

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

ESTUDIO DEL POTENCIAL EFECTO NEUROPROTECTOR  
DE FITOESTRÓGENOS EN EL ICTUS ISQUÉMICO EN  
RATA.

MARÍA CASTELLÓ RUIZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de juliol de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. José María Vila Salinas
- Dr. José Castillo Sánchez
- Dra. Anna Planas Obrador
- Dr. José Sánchez Prieto
- Dr. Francisco Javier Miranda Alonso

Va ser dirigida per:

Dr. Enrique Alborch Domínguez

Dr. Germán Torregrosa Bernabé

Dr. Joan Salom Sanvalero

©Copyright: Servei de Publicacions  
María Castelló Ruiz

---

Dipòsit legal: V-3437-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7984-4

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Fisiología

ESTUDIO DEL POTENCIAL EFECTO  
NEUROPROTECTOR DE  
FITOESTRÓGENOS EN EL ICTUS  
ISQUÉMICO EN RATA

Tesis Doctoral

María Castelló Ruiz

Valencia, Mayo de 2010



**D. ENRIQUE ALBORCH DOMÍNGUEZ**, Catedrático de Fisiología de la Universitat de València y Jefe de Sección en el Centro de Investigación del Hospital “La Fe” de Valencia; **D. JUAN B. SALOM SANVALERO**, Facultativo del Centro de Investigación del Hospital “La Fe” de Valencia y Profesor Asociado del Departamento de Fisiología de la Universitat de València; y **D. GERMÁN TORREGROSA BERNABÉ**, Facultativo del Centro de Investigación del Hospital “La Fe” de Valencia y Profesor Asociado del Departamento de Fisiología de la Universitat de València

### **CERTIFICAN**

Que Dña. **MARÍA CASTELLÓ RUIZ**, Licenciada en Biología ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo experimental para la realización de su Tesis Doctoral “Estudio del potencial efecto neuroprotector de fitoestrógenos en el ictus isquémico en rata” en el Centro de Investigación del Hospital “La Fe” de Valencia.

Y para que así conste, expedimos el presente en Valencia, a 27 de Abril de 2010.

*Dr. Enrique Alborch Domínguez*

*Dr. Juan B. Salom Sanvalero*

*Dr. Germán Torregrosa Bernabé*



## **AGRADECIMIENTOS**

Con esta Tesis Doctoral culminan muchos años de trabajo; años llenos de ilusión, de alegría, de satisfacción, de esfuerzo y también, cómo no, de momentos difíciles; años que he tenido la suerte de compartir con todas aquellas personas a las que desde estas líneas quisiera agradecer y dedicar el presente trabajo:

A mis directores de Tesis Doctoral, los Dres. Enrique Alborch Domínguez, Germán Torregrosa Bernabé y Juan Bautista Salom Sanvalero. Muchas gracias por confiar en mí, por apoyarme y sobre todo por enseñarme lo bonita que puede llegar a ser la Ciencia.

A Xelo, mi compañera inseparable de “isquemias”, gracias por tu ayuda, por tus consejos, por tu alegría, por tus confianzas, por escuchar las mías, y en definitiva gracias por concederme algo que me acompañará vaya donde vaya: tu amistad.

A mis auxiliares favoritas, con las que tantas horas de quirófano he compartido, Carmen Mañez y Carmen Tirados, gracias por vuestro cariño, por vuestra paciencia y por vuestra comprensión.

A mis “compis” de laboratorio: a los que estuvieron (Fernando, Paula, Clara y Vannina) y a los que están (Pedro, Belén, Ricardo y Sonia). Muchas gracias a todos por los buenos momentos que hemos compartido, por vuestras palabras de ánimo, por vuestra ayuda, y sobre todo muchas gracias por ser compañeros.

Al resto de mis compañeros del Centro de Investigación del Hospital La Fe y del Departamento de Fisiología de la Universitat de València, a los que no quiero nombrar por no olvidarme de ninguno, gracias a todos por vuestra simpatía y disposición.

