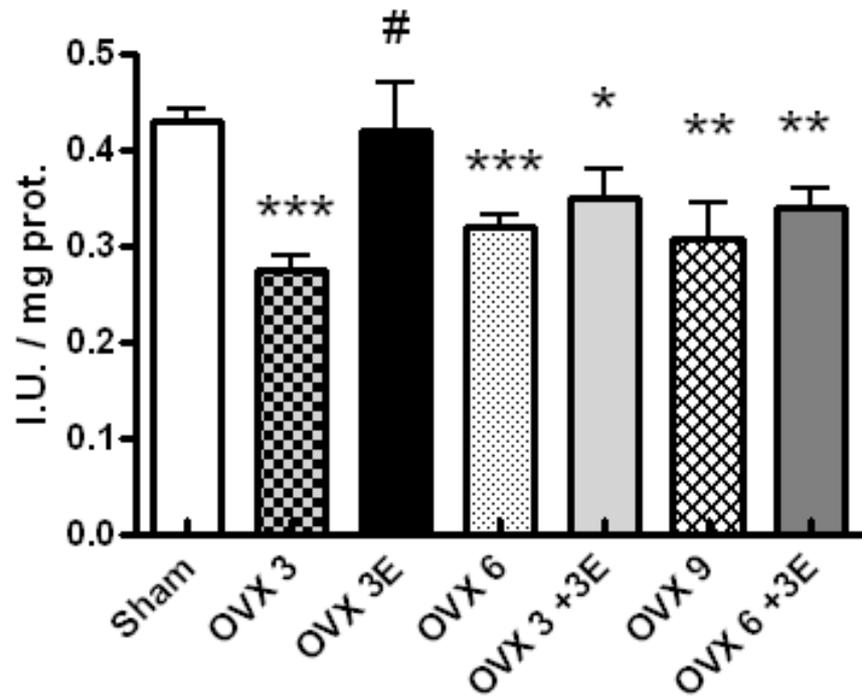


Figura 4.8.- Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p<.05$ vs control; ** $p<.01$ vs control; *** $p<.001$ vs control; # $p<.05$ vs OVX 3.

4.3. DAÑO OXIDATIVO.

Una vez establecido que existe una diferencia de estrés oxidativo entre los diversos grupos estudiados, determinamos si estas diferencias se traducían también en diferencias en daño oxidativo a biomoléculas como los lípidos.

4.3.1. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS.

Para evaluar el daño oxidativo en nuestro estudio, realizamos la determinación de los niveles de peroxidación lipídica determinados en forma de malondialdehído (MDA) en mitocondrias aisladas de hígado en los grupos experimentales del presente trabajo.

4.3.1.1. Efecto de la ovariectomía

En la figura 4.9 se muestran los niveles de MDA en el grupo de ovariectomía de 3, 6 y 9 semanas en comparación con el control ($p < 0.01$, Sham vs OVX 3; $p < 0.05$ Sham vs OVX 6), los cuales se incrementan en periodos cortos de ovariectomía (OVX 3 y 6) y van disminuyendo a medida que se alarga el periodo del mismo (OVX 9).

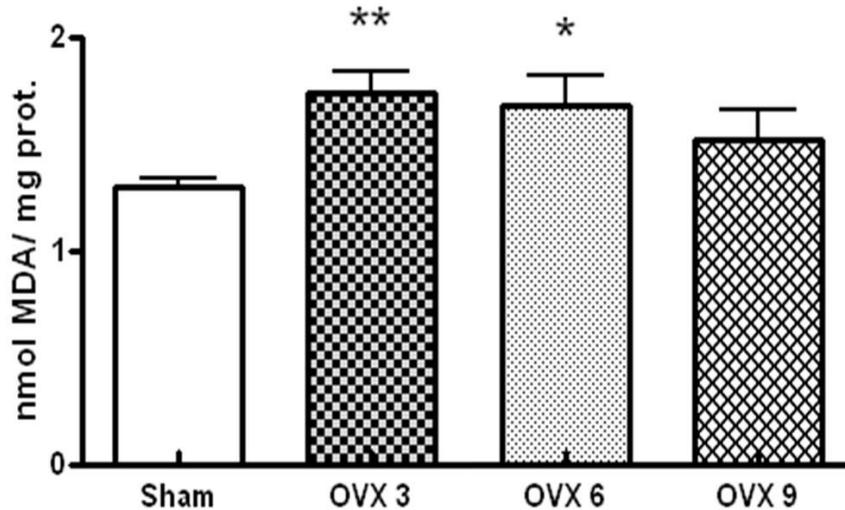


Figura 4.9.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p<.05$ vs control; ** $p<.01$ vs control.

4.3.1.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

En la figura 4.10 se muestra un aumento de los niveles de MDA en el grupo de ovariectomía de 3 semanas en comparación con el control ($p<0.01$, Sham vs OVX 3), que revierte al tratar con estradiol inmediatamente tras la ovariectomía (OVX 3E). El grupo de ratas vehículo no mostró ninguna diferencia con respecto al grupo de ovariectomía.

Por tanto, el tratamiento inmediato con estradiol tras la ovariectomía es efectivo en la prevención del daño oxidativo a lípidos producido por la ovariectomía en mitocondrias hepáticas.

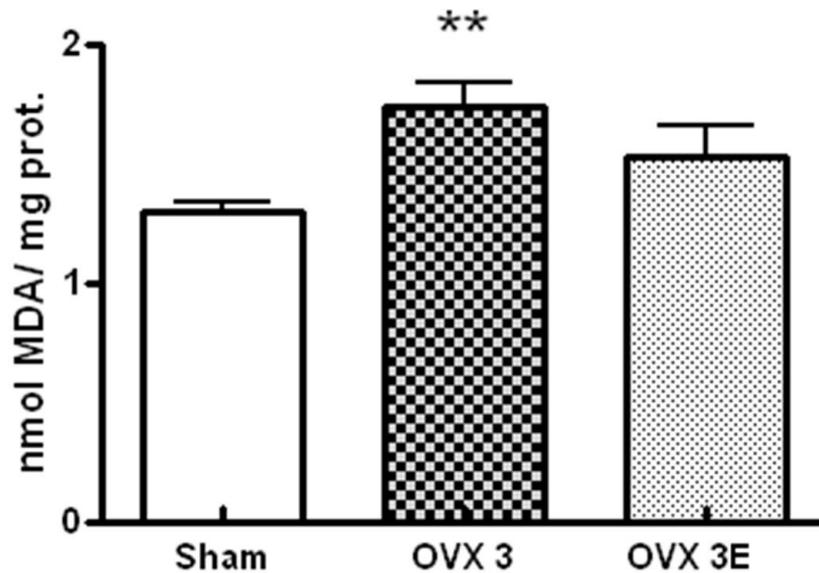


Figura 4.10.- Niveles de MDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: $**p<.01$ vs control.

4.3.1.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

El incremento de los niveles de MDA en las mitocondrias hepáticas aisladas también ocurrió en el grupo de ovariectomía de 6 semanas ($p<0.05$), aunque no hubo cambios en el grupo de 9 semanas, descendiendo al tratar con estradiol las ratas ovariectomizadas las 3 últimas semanas en ambos grupos (figura 4.11). El grupo de ratas vehículo no mostró ninguna

diferencia con respecto al grupo de ovariectomía. Esto indica que en el caso de la peroxidación lipídica el estradiol sí parece tener un ligero efecto protector aunque el tratamiento se inicie después de 3 semanas de ovariectomía.

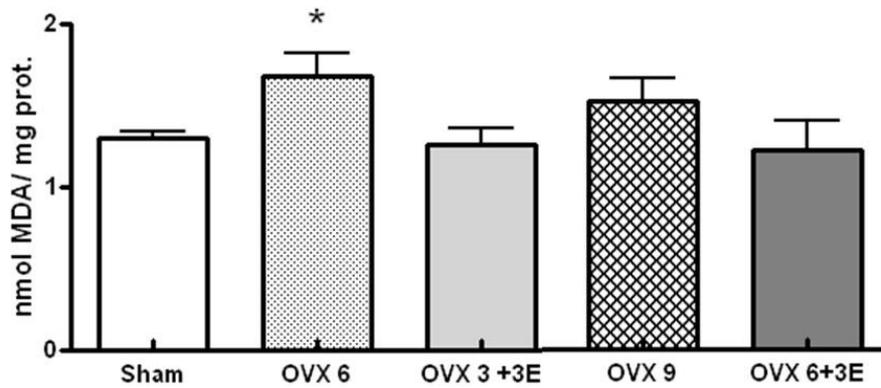


Figura 4.11.- Niveles de MDA de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente o tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: $*p<.05$ vs control.

4.3.1.4. Conclusión

De forma global, se muestran en la figura 4.12 todos los grupos experimentales donde se observa claramente el efecto negativo de la ovariectomía sobre los niveles de MDA en las mitocondrias hepáticas (de forma significativa en los grupos de 3 y 6 semanas). Así mismo, el beneficio del tratamiento con estradiol se da en todos los periodos aunque no de manera significativa respecto al grupo de ovariectomía.

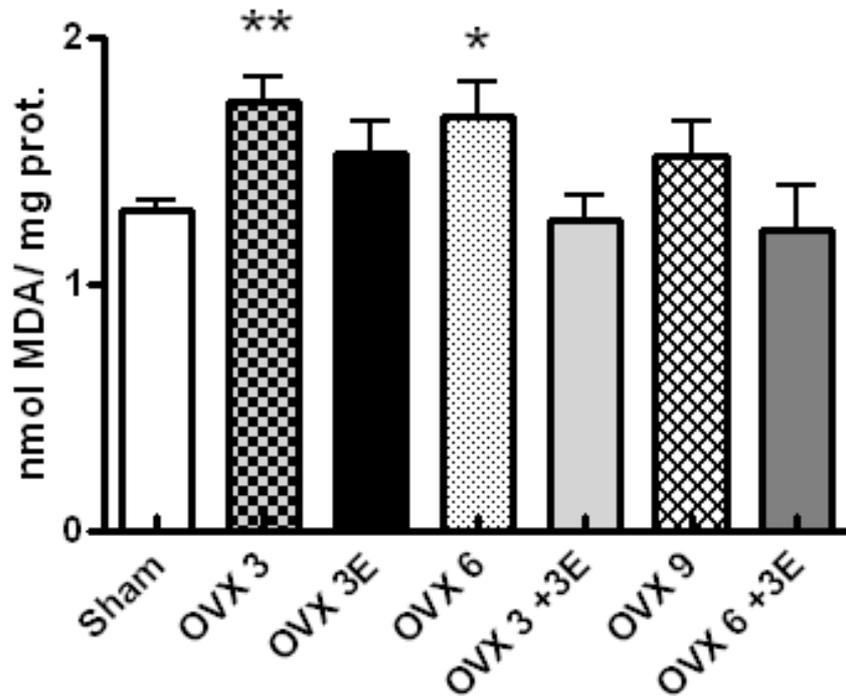


Figura 4.12.- Tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p<.05$ vs control; ** $p<.01$ vs control.

4.3.2. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PLASMA DE RATAS HEMBRAS.

Para comprobar si los resultados obtenidos en mitocondrias se extendían a nivel sistémico, determinamos los niveles de peroxidación lipídica en el plasma de los diversos grupos.

4.3.2.1. Efecto de la ovariectomía

Así pues, la figura 4.13 muestra los niveles de peroxidación lipídica determinados en forma de MDA en plasma, donde se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) con la ovariectomía de 3 semanas, aunque periodos más largos (6 y 9 semanas) no se diferencian significativamente del grupo control.

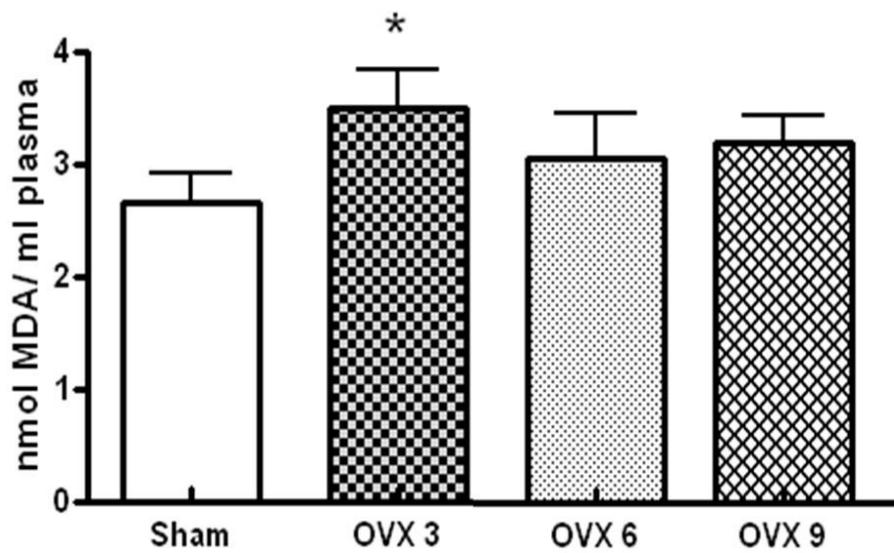


Figura 4.13.- Niveles de MDA en plasma de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n = 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: $*p < 0.05$ vs control.

4.3.2.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

La ovariectomía de 3 semanas produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) de los niveles de peroxidación lipídica respecto al control (figura 4.14), los cuales descienden hasta casi igualar al control en el grupo tratado con estradiol inmediatamente tras la ovariectomía. El grupo de ratas vehículo no mostró ninguna diferencia con respecto al grupo de ovariectomía.

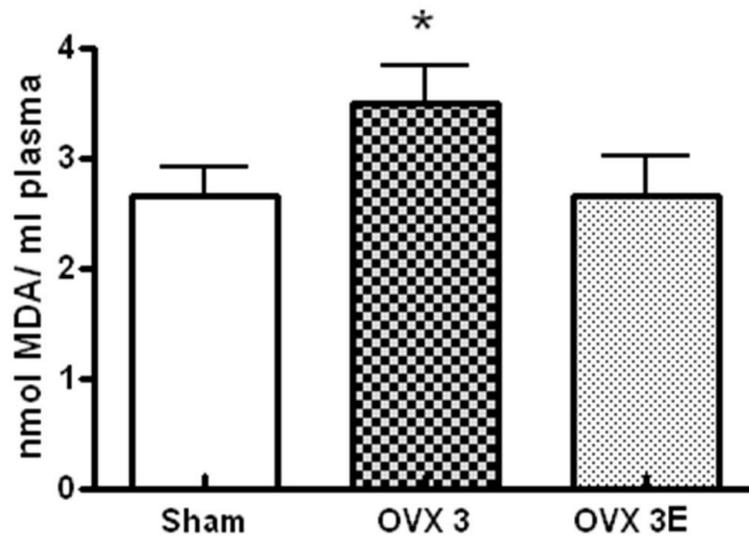


Figura 4.14.- Niveles de MDA en plasma de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n = 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p < .05$ vs control.

4.3.2.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

En la siguiente figura 4.15, se muestra cómo no hubo cambios en ningún grupo respecto al control ni por efecto de la ovariectomía o la reposición con estradiol en los niveles de MDA, ya fuese en los grupos de 6 semanas de ovariectomía y de 3 semanas de ovariectomía seguido por un periodo de 3 semanas con tratamiento con estradiol, así como los de ovariectomía de 9 semanas, además del grupo de 6 semanas de ovariectomía seguido de 3 semanas con tratamiento con estradiol. El grupo de ratas vehículo no mostró ninguna diferencia con respecto al grupo de ovariectomía.

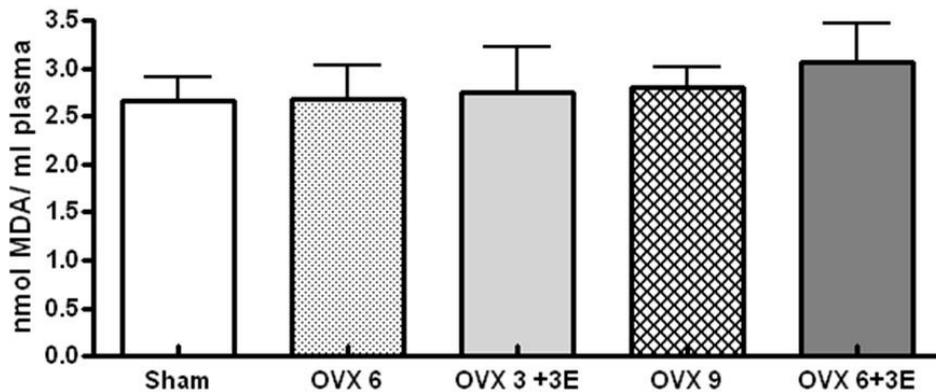


Figura 4.15.- Niveles de MDA en plasma de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$).

4.3.2.4. Conclusión

Se muestran todos los grupos experimentales en la figura 4.16, en la cual se aprecia que la ovariectomía de 3 semanas es la única situación en la que se elevan significativamente los niveles de MDA respecto al control ($p < 0.05$), devolviéndolos a valores normales el tratamiento inmediato con estradiol.

Paradójicamente, periodos más largos con y sin reposición no consiguen elevar estos niveles de peroxidación lipídica a nivel plasmático.

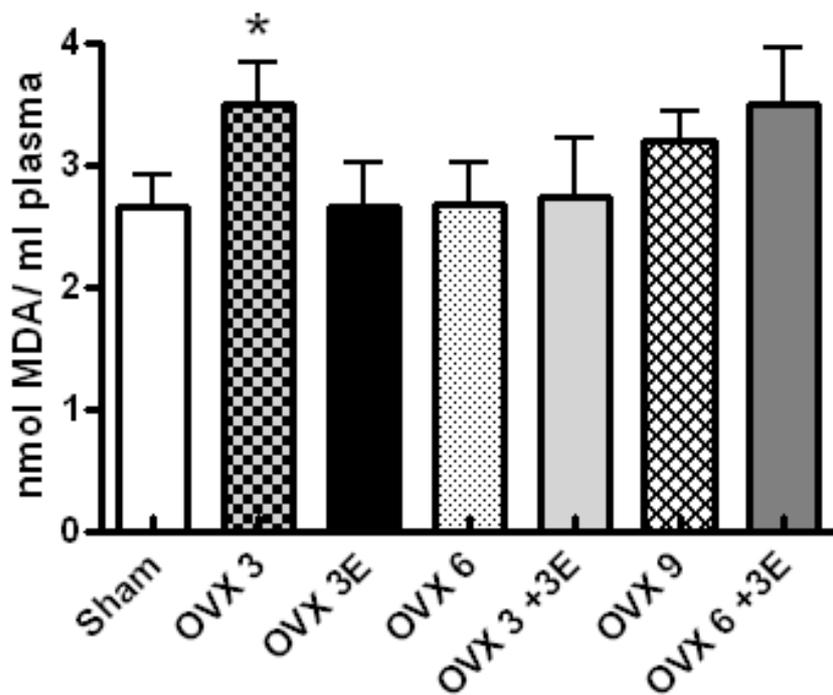


Figura 4.16 Niveles de MDA en plasma de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n = 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: $*p < 0.05$ vs control.

Parece por tanto, que el efecto que se observa en mitocondrias aisladas se extiende a nivel sistémico tras 3 semanas de ovariectomía y reposición con estradiol, pero no después de esas 3 semanas, lo cual indica que podría haber algún tipo de compensación sistémica por la agresión.

4.3.3. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CEREBRO DE RATAS HEMBRAS.

Para comprobar si el daño oxidativo observado en las mitocondrias aisladas de hígado y plasma se hacían extensibles a algunos de los principales órganos de interés estudiados en otros apartados (4.3.4 y 4.3.5) de la presente tesis, decidimos medir los niveles de peroxidación lipídica (MDA) en cerebro.

4.3.3.1. Efecto de la ovariectomía

Como se observa en la figura 4.17, la ovariectomía de 3 semanas disminuyó los niveles de MDA significativamente, aspecto que no ocurrió ni en el de 6 semanas (aumentó respecto al control) ni en el de 9 semanas (disminuyó en comparación con el grupo control), en ninguno de los dos de forma significativa.

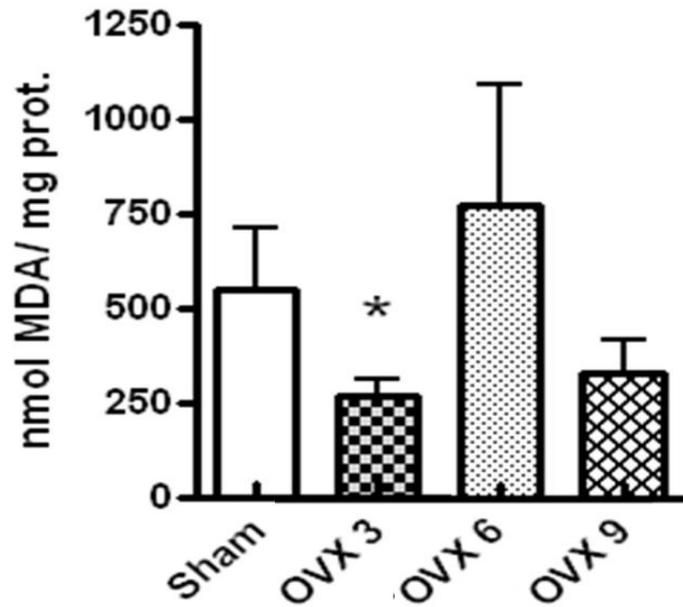


Figura 4.17.- Niveles de MDA en cerebro de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p<.05$ vs control.

4.3.3.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

Contrario al efecto visto anteriormente, la figura 4.18 muestra cómo la reposición inmediata con estradiol durante 3 semanas disminuyó los niveles de MDA, pero solo respecto al control y de forma no significativa, no observándose tampoco diferencias respecto al grupo de ovariectomía.

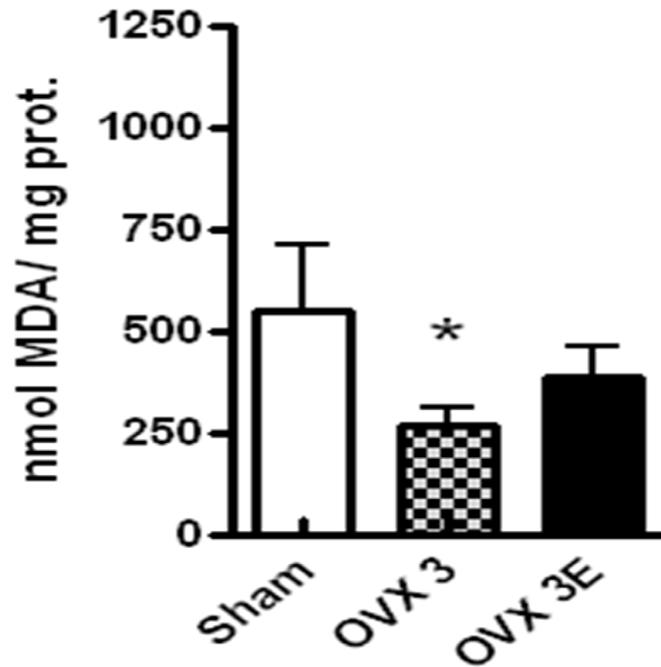


Figura 4.18.- Niveles de MDA en cerebro de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: $*p<.05$ vs control.

4.3.3.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

Los periodos mayores de ovariectomía y reposición con estradiol (de 6 y 9 semanas con y sin tratamiento con estradiol) no provocaron modificación alguna de forma significativa respecto al grupo control ni entre dichos grupos, como refleja la figura 4.19.

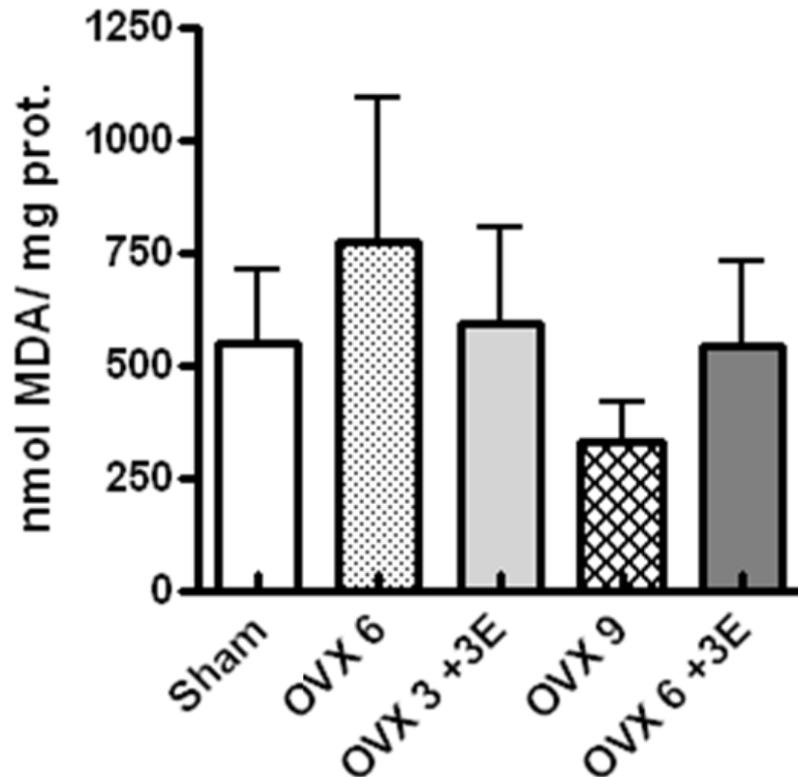


Figura 4.19.- Niveles de MDA de cerebro de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía. Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$).

4.3.3.4. Conclusión

Para concluir con el daño oxidativo en el cerebro, podríamos ver cómo la figura 4.20 nos da una idea de la variabilidad del efecto de los diferentes periodos de ovariectomía y reposición con estradiol, ya que no existe un resultado claro entre dichos grupos experimentales.

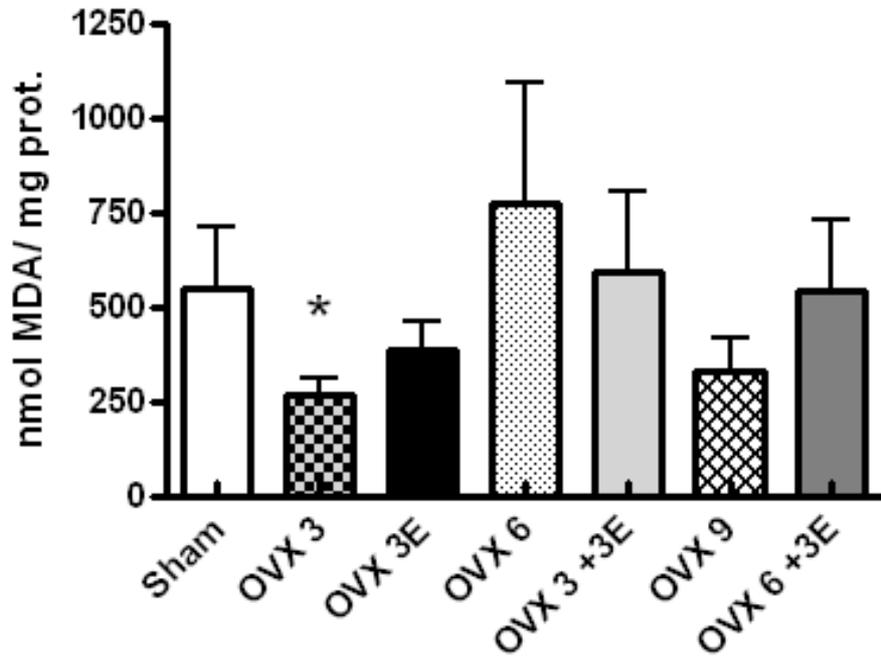


Figura 4.20.- Niveles de MDA de cerebro de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: $*p<.05$ vs control.

4.3.4. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HÍGADO DE RATAS HEMBRAS.

Siguiendo con otro órgano de interés y, observado el efecto de la ovariectomía y el tratamiento con estradiol en las mitocondrias aisladas de hígado, decidimos medir los niveles de peroxidación lipídica (MDA) en este caso el hígado.

4.3.4.1. Efecto de la ovariectomía

Como se observa en la figura 4.21, ninguno de los periodos de ovariectomía (3, 6 ó 9 semanas) modificó los niveles de MDA respecto al grupo control.

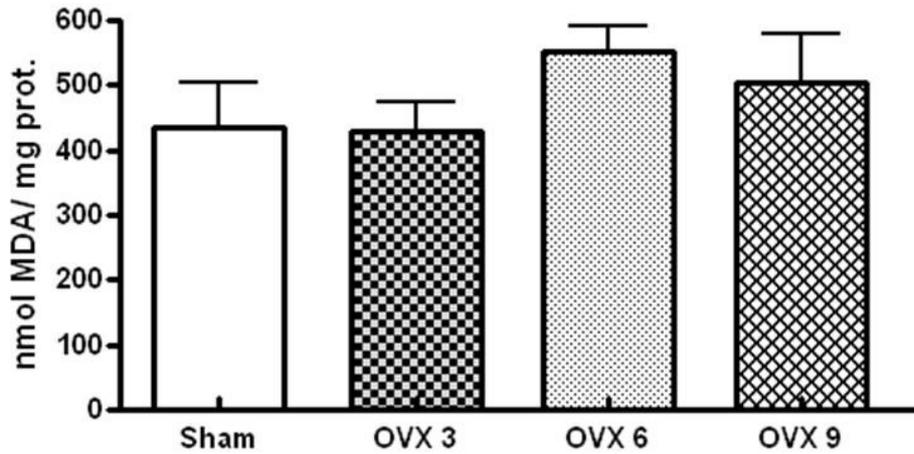


Figura 4.21.- Niveles de MDA en hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$).

Por lo que parece ser que la mitocondria aislada y no el hígado en su conjunto, está implicada en el daño producido por la ovariectomía.

4.3.4.2. Efecto de la reposición inmediata con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

Ningún efecto se observó en el grupo de ovariectomía inmediata tras la ovariectomía durante 3 semanas, ni siquiera en el grupo tratado con estradiol (figura 4.22). Lo cual deja en evidencia la importancia de la acción del tratamiento hormonal sobre la mitocondria de forma específica.

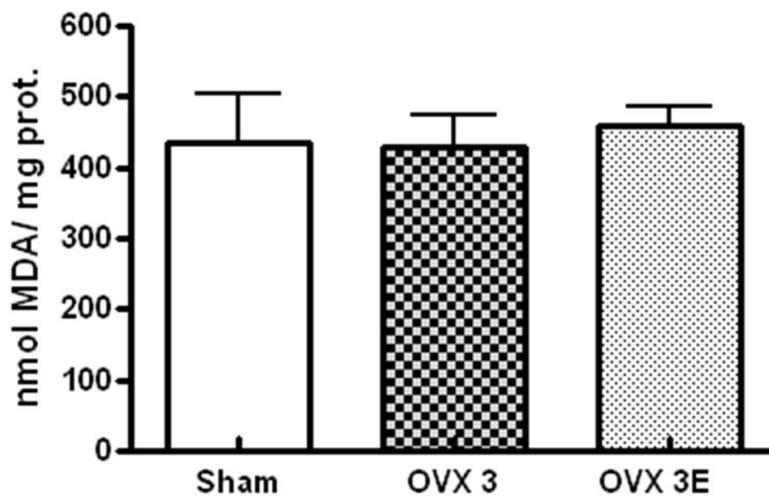


Figura 4.22.- Niveles de MDA en hígado de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$).

4.3.4.3. Efecto de la reposición con 17β-Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

Del mismo modo, observando la figura 4.23 queda claro que realizar periodos más largos tanto en los grupos de ovariectomía como en el inicio de los tratamientos con estradiol, no modificaron de ningún modo los valores de MDA en hígado.

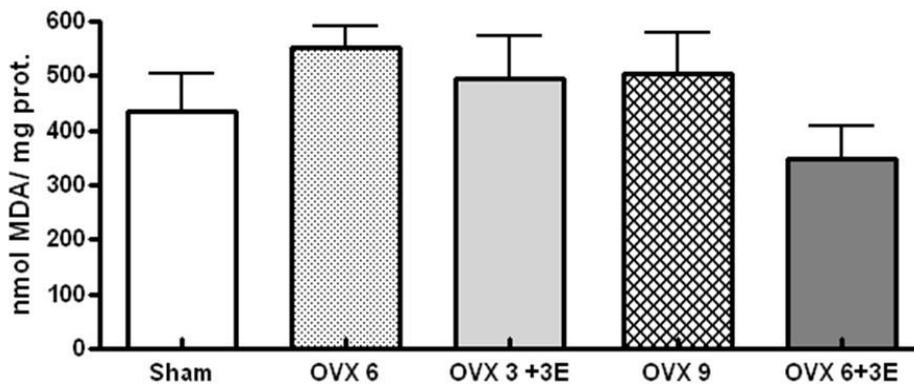


Figura 4.23.- Niveles de MDA en hígado de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media ± desviación estándar (n= 5-8).

4.3.4.4. Conclusión

La figura 4.24 resume el nulo efecto de la ovariectomía y el tratamiento con estradiol sobre el hígado de las ratas hembras en relación al daño oxidativo medido como peroxidación lipídica.

Ello resalta la teoría mitocondrial de los radicales libres del envejecimiento, pues el daño se produce fundamentalmente a nivel mitocondrial.

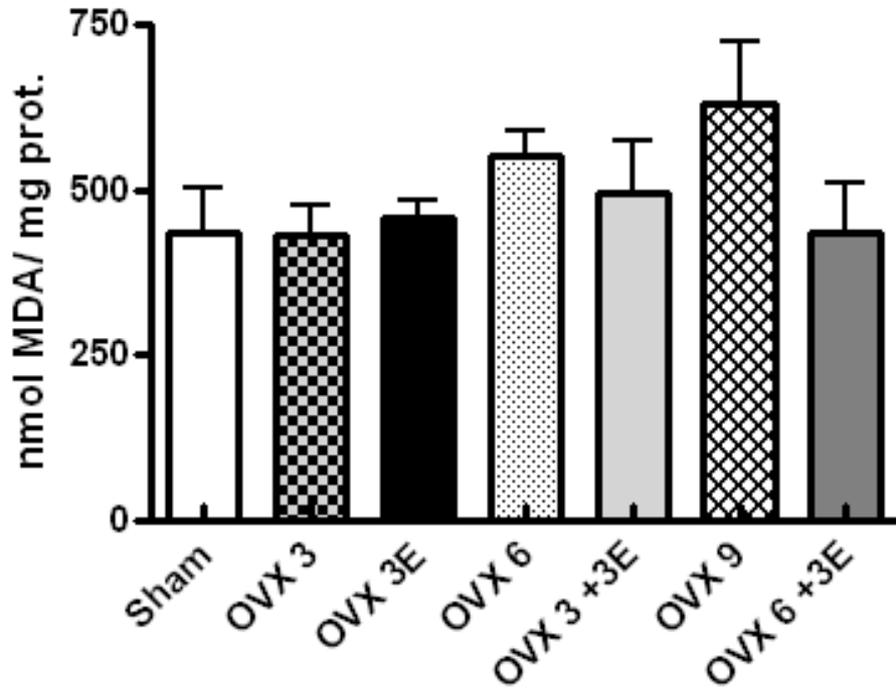


Figura 4.24.- Niveles de MDA en hígado de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$).

4.3.5. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CORAZÓN DE RATAS HEMBRAS.

Por último, quisimos evaluar el corazón en cuanto al daño oxidativo midiendo los niveles de MDA.

4.3.5.1. Efecto de la ovariectomía

Así, la figura 4.25 refleja que, aunque no de manera significativa y contrariamente a lo esperado, 3 y 6 semanas de ovariectomía disminuyen los niveles de MDA en corazón, pero aumentándolos tras 9 semanas de la ovariectomía.

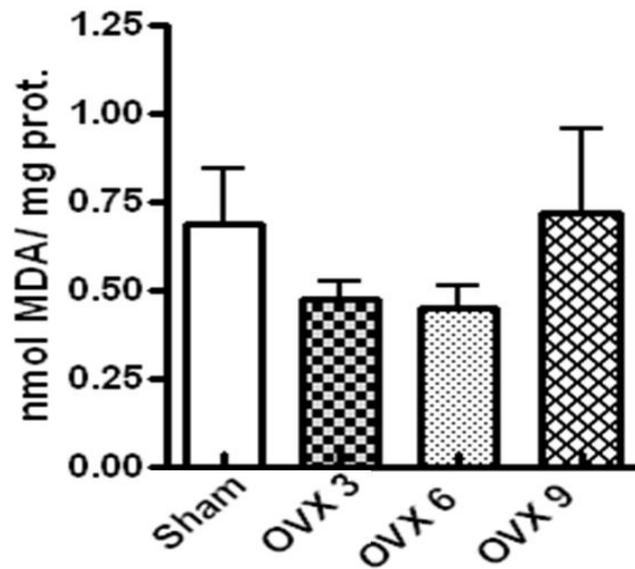


Figura 4.25.- Niveles de MDA en corazón de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$).

4.3.5.2. Efecto de la reposición inmediata con 17 β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

Sin embargo y, a diferencia de lo que ocurría en los dos órganos estudiados anteriormente (cerebro e hígado) y de forma similar a lo observado en las mitocondrias aisladas de hígado, la figura 4.26 muestra como la ovariectomía seguida inmediatamente por 3 semanas de reposición con estradiol, disminuye los niveles de peroxidación lipídica respecto al control.

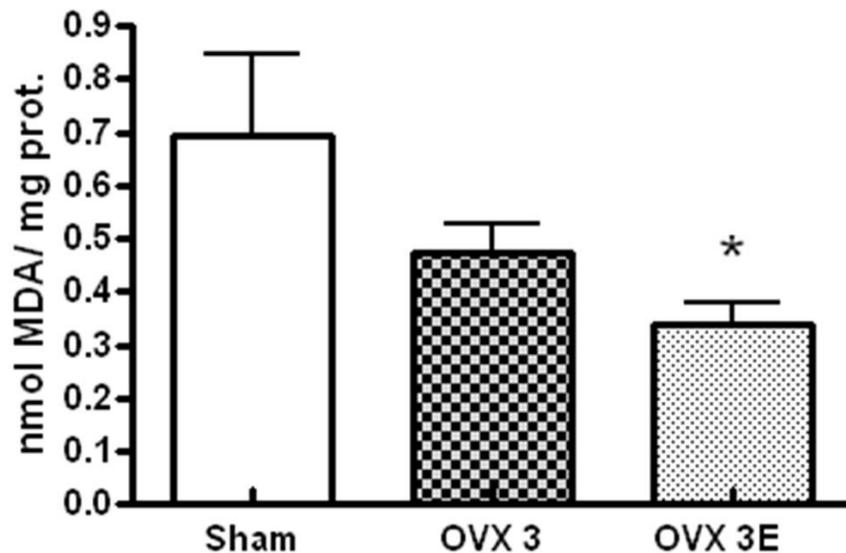


Figura 4.26.- Niveles de MDA en corazón de ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: * $p<.05$ vs control.

4.3.5.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

En la figura 4.27 se observa cómo iniciar el tratamiento con estradiol transcurrido un tiempo tras producir la ovariectomía no consigue disminuir los niveles de MDA ni respecto al grupo control ni con su grupo ovariectomía de 6 y 9 semanas.

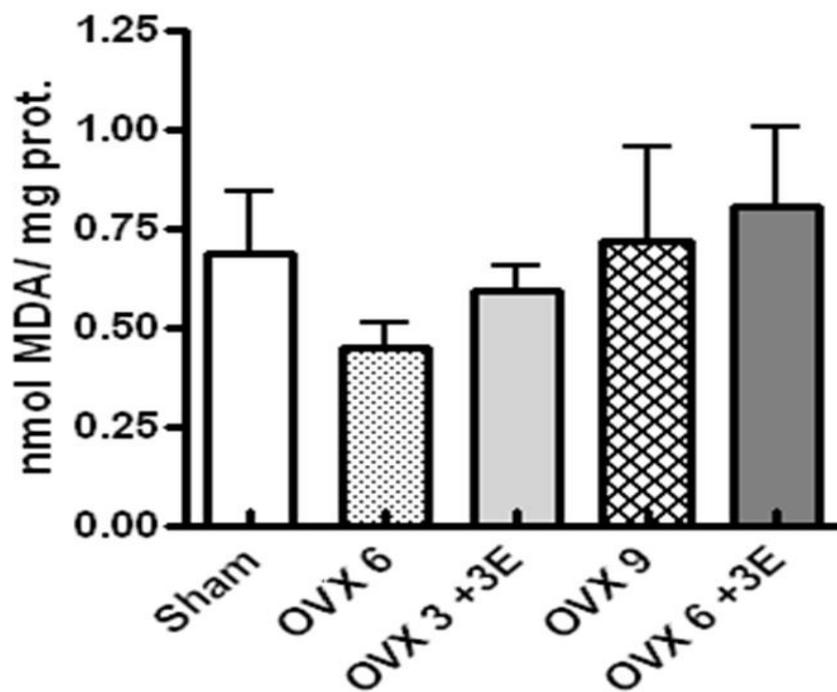


Figura 4.27.- Niveles de MDA en corazón de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n=5-8$).

4.3.5.4. Conclusión

De forma clara, vemos en la figura 4.28 cómo no hay diferencia en ninguno de los grupos estudiados, con la salvedad del efecto favorable del que inició el tratamiento con estradiol inmediatamente tras la ovariectomía (OVX 3E).

Así, en el apartado de Daño Oxidativo, encontramos que a nivel del corazón queda patente la importancia de que el inicio del tratamiento hormonal sí puede influir en este órgano en particular y, puede que, sobre el sistema cardiovascular en general, como ha sido publicado recientemente (Merz, 2009).

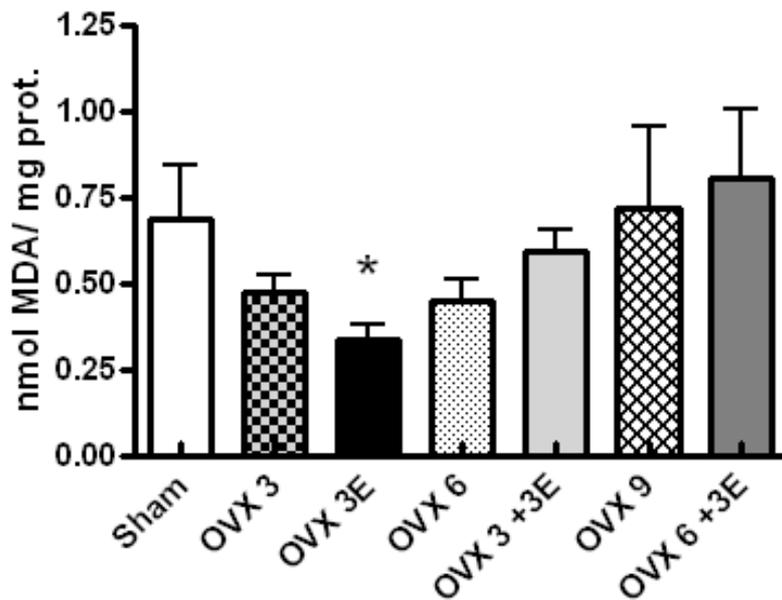


Figura 4.28.- Niveles de MDA en corazón de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$). La diferencia estadística se expresa como: $*p<.05$ vs control.

4.4. CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA *IN VIVO* MEDIANTE LA TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET).

Como hemos señalado en la introducción, existen muchos estudios que relacionan el consumo cerebral de glucosa con diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, especialmente la enfermedad de Alzheimer (Small et al., 2006a, de Leon et al., 2007). Así mismo, se ha observado que la menopausia en mujeres disminuye el consumo cerebral de glucosa y que la reposición con estrógenos revierte este descenso (Rasgon et al., 2005).

Por ello, en este trabajo pretendemos un doble objetivo:

- 1.- Por un lado observar qué efecto tiene el envejecimiento sobre el consumo cerebral de glucosa
- 2.- Por otro, determinar el efecto de la reposición con estrógenos a distintos tiempos tras inducir la menopausia en ratas.

4.4.1. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA EN RATAS HEMBRAS.

Respondiendo al primer objetivo de este apartado, en la figura 4.29 se muestra el consumo cerebral de glucosa *in vivo* de ratas jóvenes (3-4

meses) y viejas (22-24 meses) y como se puede comprobar, éste disminuyó significativamente con la edad. ($p < 0.05$).

El cerebro de las ratas jóvenes consumió alrededor del doble de glucosa en comparación con las viejas. Por tanto, el envejecimiento interfiere con el consumo cerebral de glucosa en ratas.

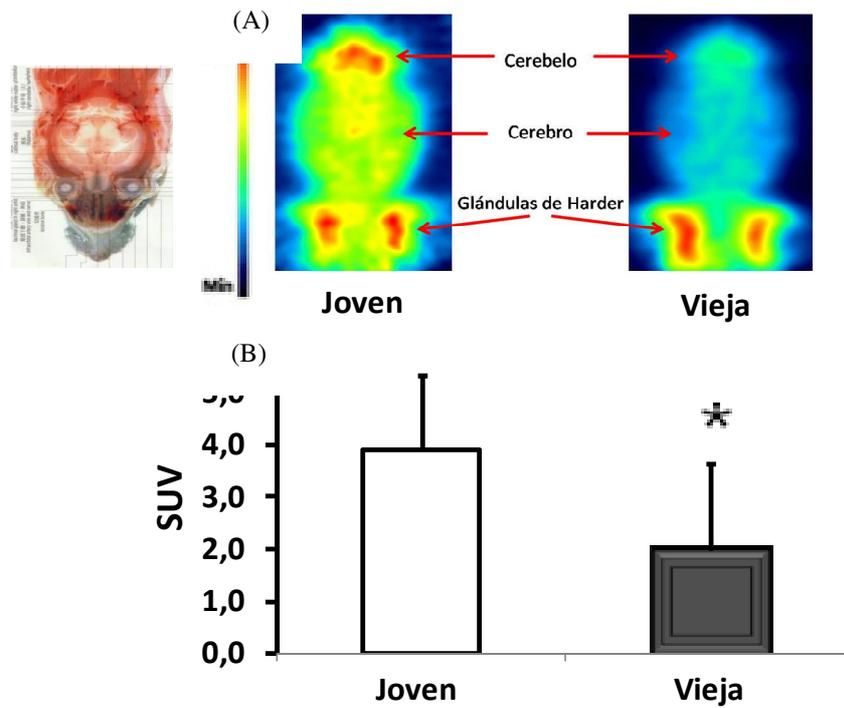


Figura 4.29.- Consumo cerebral de glucosa *in vivo* en ratas jóvenes (3-4 meses) y viejas (22-24 meses). Imagen coronal de cerebro (intensidad expresada como “máxima captación por corte”). (B) Metabolismo cerebral de glucosa (FDG) expresado como SUV.

Valores expresados como media \pm SD ($n = 6$). La diferencia estadística está expresada como: $*p < 0.05$ vs control.

4.4.2. EFECTO DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA *IN VIVO* EN RATAS HEMBRAS.

Para responder al segundo objetivo antes propuesto, se analizó el consumo cerebral de glucosa en todos los grupos de ovariectomía.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.30, donde se observa un descenso significativo en los periodos de 3 ($p < 0.01$) y 6 ($p < 0.05$) semanas tras la ovariectomía comparado con el grupo control. No se pudo realizar la medida mediante PET del grupo de ovariectomía 9 semanas (OVX 9).

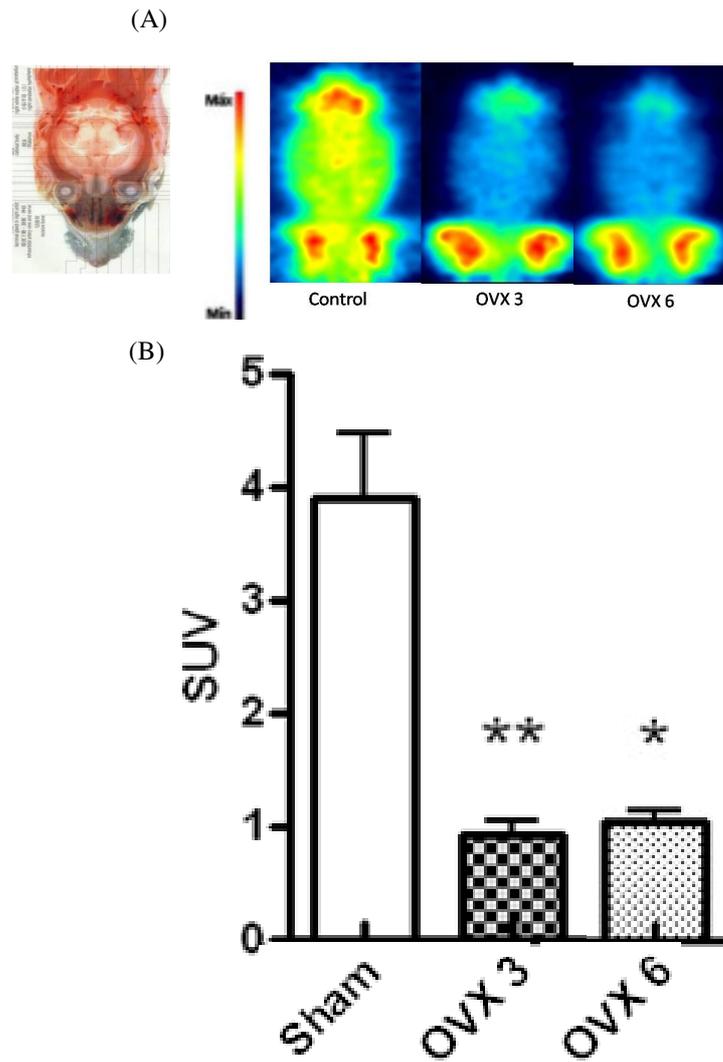


Figura 4.30.- Consumo cerebral de glucosa *in vivo* en ratas ovariectomizadas de 3 y 6 semanas. (A) Imagen coronal de cerebro (intensidad expresada como “máxima captación por corte”). (B) Metabolismo cerebral de glucosa (FDG) expresado como SUV.

Valores expresados como media \pm SD ($n= 5-8$). La diferencia estadística está expresada como: * $p<.05$ vs control; ** $p<.01$ vs control.

**4.4.3. EFECTO DE LA REPOSICIÓN INMEDIATA CON 17 β -
ESTRADIOL DURANTE 3 SEMANAS TRAS LA
OVARIECTOMÍA SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE
GLUCOSA *IN VIVO* EN RATAS HEMBRAS.**

La figura 4.31 muestra el consumo cerebral de glucosa *in vivo* del grupo de ratas con ovariectomía de 3 semanas y su disminución respecto al control ($p < 0.01$). Además, podemos comprobar cómo el tratamiento inmediato con estradiol tras la ovariectomía previno este descenso de manera significativa ($p < 0.001$).

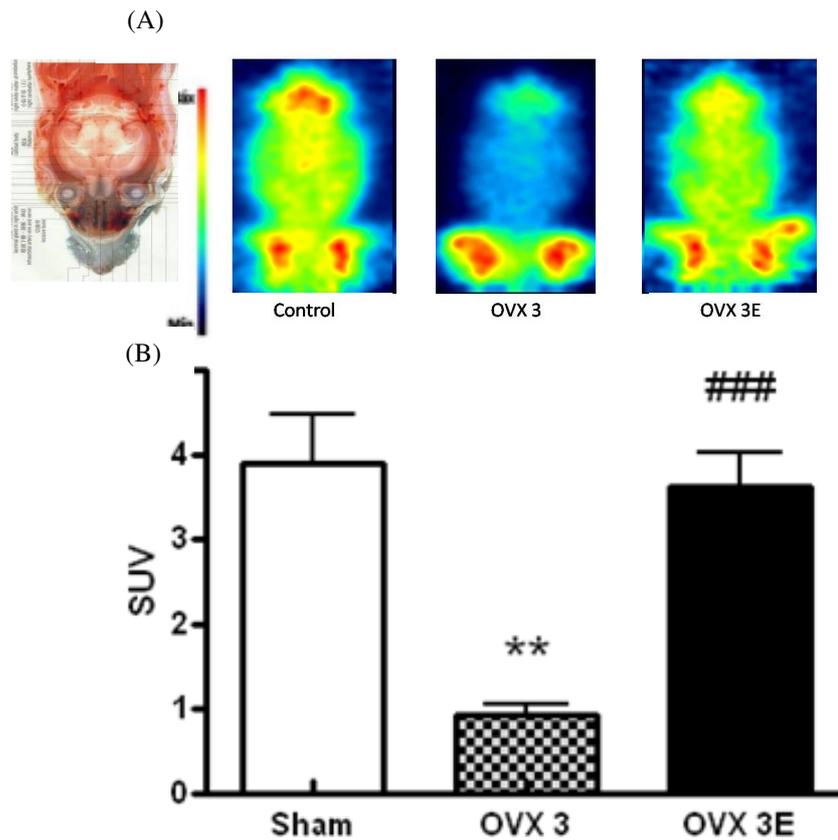


Figura 4.31.- Consumo cerebral de glucosa *in vivo* en ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas. (A) Imagen coronal de cerebro (intensidad expresada como “máxima captación por corte”). (B) Metabolismo cerebral de glucosa (FDG) expresado como SUV.

Valores expresados como media \pm SD ($n= 5-8$). La diferencia estadística está expresada como: ** $p<.01$ vs control; ### $p<.05$ vs OVX 3.

Por tanto, el estradiol previno el descenso de consumo cerebral de glucosa cuando se administró inmediatamente tras la menopausia.

4.4.4. EFECTO DE LA REPOSICIÓN CON 17 β -ESTRADIOL DURANTE 3 SEMANAS TRAS 3 Y 6 SEMANAS DE OVARIECTOMÍA SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA *IN VIVO* EN RATAS HEMBRAS.

A continuación, y para ver si este consumo seguía los mismos patrones de modificación que los parámetros de estrés oxidativo estudiados, se muestran en la figura 4.32 los grupos de 6 semanas de ovariectomía, y los de 3 ó 6 semanas de ovariectomía seguido por un periodo de 3 semanas con tratamiento con estradiol.

Como se puede apreciar tras 6 semanas de ovariectomía, el consumo cerebral de glucosa se mantuvo a niveles considerablemente más bajos en comparación con el control ($p < 0.05$), y el tratamiento con estradiol, ya sea 3 ó 6 semanas tras la ovariectomía no ejerció ningún efecto de reversión sobre el consumo cerebral de glucosa.

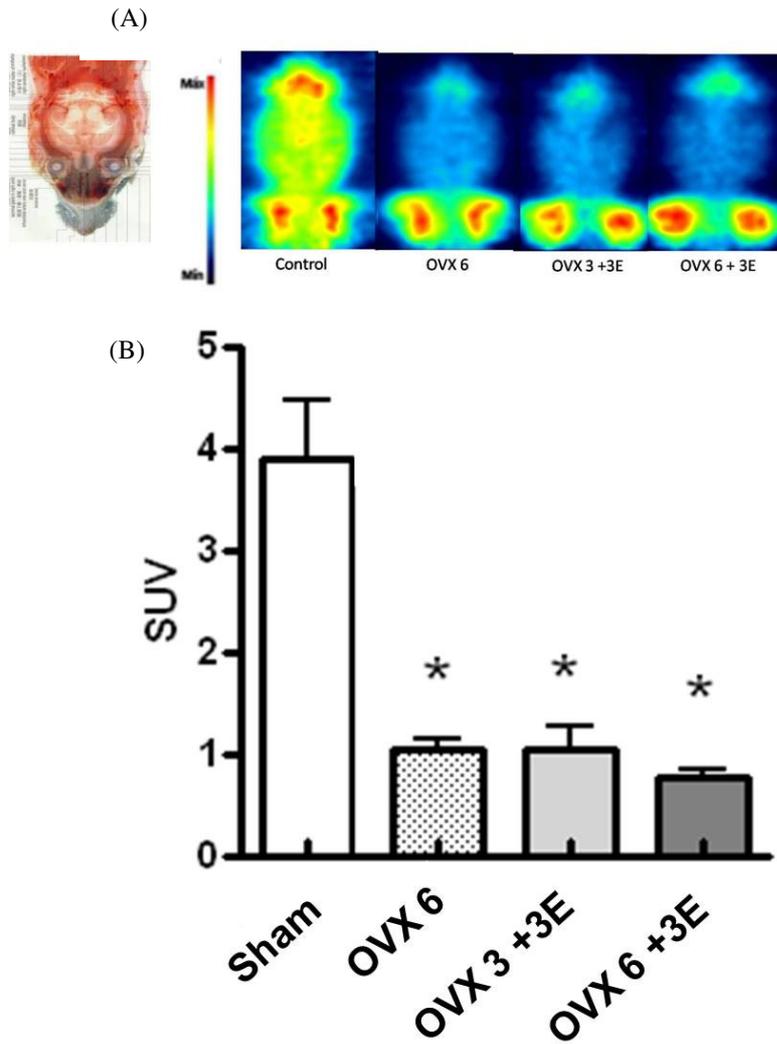


Figura 4.32.- Consumo cerebral de glucosa *in vivo* en ratas ovariectomizadas de 3 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía.

(A) Imagen coronal de cerebro (intensidad expresada como “máxima captación por corte”).

(B) Metabolismo cerebral de glucosa (FDG) expresado como SUV.

Valores expresados como media \pm SD ($n= 5-8$). La diferencia estadística está expresada como: $*p<.05$ vs control.

4.4.5. CONCLUSIÓN.

En la figura 4.33 se muestran todos los grupos experimentales en los que se aprecia que el tratamiento con estradiol tras la ovariectomía fue totalmente beneficioso sobre el consumo cerebral de glucosa en el grupo con el tratamiento inmediato y cómo después no se aprecia ningún efecto positivo.