Al grupo de la Facultad de Farmacia, los Dres. Javier Miranda Alonso y José Centeno Gil, muchas gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado, y también con mucho cariño a mi acompañante de congresos la Dra. Teresa Jover Mengual.

Al Dr. José Vicente Gil Ponce por su inestimable colaboración en la determinación de isoflavonas y, en esta nueva etapa, por la confianza que ha depositado en mí.

A mis amigos, simplemente gracias por vuestra amistad, y sobre todo a Raquel y Richy por todas las noches sin salir, no os preocupéis las recuperaremos.

A mi familia de siempre y a mi nueva gran familia, gracias por acogermme y por intentar entender este mundo de la investigación por raro que parezca.

A mis padres y mi hermano porque sin duda a vosotros os debo todo lo que soy. Muchas gracias por apoyarme siempre, por estar ahí en los buenos, pero sobre todo, en los malos momentos, por escucharme cuando necesito desahogarme, por no permitirme abandonar, por animarme cuando estoy triste. Muchas gracias por darme una vida maravillosa. Esta Tesis va por vosotros.

A Jose, por haber elegido estar a mi lado en este viaje que es la vida, porque en tu compañía las cosas malas se convierten en buenas. Gracias por tu comprensión, tu ayuda, tu apoyo y tu generosidad. Nunca te podré estar lo suficientemente agradecida. Esta Tesis también va por ti, por los dos, en compensación por el tiempo que nos ha robado.



## **ABREVIATURAS**

**AA:** ácido araquidónico.

**ACM:** arteria cerebral media.

**AVPV:** núcleo anteroventral periventricular.

**DHA:** ácido docasahexanoico.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**EAC:** (“*endocrine active compounds*”), compuestos endocrinológicamente activos.

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**ER:** (“*estrogen receptor*”), receptor estrogénico.

**ERE:** (“*estrogen response element*”), elemento de respuesta al estrógeno

**EROs:** especies reactivas del oxígeno.

**Fito-0n:** dieta natural libre de fitoestrógenos.

**Fito-0r:** dieta refinada libre de fitoestrógenos.

**Fito-600:** dieta natural con un contenido de 600 µg de fitoestrógenos por gramo de dieta.

**FSC:** flujo sanguíneo cerebral.

**NOS:** (“*Nitric Oxide Synthase*”), óxido nítrico sintasa.

**PAS:** presión arterial sistémica.

**PC:** perfusión cerebral.

**RLs:** radicales libres.

**SDN:** (“*sexually dimorphic nucleus*”), núcleos sexualmente dimórficos.

**SERMs:** (“*selective estrogen receptor modulators*”), moduladores selectivos de los receptores estrogénicos.

**SHR:** (“*spontaneously hypertensive rats*”), ratas espontáneamente hipertensas.

**THS:** terapia hormonal sustitutiva.

**TIA:** (“*transient ischemic attack*”), accidente isquémico transitorio.

**tPA:** (“*tisular plasminogen activator*”), activador de plasminógeno tisular.

**TTC:** (“*2,3,5 triphenyltetrazolium chloride*”) cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.

**WKY:** ratas Wistar-Kyoto.



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Epidemiología y clasificación del ictus.....	3
2. Isquemia cerebral.....	5
3. Fisiopatología de la isquemia cerebral: la cascada isquémica.....	7
4. Terapéutica del ictus.....	16
5. Prevención del ictus.....	19
5.1. Ictus e hipertensión.....	20
5.2. Ictus y género.....	22
6. Potencial del estrógeno en la prevención y tratamiento del ictus.....	22
7. Terapia hormonal sustitutiva.....	27
8. Fitoestrógenos.....	29
8.1. Metabolismo de las isoflavonas.....	31
8.2. Efectos biológicos de las isoflavonas.....	32
8.3. Cerebro, estrógeno y fitoestrógenos.....	37
 <b>OBJETIVOS</b> .....	 41
 <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	 45
1. Animales y dietas.....	47
2. Modelos experimentales.....	51
2.1. Modelo animal de ictus isquémico: oclusión-reperfusión de la arteria cerebral media mediante la técnica del filamento intraluminal en rata.....	51
2.2. Modelo animal de hipertensión: la rata SHR.....	56
3. Evaluación del daño cerebral isquémico.....	56
3.1. Valoración neurológica.....	56