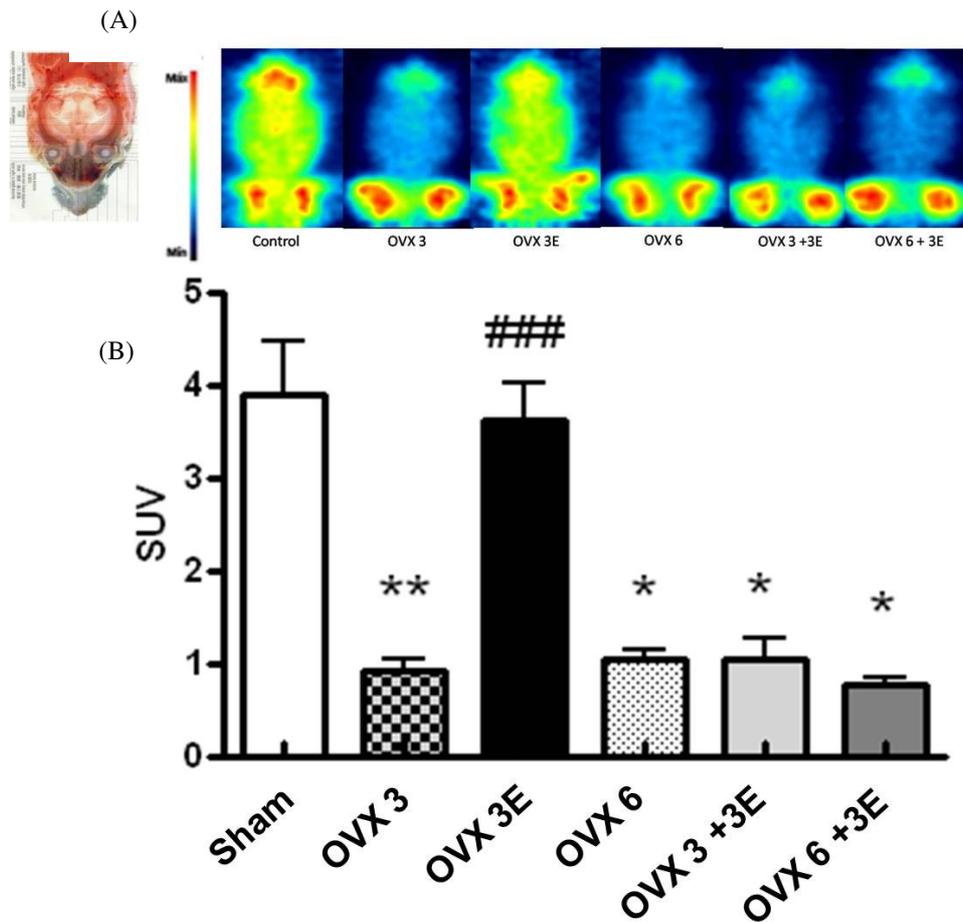


Figura 4.33.- Consumo cerebral de glucosa *in vivo* en ratas ovariectomizadas de 3 y 6 semanas y con reposición de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, o tras 3 y 6 de ovariectomía. (A) Imagen coronal de cerebro (intensidad expresada como “máxima captación por corte”). (B) Metabolismo cerebral de glucosa (FDG) expresado como SUV. Valores expresados como media \pm SD ($n= 5-8$). La diferencia estadística está expresada como: * $p<.05$ vs control; ** $p<.01$ vs control; ### $p<.05$ vs OVX 3.

4.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL METABÓLICO EN PLASMA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹H NMR).

Uno de los objetivos de la presente tesis es estudiar el efecto sobre el perfil metabólico de la terapia sustitutiva con estrógenos (TSE) administrada a distintos tiempos tras la ovariectomía (OVX) en ratas jóvenes. A continuación, se muestran los resultados obtenidos que nos ayudarán a interpretar y relacionar estos datos con los obtenidos en los demás experimentos.

4.5.1. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) de espectro de RMN de PLASMA.

Este análisis, al ser capaz de representar estructuras de datos multivariable complejas en un espacio de dimensionalidad reducida conservando la estructura de los datos (los componentes principales explican, al menos, el 59.5% de la varianza), nos permitirá detectar agrupaciones y patrones de las distintas muestras en función de su composición metabólica global. A su vez, el peso en cada eje (componente principal) de las distintas resonancias y la comparación de su valor respecto al valor medio en todos los espectros nos indica los metabolitos más relevantes.

En la figura 4.34 se muestra la superposición de todos los espectros estudiados, donde se observa claramente la reproducibilidad de los espectros de RMN, la complejidad del espectro y del detalle metabólico (zooms) y, lo más importante, que el espectro está dominado por los lípidos, siendo ésta la mayor influencia en el PCA.

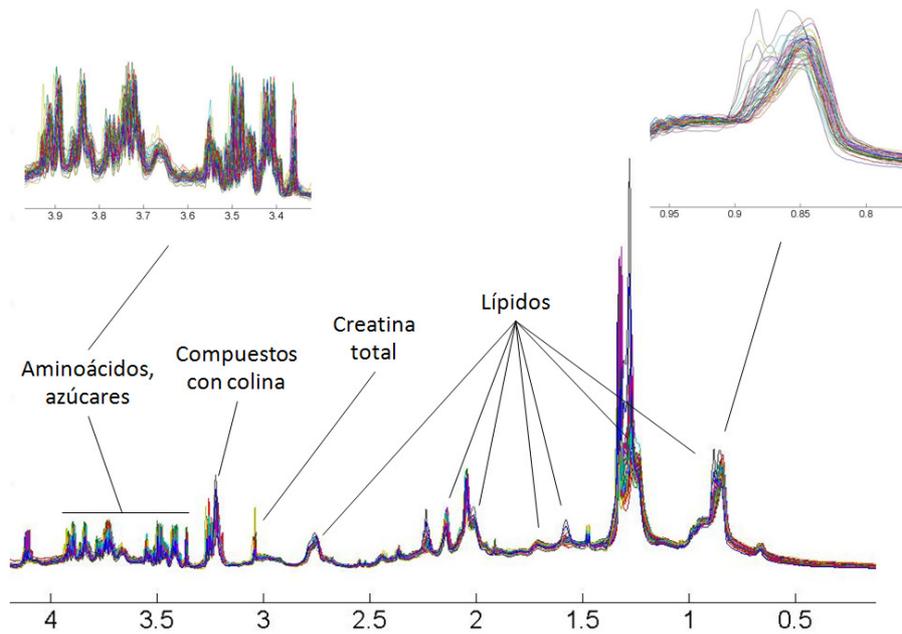


Figura 4.34.- Superposición de la región alifática de todos los espectros de RMN estudiados con una indicación general de los metabolitos observados y una ampliación de regiones de interés. En la ampliación de la región de lípidos a 0.9 ppm se observa la complejidad del solapamiento de las distintas contribuciones lipídicas y la variación entre muestra.

4.5.1.1. Efecto de la ovariectomía

Los resultados obtenidos en este análisis de todos los grupos de ovariectomía se muestran en la figura 4.35, donde se observa un claro alejamiento en todos y cada uno de los periodos de ovariectomía, respecto al grupo control.

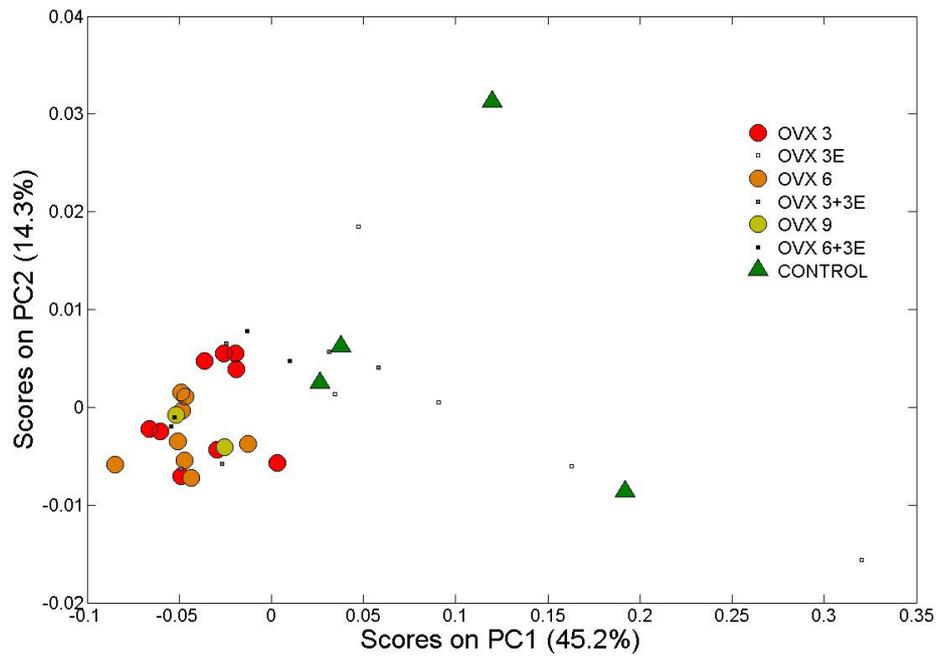


Figura 4.35.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metabonoma del plasma de ratas ovariectomizadas –OVX– (3, 6 y 9 semanas) respecto al grupo control. Grupo control (triángulo verde), Grupo OVX 3 semanas (círculo rojo), Grupo OVX 6 semanas (círculo naranja), Grupo OVX 9 semanas (círculo dorado). Los grupos con estradiol permanecen como pequeños puntos negros ya que son interpretados en otras gráficas.

4.5.1.2. Efecto de la reposición inmediata con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras la ovariectomía

La figura 4.36 muestra los resultados del PCA para el grupo de ratas con ovariectomía de 3 semanas y su comparación respecto al control. El tratamiento inmediato tras la ovariectomía con estradiol se asemeja, en cuanto al perfil metabólico, al grupo control y no al grupo OVX 3.

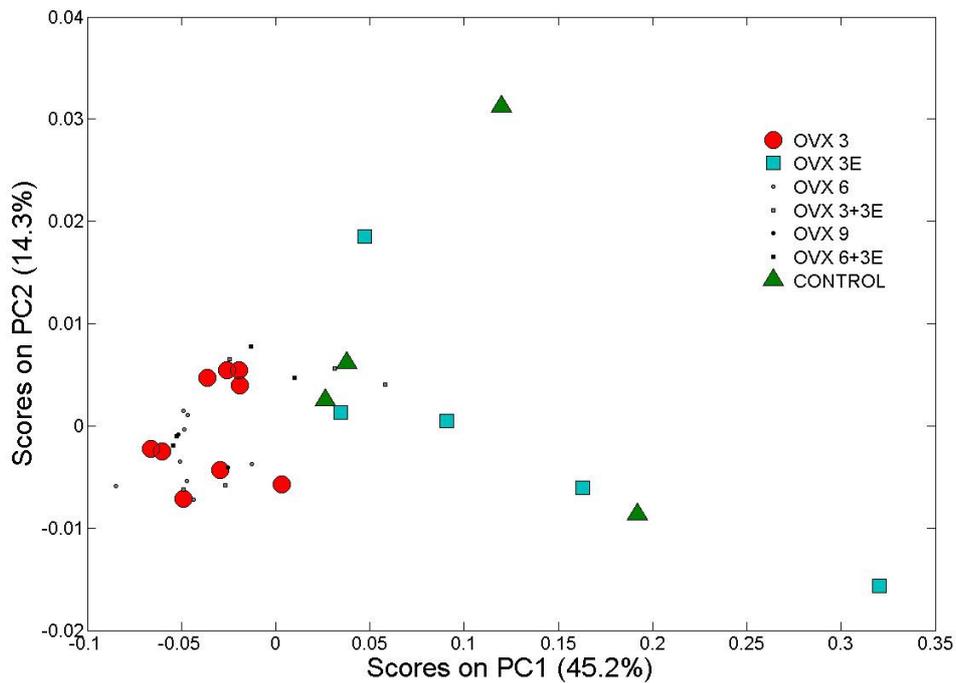


Figura 4.36.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metabonoma del plasma de ratas ovariectomizadas de 3 semanas (OVX 3) y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas (OVX 3E). Grupo control (triángulo verde), Grupo OVX 3 semanas (círculo rojo), Grupo OVX 3E (cuadrado turquesa). Los demás grupos permanecen como pequeños puntos negros ya que son interpretados en otras gráficas.

4.5.1.3. Efecto de la reposición con 17β -Estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 semanas de ovariectomía

En la figura 4.37 observamos los resultados del PCA para los grupos de 6 semanas de ovariectomía y de 3 semanas y 6 semanas de ovariectomía seguido por un periodo de 3 semanas con tratamiento con estradiol.

Como se puede apreciar en ninguno de estos grupos el metabonoma se asemeja al grupo control.

Sí es de destacar, que los valores de los grupos repuestos con estradiol y los relativos a un periodo menor de ovariectomía (3 semanas), parecen estar más próximos al grupo control, pero lejos de los datos mostrados en la figura 4.35 por el grupo OVX 3E

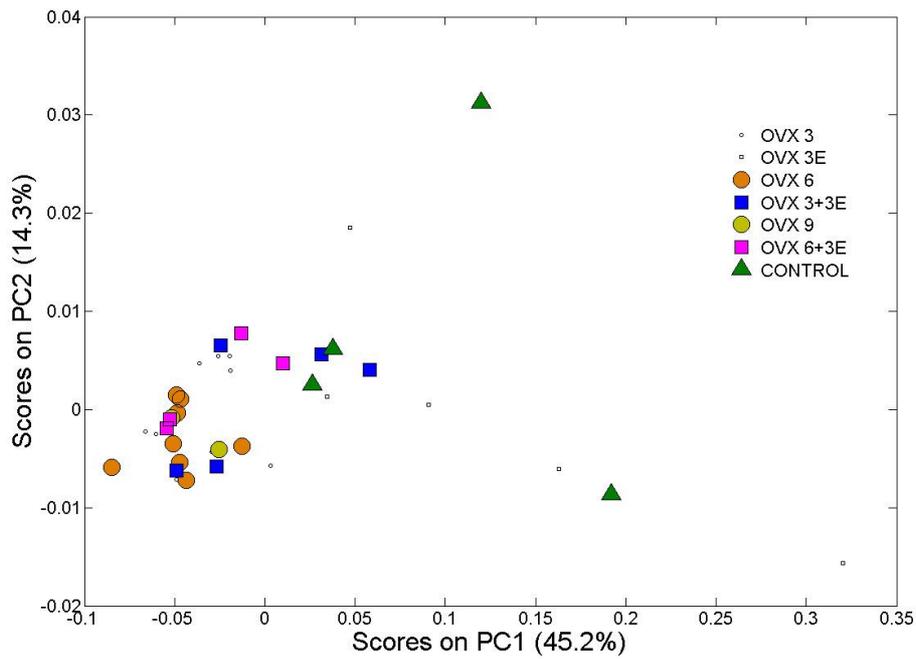


Figura 4.37.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metabonoma del plasma de ratas ovariectomizadas de 6 y 9 semanas (OVX 6 y OVX 9) y con reposición de estradiol durante 3 semanas tras 3 y 6 de ovariectomía (OVX 3 +3E y OVX 6 +3E). Grupo control (triángulo verde), Grupo OVX 6 semanas (círculo naranja), Grupo OVX 3 +3E (cuadrado azul), Grupo OVX 9 (círculo dorado), Grupo OVX 6 +3E (cuadrado morado). Los demás grupos permanecen como pequeños puntos negros ya que son interpretados en otras gráficas.

4.5.1.4. Conclusión

Como en anteriores ensayos, en la siguiente figura (4.38), se muestran todos los grupos experimentales en los que se aprecia que el tratamiento inmediato con estradiol tras la ovariectomía tiene un efecto que

hace similar su perfil metabólico, respecto a los componentes principales de sus espectros, al grupo control. Hecho que no se observa en inicios más tardíos del tratamiento y que son muy diferentes a los resultados obtenidos en los grupos de ovariectomía.

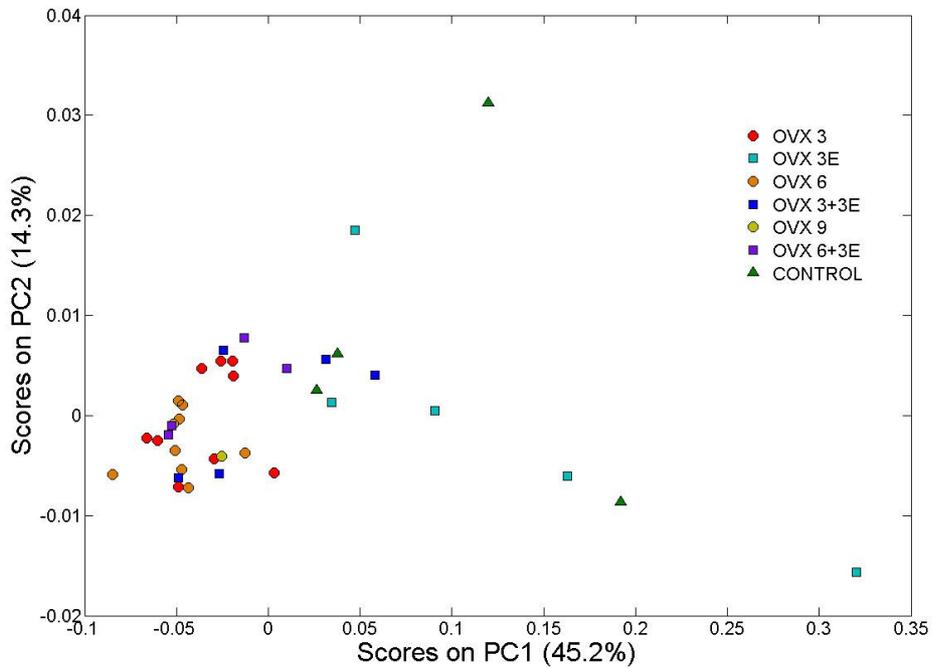


Figura 4.38.- Puntuaciones del PCA realizado para comparar el metabonoma del plasma de ratas ovariectomizadas de 3 y 6 semanas, y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, tras 3 y 6 de ovariectomía. Grupo control (triángulo verde), Grupo OVX 3 semanas (círculo rojo), Grupo OVX 3E (cuadrado turquesa), Grupo OVX 6 semanas (círculo naranja), Grupo OVX 3 +3E (cuadrado azul), Grupo OVX 9 (círculo dorado), Grupo OVX 6 +3E (cuadrado morado). Los demás grupos permanecen como pequeños puntos negros ya que son interpretados en otras gráficas.

4.5.2. METABOLITOS DE ESPECIAL RELEVANCIA OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) de espectro de RMN de PLASMA.

Una vez realizado el PCA, decidimos analizar aquellos metabolitos que por su perfil y peso metabólico en el espectro total de la muestra pudiesen tener especial relevancia para los objetivos planteados en la presente tesis.

4.5.2.1. Glicerol

Para analizar el tipo de metabolismo principal en cada uno de los grupos de ratas y basándonos en la literatura existente, hicimos hincapié en el metabolismo de los lípidos. Así, analizamos los niveles de glicerol en los diferentes grupos experimentales.

En la figura 4.39, observamos cómo la presencia de glicerol en plasma tiene una tendencia no significativa en aumento con la ovariectomía (OVX 3 y 6), siendo mayor ($p < 0.05$) en el grupo OVX 9. Sin embargo, y contrariamente, la reposición con estradiol es significativamente diferente a su grupo ovariectomía en cada uno de los tres periodos estudiados, pero no respecto al grupo control. Solamente en el grupo OVX 3E existen diferencias entre dicho grupo y los controles.

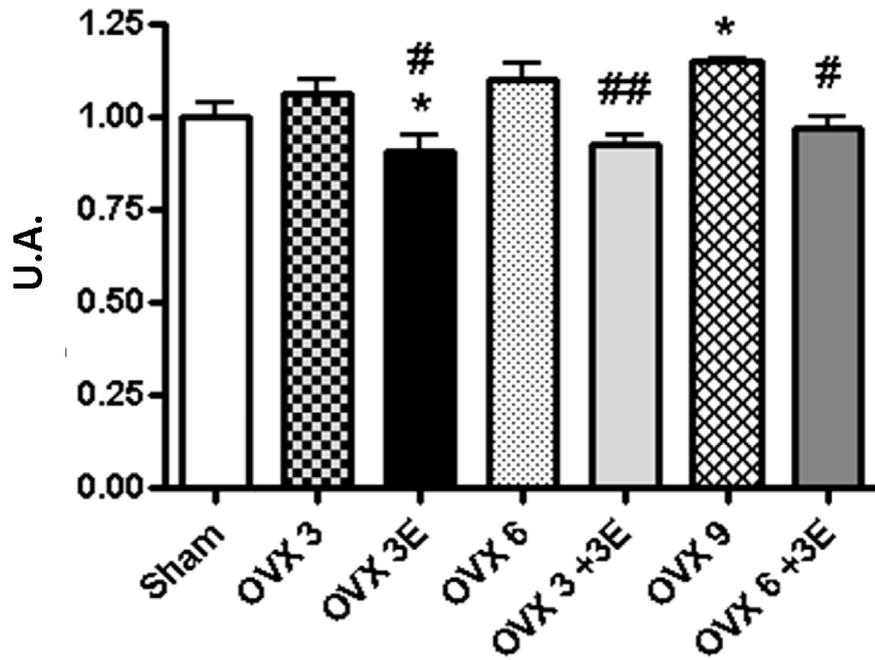


Figura 4.39.- Valores plasmáticos de espectro de RMN de glicerol de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$) de Unidades Arbitrarias (U.A.): área pico/área espectral total.

La diferencia estadística se expresa como: * $p<.05$ vs control; # $p<.05$ vs OVX 3 y OVX 9; ## $p<.01$ vs OVX 6.

El aumento en plasma de este metabolito refleja el uso de triglicéridos y grasa como fuente de energía en detrimento del consumo de glucosa.

4.5.2.2. Glucosa

Por el motivo comentado anteriormente y, obtenidos los resultados del metabolismo de la glucosa medidos por PET, evaluamos el metabolito de la glucosa.

La figura 4.40 representa menores niveles de glucosa circulante en el grupo OVX 3E respecto al grupo control y OVX 3, lo cual puede indicar mayor consumo (como mostró el consumo cerebral de glucosa por PET en este grupo de reposición con estradiol).

Contrariamente a los resultados obtenidos por PET, el grupo OVX 3 +3E también difiere significativamente de su grupo OVX (OVX 6) pero ya no es menor que el grupo control.

Este hecho parece que se va perdiendo progresivamente a medida que aumenta el periodo de la ovariectomía, puesto que en el último de ellos (OVX 9 y OVX 6 +3E) se pierde completamente.

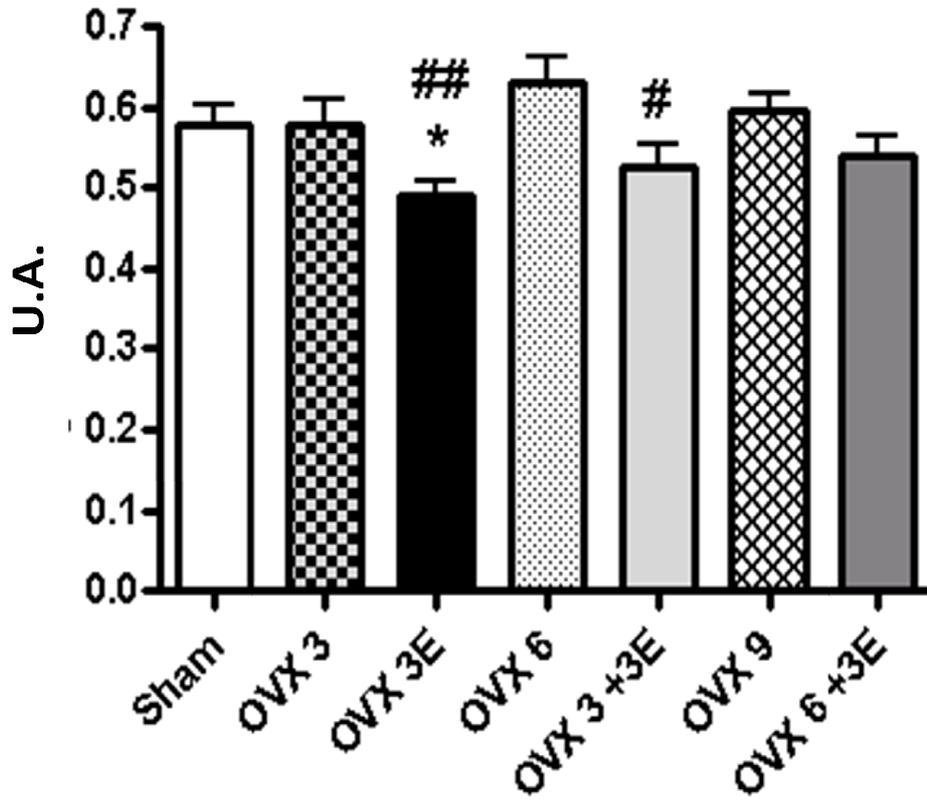


Figura 4.40.- Valores plasmáticos de espectro de RMN de glucosa de ratas ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y con reposición inmediata de estradiol durante 3 semanas inmediatamente, tras 3 y 6 de ovariectomía.

Los valores están expresados como media \pm desviación estándar ($n= 5-8$) de Unidades Arbitrarias (U.A.): área pico/área espectral total.

La diferencia estadística se expresa como: * $p<.05$ vs control; # $p<.05$ vs OVX 6; ## $p<.01$ vs OVX 3.

DISCUSIÓN

5.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Como se ha comentado en la Introducción, existen muchas teorías sobre el envejecimiento (Medvedev, 1990). Una de las más relevantes es la teoría de los radicales libres en el envejecimiento (Harman, 1956b), que propone que los radicales libres están implicados en el daño celular que acompaña al envejecimiento y a enfermedades relacionadas con el mismo.

Las mitocondrias constituyen la fuente principal de radicales libres de las células y los daños producidos por los radicales libres asociados al envejecimiento se centran fundamentalmente en los componentes mitocondriales (Miquel et al., 1980, Sastre et al., 1996, García de la Asunción et al., 1996, Hagen et al., 1997, Barja, 2000).

Uno de los mayores logros del siglo XX es el aumento de la esperanza de vida en nuestra especie. En Europa, ésta se ha duplicado entre 1900 y 1992 (Fernandez Ballesteros 1999) y, siempre, la esperanza de vida de las mujeres supera a la de los hombres.

La base de la diferencia de esperanza de vida entre hombres y mujeres sigue sin esclarecerse, pero este fenómeno se reproduce en otras especies como, por ejemplo, las ratas Wistar en las cuales las condiciones de vida son idénticas, mismos ciclos de luz-oscuridad, misma alimentación, misma temperatura, etc. (Borras et al., 2003). En este estudio se demostró que las diferencias de longevidad entre machos hembras tienen una base biológica: los estrógenos suponen una ventaja para la supervivencia de las hembras, puesto que inducen la expresión de enzimas antioxidantes, y ello las protege frente al estrés oxidativo, y por tanto les confiere una mayor longevidad.

Los estrógenos poseen un efecto cardioprotector (Arnal et al., 1996), actúan como antioxidantes *in vitro* (Ruiz-Larrea et al., 1997), tienen un efecto positivo ante el estrés oxidativo en las mitocondrias de cerebro (Irwin et al., 2008) y se postula que podrían ser posibles agentes protectores frente a la enfermedad de Alzheimer (Tang et al., 1996, Henderson et al., 2000, Bhavnani, 2003, LeBlanc, 2002), con evidentes efectos neuroprotectores (Suzuki et al., 2006), beneficiosos para la conectividad y función del hipocampo (Spencer et al., 2008, Woolley, 2007).

Sin embargo, y debido a los estudios (*Women's Health Initiative Memory Study –WHIMS–*; *Women's Health Initiative Study of Cognitive Aging –WHISCA–*) que rechazan la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos en humanos, el uso de esta hormona es controvertido (Rossouw et al., 2002, Resnick et al., 2006, Shumaker et al., 2004).

Pero, a su vez, estudios con animales sugieren que los efectos positivos de los estrógenos sobre el cerebro y la función cognitiva pueden cambiar con la edad, y ser reducidos o perderse tras el cese de estas hormonas durante un largo periodo de tiempo. Estudios con humanos apoyan esta idea (Sherwin, 2007), no solo a nivel cognitivo, sino también a nivel cardiovascular (Merz et al., 2009, Miller et al., 2009).

Desde 2002 (Resnick and Henderson, 2002), se postula como un factor clave para aprovechar los beneficios de dicha terapia, que existe una “ventana” que debe ser aprovechada, tras la pérdida de la función ovárica durante la cual la THS debe ser iniciada para que sea efectiva (Sherwin, 2007). Es lo que se ha dado a conocer como “*Hipótesis del Tiempo Crítico*”.

Aunque existen muchos estudios sobre el beneficioso papel de los estrógenos en procesos patológicos relacionados con el envejecimiento, y sobre todo, en el caso de las mujeres, a partir de la menopausia, el mecanismo de estos efectos favorables de los estrógenos no ha sido todavía investigado en profundidad.

Así pues, el **objetivo principal de la presente investigación es determinar en qué momento, tras inducir menopausia en ratas Wistar mediante la ovariectomía, es más beneficiosa la reposición con estrógenos.** Para ello, se han realizado diferentes estudios de estrés oxidativo, metabólica y de consumo cerebral de glucosa, lo cual nos ha permitido alcanzar los objetivos propuestos.

5.2. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Aunque son varios y diferentes los aspectos que se intentan abarcar en la presente investigación, también somos conscientes de las limitaciones que presenta.

Así, creemos que la principal y más importante limitación de nuestro trabajo es la **dificultad de extrapolar los resultados que hemos obtenido hacia una posible aplicación o intervención clínica en humanos, en este caso mujeres en la “perimenopausia”, porque en ellas la menopausia no aparece de forma inmediata y en los animales sí al realizarles la ovariectomía.**

Otra limitación de la presente investigación, es que el metabolismo cerebral medido con PET-CT y FDG presenta dudas a la hora de interpretar los resultados.

Esto se debe a que con la FDG realmente ¿se está cuantificando la captación de glucosa por el cerebro o también se valora el flujo sanguíneo en el mismo? ¿Hay un mayor flujo sanguíneo cerebral por la acción vasodilatadora de los estrógenos?

Por estas cuestiones, principalmente, creemos que es necesario analizar de forma mucho más específica aquellas zonas cerebrales afectadas en procesos cognitivos en la perimenopausia, no sólo con PET-CT sino con otras determinaciones, flujo sanguíneo cerebral, su modificación estructural (mediante CT o MRI) y/o MRI funcional como abogan ciertos autores (Joffe et al., 2006).

Respecto a las limitaciones del estudio en relación con la teoría de los radicales libres del envejecimiento vemos necesario evaluar los efectos de estas terapias sobre las mitocondrias cerebrales, parámetros de estrés oxidativo y genes de longevidad en el cerebro de modo general, y en áreas específicas en particular, puesto que la ovariectomía y la TSE los afecta (al estado redox y genes de longevidad) de modo significativo (Borras et al., 2010).

A colación del metabolismo cerebral y la acción estrógenica sobre este órgano, no hemos evaluado qué papel pueden jugar tras la menopausia inducida y la TSE los diferentes receptores estrógenicos y la incidencia sobre los transportadores de glucosa, en las distintas áreas cerebrales especialmente en la barrera hemato-encefálica (Vannucci et al., 1998,

Leybaert, 2005, Mann et al., 2003, Dormire, 2009, Shi and Simpkins, 1997, Nagamatsu et al., 1992).

Por dichos motivos, están programados e iniciados otros experimentos destinados a dilucidar y aportar información a estas limitaciones para completar el estudio de la presente tesis.

5.3. EFECTO DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO

Las mitocondrias constituyen la principal fuente de generación de radicales libres en el seno de las células. Es más, los componentes mitocondriales son una de las dianas del daño oxidativo que se asocia al envejecimiento (Miquel et al., 1980, Sastre et al., 1996, García de la Asunción et al., 1996, Hagen et al., 1997, Barja, 2000).

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la ovariectomía durante 4 semanas supone un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno por mitocondrias hepáticas y cerebrales (sinápticas y no sinápticas) en comparación con las ratas control (Borras et al., 2003).

En la figura 4.1 se muestra que conforme aumentan las semanas tras la ovariectomía (3, 6 y 9 semanas), la tasa de producción de peróxido de hidrógeno aumenta. Este hecho indica que los niveles de peróxido de hidrógeno en la menopausia se incrementan progresivamente al inicio de su instauración y permanecen elevados en el tiempo sin descender, lo cual favorece el daño oxidativo mitocondrial por este tipo de radical libre.

Existen datos que confirman que el estado redox del hígado es peor conforme van pasando las semanas desde la ovariectomía (Kankofer et al., 2007), hecho que también ocurre a nivel óseo, ya que también se incrementa la producción de peróxido de hidrógeno (Muthusami et al., 2005) o en aorta de ratas “sensibles a la sal” (Zhang et al., 2007).

5.4. EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS

Puesto que ha sido demostrado que la producción mitocondrial de agentes oxidantes está relacionada con la longevidad (Ku et al., 1993), medimos la tasa de producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratas hembra ovariectomizadas de 3, 6 y 9 semanas y tratadas con estradiol.

Las figuras 4.2 a 4.4 muestran que las mitocondrias de las ratas ovariectomizadas producen una mayor cantidad de estas especies reactivas de oxígeno que las de hembras de la misma edad mientras que las tratadas con estradiol inmediatamente tras la ovariectomía poseen niveles similares.

Otro aspecto muy importante es que al iniciar el tratamiento hormonal tras un periodo largo de ovariectomía no se consiguen revertir los efectos perjudiciales de la misma, al contrario de lo que ocurre cuando la reposición se instaura inmediatamente después de inducirse la menopausia mediante cirugía.

Los efectos favorables de los estrógenos en varias enfermedades, incluyendo las cardiovasculares y neurológicas, se atribuyen a las propiedades antioxidantes de los estrógenos debido a su naturaleza fenólica (Ruiz-Larrea et al., 1997). Sin embargo, la cantidad de estrógenos empleada en las terapias sustitutivas de estrógenos es probablemente insuficiente para que los estrógenos actúen como antioxidantes *per se*.

Por ejemplo, en humanos, se administra una dosis diaria de 50 μg de estrógenos, mientras que se recomiendan dosis de 400 mg/día de vitamina E para ser efectiva como antioxidante (Diplock, 1998, Diplock et al., 1998), es decir se requieren dosis 8000 veces mayores que de estrógenos.

Según los resultados de Borras y cols. (Borras et al., 2005) el 17β -estradiol, a concentraciones fisiológicas, se une a los receptores estrogénicos de membrana, activándolos y desencadenando una señal mediada por las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP Kinasas). Las sucesivas fosforilaciones de las kinasas, mediadas por kinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) acaban fosforilando la proteína inhibitoria de NF- κ B (I κ B), produciendo la liberación del Factor Nuclear kappa B (NF- κ B) que se transloca al núcleo donde se une a regiones específicas en los promotores de las enzimas Mn-SOD y glutatión peroxidasa, iniciando la transcripción génica. Una vez terminada la síntesis, en los ribosomas, estas enzimas migran a la mitocondria donde ejercen un efecto antioxidante disminuyendo los niveles de peróxido de hidrógeno. La figura 5.1 muestra un esquema del mecanismo propuesto (Borras et al., 2005).

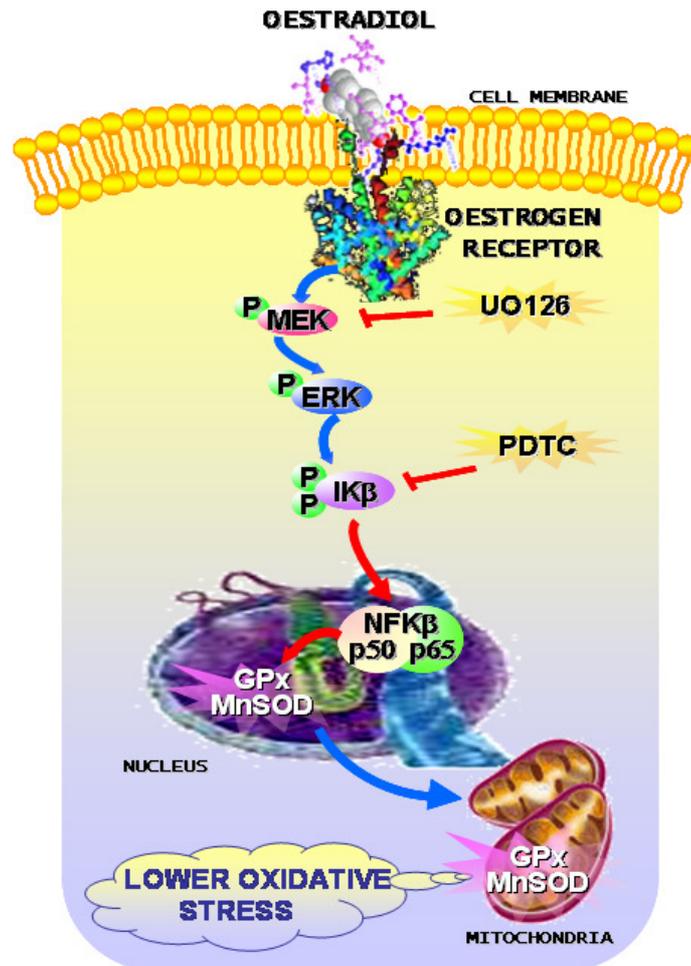


Figura 5.1. Esquema del mecanismo de acción del estradiol (tomado de Borrás et al., 2005)

Sin embargo, la pérdida de receptores estrogénicos puede alterar el anterior mecanismo de acción de los estrógenos. Así, Moorthy y cols. (Moorthy et al., 2005) mantiene que las ratas hembras presentan ciclos irregulares a la edad de 12 meses, que no ocurren con 3 meses de edad. Lu y cols. (Lu et al., 1979) encontraron un 65% en el aumento de incidencia de

esta irregularidad en los ciclos a partir de 12 meses de edad, lo que puede reflejar un efecto del envejecimiento sobre esta función.

De hecho, Sohrabji y cols. revisaron el papel protector de los estrógenos cuando no se administra en “edad reproductiva” y sí en “senescentes”, sugiriendo con sus estudios que tienen un efecto deletéreo en aquellos órganos, como por ejemplo, el cerebro por un estado prolongado ausente de estrógenos. Este efecto desfavorable de la THS en edad avanzada puede deberse al potencial mecanismo de los cambios asociados a la edad de la pérdida de receptores estrogénicos, especialmente el “alfa” (Sohrabji, 2005).

5.5. EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE GLUTATION PEROXIDASA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS

Se sabe que la menor producción de radicales libres y los mayores niveles de antioxidantes en las hembras es, en parte, lo que confiere una mayor longevidad a las hembras en comparación con los machos. Así mismo, se ha demostrado que los estrógenos inducen la expresión de enzimas antioxidantes (Borras, 2003, Vina et al., 2003) y, por ejemplo, en el caso de aorta de ratas “sensibles a la sal” la administración de estrógenos durante 4 semanas tras la ovariectomía revertió el descenso de la actividad

de la GPx tras dicha “menopausia inducida” quirúrgicamente (Zhang et al., 2007).

Por todo ello y por su acción detoxificante sobre el peróxido de hidrógeno, estudiamos la actividad de la glutatión peroxidasa en mitocondrias aisladas de hígado.

Nuestros resultados (figuras 4.5 a 4.8) muestran que en las ratas ovariectomizadas disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa y solamente en el grupo tratado con estradiol inmediatamente después de la ovariectomía (OVX 3E, figura 4.6) este efecto es revertido. Así pues, el tratamiento con estradiol parece ser sólo efectivo si la reposición se produce inmediatamente tras la instauración de la menopausia, y deja de serlo si esperamos varias semanas para comenzar.

Este hecho resulta del gran interés para entender la efectividad de la terapéutica hormonal sustitutiva, pues en la mayoría de los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha, tanto con resultados beneficiosos (Manning et al., 2001) como perjudiciales (Rossouw et al., 2002), este factor no ha sido tenido en cuenta y, sin embargo, parece ser muy importante a la hora de tomar la decisión de recomendar la terapia hormonal sustitutiva o no a las mujeres menopáusicas.

También, se ha demostrado que el 17β -estradiol, a concentraciones fisiológicas, sobreexpresa enzimas antioxidantes (Mn-SOD y GPx) relacionadas con la longevidad a través de la cascada ERK1/ERK2 en la vía de señalización de las MAP kinasas (NF κ B) por la acción sobre receptores estrogénicos de membrana (Borras et al., 2005).

En estudios previos, nuestro grupo ha encontrado que animales vertebrados que sobreexpresan Mn-superóxido dismutasa y glutatión

peroxidasa, poseen una vida media más prolongada. Así pues, podríamos considerar que las ratas hembras se comportan como dobles transgénicos en comparación con los machos, sobreexpresando ambas enzimas antioxidantes mitocondriales (Borras, 2003). El hecho de que la actividad de la glutatión peroxidasa sea superior en hembras, fue observado previamente alrededor de los años 60 (Pinto and Bartley, 1969).

5.6. EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS

Una vez establecido que existe una diferencia de estrés oxidativo entre los diversos grupos estudiados, determinamos si estas diferencias se traducían también en diferencias en daño oxidativo a biomoléculas como los lípidos.

Determinamos, para ello, los niveles de malondialdehído (MDA) en mitocondrias aisladas de hígado, un producto formado a partir de la hidrólisis ácida, a 100° C, de los lipoperóxidos. Los lipoperóxidos se forman a partir de una cadena de reacciones de peroxidación de lípidos de membranas plasmáticas, que ocurre en presencia de radicales libres de oxígeno.

Al igual que la oxidación del glutatión podemos considerarla un parámetro de medida de estrés oxidativo agudo, el MDA muestra, por el

contrario, modificaciones más a largo plazo. Podemos, por tanto, considerarlo un parámetro de medida de estrés oxidativo crónico.

El método por HPLC de medida de MDA es muy específico y sensible, y distingue entre la concentración de malondialdehído y otros aldehídos que pueden reaccionar con el TBA (ácido tiobarbitúrico) (Bermejo et al., 1997). Por este motivo nos decantamos por este parámetro de medida para estudiar la lipoperoxidación en nuestro modelo.

En la figura 4.10 vemos que el tratamiento inmediato con estradiol tras la ovariectomía es efectivo en la prevención del daño oxidativo a lípidos tras dicha menopausia inducida.

Sin embargo y, como se muestra a continuación en la figura 4.11, esta mejora tras la administración con estradiol se da en todos los grupos estudiados aunque no de manera significativa respecto a su grupo ovariectomía.

5.7. EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PLASMA DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS

Posteriormente, comprobamos si los daños acaecidos a nivel hepático se extendían a nivel sistémico determinando los niveles de peroxidación lipídica en el plasma de los diversos grupos (figuras 4.13 a 4.16).

Como se comenta en el apartado correspondiente de Resultados, parece ser que solamente el grupo de ovariectomía de 3 semanas eleva significativamente los niveles de MDA, actuando beneficiosamente la reposición con estradiol durante este periodo, lo cual corrobora los resultados encontrados por Topcuoglu y cols.(Topcuoglu et al., 2009).

Vemos también que a medida que transcurre el tiempo de ovariectomía y de tratamiento con estradiol, no hay beneficios con la terapéutica hormonal, aunque es de destacar que progresivamente, los valores basales en ambos grupos van aumentando ligeramente.

Este último aspecto, parece ser que puede deberse al daño progresivo que se va dando por causa del envejecimiento tras la instauración de la menopausia.

En general, la terapia hormonal incluyendo las dosis bajas (Genant et al., 1997), disminuye el colesterol total, el colesterol LDL, y la lipoproteína (a) (Lobo, 1991, Soma et al., 1993, Martin and Freeman, 1993, Miller et al., 1995, Pickar et al., 1998a, Pickar et al., 1998b); a diferencia de otras terapias, los estrógenos equinos incrementan los triglicéridos en un 10% e incrementan el colesterol HDL en una proporción mayor que las otras, efecto que puede estar atenuado por la adición de un progestágeno (Miller et al., 1995); el tamoxifeno incrementa los triglicéridos de forma importante en algunas pacientes (Genant et al., 1997).

En las pacientes diabéticas se encontró inicialmente un efecto adverso de la terapia hormonal (Robinson, 1996) que no se ha demostrado posteriormente en otros estudios (Andersson et al., 1997, Samaras et al., 1999); por el contrario, se halló mejoría del perfil lipídico y del control

glicémico, con disminución en los niveles de glicemia e insulina (Andersson et al., 1997, Friday et al., 2001, Manning et al., 2001, Manning et al., 2002).

En este sentido los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con los datos que acabamos de mostrar en cuanto que previenen la oxidación de los lípidos.

5.8. EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CEREBRO DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS

Ya que la masa cerebral está compuesta principalmente por tejido lipídico, decidimos analizar el daño oxidativo a nivel de lipopéroxidos de este órgano. Sorprendentemente y, como muestran las figuras 4.17 a 4.20, hubo bastante variación en los niveles de MDA, aunque no significativos, en los diferentes grupos estudiados, salvo en el grupo OVX 3, el cual disminuyó respecto al grupo control. Es extraño que el periodo en el cual encontramos un mayor daño oxidativo de otras moléculas y en otros tejidos, sea en el que se produce un ligero beneficio en este caso. Ello puede deberse a la heterogenicidad de las muestras y su variabilidad, ya que el cerebro es extremadamente heterógeno y cada una de las zonas y áreas que lo conforman deberían ser estudiadas por separado y no conjuntamente.

Existe muy poca bibliografía al respecto para poder comparar el resultado obtenido. TopÇouglu y cols. (Topcuoglu et al., 2009) encontraron que la ovariectomía aumentó los niveles de MDA en cerebro y cómo estos

niveles eran menores tras la administración de varias combinaciones de estrógenos.

5.9. EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HÍGADO DE RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS

Tras observar el efecto perjudicial de la ovariectomía sobre los lípidos en las mitocondrias aisladas de hígado, y el efecto beneficioso de la reposición con estradiol en diferentes periodos, estudiamos este parámetro en el tejido hepático.

Como se muestran en las figuras 4.21 a 4.24 no hay diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados tanto de ovariectomía como de reposición con estradiol.

Otros autores si han encontrado lipoperoxidación en homogenados de hígado tras ovariectomía (Kankofer et al., 2007, Topcuoglu et al., 2009) y como se revertían estos efectos tras la administración de estrógenos (Topcuoglu et al., 2009).

Este nos lleva a pensar que la mitocondria aislada, en este caso de hígado, es la referencia a nivel oxidativo, ya que actúa como protector (defensa antioxidante) frente a la formación de radicales libres de la que es la principal generadora (Miquel et al., 1980, Sastre et al., 1996, García de la Asunción et al., 1996, Hagen et al., 1997, Barja, 2000, Borrás et al., 2003, Borrás, 2003).

**5.10. EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS
SOBRE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA
EN CORAZÓN DE RATAS HEMBRAS
OVARIECTOMIZADAS**

Los estrógenos incrementan el metabolismo de los diferentes tipos de colesterol LDL y aunque no cambia la concentración de LDL densa disminuye su tiempo de residencia en plasma (Campos et al., 1997); igualmente, evitan la oxidación de las lipoproteínas (Sack et al., 1994, McKinney et al., 1997) disminuyendo la aterogénesis y en animales de experimentación evitan la progresión de los ateromas (Lacut et al., 2003); estudios clínicos muestran un incremento de la supervivencia de las pacientes con enfermedad y estenosis coronaria (Ridker et al., 1999) y disminución de los ateromas en la carótida (Dubuisson et al., 1998, Bernini et al., 1999).

En las figuras 4.24 a 4.28 podemos ver cómo únicamente la reposición inmediata con estradiol durante 3 semanas (OVX 3) disminuye el daño oxidativo a lípidos en el corazón respecto al grupo control y los demás grupos experimentales. Estos resultados indican el posible beneficio de los estrógenos de forma inmediata frente a la instauración de la menopausia (inducida por ovariectomía en nuestro estudio) y cómo a medida que los sujetos envejecen, tanto la ovariectomía como la reposición hormonal no parecen tener un efecto positivo puesto que el daño oxidativo se va incrementando progresivamente (figura 4.28). Como también remarcó el estudio de Shehata y Kamel (Shehata and Kamel, 2008) donde encontraron

que la administración durante 4 semanas de THS en ratas Wistar anuló los datos negativos en los parámetros de estrés oxidativo (MDA, GSSG, ox-LDL) estudiados tras realizarles la ovariectomía.

Como concluía la publicación de Rosano (Rosano et al., 2003), los posibles efectos cardioprotectores de la THS, casi siempre se habían evaluado en el caso de humanos, y también en la presente tesis, en “menopausia temprana”, por lo que se hace patente la necesidad de estudiar este tipo de terapia de forma más concreta, como por ejemplo, plantea el estudio *Kronos Early Estrogen Prevention Study* (KEEPS) (Miller et al., 2009). El estudio WHI (Rossouw et al., 2002) terminó antes de tiempo debido a los problemas que originó en cuanto a la incidencia de cáncer de mama y de otro tipo, sin llegar a garantizar los efectos cardiovasculares, seguramente por la edad de las participantes (65 años, aproximadamente), como también ocurrió con el estudio HERS (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*) (Grady et al., 1992, Hulley et al., 1998). El estudio PEPI (*Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions prospective trial*) fue realizado con mujeres postmenopáusicas sanas entre 45 y 64 años de edad, donde sí hubo resultados satisfactorios a nivel cardiovascular de la THS (The Writing Group for the PEPI Trial, JAMA, 1995), confirmado también con otros estudios (Manson et al., 2007, Allison et al., 2008, Spencer et al., 1999, Darling et al., 1997, Herrington et al., 1999).

5.11. EFECTO DE LA REPOSICIÓN DE ESTRÓGENOS SOBRE EL CONSUMO CEREBRAL DE GLUCOSA *IN VIVO* EN RATAS HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS

La mujer, durante su etapa fértil, tiene una mayor sensibilidad a la insulina que el hombre, expresada como Globulina unida a las hormonas sexuales (*Sex Hormone Binding Globulin*, –SHBG–). El San Antonio Heart Study demostró que este parámetro refleja en parte el status endógeno estrogénico (a mayores niveles de SHBG, mayores niveles de estrógenos endógenos) y que el SHBG se correlaciona negativamente con la insulina en ayuno y las respuestas de la glucosa e insulina a la ingesta oral de glucosa (Goodman-Gruen and Barrett-Connor, 1997, Ding et al., 2009).

En un estudio con animales la reposición con 17β -estradiol mejoró la secreción de insulina en islotes celulares y, con ello, la respuesta a la glucosa, así como disminuyendo la resistencia a la insulina (Skouby, 1988). Aunque también en humanos, se han evaluado el efecto de la terapéutica hormonal sustitutiva sobre la incidencia de diabetes, como el estudio HERS (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*), donde la incidencia de diabetes fue un 35% menor entre las que tuvieron reposición con estrógenos y progesterona de un total de 2029 mujeres postmenopáusicas con enfermedad coronaria documentada (Kanaya et al., 2003).

Otros estudios, como el *Women's Health Initiative (WHI) randomized controlled trial* (Rossouw et al., 2002) tuvieron que detenerse al superar los riesgos a los beneficios de la reposición con estrógenos más progesterona, que como se ha indicado anteriormente se realizó en mujeres

de 65 años, aproximadamente, con la menopausia ya instaurada durante mucho tiempo.

Desde hace más de dos décadas, se están llevando a cabo estudios donde se analiza y evalúa el consumo metabólico de glucosa a nivel fisiológico y/o fisiopatológico con la técnica de PET (Phelps et al., 1979, Huang et al., 1980), sobre todo en los cambios que acontecen con el envejecimiento (Kushner et al., 1987, Loessner et al., 1995, Ishii et al., 1997, Garraux et al., 1999, Mosconi et al., 2004b, Pardo et al., 2007, Borrás et al., 2009).

Los equipos PET han ido evolucionando y perfeccionándose cada vez más, tanto a en su tecnología y programas informáticos, como en la planificación de los estudios y el análisis de sus resultados. Sin embargo, hoy día se plantean aún dudas respecto a la metodología que se usa para extraer los resultados (Yamaji et al., 2000, Keyes, 1995) y el correcto manejo de los animales en dichos estudios (Fueger et al., 2006, Schiffer et al., 2007), etc.

Además, como hemos señalado en la Introducción, existen muchos estudios que relacionan el consumo cerebral de glucosa con diversas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, especialmente la enfermedad de Alzheimer (Small et al., 2006a, de Leon et al., 2007, Mosconi et al., 2009, Mistur et al., 2009, Mosconi et al.).

Por ese motivo, se han realizado varios estudios evaluando los efectos que podría tener la reposición con estrógenos en mujeres postmenopáusicas y la incidencia o no, sobre todo, en demencia o enfermedad de Alzheimer (Ohkura et al., 1995, Resnick et al., 1998, Waring

et al., 1999, Eberling et al., 2000, Eberling et al., 2003, Maki and Resnick, 2000, Rasgon et al., 2005, Rasgon et al., 2001, Schonknecht et al., 2003).

En este sentido, el estudio de Rasgon (Rasgon et al., 2005) concluyen que los estrógenos preservan el metabolismo cerebral de aquellas regiones que se ven disminuidas en las fases tempranas y más avanzadas de la enfermedad de Alzheimer, protegiendo también el descenso que hay en las mujeres postmenopáusicas, especialmente en la corteza cingulada posterior.

Como muestran nuestros resultados (figuras 4.29), en primer lugar hay un descenso con el envejecimiento sobre el consumo cerebral de glucosa en ratas hembra. Resultado que nuestro grupo comprobó recientemente que también se daba en una especie de ratones que envejecen de forma prematura –SAM: *senescence accelerated mice*– (Borras et al., 2009).

Ya en 1998, Ernst y cols. revisaron la bibliografía y observaron por PET, SPECT e inhalación de N₂O como, de forma generalizada, se producía un descenso de la actividad cerebral. Estos estudios en humanos desde los años 80 muestran unos cambios relacionados con el envejecimiento en cuanto a imagen funcional del cerebro utilizando FDG para la captación y metabolismo de la glucosa, ¹⁵O, ¹³³Xe y N₂O para evaluar, además el flujo sanguíneo cerebral (Ernst et al., 1999).

Posteriormente la revisión de Cosgrove y cols. (Cosgrove et al., 2007) amplía y completa los estudios funcionales con estudios de estructura (masa, volumen, etc.) y relaciona los cambios acaecidos con el envejecimiento junto a las diferencias entre sexos, que también varías

publicaciones reflejaban (Xu et al., 2000, Perneczky et al., 2007b, Perneczky et al., 2007a).

En las figuras siguientes de la presente memoria (figura 4.30), se observa cómo la ovariectomía de 3 y 6 semanas en ratas hembra produce un descenso global en el consumo cerebral de glucosa, similar a las ratas viejas (figura 4.29).

Sin embargo, el tratamiento con estradiol produce un aumento significativo en dicho metabolismo cerebral únicamente si éste se inicia tras producirse la ovariectomía (3 semanas de estradiol inmediatamente después de la ovariectomía, figura 4.31). En los grupos donde se retrasó este inicio del tratamiento (figuras 4.32), podemos apreciar que no hay recuperación en los valores metabólicos de glucosa en el cerebro de dichos grupos experimentales. En mujeres postmenopáusicas que toman estrógenos hay una menor incidencia de desarrollo de enfermedad de Alzheimer (Eberling et al., 2000).

A pesar de las limitaciones que exponían los autores de los anteriores estudios, ya sea por tamaño muestral insuficiente, por efectos no esperados, así como por la edad y patologías subyacentes, parece ser que los estrógenos tienen un efecto positivo en el consumo cerebral de glucosa y flujo sanguíneo cerebral evaluado con PET y/o SPECT.

Nuestros resultados concuerdan en parte con ellos, pero parece ser que este efecto positivo depende, en gran medida, del momento de aplicación del tratamiento.

Recientemente, se ha publicado un estudio sobre el efecto a corto plazo del cese de la función hormonal en animales de mediana edad con o sin terapéutica hormonal con estrógenos y la capacidad de regular los

niveles proteicos de acetiltransferasa en el hipocampo y corteza prefrontal en ratas (Bohacek et al., 2008). En él se recuerda que el papel que juega la reposición con estrógenos en la prevención o retrasos de los cambios en el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer es controvertido. Sin embargo, como se aboga en el anterior estudio de de Bohacek et al., son varios grupos de investigación los que creemos que su éxito puede depender, críticamente, del tiempo de inicio del tratamiento una vez se produce la menopausia (Resnick and Henderson, 2002, Maki, 2006b, Maki, 2006a, Sherwin, 2007).

5.12. PERFIL METABÓLICO EN PLASMA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹H-NMR) DE RATAS OVARIECTOMIZADAS Y EL EFECTO DE LA REPOSICIÓN CON ESTRADIOL

Uno de los objetivos de la presente tesis era estudiar el efecto sobre el perfil metabólico de la terapia sustitutiva con estrógenos (TSE) administrada a distintos tiempos tras la ovariectomía (OVX) en ratas jóvenes.

Los resultados obtenidos podrían ayudar a completar e interpretar los resultados obtenidos en los demás experimentos acerca de la importancia o no del inicio temprano de la TSE.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) del espectro de RMN en plasma nos permitió detectar agrupaciones y patrones de las distintas muestras en función de su composición metabólica global.

Así, en la figura 4.34 se observa cómo los distintos grupos de ovariectomía se alejan de la puntuación obtenida en el PCA por el grupo control, apareciendo de forma agrupada indistintamente de la duración del periodo. Además, vimos (figura 4.35) cómo la reposición inmediata con estradiol (OVX 3E) hacía que las puntuaciones de este grupo se asemejasen al control, diferenciándose claramente del grupo ovariectomía (OVX 3). Este resultado difiere de los demás grupos repuestos a periodos más tardíos (OVX 3 +3E y OVX 6 +3E), ya que no se separaban de sus respectivos grupos ovariectomía y permanecían alejados a su vez del grupo control (figura 4.36).

Basándonos en un estudio reciente (Bertram et al., 2009) donde se analizó el plasma de chicos y chicas jóvenes (17 años), podemos decir que hay una diferencia atribuida a las hormonas sexuales importante, ya que dicho estudio encontró que el sexo tenía un gran impacto sobre el metabonoma de los sujetos.

Este hecho trasladado a nuestro estudio indicaría el efecto del estradiol administrado a los diferentes grupos, pero solamente mejorando el perfil metabólico de aquellos repuestos inmediatamente (figura 4.37), lo cual concuerda con otros resultados obtenidos en la presente tesis, apoyando la hipótesis del “tiempo crítico” en el inicio de la TSE.

5.13. CUANTIFICACIÓN METABÓLICA EN PLASMA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (¹H NMR) DE RATAS OVARIECTOMIZADAS Y EL EFECTO DE LA REPOSICIÓN CON ESTRADIOL

Este análisis (PCA), al ser capaz de representar estructuras de datos multivariable complejas (los componentes principales explican, al menos, el 59.5% de la varianza), nos permitirá detectar agrupaciones y patrones de las distintas muestras en función de su composición metabólica global. A su vez, el peso en cada eje (componente principal) de las distintas resonancias y la comparación de su valor respecto al valor medio en todos los espectros nos indica los metabolitos más relevantes.

Analizando el espectro de las muestras estudiadas se observa que el componente que tiene mayor peso en la distribución del PCA son los lípidos (figura 4.34). El perfil lipídico y de lipoproteínas en plasma suele dominar el espectro de RMN. Por ello, las diferencias en el perfil lipídico, si existen, dominan las ponderaciones en el PCA. Sin embargo, el gran solapamiento de estas señales en el espectro no permite una cuantificación individual de los lípidos que contribuyen al perfil, aunque sí permiten evaluar variaciones globales en la distribución de los mismos.

No se tuvo en cuenta en esta investigación, pero lo hemos planificado para realizar en experimentos futuros, el posible efecto de la ovariectomía sobre el aumento de peso, además de los diferentes componentes lipídicos que se ven alterados tras la menopausia y la acción de la TSE sobre ellos (Campos et al., 1997). Ello es debido a que estudios publicados muy recientemente (Witte et al., 2010) consideran que la

ovariectomía produce un aumento de peso mediado por hiperfagia y disminución en la actividad motriz en ratones, así como gasto metabólico y también una menor actividad motriz en ratas, aumento de peso que también observaron TopÇuoglu y cols. (Topcuoglu et al., 2009) al estudiar el daño oxidativo a proteínas y su relación con la administración de estrógenos.

El perfil global de lípidos representado en el PCA permite detectar similitudes globales a nivel de composición lipídica entre los distintos grupos. Para comprobar de modo cuantitativo el posible impacto en el metabolismo de triglicéridos cuantificamos el glicerol.

En la figura 4.38 observamos cómo el glicerol tiene una tendencia ascendente no significativa con la ovariectomía (OVX 3 y 6), pero sí en el grupo OVX 9 ($p < 0.05$). Sin embargo, y contrariamente, la reposición con estradiol fue significativamente diferente a su grupo ovariectomía en cada uno de los tres periodos estudiados, pero no respecto al grupo control, salvo en el grupo OVX 3E ($p < 0.05$).

Ello puede indicarnos que la ovariectomía hace que el metabolismo de los lípidos esté aumentado, normalmente por el uso de triglicéridos, no así en el caso de los que se reponen con estradiol. Solamente en el caso de la reposición inmediata (OVX 3E) hay diferencias en la presencia de glicerol en plasma respecto a su grupo ovariectomía.

A partir de estos resultados y considerando la posible relación con el metabolismo de la glucosa medido por PET, además de que ambos metabolitos (glicerol y glucosa) están inversamente relacionados, evaluamos el metabolito Glucosa.

La figura 4.39 muestra cómo los niveles de glucosa circulante en plasma medidos por ^1H NMR son menores en OVX 3E respecto al grupo

control y OVX 3, lo que se podría correlacionar con el mayor consumo observado en el mismo grupo en el consumo cerebral de glucosa por PET). Contrariamente a los resultados obtenidos por PET, el grupo OVX 3 +3E también difiere significativamente de su grupo OVX (OVX 6) pero ya no es menor que el grupo control, efecto que va disminuyendo progresivamente a medida que aumenta el periodo de la ovariectomía, puesto que en el último de ellos (OVX 9 y OVX 6 +3E) se pierde completamente.

5.14. IMPORTANCIA DEL COMIENZO INMEDIATO DE LA TERAPÉUTICA HORMONAL SUSTITUTIVA TRAS LA MENOPAUSIA

El tratamiento con estradiol parece ser sólo efectivo si la reposición se produce inmediatamente tras la instauración de la menopausia, y deja de serlo si esperamos varias semanas para comenzarlo (ver figuras 4.4, 4.8, 4.12, 4.16, 4.20, 4.24, 4.28, 4.33 y 4.37).

Este hecho resulta de gran interés para entender la efectividad de la terapéutica hormonal sustitutiva, pues en la mayoría de los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha, tanto con resultados beneficiosos (Manning et al., 2001) como perjudiciales (Rossouw et al., 2002), este factor no ha sido tenido en cuenta, y sin embargo parece ser muy importante a la hora de tomar la decisión de recomendar la terapia hormonal sustitutiva o no a las mujeres menopáusicas, como así lo afirman estudios recientes (Bohacek et al., 2008, Miller et al., 2009).

Por lo tanto, se hacen necesarios más estudios, en primer lugar con animales de laboratorio, para extrapolar sus resultados de forma correcta a los tratamientos en humanos y, así, se puedan extraer conclusiones de aplicación clínica (Birge, 1996, Lethaby et al., 2008), con las limitaciones anteriormente mencionadas.

Así pues, nos planteamos: ¿En la “perimenopausia” sería factible el comenzar con estas terapias? ¿a qué tipo de sujetos (sanos, con enfermedades ya instauradas desde antes de la menopausia, gravedad de las mismas, menopausia inducida,...)?, etc.

Ampliar a otros órganos de interés, no sólo a nivel cerebral estas investigaciones, ya que artículos recientes como la revisión de Barret (Barrett-Connor and Laughlin, 2009) o el posicionamiento de la Sociedad Norteamericana de Menopausia (Utian et al., 2008), aconsejan para iniciar la TSE con efectos cardiovasculares positivos lo más inmediatamente posible tras la menopausia con una duración media de 5 años extraída de los estudios analizados y recomendando periodos más largos. Además, se sugiere que la mortalidad total se reduce en aquellos casos que la TSE se inicia pronto tras la menopausia y hay un menor riesgo cardiovascular. También, se recomienda para prevenir el deterioro cognitivo en aquellas zonas afectadas por la la enfermedad de Alzheimer, pero no se aconseja esta terapia para las mujeres que presentan síntomas de declive o envejecimiento cognitivo o mayores de 65 años.

Así mismo, el último posicionamiento de la Sociedad Norteamericana de Menopausia (North American Menopause Society, 2010), concluye que las últimas investigaciones apoyan el inicio de la TSH cercana a la menopausia para tratar los síntomas relacionados; tratar o

reducir el riesgo de ciertos desórdenes (como osteoporosis o fracturas), o ambos. El ratio beneficio/riesgo para las TSH en la menopausia es favorable para las mujeres que inician la TSH muy próxima a la menopausia, pero disminuye en mujeres mayores o a medida que transcurre el tiempo desde la instauración de la menopausia en mujeres no tratadas previamente.

Aunque como dijo el profesor David H. Barlow de la Universidad de Oxford en “*Who understands the menopause?*” (Barlow, 1997), debemos seguir trabajando y cooperando para lograr “entenderla”.

Los resultados de esta tesis resumidos en las Conclusiones, intentan dirigirse hacia ese entendimiento.

***SUMMARY OF
RESULTS AND
DISCUSSION***

6.1. SUMMARY

Females live longer than males in many mammalian species, including humans. This natural phenomenon can be explained on the basis of the mitochondrial theory of aging. Mitochondria are a major source of free radicals in cells. Mitochondria from female rats generate half the amount of hydrogen peroxide than those of males and have higher levels of mitochondrial reduced glutathione. Mitochondria from ovariectomized rats generate higher hydrogen peroxide levels than controls (Sham) but are diminished only if estrogen replacement therapy (ERT) is initiated immediately after induced menopause. The same pattern occurs with glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activity in mitochondria showing an increase in this antioxidant enzyme and a recovery of oxidative damage to lipids in heart and plasma after the negative effects produced by ovariectomy.

Aging and induced menopause decrease the brain glucose uptake *in vivo* measured by PET and ERT is only relatively beneficial in the immediate treatment group. This “critical time” to initiate the treatment after ovariectomy reflects similar metabolomic profiles compared with control and young rat groups.

The challenge for the future is to find a molecular mechanism that can explain the beneficial effects of ERT and to discover if there are molecules which mimic these effects too.

6.2. INTRODUCTION

There are many theories about aging (Medvedev, 1990). One of the most important is the free radical theory of aging (Harman, 1956a), which proposes that free radicals are involved in cell damage that accompanies aging and diseases related thereto. In addition, there is a relationship between mitochondrial peroxide production and longevity in mammals (Ku et al., 1993, Lopez-Torres et al., 1993).

Mitochondria are the main source of free radicals in cells. The damage caused by free radicals associated with aging mainly focuses on mitochondrial components (Miquel et al., 1980, Sastre et al., 1996, García de la Asunción et al., 1996, Hagen et al., 1997, Barja, 2000, Navarro and Boveris, 2004).

One of the greatest achievements of the twentieth century is the increased life expectancy of our species. In Europe, it doubled between 1900 and 1992 (Fernandez Ballesteros 1999) and the life expectancy of women has always exceeded that of men.

The basis of the difference in life expectancy between men and women remains unclear but it also occurs in other species, such as the Wistar rat, when living under identical conditions, same cycles of light and dark, same food, same temperature, etc. (Borras et al., 2003).

Estrogens have a cardioprotective effect (Arnal et al., 1996), act as antioxidants *in vitro* (Ruiz-Larrea et al., 1997), have a positive effect against the oxidative stress in brain mitochondria (Irwin et al., 2008) and it has been

postulated that there could be potential protective agents against Alzheimer's Disease (Tang et al., 1996, Henderson et al., 2000).

However, because some studies (*Women's Health Initiative Memory Study –WHIMS-*, *Women's Health Initiative Study of Cognitive Aging*, -WHISCA-) reject hormone replacement therapy with estrogen in humans, the use of this hormone is controversial (Rossouw et al., 2002, Resnick, 2006 #3139, Shumaker et al., 2004).

But, in turn, animal studies suggest that the positive effects of estrogen on the brain and cognitive function may change with age, and be reduced or lost after the cessation of these hormones over a long period of time. Human studies support this idea (Sherwin, 2007), not only at the cognitive level, but also at the cardiovascular level (Merz et al., 2009, Miller et al., 2009).

Resnick in 2002 (Resnick and Henderson, 2002) postulated that there is a "window" that must be taken into account after the loss of ovarian function during which HRT should be initiated to be effective (Sherwin, 2007) as a key factor in the benefits of such therapy. This is what has become known as the "*Critical Time Hypothesis*".

Although there are many studies on the beneficial role of estrogens in pathological processes associated with aging, especially after menopause in the case of women, the mechanism of the favorable effects of estrogen has not yet been investigated in depth.

Thus the main objective of this research is to determine the point in time after menopause induced by ovariectomy in Wistar rats when ERT is most beneficial. To do this, several studies have been performed on

oxidative stress, metabolomics, and cerebral glucose consumption, which have enabled us to achieve the objectives.

6.3. CRITICAL EVALUATION OF THE METHODOLOGY: BENEFITS/LIMITATIONS OF THE TECHNIQUES

Although there are many different aspects we try to cover in this investigation, we are also aware of the limitations it presents.

Thus, we believe that the main and most important limitation of our work is the **difficulty of extrapolating the results we have obtained towards a possible application in humans or clinical intervention, in this case women in the "perimenopause", as they do not have menopause immediately as ovariectomised animals do.**

Another limitation of this research is that brain metabolism measured with FDG by PET-CT presents difficulties when interpreting the results.

This is because we do not know whether FDG really quantifies glucose uptake by the brain or whether it also evaluates blood flow. Is there a higher cerebral blood flow by the vasodilator action of estrogens?

For these issues, for the most part we believe it is necessary to analyze much more specifically those brain areas involved in cognitive processes in perimenopause, not only by PET-CT but by other

determinations, cerebral blood flow, structural modification (by CT or MRI) and/or functional MRI as some authors argue (Joffe et al., 2006).

Regarding the study limitations related to the free radical theory of aging, we need to evaluate the effects of these therapies on brain mitochondria, parameters of oxidative stress, and longevity genes in the brain in general and particularly in specific cerebral areas, since ovariectomy and ERT have a significant effect on redox state and longevity genes (Borras et al., 2010).

Regarding brain metabolism and estrogenic action on this organ, we have not evaluated what role oestrogen receptors can play and the different impact on glucose transporters in the brain regions, particularly in blood-brain barrier, after induced menopause and ERT (Vannucci et al., 1998, Leybaert, 2005, Mann et al., 2003, Dormire, 2009, Shi and Simpkins, 1997, Nagamatsu et al., 1992).

For these reasons, we have scheduled and initiated experiments designed to elucidate and provide information on these limitations to complete the study of this thesis.

6.4. EFFECTS OF OVARIECTOMY AND ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY ON THE OXIDANT PRODUCTION BY HEPATIC MITOCHONDRIA

In vivo experiments show that estrogens have a powerful antioxidant effect: mitochondrial H₂O₂ production is significantly increased (by more

than 50%) after ovariectomy and this is completely prevented when ovariectomized rats are treated with estradiol at doses similar to those used in ERT (for details see (Borras et al., 2003)). Therefore, it is clear that estrogens do not act as chemical antioxidants *in vivo*, but exert their antioxidant effect by up-regulation of the expression of antioxidant genes and antioxidant enzymes.

We evaluated the oxidative stress in isolated hepatic mitochondria from Wistar rats of 3-4 months that underwent ovariectomy to induce menopause, a sham group being used as controls until sacrifice at 3, 6, and 9 weeks (OVX 3, 6 and 9). The ERT groups were given 17 β -estradiol (1 μ g/kg/day) subcutaneously for three weeks, starting the day after surgery (OVX 3E) or three or six weeks later, for the same period of three weeks (OVX 3+3E and OVX 6+3E).

We measured the levels of H₂O₂ in the isolated mitochondria to determine if the time after ovariectomy influences the hydrogen peroxide production by mitochondria, providing substrates for complex II (succinate) of the mitochondrial electron transport chain.

Hydrogen peroxide levels in ovariectomized female rat groups were significantly higher when compared with control rats, and this rate increased with the weeks after ovariectomy (see Figure 6.1).

This effect was reversed by initiating ERT immediately after ovariectomy for three weeks (OVX 3E), confirming a previously published report by Borras et al. (Borras et al., 2003).

Therefore, we also decided to determine whether a delay in estradiol treatment of 3 to 6 weeks after ovariectomy is effective in preventing the increase in peroxide production associated with ovariectomy.

6. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

However, all the groups (OVX 6, OVX 3+3E, OVX 9 and OVX 6+3E) significantly increased their production rates relative to controls. There were no differences between the experimental groups, nor was there an improvement with estradiol treatment.

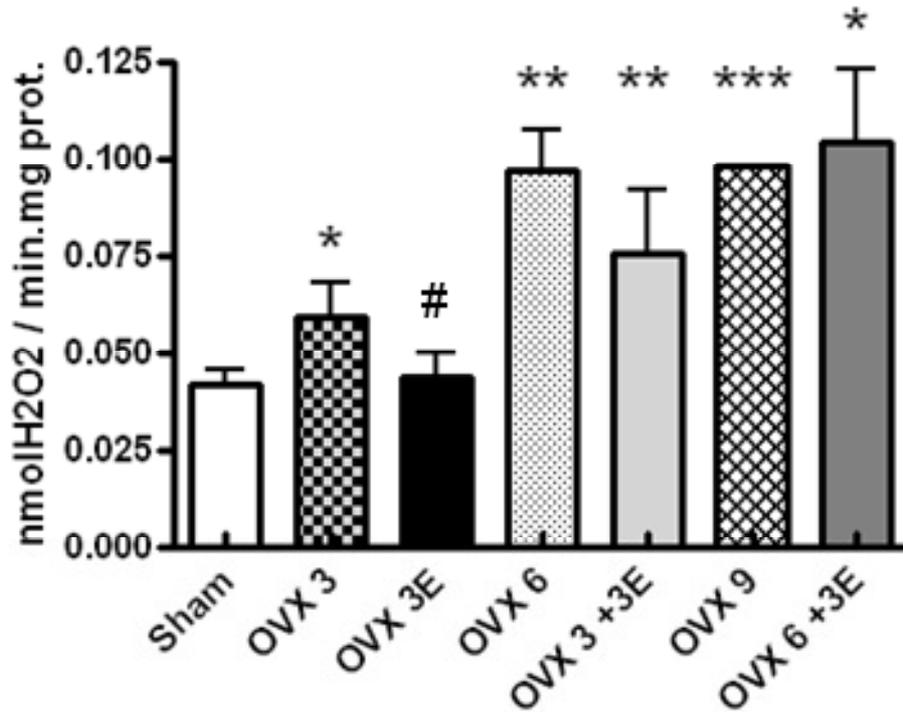


Figure 6.1.- Estrogen treatment against the increase of hydrogen peroxide produced in isolated hepatic mitochondria from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) is only effective if applied immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD of 5–8 different experiments. The statistical significance is expressed as * p <.05 vs control; ** p <.01 vs control; *** p <.001 vs control; # p <.05 vs OVX 3.

This indicates that hydrogen peroxide levels at menopause increase gradually at the initiation of its inception and remain high over time, which promotes oxidative damage by these free radicals.

Data confirm that, as the weeks go by, ovariectomy negatively affects the redox state of the liver (Kankofer et al., 2007), the bone (Muthusami et al., 2005), and the aorta of the "salt sensitive" rat (Zhang et al., 2007).

Therefore, ERT is ineffective in the protection against hydrogen peroxide production if it is established three weeks after ovariectomy in rats.

Estradiol treatment does not cause any significant improvement compared to ovariectomy groups except when the replacement is established immediately after ovariectomy.

6.5. EFFECTS OF OVARIECTOMY AND ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY ON THE ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT ENZYME GLUTATHIONE PEROXIDASE IN HEPATIC MITOCHONDRIA

Oxidative stress is considered to be the "imbalance between production of free radicals and antioxidant levels in favor of the first ones" (Sies, 1986) and the production of hydrogen peroxide generated in the mitochondria by ovariectomy. Figure 6.2 shows the antioxidant levels (the enzyme glutathione peroxidase -GPx-, one of the antioxidant enzymes present in mitochondria and that detoxifies hydrogen peroxide) establishing the differences in oxidative stress between the various groups.

6. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

The enzymatic activity of GPx in the control group decreased in all the ovariectomy groups, as well as estradiol-replacement groups, except when ERT was performed immediately.

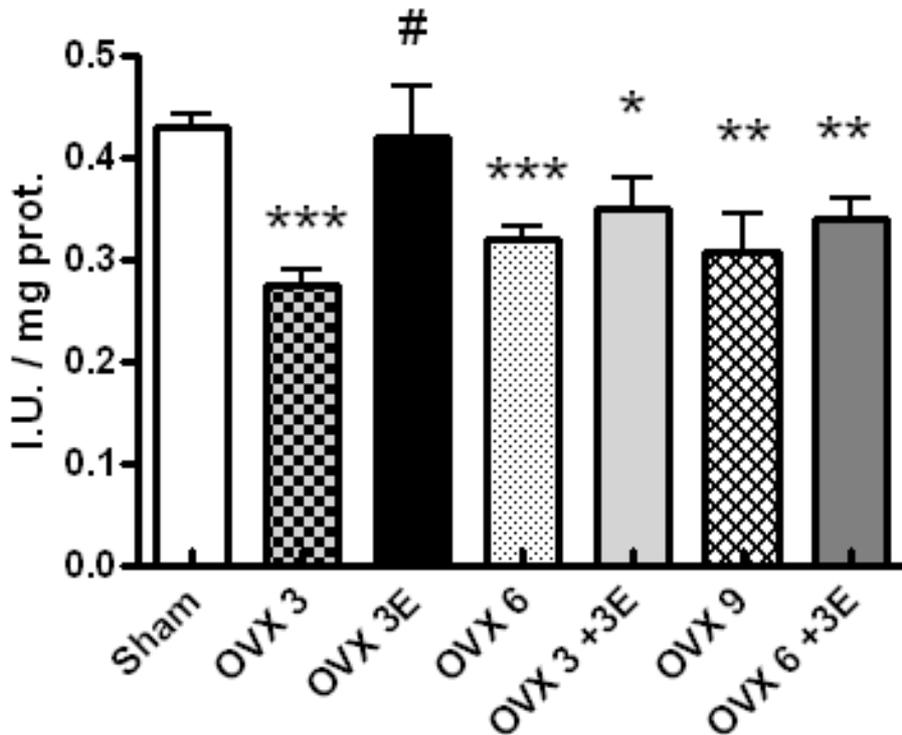


Figure 6.2.- Initiating ERT immediately after ovariectomy recovers the activity of antioxidant enzyme activity of GPx, but late treatment does not.

Glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activity in isolated hepatic mitochondria from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD of 5–8 different experiments. The statistical significance is expressed as * p <.05 vs control; ** p <.01 vs control; *** p <.001 vs control; # p <.05 vs OVX 3.

Therefore, estradiol treatment after ovariectomy is effective at the level of mitochondrial antioxidant enzyme activity only when initiated immediately; treatment with estradiol immediately after ovariectomy decreases the production of hydrogen peroxide in isolated mitochondria, but does bring about improvements subsequently.

6.6. EFFECTS OF OVARIECTOMY AND ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY ON THE OXIDATIVE DAMAGE IN TISSUES

Having established that there is a difference in oxidative stress in the various groups studied, we determined whether these differences were also translated into differences in oxidative damage to biomolecules such as lipids.

To assess oxidative damage in our study, we determined lipid peroxidation levels (like malondialdehyde -MDA-) in isolated hepatic mitochondria from experimental groups in this work.

Figure 6.3 shows all the experimental groups and the negative effect of ovariectomy on MDA levels in hepatic mitochondria (significantly in groups after three and six weeks, but not after nine weeks,) can be clearly seen. Also the benefit of treatment with estradiol occurs in all periods but not significantly for the ovariectomized group.

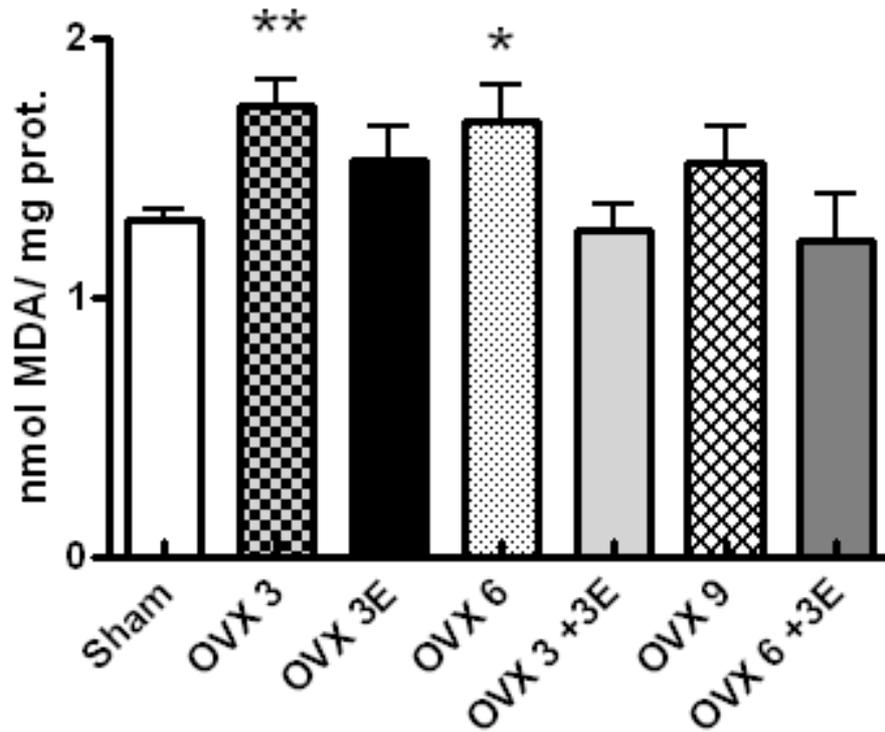


Figure 6.3.- Oxidative damage produced at the beginning of ovariectomy and estradiol or reversed with longer ovariectomy periods.

Lipid peroxidation levels (MDA) in isolated hepatic mitochondria from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD of 5–8 different experiments. The statistical significance is expressed as * p <.05 vs control; ** p <.01 vs control.

To check whether the results obtained in mitochondria spread to the systemic level, we determined the lipid peroxidation levels in plasma of various groups.

Figure 6.4 shows all the experimental groups and it can be seen that only the 3-week ovariectomy group had significantly elevated levels of MDA compared to controls, normal values returning with estradiol treatment. Paradoxically, longer periods with and without replacement are unable to raise these levels of lipid peroxidation in plasma.

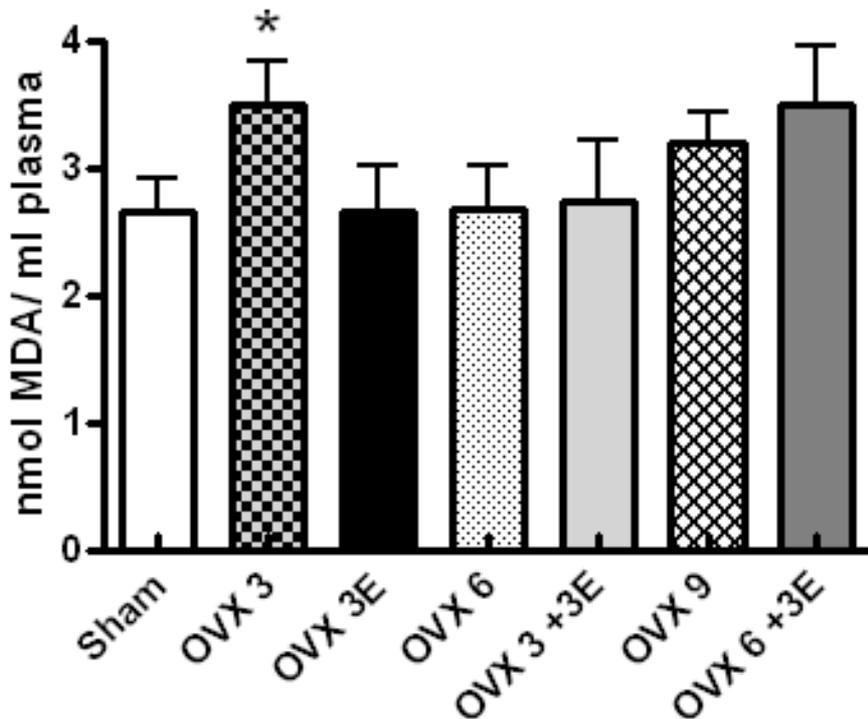


Figure 6.4. Systemic lipid peroxidation occurs when menopause is established.

Lipid peroxidation levels (MDA) in plasma from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD of 5–8 different experiments. The statistical significance is expressed as $*p < .05$ vs control.

It seems, therefore, that the observed effect in isolated mitochondria extends to systemic levels three weeks after ovariectomy and replacement with estradiol, corroborating the results found by TopÇuoglu et al. (Topcuoglu et al., 2009) indicating that there might be some sort of systemic compensation for the aggression.

But we decided to analyze whether the observed oxidative damage in isolated mitochondria from liver and plasma extended to some of the major organs of interest, such as the brain, liver, and heart, since other authors have found lipid peroxidation in homogenates of liver following ovariectomy (Kankofer et al., 2007, Topcuoglu et al., 2009) and these effects are reverted following the administration of estrogens (Topcuoglu et al., 2009).

Figure 6.5 gives an idea of the variability of the effect of different periods of ovariectomy and ERT, as there is a clear result from these experimental groups.

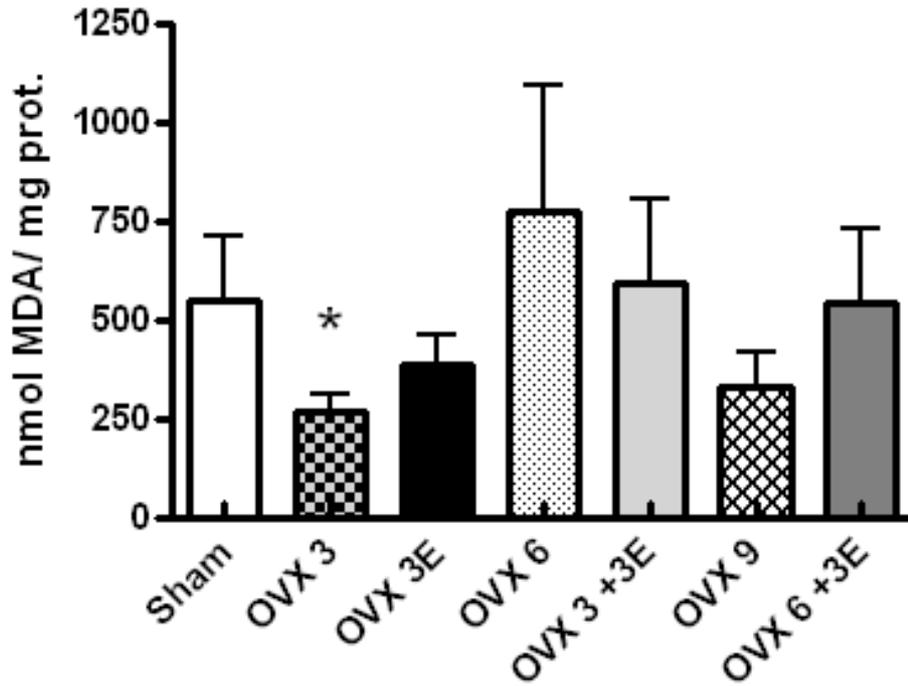


Figure 6.5.- Lipid peroxidation levels (MDA) in brain from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD of 5–8 different experiments. The statistical significance is expressed as $*p < .05$ vs control.

We wanted to see if the effect on the liver of ovariectomy and different periods of ERT were due to the action of mitochondria or ovariectomy itself.

Figure 6.6 summarizes the absence of effect of ovariectomy and estradiol treatment on the liver of female rats in relation to the oxidative damage and lipid peroxidation measured.

This contrasts and distinguishes the action of isolated mitochondria from the liver itself when being involved in processes of oxidative damage.

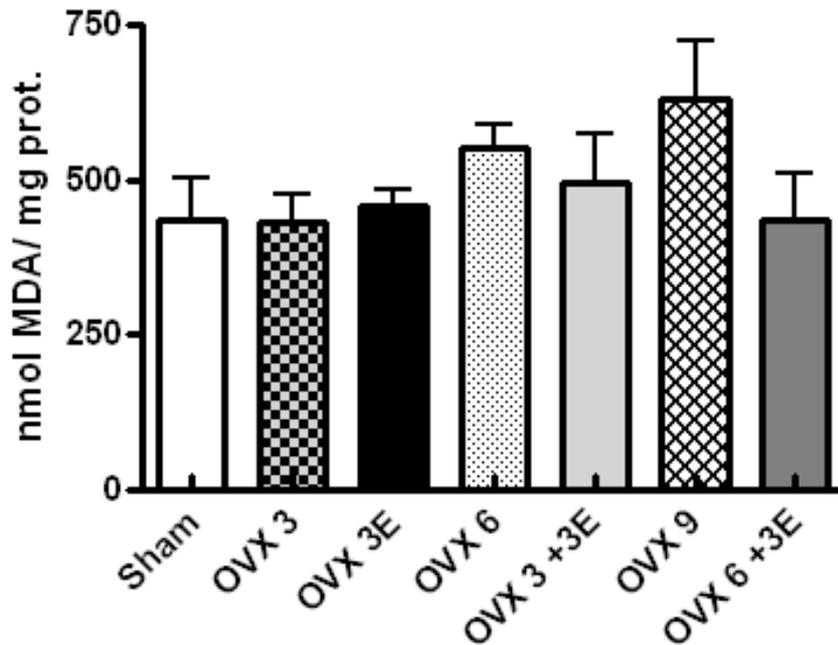


Figure 6.6.- The liver as an organ is not involved as mitochondria in lipid peroxidation levels (MDA) from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD of 5–8 different experiments.

Unlike what happened in both organs previously studied (brain and liver) and in a similar manner to that observed in isolated mitochondria from liver, Figure 6.7 shows how ovariectomy immediately followed by three weeks of ERT decreases lipid peroxidation levels in heart compared to controls and no differences in any of the other groups studied were found.

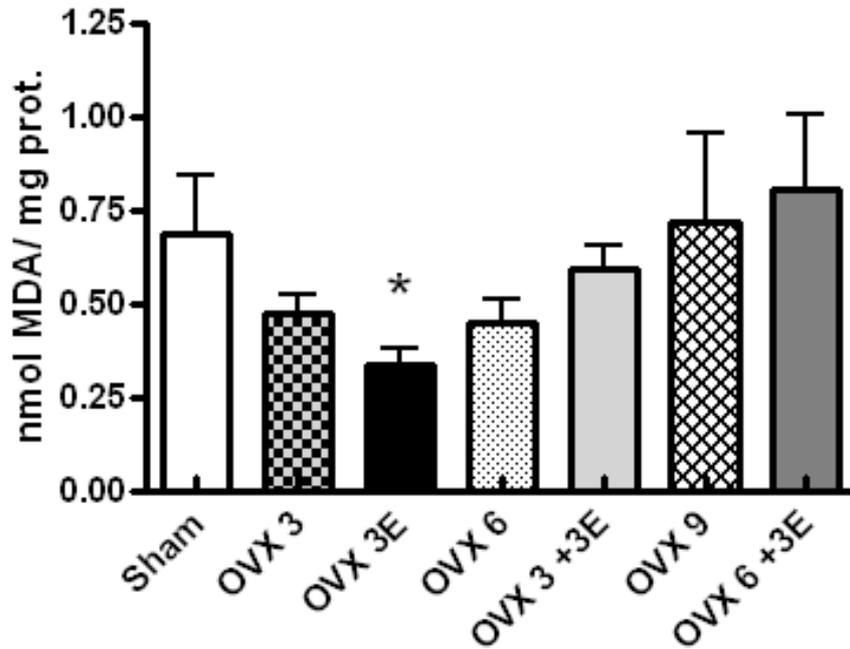


Figura 6.7.- Immediate ERT is beneficial respect to lipid peroxidation levels (MDA) in heart from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD of 5–8 different experiments. The statistical significance is expressed as * $p < .05$ vs control.

Thus, in the section on oxidative damage, we find that at the heart level, the initiation of hormonal treatment itself is of obvious importance as it may bear an influence on this particular organ and possibly on the cardiovascular system in general, as has been published recently (Merz et al., 2009, Shehata and Kamel, 2008).

As the published data by Rosano (Rosano et al., 2003) concluded, the cardioprotective effects of HRT, had almost always been assessed in the

case of humans and likewise in this thesis on "early menopause". So the need to study this type of therapy more specifically became evident, the *Kronos Early Estrogen Prevention Study* (KEEPS) (Miller et al., 2009) being an example.

The WHI study (Rossouw et al., 2002) ended prematurely due to problems that originated in the incidence of breast cancer and other types without ensuring cardiovascular protective effects, probably due to the age of the participants (65 years, approximately), as happened with the HERS study (*Heart and Estrogen / Progestin Replacement Study*) (Grady et al., 1992, Hulley et al., 1998). The PEPI study (*Postmenopausal Estrogen / Progestin Interventions prospective trial*) was conducted on healthy postmenopausal women between 45 and 64 years of age; it was successful at the cardiovascular level of HRT (The Writing Group for the PEPI Trial, JAMA, 1995), and the results were also confirmed by other studies (Allison et al., 2008, Manson et al., 2007, Spencer et al., 1999, Darling et al., 1997, Herrington et al., 1999).

6.7. AGING REDUCES THE CEREBRAL GLUCOSE UPTAKE MEASURED BY *IN VIVO* POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY (PET)

As noted in the Introduction, there are many studies linking cerebral glucose uptake with aging (Kushner et al., 1987, Loessner et al., 1995, Ishii et al., 1997, Garraux et al., 1999, Mosconi et al., 2004b, Pardo et al., 2007, Borrás et al., 2009) and age-associated diseases, especially Alzheimer's

6. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Disease (Small et al., 2006a, de Leon et al., 2007, Mosconi et al., Mosconi et al., 2009, Mistur et al., 2009).

Consequently, we now have a double objective:

- 1.- To evaluate the effect of aging on cerebral glucose uptake
- 2.- To determine the effect of estrogen replacement at different times after inducing menopause in rats.

In response to the former objective, Figure 6.7 shows cerebral glucose uptake *in vivo* in young rats (3-4 months) and old (22-24 months) and as can be seen, this declines significantly with age. Thus, aging interferes with cerebral glucose uptake in rats, confirming the results published recently by our group (Borras et al., 2009) in a type of mice that age prematurely (Senescence-Accelerated Mice, "SAM").

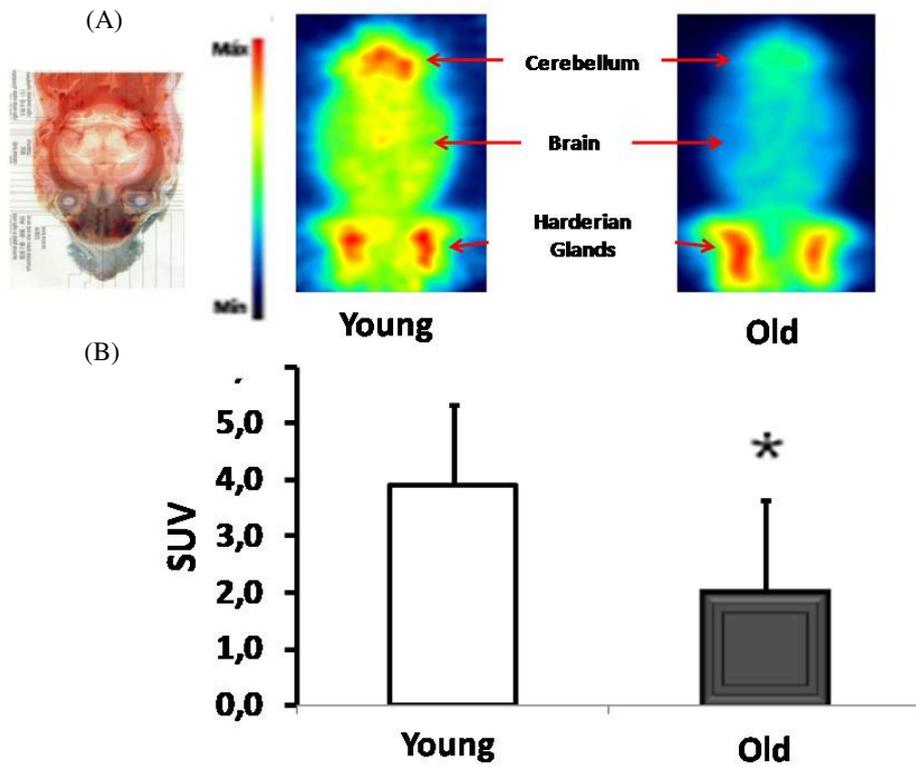


Figura 6.8.- Aging decreases the brain glucose uptake *in vivo* in young (3-4 months) and old (22-24 months) rats. (A) Coronal view of brain (the intensity is expressed as “maximal uptake per slice”). (B) Brain glucose (FDG) metabolism is expressed as SUV.

Data are expressed as mean \pm SD of 6 different experiments. The statistical significance is expressed as $*p < .05$ vs control.

6.8. EFFECTS OF THE ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY ON CEREBRAL GLUCOSE UPTAKE *IN VIVO* IN OVARIECTOMISED WISTAR RATS

Studies such as the *Women's Health Initiative (WHI) randomized controlled trial* (Rossouw et al., 2002) had to be discontinued as the risks outweighed the benefits of estrogen plus progesterone replacement. As mentioned above, in the published data by Rosano (Rosano et al., 2003), the cardioprotective effects of HRT were almost always assessed in "early menopause", as in this thesis, so the need to study this type of therapy more specifically (Miller et al., 2009) has become evident.

For that reason, there have been several studies evaluating the possible effects estrogen replacement in postmenopausal women and the incidence of dementia or Alzheimer's Disease (Ohkura et al., 1995, Resnick et al., 1998, Waring et al., 1999, Eberling et al., 2000, Eberling et al., 2003, Maki and Resnick, 2000, Rasgon et al., 2005, Rasgon et al., 2001, Schonknecht et al., 2003), highlighting the "Critical Time" of HRT initiation as a key factor in achieving beneficial or harmful effects.

We support this hypothesis of "Critical Time" with the results of this thesis.

To answer the second objective suggested above, we examined the cerebral glucose uptake in all the ovariectomy groups.

All the experimental groups are shown in Figure 6.9 demonstrating that estradiol treatment after ovariectomy is relatively beneficial for cerebral glucose uptake in the immediate treatment group but that subsequently no

6. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

positive effect is seen (it was not possible to perform the experiment on the 9-week ovariectomized group -OVX 9-) by PET.

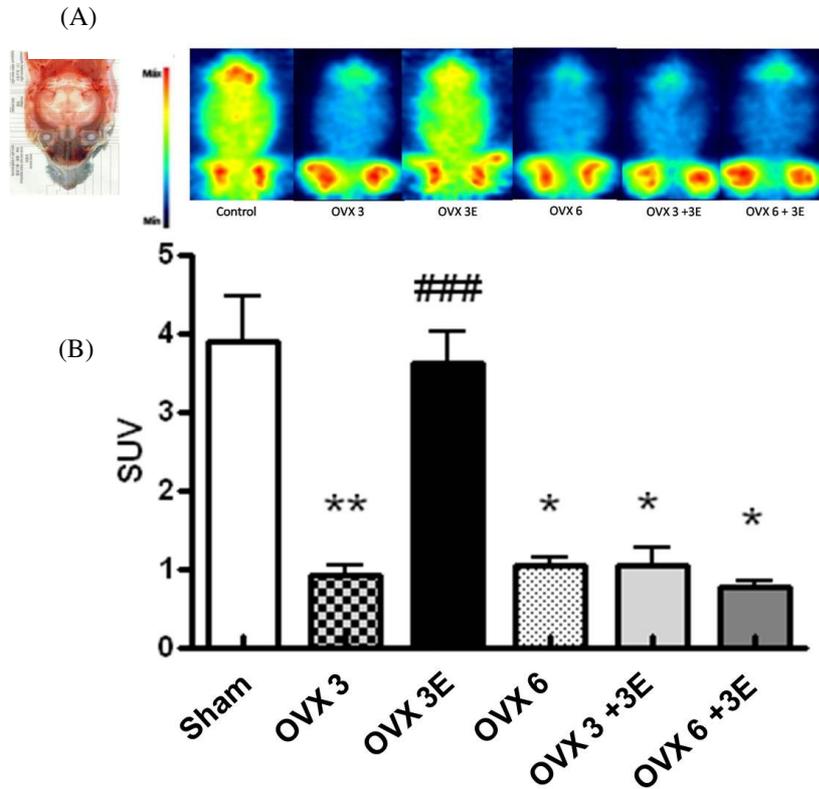


Figure 6.9.- The cerebral metabolism of glucose matched the control group levels when ERT was initiated immediately after ovariectomy.

Brain glucose uptake *in vivo* in ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

(A) Coronal view of brain (the intensity is expressed as “maximal uptake per slice”). (B) Brain glucose (FDG) metabolism is expressed as SUV.

Data are expressed as mean \pm SD of 6 different experiments. The statistical significance is expressed as * p <.05 vs control; ** p <.01 vs control; ### p <.05 vs OVX 3.

6.9. IMMEDIATE ESTROGEN REPLACEMENT HAS THE BEST METABOLIC PROFILE IN PLASMA OF OVARIECTOMIZED RATS BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (¹H NMR)

One of the objectives of this thesis was to study the effect on the metabolic profile of ERT administered at different times after ovariectomy (OVX) in young rats.

The results could help to supplement and interpret the results obtained in other experiments on the importance of early initiation of ERT.

Principal Component Analysis (PCA) of NMR spectrum of plasma allowed us to detect clusters and patterns of the different samples based on their overall metabolic composition.

Thus, Figure 6.10 shows how different ovariectomy groups are distant from the control group in the PCA score. In addition, immediate estradiol replacement (OVX 3E) meant that the scores of this group resembled those of controls, differentiated into ovariectomy group (OVX 3). This result differs from the other groups which initiate ERT in subsequent periods (OVX 3+3E and OVX 6 +3E) however, the 6- and 9-week ovariectomized groups (OVX 6 and OVX 9) presented the same results as their respective OVX+E groups.

Based on a recent study (Bertram et al., 2009) which analyzed the plasma of boys and girls (17-year-olds), there is a considerable difference attributed to sex hormones because the study found that gender had a great impact on the metabonomics of the subjects.

Our results indicate that the effect of estradiol only improved the metabolic profile of the groups with immediate ERT, which is consistent with other results obtained in this thesis, supporting the hypothesis of “critical time” of the initiation of ERT.

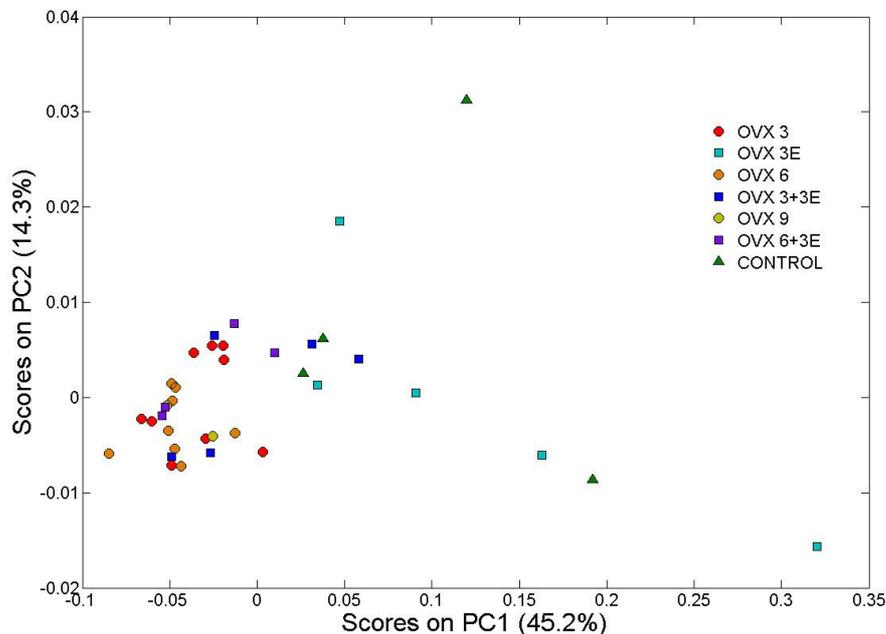


Figure 6.10.- Similarity in metabolic profile between control rats and those replaced with estradiol immediately after ovariectomy.

PCA scores performed to compare the plasma metabonomics from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Control group (green triangle), OVX 3 weeks group (red circle), OVX 3E weeks group (turquoise square), OVX 6 weeks group (red circle), OVX 3 +3E group (blue square), OVX 9 group (golden circle), OVX 6 +3E group (purple square).

Analyzing the spectrum of the samples shows that the strongest components in the distribution of the PCA are lipids. The lipid and

lipoprotein profiles in plasma usually dominate the NMR spectrum. However, the large overlap of these signals in the spectrum does not allow individual quantification of lipids contributing to the profile, although it does make it possible to assess global changes in their distribution.

Figure 6.11 shows the superposition of all the spectra studied, which clearly shows the reproducibility of the NMR spectrum, the complexity of the spectrum and metabolic detail (zoom) and, most importantly, that the spectrum is dominated by lipids, which are the major influence in the PCA.

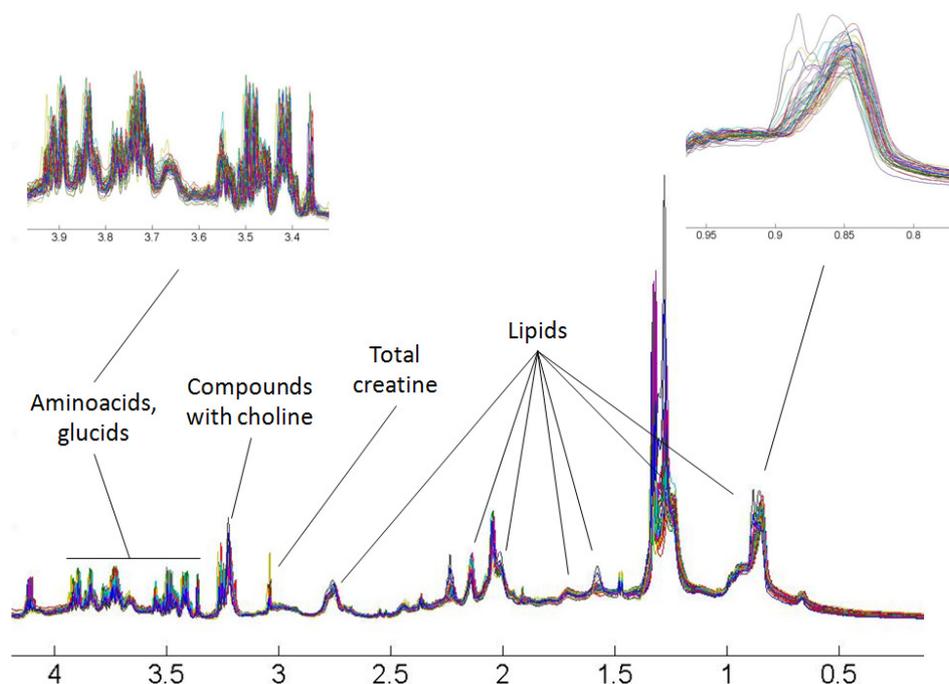


Figure 6.11.- Overlay of the aliphatic region of all NMR spectrum studied with a general indication of the metabolites observed and an expansion of areas of interest. The enlargement of the lipid region of 0.9 ppm shows the complex overlap of contributions of lipid and sample variations.

6. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

In future experiments we plan to monitor possible weight gain caused by ovariectomy, as well as the action of menopause and ERT on different lipid components (Campos et al., 1997). This is because very recently published studies (Witte et al., 2010) consider that ovariectomy causes weight gain mediated by hyperphagia and decreased motor activity in mice, and metabolic rate and reduced motor activity in rats; weight gain was also observed by TopÇuoglu et al. (Topcuoglu et al., 2009) when studying the oxidative damage to proteins and their relationship with the administration of estrogen.

The overall profile of lipids represented in the PCA show similarities between the different groups. Glycerol data are quantified to check the possible impact on the triglyceride metabolism.

Glycerol induced a non-significant upward trend with ovariectomy (OVX 3 and 6), but it was significant in the OVX 9 group. However, in contrast, the replacement of estradiol was significantly different from the ovariectomy group in each of the three periods studied, but not in the control group, except the OVX 3E group (Figure 6.11).

This may indicate that ovariectomy causes an increase in lipid metabolism, usually due to the use of triglycerides, but not in the case of those with estradiol replacement. Differences were only detected in the case of immediate replacement (OVX 3E) in the presence of glycerol in plasma with respect to their ovariectomy group.

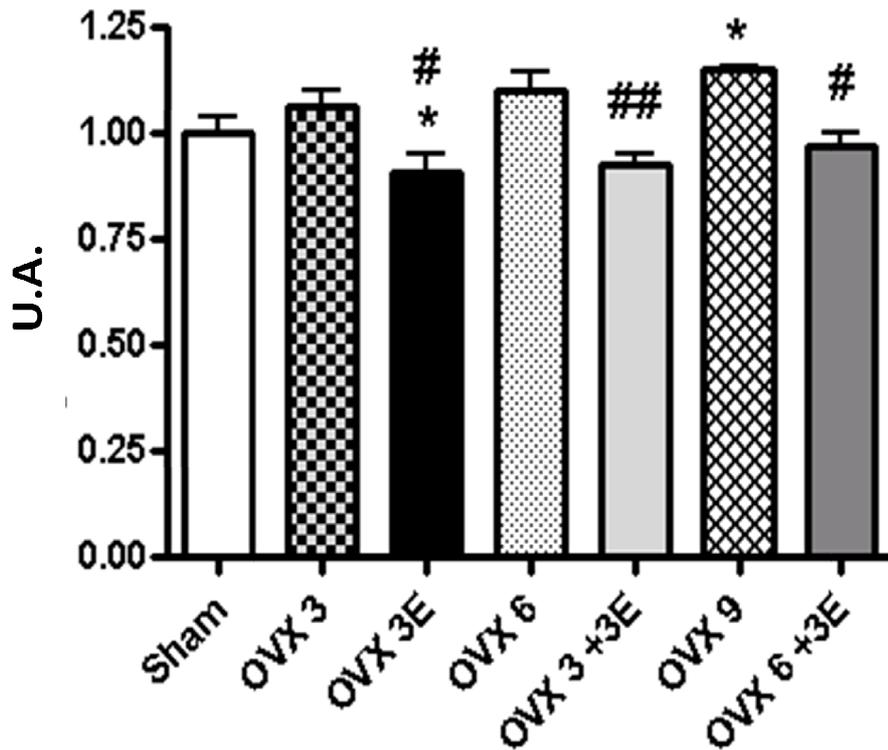


Figura 6.12.- NMR spectrum of glycerol in plasma from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD (n= 5-8) of arbitrary units (AU): peak area / total spectral area. The statistical significance is expressed as * p <.05 vs control; # p <.05 vs OVX 3 y OVX 9; ## p <.01 vs OVX 6.

Taking into account the above results and their possible relationship with glucose metabolism measured by PET, we evaluated the glucose metabolite as both glycerol and glucose are inversely related.

Figure 6.13 shows that the glucose circulating levels in plasma, as measured by ^1H NMR, are lower in the OVX 3E group compared to the control and OVX 3 groups, which could correlate with the highest cerebral

6. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

glucose uptake by the OVX 3E group determined by PET. Contrary to the results obtained in the PET experiments, the OVX 3+3E group also differed significantly from the OVX group (OVX 6) but the NMR value was not lower than the control group; this effect gradually decreased as the ovariectomy period increased, and was completely lost in the last groups (OVX 9 and OVX 6+3E).

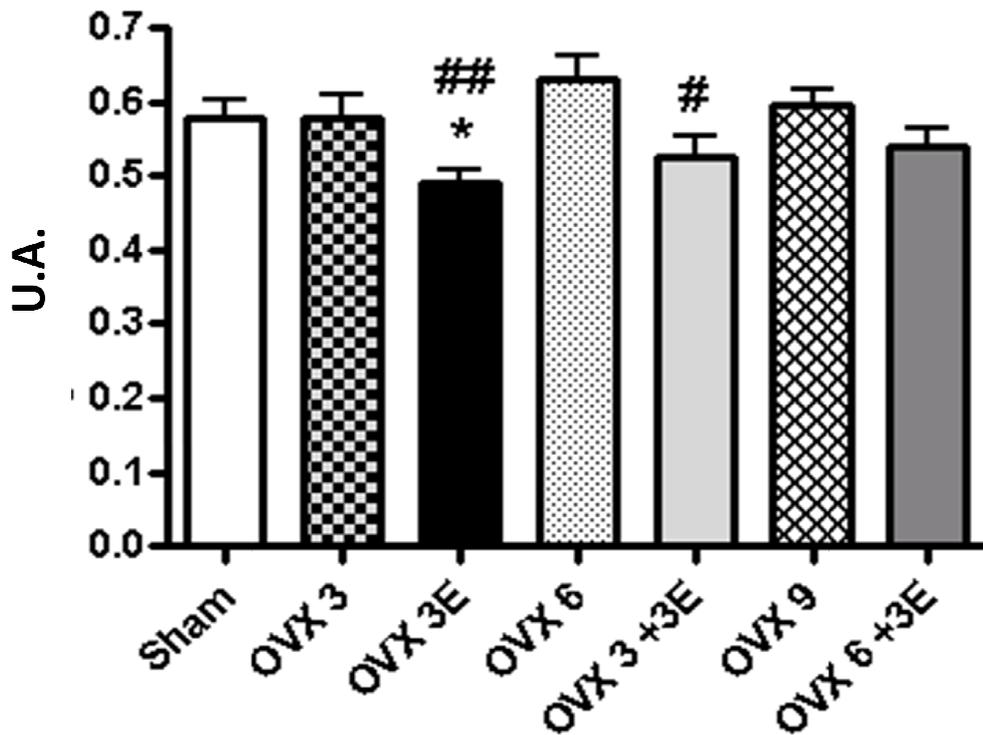


Figure 6.13.- NMR spectrum of glucose in plasma from ovariectomized rats (three, six and nine weeks after ovariectomy) and estradiol replacement for three weeks immediately, or three and six weeks after, ovariectomy.

Data are expressed as mean \pm SD (n= 5-8) of arbitrary units (AU): peak area / total spectral area. The statistical significance is expressed as * p <.05 vs control; # p <.05 vs OVX 6; ## p <.01 vs OVX 3.

6.10. IMPORTANCE OF INITIATION OF ESTROGEN REPLACEMENT THERAPY AFTER MENOPAUSE IS ESTABLISHED: "CRITICAL TIME HYPOTHESIS"

Treatment with estradiol only appears to be effective if the replacement occurs immediately after the commencement of menopause, and ceases to be so if several weeks elapse before starting it (see Figures 4.4, 4.8, 4.12, 4.16, 4.20, 4.24, 4.28, 4.33 and 4.37).

This fact is critical to understand the effectiveness of hormone replacement therapy, as in most epidemiological studies to date, both with beneficial (Manning et al., 2001) and adverse results (Rossouw et al., 2002); this factor has not been taken into account, and yet it seems to be very important when making the decision to recommend hormone replacement therapy or not to menopausal women, as recent studies confirm (Bohacek et al. 2008, Miller et al., 2009).

Therefore, more studies are needed, first with laboratory animals to extrapolate their results correctly to treatment for humans and thus draw conclusions for clinical applications (Birge, 1996, Lethaby et al., 2008), with the above limitations.

So our question is: Would it be feasible to start with these therapies in the "perimenopause"? What type of subjects (healthy, with diseases established before the menopause, the seriousness of such diseases, induced menopause...), etc?

Extending these investigations to other organs of interest, not only the brain, as recent articles and the revision by Barret (Barrett-Connor and Laughlin, 2009) and the North American Menopause Society (Utian et al.,

2008) indicate, it is advisable to start ERT for positive cardiovascular effects as immediately after menopause as possible with an average duration of five years or, in accordance with these studies, longer periods. Furthermore, it is suggested that total mortality is reduced in those cases where ERT is initiated soon after menopause and there is less cardiovascular risk. Also, it is recommended to prevent cognitive decline in those areas affected by Alzheimer's disease, but this therapy is not recommended for women with symptoms of cognitive decline or aged over 65 years.

Moreover, the final opinion of the North American Menopause Society (North American Menopause Society, 2010) concludes that recent research supports the start of HRT near menopause to treat symptoms, to treat or reduce the risk of certain disorders (such as osteoporosis or fractures), or both. The benefit / risk ratio of HRT at menopause is favourable for women who start HRT very close to menopause but decreases in older women or as time passes from the commencement of menopause in previously untreated women.

Although, as Professor David H. Barlow of the University of Oxford said in "*Who understands the menopause?*" (Barlow, 1997), we must keep working and working together to "understand".

The results of this study summarized in the conclusions attempt to approach that understanding.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que podemos extraer a la luz de los resultados obtenidos se enumeran a continuación:

1. Los niveles de peróxido de hidrógeno tras la menopausia inducida se incrementan progresivamente al inicio de su instauración y permanecen elevados en el tiempo, mientras que el tratamiento inmediato con estradiol en las ratas ovariectomizadas revierte el efecto.
2. El inicio del tratamiento con estradiol semanas después de realizarse la ovariectomía no ejerce ningún efecto beneficioso sobre la producción mitocondrial de peróxidos.
3. En las ratas ovariectomizadas disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa y solamente en el grupo tratado con estradiol inmediatamente después de la ovariectomía este efecto es revertido.
4. El tratamiento inmediato con estradiol tras la ovariectomía es efectivo en la prevención del daño oxidativo a lípidos en mitocondrias y corazón tras dicha menopausia inducida, no así en cerebro o hígado. Así mismo, el beneficio del tratamiento con estradiol se da en todos los periodos aunque no de manera significativa, lo que puede indicar que habría algún tipo de compensación sistémica por la agresión.
5. El consumo cerebral de glucosa disminuye con el envejecimiento.
6. La ovariectomía de 3, 6 y 9 semanas en ratas hembra produce un descenso global en el consumo cerebral de glucosa, similar a las ratas viejas.

7. El tratamiento con estradiol produce un aumento significativo en dicho metabolismo cerebral únicamente si éste se inicia inmediatamente tras producirse la ovariectomía
8. El perfil metabólico en plasma de los animales tratados inmediatamente con estradiol tras la ovariectomía se asemeja a los animales control, no ocurriendo en los grupos ovariectomía ni cuando se inició la terapia hormonal en periodos más tardíos.
9. El análisis del espectro de RMN de los grupos experimentales muestran que el componente que domina y mayor peso tiene en la distribución de los metabolitos en plasma es el perfil lipídico ocasionado probablemente por la ovariectomía.
10. El glicerol se encuentra elevado en el plasma de los grupos ovariectomizados así como los repuestos con estradiol pero no de forma inmediata. Lo contrario ocurre con el metabolito de la glucosa, dando una idea de la relación inversa entre el metabolismo de los lípidos y de la glucosa en los grupos estudiados.

CONCLUSIÓN FINAL: El tratamiento con estradiol parece ser sólo efectivo si la reposición se produce inmediatamente tras la instauración de la menopausia, y deja de serlo si esperamos varias semanas para comenzarlo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Farid IB, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2007) Metabolic characterization of Brassica rapa leaves by NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem*, **55**, 7936-43.
- Abraham RJ, Byrne JJ, Griffiths L, Koniotou R (2005) ¹H chemical shifts in NMR: Part 22-Prediction of the ¹H chemical shifts of alcohols, diols and inositols in solution, a conformational and solvation investigation. *Magn Reson Chem*, **43**, 611-24.
- Albertini R, Rindi S, Passi A, et al. (1996) The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 207-214.
- Aloj L, Caraco C, Jagoda E, Eckelman WC, Neumann RD (1999) Glut-1 and hexokinase expression: relationship with 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake in A431 and T47D cells in culture. *Cancer Res*, **59**, 4709-14.
- Allison MA, Manson JE, Langer RD, et al. (2008) Oophorectomy, hormone therapy, and subclinical coronary artery disease in women with hysterectomy: the Women's Health Initiative coronary artery calcium study. *Menopause*, **15**, 639-47.
- Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **221**, 1256-1264.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915-7922.
- Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, et al. (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology*, **53**, 1992-7.
- Andersson B, Mattsson LA, Hahn L, et al. (1997) Estrogen replacement therapy decreases hyperandrogenicity and improves glucose homeostasis and plasma lipids in postmenopausal women with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 638-43.
- Arnal JF, Clamens S, Pechet C, et al. (1996) Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4108-13.
- Asdell SA, Doornenbal H, Joshi SR, Sperling GA (1967) The effects of sex steroid hormones upon longevity in rats. *J Reprod Fertil*, **14**, 113-20.

- Ayres S, Tang M, Subbiah MT (1996) Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med*, **128**, 367-75.
- Azad NA, Al Bugami M, Loy-English I (2007) Gender differences in dementia risk factors. *Gen Med*, **4**, 120-9.
- Barja de Quiroga C (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J. Bioenergetics Biomembranes*, **31**, 347-366.
- Barja G (2000) The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging (Milano)*, **12**, 342-55.
- Barja G, Cadenas S, Rojas C, Perez-Campo R, Lopez-Torres M (1994) Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic Res*, **21**, 317-27.
- Barlow DH (1997) Who understands the menopause? *Br J Obstet Gynaecol*, **104**, 879-80.
- Barrett-Connor E, Laughlin GA (2009) Endogenous and exogenous estrogen, cognitive function, and dementia in postmenopausal women: evidence from epidemiologic studies and clinical trials. *Semin Reprod Med*, **27**, 275-82.
- Barton JP, Parker JE (1970) The radiolysis of oxygenated cysteine solutions at neutral pH. The role of RSSR and O₂. *Int. J. Radiat. Phys. Chem.*, **2**, 159-166.
- Begun AZ, Iachine IA, Yashin AI (2000) Genetic nature of individual frailty: comparison of two approaches. *Twin Res*, **3**, 51-7.
- Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, et al. (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*, **51**, 535-41.
- Benzi G, Moretti A (1995) Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med*, **19**, 77-101.
- Bermejo P, Gomez-Serranillos P, Santos J, Pastor E, Gil P, Martin-Aragon S (1997) Determination of malonaldehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test. *Gerontology*, **43**, 218-22.

- Bernini GP, Sgro M, Moretti A, et al. (1999) Endogenous androgens and carotid intimal-medial thickness in women. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 2008-12.
- Berrueta LA, Alonso-Salces RM, Heberger K (2007) Supervised pattern recognition in food analysis. *J Chromatogr A*, **1158**, 196-214.
- Berthois Y, Pourreau-Schneider N, Gandilhon P, Mittre H, Tubiana N, Martin PM (1986) Estradiol membrane binding sites on human breast cancer cell lines. Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding systems. *J Steroid Biochem*, **25**, 963-72.
- Bertram HC, Duus JO, Petersen BO, et al. (2009) Nuclear magnetic resonance-based metabolomics reveals strong sex effect on plasma metabolism in 17-year-old Scandinavians and correlation to retrospective infant plasma parameters. *Metabolism*, **58**, 1039-45.
- Bhavnani BR (2003) Estrogens and menopause: pharmacology of conjugated equine estrogens and their potential role in the prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**, 473-82.
- Bielsky BH, Gebieki JM (1977) Application of radiation chemistry to biology. In *Free radicals in biology*. (ed W.A. P), pp. 1-19. Academic Press.
- Birge SJ (1996) Is there a role for estrogen replacement therapy in the prevention and treatment of dementia? *J Am Geriatr Soc*, **44**, 865-70.
- Bohacek J, Bearl AM, Daniel JM (2008) Long-term ovarian hormone deprivation alters the ability of subsequent oestradiol replacement to regulate choline acetyltransferase protein levels in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats. *J Neuroendocrinol*, **20**, 1023-7.
- Bonte FJ, Hom J, Tintner R, Weiner MF (1990) Single photon tomography in Alzheimer's disease and the dementias. *Semin Nucl Med*, **20**, 342-52.
- Borel JP, Monboisse JC, Bellon G (1988) *Med. Sci.*, **5**, 304-311.
- Borras C (2003) *Importancia del estrés oxidativo en la diferencias de longevidad entre machos y hembras*, Universidad de Valencia, Valencia.

- Borras C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, et al. (2005) 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell*, **4**, 113-8.
- Borras C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, et al. (2006) Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *Faseb J*, **20**, 2136-8.
- Borras C, Gambini J, Lopez-Grueso R, Pallardo FV, Vina J (2010) Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1802**, 205-11.
- Borras C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*, **34**, 546-52.
- Borras C, Stvolinsky S, Lopez-Grueso R, et al. (2009) Low in vivo brain glucose consumption and high oxidative stress in accelerated aging. *FEBS Lett*, **583**, 2287-93.
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, **134**, 707-16.
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*, **128**, 617-30.
- Brand MD, Murphy MP (1987) Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol. Rev.*, **62**, 141-193.
- Breen AP, Murphy JA (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad. Biol. Med.*, **18**, 1033-1077.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 248-257.
- Calleja M, Pena P, Ugalde C, Ferreiro C, Marco R, Garesse R (1993) Mitochondrial DNA remains intact during Drosophila aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced. *J Biol Chem*, **268**, 18891-7.
- Campos H, Walsh BW, Judge H, Sacks FM (1997) Effect of estrogen on very low density lipoprotein and low density lipoprotein subclass metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 3955-63.

- Capdevila L, Parkhill L, Chacos N, Okita R, Masters BBS, Estabrook RW (1981) The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 1357-1362.
- Cassey M and Nutt R (1986) A multislice two-dimensional BGO detector system for PET. *I.E.E.E. Trans Nucl Sci*, **NS-33**:760-763.
- Catana C, Procissi D, Wu Y, et al. (2008) Simultaneous in vivo positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3705-10.
- Chevallier S, Bertrand D, Kohler A and Courcoux P (2006) Application of PLS-DA in multivariate image analysis. *J. Chemometrics*, **20**, 221-229.
- Corbisier P, Remacle J (1990) Involvement of mitochondria in cell degeneration. *European J. Cell. Biol.*, **51**, 173-182.
- Cosgrove KP, Mazure CM, Staley JK (2007) Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiatry*, **62**, 847-55.
- Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK, Lindon JC (2006) Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabolomic data sets. *Anal Chem*, **78**, 2262-7.
- Crawford DR, Wang Y, Schools GP, Kochheiser J, Davies KJ (1997) Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **22**, 551-9.
- Cutler RG (1991) Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr*, **53**, 373S-379S.
- Czapski G, Goldstein S (1995) The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach. *Free. Radic. Biol. Med.*, **19**, 785-794.
- Chaban VV, Lakhter AJ, Micevych P (2004) A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology*, **145**, 3788-95.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, **59**, 527-605.
- Charlton A, Allnut T, Holmes S, et al. (2004) NMR profiling of transgenic peas. *Plant Biotechnol J*, **2**, 27-35.
- Chawluk JB, Alavi A, Dann R, et al. (1987) Positron emission tomography in aging and dementia: effect of cerebral atrophy. *J Nucl Med*, **28**, 431-7.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, **49**, 588-603.

- Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD (2004a) Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286**, E1011-22.
- Chen JQ, Eshete M, Alworth WL, Yager JD (2004b) Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J Cell Biochem*, **93**, 358-73.
- Chen JQ, Yager JD, Russo J (2005a) Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta*, **1746**, 1-17.
- Chen WP, Matsunari I, Noda A, et al. (2005b) Rapid scanning protocol for brain (18)F-FDG PET: a validation study. *J Nucl Med*, **46**, 1633-41.
- Chugani HT (1998) A critical period of brain development: studies of cerebral glucose utilization with PET. *Prev Med*, **27**, 184-8.
- Chugani HT, Phelps ME (1986) Maturational changes in cerebral function in infants determined by 18FDG positron emission tomography. *Science*, **231**, 840-3.
- Chugani HT, Phelps ME, Mazziotta JC (1987) Positron emission tomography study of human brain functional development. *Ann Neurol*, **22**, 487-97.
- Darling GM, Johns JA, McCloud PI, Davis SR (1997) Estrogen and progesterone compared with simvastatin for hypercholesterolemia in postmenopausal women. *N Engl J Med*, **337**, 595-601.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, **107**, 1198-205.
- Davies KJA, Delsignore ME, Lin SW (1987a) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9902-9907.
- Davies KJA, Pacifici RE, Lin SW (1987b) Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9914-9920.
- De Leon MJ, Mosconi L, Logan J (2007) Seeing what Alzheimer saw. *Nat Med*, **13**, 129-31.
- De Noord OE (1994) Multivariate calibration standardization. *Chemometr. Intell. Lab. Syst*, **25**, 85 –97

- De Santi S, de Leon MJ, Rusinek H, et al. (2001) Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD. *Neurobiol Aging*, **22**, 529-39.
- Dean RT, Gieseg S, Davies MJ (1993) Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins. *TIBS.*, **18**, 437-441.
- Deroo BJ, Hewitt SC, Peddada SD, Korach KS (2004) Estradiol regulates the thioredoxin antioxidant system in the mouse uterus. *Endocrinology*, **145**, 5485-92.
- Ding EL, Song Y, Manson JE, et al. (2009) Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med*, **361**, 1152-63.
- Diplock AT (1998) Defense against reactive oxygen species. *Free Radic Res*, **29**, 463-7.
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, et al. (1998) Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr*, **80 Suppl 1**, S77-112.
- Dixon SJ, Xu Y, Brereton RG, Soini HA, Novotny MV, Oberzaucher E, Grammer K and Penn DJ (2007) Pattern recognition of gas chromatography mass spectrometry of human volatiles in sweat to distinguish the sex of subjects and determine potential discriminatory marker peaks . *Chemom. Intell. Lab. Syst*, **87**, 161–172
- Dluzen DE, McDermott JL (2004) Developmental and genetic influences upon gender differences in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, **1025**, 205-20.
- Dolphin D (1988) The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. In *Oxygen radicals in biology and medicine*. (eds Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Sonntag C), pp. 491-500. New York: Ed. Plenum Press.
- Donald R, Johns MD (1995) Mitochondrial DNA and disease. *N. Engl. J. Med.*, **333**, 638-644.
- Dormire SL (2009) The potential role of glucose transport changes in hot flash physiology: a hypothesis. *Biol Res Nurs*, **10**, 241-7.
- Doroshov J, Hochstein P (1982) Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases. In *Pathology of Oxygen*, pp. 245-253. New York: Academic Press.
- Duarte IF, Barros A, Almeida C, Spraul M, Gil AM (2004) Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. *J Agric Food Chem*, **52**, 1031-8.

- Dubuisson JT, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Jr., et al. (1998) Association of hormone replacement therapy and carotid wall thickness in women with and without diabetes. *Diabetes Care*, **21**, 1790-6.
- Eberling JL, Reed BR, Coleman JE, Jagust WJ (2000) Effect of estrogen on cerebral glucose metabolism in postmenopausal women. *Neurology*, **55**, 875-7.
- Eberling JL, Wu C, Haan MN, Mungas D, Buonocore M, Jagust WJ (2003) Preliminary evidence that estrogen protects against age-related hippocampal atrophy. *Neurobiol Aging*, **24**, 725-32.
- Ernst T, Chang L, Itti L, Speck O (1999) Correlation of regional cerebral blood flow from perfusion MRI and spect in normal subjects. *Magn Reson Imaging*, **17**, 349-54.
- Esteve JM, Mompo J, Garcia de la Asuncion J, et al. (1999) Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J*, **13**, 1055-64.
- Estrela JM, Saez GT, Such L, Viña J (1983) The effect of cysteine and N-acetylcysteine on rat liver glutathione. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 3483-3485.
- Fenton HJH (1894) Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.*, **65**, 899-910.
- Ferl GZ, Zhang X, Wu HM, Huang SC (2007) Estimation of the 18F-FDG input function in mice by use of dynamic small-animal PET and minimal blood sample data. *J Nucl Med*, **48**, 2037-45.
- Fernandez Ballesteros R (1999) Aging in Europe--European Aging. IVth European Congress of Gerontology. Berlin, Germany, July 7-11, 1999. Abstracts. *Z Gerontol Geriatr*, **32 Suppl 2**, II1-298, 299-312.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*, **14**, 1649-60.
- Fisher B, Dignam J, Wolmark N, et al. (1999) Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet*, **353**, 1993-2000.
- Flohe L, Gunzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, **105**, 114-21.

- Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL (1978) Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry.*, **17**, 2639-2644.
- Foster RE, Estabrook RW (1993) Is oxygen an essential nutrient? *Annu. Rev. Nutr.*, **13**, 383-403.
- Freeman BA, Crapo J (1982) Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**, 412-426.
- Frei B (1994a) Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am. J. Med.*, **97**, 5S-13S.
- Frei B (1994b) Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am. J. Med.*, **97**, 5S-13S.
- Friday KE, Dong C, Fontenot RU (2001) Conjugated equine estrogen improves glycemic control and blood lipoproteins in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 48-52.
- Fridovich I (1974) Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.*, **41**, 35-97.
- Fridovich I (1986a) Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide and Oxygen Toxicity. In *Free Radicals and Biology* (ed Pryor WA), pp. 239-246. New York: Academic Press.
- Fridovich I (1986b) Superoxide dismutases. *Methods. Enzymol.*, **58**, 61-97.
- Fridovich I (1997) Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18515-18517.
- Fueger BJ, Czernin J, Hildebrandt I, et al. (2006) Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice. *J Nucl Med*, **47**, 999-1006.
- Gambhir SS, Barrio JR, Wu L, et al. (1998) Imaging of adenoviral-directed herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene expression in mice with radiolabeled ganciclovir. *J Nucl Med*, **39**, 2003-11.
- Gámez C and Cantero M (2000) Tomografía por emisión de positrones. *Revista Oficial Colegio Médicos de Málaga*, **71**: 20-26.
- García de la Asunción J, Millán A, Plá R, et al. (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *Faseb J*, **10**, 333-8.
- Garraux G, Salmon E, Degueldre C, Lemaire C, Laureys S, Franck G (1999) Comparison of impaired subcortico-frontal metabolic networks in normal aging, subcortico-frontal dementia, and cortical frontal dementia. *Neuroimage*, **10**, 149-62.

- Gavaghan CL, Wilson ID, Nicholson JK (2002) Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA. *FEBS Lett*, **530**, 191-6.
- Genant HK, Lucas J, Weiss S, et al. (1997) Low-dose esterified estrogen therapy: effects on bone, plasma estradiol concentrations, endometrium, and lipid levels. Estratab/Osteoporosis Study Group. *Arch Intern Med*, **157**, 2609-15.
- Gerothanassis IP, Troganis A, Exarchou V and Barbarassou K (2002) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy: Basic principles and phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine. *Chemistry Education: Research and Practice In Europe*, **3**, 229-252
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, et al. (2000) Cell proliferation and apoptosis in the immune system in the elderly. *Immunol Res*, **21**, 31-8.
- Giulivi C, Davies KJA (1993) Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome. *J. Biol. Chem.*, **268**, 8752-8759.
- Gonzalo S (2010) Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol*.
- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol*, **22**, 245-52.
- Goodman-Gruen D, Barrett-Connor E (1997) Sex hormone-binding globulin and glucose tolerance in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*, **20**, 645-9.
- Goodman MM, Elmaleh DR, Kearfott KJ, et al. (1981) F-18-labeled 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose for the study of regional metabolism in the brain and heart. *J Nucl Med*, **22**, 138-44.
- Gottardis MM, Jordan VC (1987) Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Res*, **47**, 4020-4.
- Grady D, Rubin SM, Petitti DB, et al. (1992) Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med*, **117**, 1016-37.
- Graham MM, Peterson LM, Hayward RM (2000) Comparison of simplified quantitative analyses of FDG uptake. *Nucl Med Biol*, **27**, 647-55.

- Green LA, Gambhir SS, Srinivasan A, et al. (1998) Noninvasive methods for quantitating blood time-activity curves from mouse PET images obtained with fluorine-18-fluorodeoxyglucose. *J Nucl Med*, **39**, 729-34.
- Greenwald RA, Moy WW (1980) Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.*, **23**, 455-463.
- Grossman A, Traish A (1992) Site-specific antibodies to the DNA-binding domain of estrogen receptor distinguish this protein from the 3H-estradiol-binding protein in pancreas. *Life Sci*, **51**, 859-67.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002) Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, **346**, 340-52.
- Gryglewli RJ, Palmer RMJ, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, **320**, 454-456.
- Guvakova MA, Surmacz E (1997) Tamoxifen interferes with the insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res*, **57**, 2606-10.
- Haber F, Weiss J (1932) Uber die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturweiss.*, **20**, 948.
- Haber F, Weiss J (1934) The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London.*, **147**, 332-351.
- Hageman HH, Bast A, Vermeulen NPE (1992) Monitoring of oxidative free radical damage *in vivo*: Analytical aspects. *Chem. Biol. Interactions.*, **82**, 243-293.
- Hagen TM, Yowe DL, Bartholomew JC, et al. (1997) Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3064-9.
- Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, **91**, 14S-22S.
- Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet*, **344**, 721-724.
- Halliwell B (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, **16**, 33-50.
- Halliwell B, Auroma OI (1991) DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*, **281**, 9-19.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, **18**, 125-6.

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **246**, 501-514.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine.*, Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, **186**, 1-85.
- Hamacher K, Coenen HH, Stocklin G (1986) Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med*, **27**, 235-8.
- Harman D (1956a) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, **2**, 298-300.
- Harman D (1956b) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*, **11**, 298-300.
- Harman D (1978) Free radical theory of aging: Nutritional implications. *Age.*, **1**, 145-152.
- Harman D (2001) Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci*, **928**, 1-21.
- Hassan HM, Fridovich I (1977) Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7667-7672.
- Heiss G, Wallace R, Anderson GL, et al. (2008) Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. *JAMA*, **299**, 1036-45.
- Henderson VW, Paganini-Hill A, Miller BL, et al. (2000) Estrogen for Alzheimer's disease in women: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*, **54**, 295-301.
- Herrington DM, Werbel BL, Riley WA, Pusser BE, Morgan TM (1999) Individual and combined effects of estrogen/progestin therapy and lovastatin on lipids and flow-mediated vasodilation in postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, **33**, 2030-7.
- Hood DA, Adhietty PJ, Colavecchia M, et al. (2003) Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med Sci Sports Exerc*, **35**, 86-94.
- Hopkins FG (1921) On an Autoxidisable Constituent of the Cell. *Biochem J*, **15**, 286-305.

- Huang SC, Phelps ME, Hoffman EJ, Sideris K, Selin CJ, Kuhl DE (1980) Noninvasive determination of local cerebral metabolic rate of glucose in man. *Am J Physiol*, **238**, E69-82.
- Huang SC, Wu HM, Shoghi-Jadid K, et al. (2004) Investigation of a new input function validation approach for dynamic mouse microPET studies. *Mol Imaging Biol*, **6**, 34-46.
- Hulley S, Grady D, Bush T, et al. (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*, **280**, 605-13.
- Huynh HT, Tetenes E, Wallace L, Pollak M (1993) In vivo inhibition of insulin-like growth factor I gene expression by tamoxifen. *Cancer Res*, **53**, 1727-30.
- Hyder SM, Stancel GM, Chiappetta C, Murthy L, Boettger-Tong HL, Makela S (1996) Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res*, **56**, 3954-60.
- Ido T, Wan CN, Casella JS (1978) Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs: ¹⁸F labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-manose and ¹⁴C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J Labeled Compds Radiopharmacol*, **14**: 175- 183
- Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J (2008) Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology*, **149**, 3167-75.
- Ishii K, Sasaki M, Kitagaki H, et al. (1997) Reduction of cerebellar glucose metabolism in advanced Alzheimer's disease. *J Nucl Med*, **38**, 925-8.
- Ishii K, Sasaki M, Sakamoto S, Yamaji S, Kitagaki H, Mori E (1999) Tc-99m ethyl cysteinate dimer SPECT and 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose PET in Alzheimer's disease. Comparison of perfusion and metabolic patterns. *Clin Nucl Med*, **24**, 572-5.
- Ishikawa T, Zimmer M, Sies H (1986) Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS Lett*, **200**, 128-32.
- Jain AK, Duin RPW and Mao J (2000) Statistical Pattern Recognition: A Review. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, **22**, 4-37
- Jensen PK (1966) Antimycin insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particles. *Biochem. Biophys. Acta.*, **122**, 157-161.

- Joffe H, Hall JE, Gruber S, et al. (2006) Estrogen therapy selectively enhances prefrontal cognitive processes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with functional magnetic resonance imaging in perimenopausal and recently postmenopausal women. *Menopause*, **13**, 411-22.
- Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, Jones OT (1994) The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett.*, **355**, 178-182.
- Jordan VC, Fritz NF, Gottardis MM (1987) Strategies for breast cancer therapy with antiestrogens. *J Steroid Biochem*, **27**, 493-8.
- Judenhofer MS, Wehrl HF, Newport DF, et al. (2008) Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging. *Nat Med*, **14**, 459-65.
- Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, et al. (2003) Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*, **138**, 1-9.
- Kankofer M, Radzki RP, Bienko M, Albera E (2007) Antioxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **54**, 225-9.
- Kanofsky JR, Sima PD (1993) Singlet-oxygen generation at gas-liquid interfaces: a significant artifact in the measurement of singlet-oxygen yields from ozone-biomolecule reactions. *Photochem Photobiol*, **58**, 335-40.
- Kasai H, Nishimura S (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137-2145.
- Kepe V, Barrio JR, Huang SC, et al. (2006) Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 702-7.
- Ketterer B (1986) Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica.*, **16**, 957-973.
- Keun HC (2006) Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharmacol Ther*, **109**, 92-106.
- Keyes JW, Jr. (1995) SUV: standard uptake or silly useless value? *J Nucl Med*, **36**, 1836-9.

- Kim J, Herrero P, Sharp T, et al. (2006) Minimally invasive method of determining blood input function from PET images in rodents. *J Nucl Med*, **47**, 330-6.
- Kleinbaum D, Kupper L and Muller K (1988) Applied Regression Analysis and Other Multivariate Methods, 2nd ed., Pws-Kent, Boston
- Kleinman D, Karas M, Danilenko M, et al. (1996) Stimulation of endometrial cancer cell growth by tamoxifen is associated with increased insulin-like growth factor (IGF)-I induced tyrosine phosphorylation and reduction in IGF binding proteins. *Endocrinology*, **137**, 1089-95.
- Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, Berruex F, Fuerholz A, Fay LB (2006) Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Anal Biochem*, **352**, 274-81.
- Korte T, Fuchs M, Arkudas A, et al. (2005) Female mice lacking estrogen receptor beta display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction. *Circulation*, **111**, 2282-90.
- Korycka-Dahi M, Richardson T (1981) Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk. *J. Dairy. Sci.*, **63**, 1181-1208.
- Krinsky N (1994). In *Natural antioxidants in human health and disease*. (ed Frei B), pp. 239-262. San Diego: Academic Press.
- Krishnaraj R (1992) Negative modulation of human NK cell activity by purinoceptors. 2. Age-associated, gender-specific partial loss of sensitivity to ATP. *Cell Immunol*, **144**, 11-21.
- Ku HH, Brunk UT, Sohal RS (1993) Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med*, **15**, 621-7.
- Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA (1998) The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, **19**, 253-86.
- Kushner M, Tobin M, Alavi A, et al. (1987) Cerebellar glucose consumption in normal and pathologic states using fluorine-FDG and PET. *J Nucl Med*, **28**, 1667-70.
- Lacut K, Oger E, Le Gal G, et al. (2003) Differential effects of oral and transdermal postmenopausal estrogen replacement therapies on C-reactive protein. *Thromb Haemost*, **90**, 124-31.

- Laforest R, Sharp TL, Engelbach JA, et al. (2005) Measurement of input functions in rodents: challenges and solutions. *Nucl Med Biol*, **32**, 679-85.
- LeBlanc A (2002) Estrogen and Alzheimer's disease. *Curr Opin Investig Drugs*, **3**, 768-73.
- Lenz EM, Wilson ID (2007) Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res*, **6**, 443-58.
- Lethaby A, Hogervorst E, Richards M, Yesufu A, Yaffe K (2008) Hormone replacement therapy for cognitive function in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003122.
- Leybaert L (2005) Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab*, **25**, 2-16.
- Ley 25/90 del Medicamento, RD 479/93 por el que se regula los medicamentos radiofármacos de uso humano, y Normas de Correcta Fabricación.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet.*, 642-645.
- Liochev SI, Fridovich I (1994) The role of O₂·- in the production of HO· : in vitro and in vivo. *Free Radical Biol. Med.*, **16**, 29-33.
- Lippman RD (1985) Rapid *in vivo* quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp. Gerontol.*, **20**, 1-5.
- Lobaton CD, Vay L, Hernandez-Sanmiguel E, et al. (2005) Modulation of mitochondrial Ca(2+) uptake by estrogen receptor agonists and antagonists. *Br J Pharmacol*, **145**, 862-71.
- Lobo RA (1991) Clinical review 27: Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, **73**, 925-30.
- Loessner A, Alavi A, Lewandrowski KU, Mozley D, Souder E, Gur RE (1995) Regional cerebral function determined by FDG-PET in healthy volunteers: normal patterns and changes with age. *J Nucl Med*, **36**, 1141-9.
- Lohninger H. (1999). Teach/Me Data Analysis. Springer-Verlag, Berlín-New York-Tokio)

- Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G (1993) Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H₂O₂, and basal and maximum aerobic capacity. *Mech Ageing Dev*, **70**, 177-99.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farra aE, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lu KH, Hopper BR, Vargo TM, Yen SS (1979) Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod*, **21**, 193-203.
- Maki PM (2006a) Hormone therapy and cognitive function: is there a critical period for benefit? *Neuroscience*, **138**, 1027-30.
- Maki PM (2006b) Potential importance of early initiation of hormone therapy for cognitive benefit. *Menopause*, **13**, 6-7.
- Maki PM, Resnick SM (2000) Longitudinal effects of estrogen replacement therapy on PET cerebral blood flow and cognition. *Neurobiol Aging*, **21**, 373-83.
- Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L (2003) Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev*, **83**, 183-252.
- Manning PJ, Allum A, Jones S, Sutherland WH, Williams SM (2001) The effect of hormone replacement therapy on cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med*, **161**, 1772-6.
- Manning PJ, Sutherland WH, Allum AR, de Jong SA, Jones SD (2002) Effect of hormone replacement therapy on inflammation-sensitive proteins in post-menopausal women with Type 2 diabetes. *Diabet Med*, **19**, 847-52.
- Manson JE, Allison MA, Rossouw JE, et al. (2007) Estrogen therapy and coronary-artery calcification. *N Engl J Med*, **356**, 2591-602.
- Marquez DC, Pietras RJ (2001) Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. *Oncogene*, **20**, 5420-30.
- Martens H and Naes H (1989) *Multivariate Calibration*, Wiley, London
- Martin KA, Freeman MW (1993) Postmenopausal hormone-replacement therapy. *N Engl J Med*, **328**, 1115-7.

- Mason RP (1982) Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. In *Free radicals biology*. (ed Pryor WA), pp. 262-165. New York: Academic Press.
- Massafra C, Buonocore G, Gioia D, Sargentini I (1996) Changes in the erythrocyte antioxidant enzyme system during transdermal estradiol therapy for secondary amenorrhea. *Gynecol Endocrinol*, **10**, 155-8.
- Mazziota JC, Franckowiak RSJ, Phelps ME (1992) The use of positron emission tomography in the clinical assessment of dementia. *Semin Nucl Med* **22**:232-246.
- McCord JM (1974) Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, **185**, 5229-531.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase . An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 6049-6055.
- McCord JM, Keele BB, Fridovich Y (1974) An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **41**, 35-97.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, **34**, 939-44.
- McKinney KA, Duell PB, Wheaton DL, et al. (1997) Differential effects of subcutaneous estrogen and progesterone on low-density lipoprotein size and susceptibility to oxidation in postmenopausal rhesus monkeys. *Fertil Steril*, **68**, 525-30.
- Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **65**, 375-98.
- Mendelson CR, Evans CT, Simpson ER (1987) Regulation of aromatase in estrogen-producing cells. *J Steroid Biochem*, **27**, 753-7.
- Merz CN, Johnson BD, Berga SL, et al. (2009) Total estrogen time and obstructive coronary disease in women: insights from the NHLBI-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *J Womens Health (Larchmt)*, **18**, 1315-22.
- Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Winks DA, Grisham MB (1996) Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **271**, 40-47.

- Miller VM, Black DM, Brinton EA, et al. (2009) Using Basic Science to Design a Clinical Trial: Baseline Characteristics of Women Enrolled in the Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS). *J Cardiovasc Transl Res*, **2**, 228-239.
- Miller VT, Byington RL, Espeland MA, et al. (1995) Baseline characteristics of the PEPI participants. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions. *Control Clin Trials*, **16**, 54S-65S.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JEJ (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.*, **15**, 579-591.
- Miquel J, Fleming J (1986) Theoretical and experimental support for an "oxygen radical-mitochondrial injury" hypothesis of cell aging. In *Free radicals, aging and degenerative diseases*. (eds Johnson JEJ, Walford R, Harman D), pp. 51-74. New York.: Alan R. Liss.
- Mistur R, Mosconi L, Santi SD, et al. (2009) Current Challenges for the Early Detection of Alzheimer's Disease: Brain Imaging and CSF Studies. *J Clin Neurol*, **5**, 153-66.
- Moats RK, 2nd, Ramirez VD (2000) Electron microscopic visualization of membrane-mediated uptake and translocation of estrogen-BSA:colloidal gold by hep G2 cells. *J Endocrinol*, **166**, 631-47.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.
- Moorthy K, Sharma D, Basir SF, Baquer NZ (2005) Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. *Exp Gerontol*, **40**, 295-302.
- Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ Pre-Clinical Detection of Alzheimer's Disease Using FDG-PET, with or without Amyloid Imaging. *J Alzheimers Dis*.
- Mosconi L, De Santi S, Li J, et al. (2008) Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiol Aging*, **29**, 676-92.
- Mosconi L, De Santi S, Rusinek H, Convit A, de Leon MJ (2004a) Magnetic resonance and PET studies in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*, **4**, 831-49.
- Mosconi L, Mistur R, Switalski R, et al. (2009) FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **36**, 811-22.

- Mosconi L, Pupi A, De Cristofaro MT, Fayyaz M, Sorbi S, Herholz K (2004b) Functional interactions of the entorhinal cortex: an 18F-FDG PET study on normal aging and Alzheimer's disease. *J Nucl Med*, **45**, 382-92.
- Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, et al. (2005) Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta*, **360**, 81-6.
- Nagamatsu S, Kornhauser JM, Burant CF, Seino S, Mayo KE, Bell GI (1992) Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem*, **267**, 467-72.
- Navarro A, Boveris A (2004) Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **287**, R1244-9.
- NCF (1999) Normas de correcta fabricación: medicamentos de uso humano y medicamentos veterinarios. Normas sobre medicamentos de la Unión Europea, Vol. 4. Comisión Europea. Dirección General III.
- Nemere I, Farach-Carson MC (1998) Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 443-9.
- Nester OH, Huang CY (1975) Bismuth germanate: a high-z gamma-ray and charged particle detector. *I.E.E.E. Nucl Sci.* **NS-22**:68.
- Newberg A, Alavi A, Reivich M (2002) Determination of regional cerebral function with FDG-PET imaging in neuropsychiatric disorders. *Semin Nucl Med*, **32**, 13-34.
- Nicholson JK, Lindon JC (2008) Systems biology: Metabonomics. *Nature*, **455**, 1054-6.
- Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD (2006) Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci*, **7**, 74.
- North American Menopause Society (2010) Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*, **17**, 242-255.
- Ohkura T, Isse K, Akazawa K, Hamamoto M, Yaoi Y, Hagino N (1995) Long-term estrogen replacement therapy in female patients with dementia of the Alzheimer type: 7 case reports. *Dementia*, **6**, 99-107.

- Okamoto H (1985) Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans. *Bioassays*, **2**, 15-21.
- Oliver SG (2002) Functional genomics: lessons from yeast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **357**, 17-23.
- Orr WC, Sohal RS (1993) Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression of life span and resistance to oxidative stress in transgenic Drosophila melanogaster. *Arch Biochem Biophys*, **301**, 34-40.
- Orr WC, Sohal RS (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster. *Science*, **263**, 1128-30.
- Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J (2001) Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res*, **7**, 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
- Pacifici RE, Davies KJ (1991) Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free- radical theory of aging revisited. *Gerontology*, **37**, 166-80.
- Padgett HC, Schmidt DG, Luxen A, Bida GT, Satyamurthy N, Barrio JR (1989) Computer-controlled radiochemical synthesis: a chemistry process control unit for the automated production of radiochemicals. *Int J Rad Appl Instrum A*, **40**, 433-45.
- Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, et al. (2002) Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, **9**, 1-13.
- Pardo JV, Lee JT, Sheikh SA, et al. (2007) Where the brain grows old: decline in anterior cingulate and medial prefrontal function with normal aging. *Neuroimage*, **35**, 1231-7.
- Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006a) Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol*, **20**, 1996-2009.
- Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER (2006b) Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell*, **17**, 2125-37.
- Peñuelas I (2001) Radiofármacos PET. *Rev Esp Med Nuclear*, **20**: 477-498
- Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G (1998) The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol [B]*, **168**, 149-58.

- Perneczky R, Diehl-Schmid J, Forstl H, Drzezga A, Kurz A (2007a) Male gender is associated with greater cerebral hypometabolism in frontotemporal dementia: evidence for sex-related cognitive reserve. *Int J Geriatr Psychiatry*, **22**, 1135-40.
- Perneczky R, Drzezga A, Diehl-Schmid J, Li Y, Kurz A (2007b) Gender differences in brain reserve : an (18)F-FDG PET study in Alzheimer's disease. *J Neurol*, **254**, 1395-400.
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, **83**, 346-56.
- Peters AM and Myers M (1998) Physiological measurements with radionuclides in clinical practice. En Oxford University Press.
- Phelps ME, Hoffman EJ, Mullani NA, Ter-Pogossian MM (1975) Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. *J Nucl Med*, **16**, 210-24.
- Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE (1979) Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol*, **6**, 371-88.
- Philpot RM (1991) Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. *Methods. Enzymol.*, **206**, 623-631.
- Pickar JH, Thorneycroft I, Whitehead M (1998a) Effects of hormone replacement therapy on the endometrium and lipid parameters: a review of randomized clinical trials, 1985 to 1995. *Am J Obstet Gynecol*, **178**, 1087-99.
- Pickar JH, Wild RA, Walsh B, Hirvonen E, Lobo RA (1998b) Effects of different hormone replacement regimens on postmenopausal women with abnormal lipid levels. Menopause Study Group. *Climacteric*, **1**, 26-32.
- Pichler BJ, Judenhofer MS, Wehrl HF (2008) PET/MRI hybrid imaging: devices and initial results. *Eur Radiol*, **18**, 1077-86.
- Pietras RJ, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*, **265**, 69-72.
- Pietras RJ, Szego CM (1979) Estrogen receptors in uterine plasma membrane. *J Steroid Biochem*, **11**, 1471-83.
- Pietras RJ, Szego CM (1980) Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J*, **191**, 743-60.

- Pinto RE, Bartley W (1969) The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver. *Biochem J*, **115**, 449-56.
- Pirouz DM (2006) An Overview of Partial Least Squares. The Paul Merage School of Business University of California, Irvine
- Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A (1995) NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free. Radic. Biol. Med.*, **19**, 553-563.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ (2008) Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*, **70**, 165-90.
- Rasgon NL, Silverman D, Siddarth P, et al. (2005) Estrogen use and brain metabolic change in postmenopausal women. *Neurobiol Aging*, **26**, 229-35.
- Rasgon NL, Small GW, Siddarth P, et al. (2001) Estrogen use and brain metabolic change in older adults. A preliminary report. *Psychiatry Res*, **107**, 11-8.
- Rawley DA, Halliwell B (1983) Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanism: Relevance to the pathology of rheumatoid disease. *Clin. Sci.*, **64**, 649-653.
- Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol*, **16**, 100-15.
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*, **13**, 307-19.
- RD 1201/2005 sobre protección de los animales para experimentación y otros fines científicos
- RD 53/92 que aprueba el Reglamento sobre Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes.
- Resnick SM, Henderson VW (2002) Hormone therapy and risk of Alzheimer disease: a critical time. *JAMA*, **288**, 2170-2.
- Resnick SM, Maki PM, Golski S, Kraut MA, Zonderman AB (1998) Effects of estrogen replacement therapy on PET cerebral blood flow and neuropsychological performance. *Horm Behav*, **34**, 171-82.

- Resnick SM, Maki PM, Rapp SR, et al. (2006) Effects of combination estrogen plus progestin hormone treatment on cognition and affect. *J Clin Endocrinol Metab*, **91**, 1802-10.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, **307**, 1625-30.
- Rickwood D, Wilson MT, Darley-Usmar V (1987a). In *Mitochondria: a practical approach*. (eds Darley-Usmar V, Rickwood D, Wilson MT), pp. 1-16. Oxford: IRL Press Ltd.
- Rickwood R, Wilson MT, Darley-Usmar VM (1987b) Isolation and characteristics of intact mitochondria. In *Mitochondria, a practical approach*. (eds Rickwood R, Wilson MT, Darley-Usmar VM), pp. 1-16. Ed. IRL Press, Ltd. Reino Unido.
- Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. acad. Sci.*, **85**, 6465-6467.
- Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE (1999) Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation*, **100**, 713-6.
- Robertson DG (2005) Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci*, **85**, 809-22.
- Robertson DG, Reily MD, Baker JD (2005) Metabonomics in preclinical drug development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **1**, 363-76.
- Robinson JG (1996) How HRT Alters the Lipid Profile in Women with Diabetes. *Medscape Womens Health*, **1**, 4.
- Rodriguez AM, Carrico PM, Mazurkiewicz JE, Melendez JA (2000) Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂. *Free Radic Biol Med*, **29**, 801-13.
- Rodríguez-Delgado MA, González-Hernández G, Conde-González JE and Pérez-Trujillo JP (2002) Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry*, **78**, 4523–532.
- Rosano GM, Vitale C, Silvestri A, Fini M (2003) Hormone replacement therapy and cardioprotection: the end of the tale? *Ann N Y Acad Sci*, **997**, 351-7.

- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, **288**, 321-33.
- Ruiz-Larrea MB, Garrido MJ, Lacort M (1993) Estradiol-induced effects on glutathione metabolism in rat hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)*, **113**, 563-7.
- Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Martin C, Martinez R, Lacort M (1997) Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. *Rev Esp Fisiol*, **53**, 225-9.
- Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR (2000) Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5930-5.
- Sack MN, Rader DJ, Cannon RO, 3rd (1994) Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet*, **343**, 269-70.
- Salomon DS, Bianco C, De Santis M (1999) Cripto: a novel epidermal growth factor (EGF)-related peptide in mammary gland development and neoplasia. *Bioessays*, **21**, 61-70.
- Samaras K, Hayward CS, Sullivan D, Kelly RP, Campbell LV (1999) Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on central abdominal fat, glycemic control, lipid metabolism, and vascular factors in type 2 diabetes: a prospective study. *Diabetes Care*, **22**, 1401-7.
- Sastre J, Asensi M, Gasco E, et al. (1992) Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol*, **263**, R992-5.
- Sastre J, Millan A, Garcia de la Asuncion J, et al. (1998) A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **24**, 298-304.
- Sastre J, Pallardo FV, Pla R, et al. (1996) Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology*, **24**, 1199-205.
- Sawyer DT (1988) The redox thermodynamics for dioxygen species (O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HOO^{\cdot} , H_2O_2 and HOO^-) and monooxygen species (O , $O^{\cdot-}$, $\cdot OH$, and OH^-) in water and aprotic solvents. In *Oxygen radicals in biology and medicine*. (eds Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Sonntag C), pp. 11-20. New York: Ed. Plenum Press.

- Schelbert HR, Henze E, Phelps ME, Kuhl DE (1982) Assessment of regional myocardial ischemia by positron-emission computed tomography. *Am Heart J*, **103**, 588-97.
- Schiffer WK, Mirrione MM, Dewey SL (2007) Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with ¹⁸F-FDG in rodents. *J Nucl Med*, **48**, 277-87.
- Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M (2000) Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol*, **21**, 57-94.
- Schonknecht P, Henze M, Hunt A, Klinga K, Haberkorn U, Schroder J (2003) Hippocampal glucose metabolism is associated with cerebrospinal fluid estrogen levels in postmenopausal women with Alzheimer's disease. *Psychiatry Res*, **124**, 125-7.
- Serkova NJ, Zhang Y, Coatney JL, Hunter L, Wachs ME, Niemann CU, et al. (2007) Early detection of graft failure using the blood metabolic profile of a liver recipient. *Transplantation*, **83**, 517-521
- Setchell KD, Cassidy A (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, **129**, 758S-767S.
- Sevanian A, Davies K, Hochstein P (1985) Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J. Free Radic. Biol. Med.*, **1**, 117-124.
- Shehata M, Kamel MA (2008) Protective effect of antioxidant adjuvant treatment with hormone replacement therapy against cardiovascular diseases in ovariectomized rats. *Endocr Regul*, **42**, 69-75.
- Shen CC, Wertelecki W, Driggers WJ, LeDoux SP, Wilson GL (1995) Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells. *Mutat Res*, **337**, 19-23.
- Sherwin BB (2007) The critical period hypothesis: can it explain discrepancies in the oestrogen-cognition literature? *J Neuroendocrinol*, **19**, 77-81.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman A (1992) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, **349**, 431-434.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10771-10778.
- Shimoji K, Ravasi L, Schmidt K, et al. (2004) Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with ¹⁸F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling. *J Nucl Med*, **45**, 665-72.

- Shi J, Simpkins JW (1997) 17 beta-Estradiol modulation of glucose transporter 1 expression in blood-brain barrier. *Am J Physiol*, **272**, E1016-22.
- Shumaker SA, Legault C, Kuller L, et al. (2004) Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA*, **291**, 2947-58.
- Shwaery GT, Vita JA, Keaney JF, Jr. (1997) Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation*, **95**, 1378-85.
- Sies H (1983) Biochemistry of oxidative stress. In *Glutathione: storage, transport and turnover in mammals*. (eds Y. S, Higashi T, Tateishi N), pp. 63-69.: Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrecht.
- Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem.*, **25**, 1058-1071.
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, **215**, 213-9.
- Silva BM, Andrade PB, Martins RC, Seabra RM and Ferreira MA (2006) Principal component analysis as tool of characterization of quince (*Cydonia oblonga* Miller) jam. *Food Chemistry*, **94**, 504-512.
- Silver MH, Jilinskaia E, Perls TT (2001) Cognitive functional status of age-confirmed centenarians in a population-based study. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, **56**, P134-40.
- Sinaki M, Nwaogwugwu NC, Phillips BE, Mokri MP (2001) Effect of gender, age, and anthropometry on axial and appendicular muscle strength. *Am J Phys Med Rehabil*, **80**, 330-8.
- Skouby SO (1988) Oral contraceptives: effects on glucose and lipid metabolism in insulin-dependent diabetic women and women with previous gestational diabetes. A clinical and biochemical assessment. *Dan Med Bull*, **35**, 157-67.
- Skulachev VP (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quat. Rev. Biophys*, **29**, 169-202.
- Slater TF (1984) Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.*, **222**, 1-15.
- Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, et al. (2000) Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6037-42.

- Small GW, Kepe V, Ercoli LM, et al. (2006a) PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med*, **355**, 2652-63.
- Small GW, Silverman DH, Siddarth P, et al. (2006b) Effects of a 14-day healthy longevity lifestyle program on cognition and brain function. *Am J Geriatr Psychiatry*, **14**, 538-45.
- Smith TA (1998) FDG uptake, tumour characteristics and response to therapy: a review. *Nucl Med Commun*, **19**, 97-105.
- Sohal RS (1993) The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging (Milano)*, **5**, 3-17.
- Sohal RS, Sohal BH (1991) Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mech Ageing Dev*, **57**, 187-202.
- Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT (1990) Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech Ageing Dev*, **53**, 217-27.
- Sohn OS, Fiala ES, Upadhyaya P, Chae YH, El-Bayoumy K (1999) Comparative effects of phenylenebis(methylene)selenocyanate isomers on xenobiotic metabolizing enzymes in organs of female CD rats. *Carcinogenesis*, **20**, 615-21.
- Sohrabji F (2005) Estrogen: a neuroprotective or proinflammatory hormone? Emerging evidence from reproductive aging models. *Ann NY Acad Sci*, **1052**, 75-90.
- Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, et al. (2003) Application of biofluid 1H nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Anal Biochem*, **323**, 197-204.
- Soma MR, Osnago-Gadda I, Paoletti R, et al. (1993) The lowering of lipoprotein[a] induced by estrogen plus progesterone replacement therapy in postmenopausal women. *Arch Intern Med*, **153**, 1462-8.
- Sparrow CP, Olszewski J (1993) Cellular oxidation of low-density lipoprotein by thiols: Superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J. Lipid Res.*, **34**, 2051-2061.
- Spencer C, Crook D, Ross D, Cooper A, Whitehead M, Stevenson J (1999) A randomised comparison of the effects of oral versus transdermal 17beta-oestradiol, each combined with sequential oral norethisterone acetate, on serum lipoprotein levels. *Br J Obstet Gynaecol*, **106**, 948-53.
- Spencer JL, Waters EM, Romeo RD, Wood GE, Milner TA, McEwen BS (2008) Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol*, **29**, 219-37.

- Stadman ER (1992) Protein oxidation and aging. *Science*, **257**, 1220-1224.
- Strehler BL (1985) Aging: a challenge to science, society, and the individual. *Clin Geriatr Med*, **1**, 5-13.
- Summer LW, Mendes P and Dixon RA (2002). Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Review. Phytochemistry*, **62**, 817–836).
- Suter M, Richter C (1999) Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry*, **38**, 459-64.
- Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW (1983) Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol*, **19**, 615-21.
- Suzuki S, Brown CM, Wise PM (2006) Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine*, **29**, 209-15.
- Sweet WH (1951) The uses of nuclear disintegration in the diagnosis and treatment of brain tumor. *N Engl J Med*, **245**, 875-8.
- Szego CM, Davis JS (1967) Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 1711-8.
- Takada A, Neil J, Matsuda Y (1982) Clinicopathological study of alcoholic fibrosis. *American Journal of Gastroenterology*, **77**, 660-666.
- Tang MX, Jacobs D, Stern Y, et al. (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*, **348**, 429-32.
- The Writing Group for the PEPI Trial (1995) Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *JAMA*. **18**;273(3):199-208
- Tolbert NE, Essner E (1981) Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol*, **91**, 271s-283s.
- Topcuoglu A, Uzun H, Balci H, et al. (2009) Effects of estrogens on oxidative protein damage in plasma and tissues in ovariectomised rats. *Clin Invest Med*, **32**, E133-43.
- Utian WH, Archer DF, Bachmann GA, et al. (2008) Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*, **15**, 584-602.

- Vannucci SJ, Clark RR, Koehler-Stec E, et al. (1998) Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci*, **20**, 369-79.
- Vasudevan N, Pfaff DW (2007) Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles. *Endocr Rev*, **28**, 1-19.
- Vina J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardo FV (2005) Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett*, **579**, 2541-5.
- Vina J, Sastre J, Anton V, Bruseghini L, Esteras A, Asensi M (1992) Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. *Exs*, **62**, 136-44.
- Vina J, Sastre J, Pallardo F, Borrás C (2003) Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. *Antioxid Redox Signal*, **5**, 549-56.
- Viña J (1990) *Glutathione: Metabolism and physiological functions.*, CRC Press., Boca Raton, Florida.
- Viña J, Sáez GT, Wiggins D, Roberts AFC, Hems R, Krebs HA (1983) The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem. J.*, **212**, 39-44.
- Wang W and Kollman PA (2001) Computational study of protein specificity: The molecular basis of HIV-1 protease drug resistance. *PNAS*, **98**, 14937-14942
- Waring SC, Rocca WA, Petersen RC, O'Brien PC, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Postmenopausal estrogen replacement therapy and risk of AD: a population-based study. *Neurology*, **52**, 965-70.
- Watson CS, Norfleet AM, Pappas TC, Gametchu B (1999) Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. *Steroids*, **64**, 5-13.
- Watts CK, Sweeney KJ, Warlters A, Musgrove EA, Sutherland RL (1994) Antiestrogen regulation of cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **31**, 95-105.
- Wawrzak Z, Duax WL, Strong PD, Weisz J (1988) Steroid structure and function. Molecular conformation of 4-hydroxyestradiol and its relation to other catechol estrogens. *J Steroid Biochem*, **29**, 387-92.
- Weiss D, Sodee E, Alavi A, et al. (1990) Effects of normal aging on whole brain and regional glucose metabolism as assessed by ¹⁸F positron emission tomography. *J Nucl Med* **31**:771.

- Weljie AM, Newton J, Mercier P, Carlson E and Slupsky CM (2006) Targeted profiling: quantitative analysis of ¹H NMR metabolomics data. *Analytical Chemistry*, **78**, 4430–4442
- Westerhuis JA, Hoefsloot H, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, van Velzen EJJ, van Duijnhoven JPM and van Dorsten FA (2008) Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, **4**, 81–89
- Wishart DS (2008) Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, **19**, 482–493
- Wishart DS, Querengesser LMM, Lefebvre BA, Epstein NA, Greiner R and Newton JB (2001). Magnetic resonance diagnostics: a new technology for high-throughput clinical diagnostics. *Clinical Chemistry*, **47**, 1918–1921
- White RP (1990) Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agents. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, **1**, 401-415.
- Wilmoth JR, Deegan LJ, Lundstrom H, Horiuchi S (2000) Increase of maximum life-span in Sweden, 1861-1999. *Science*, **289**, 2366-8.
- Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM (2010) Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. *Gen Comp Endocrinol*, **166**, 520-8.
- Woolley CS (2007) Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **47**, 657-80.
- Wrenn FR, Jr., Good ML, Handler P (1951) The use of positron-emitting radioisotopes for the localization of brain tumors. *Science*, **113**, 525-7.
- Wüthrich K (2002) NMR Studies of structure and function of biological macromolecule. Nobel Lecture, 235–267
- Xu J, Kobayashi S, Yamaguchi S, Iijima K, Okada K, Yamashita K (2000) Gender effects on age-related changes in brain structure. *AJNR Am J Neuroradiol*, **21**, 112-8.
- Yamaji S, Ishii K, Sasaki M, et al. (2000) Evaluation of standardized uptake value to assess cerebral glucose metabolism. *Clin Nucl Med*, **25**, 11-6.
- Yang SH, Liu R, Perez EJ, et al. (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4130-5.
- Yoshii F, Barker WW, Chang JY, et al. (1988) Sensitivity of cerebral glucose metabolism to age, gender, brain volume, brain atrophy, and cerebrovascular risk factors. *J Cereb Blood Flow Metab*, **8**, 654-61.

- Young SHY, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach Jr. CN, Sunderman Jr. FW (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*, **33**, 214-220.
- Zhai P, Eurell TE, Cotthaus R, Jeffery EH, Bahr JM, Gross DR (2000) Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, H2766-75.
- Zhai P, Eurell TE, Cotthaus RP, Jeffery EH, Bahr JM, Gross DR (2001) Effects of dietary phytoestrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated female rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**, H1223-32.
- Zhang L, Fujii S, Kosaka H (2007) Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*, **25**, 407-14.