3.2. Evaluación del volumen de infarto cerebral.....	57
4. Técnicas analíticas.....	58
4.1. Análisis del contenido de isoflavonas en las dietas.....	58
4.2. Análisis del contenido de isoflavonas en el plasma.....	60
5. Protocolos experimentales.....	61
5.1. Criterios de exclusión .....	61
5.2. Neuroprotección preventiva: estudio del efecto de los fitoestrógenos dietéticos en la prevención del ictus.....	62
5.2.1. Influencia del género.....	62
5.2.2. Influencia de la hipertensión.....	64
5.3. Neuroprotección aguda: estudio de la administración de isoflavonas puras en la fase superaguda del ictus.....	65
5.3.1. Influencia del género.....	65
5.3.2. Influencia de la hipertensión.....	68
6. Análisis estadístico de los resultados.....	70
<b>RESULTADOS</b> .....	73
A) NEUROPROTECCIÓN PREVENTIVA.....	75
Contenido de isoflavonas en las dietas.....	75
1. Normotensión.....	75
1.1. Evolución ponderal.....	75
1.2. Hemodinámica cerebral y sistémica durante la oclusión- reperfusión de la ACM.....	76
1.2.1. Ratas macho.....	76

1.2.2. Ratas hembra.....	79
1.3. Evaluación del daño cerebral isquémico: valoración neurológica y tamaño de infarto.....	80
1.3.1 Ratas macho.....	80
1.3.2 Ratas hembra.....	84
2. Hipertensión.....	87
2.1. Evolución ponderal.....	87
2.2. Hemodinámica cerebral y sistémica durante la oclusión- reperfusión de la ACM.....	88
2.3. Evaluación del daño cerebral isquémico: valoración neurológica y tamaño de infarto.....	90
B) NEUROPROTECCIÓN AGUDA.....	94
1. Normotensión.....	94
1.1. Evolución ponderal.....	94
1.2. Hemodinámica cerebral y sistémica durante la oclusión- reperfusión de la ACM.....	94
1.2.1. Ratas macho.....	94
1.2.2. Ratas hembra.....	97
1.3. Evaluación del daño cerebral isquémico: valoración neurológica y tamaño de infarto.....	98
1.3.1 Ratas macho.....	98
1.3.2 Ratas hembra.....	101
2. Hipertensión.....	104
2.2. Hemodinámica cerebral y sistémica durante la oclusión- reperfusión de la ACM.....	104
2.3. Evaluación del daño cerebral isquémico: valoración neurológica y tamaño de infarto.....	107

---

<b>DISCUSIÓN</b> .....	111
1. NEUROPROTECCIÓN PREVENTIVA: Fitoestrógenos dietéticos.....	114
1.1 Niveles de isoflavonas en la dieta.....	114
1.2. Influencia de la dieta sobre la hemodinámica cerebral y sistémica de ratas normotensas e hipertensas.....	118
1.3. Influencia del contenido de isoflavonas en la dieta sobre el daño cerebral isquémico en ratas normotensas.....	122
2. NEUROPROTECCIÓN AGUDA.....	128
2.1. Niveles de isoflavonas en el plasma.....	128
2.2. Efectos de las isoflavonas sobre el daño cerebral isquémico en ratas normotensas.....	131
3. HIPERTENSIÓN: efectos preventivos y agudos de los fitoestrógenos sobre el daño cerebral isquémico.....	136
<b>CONCLUSIONES</b> .....	141
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	145

# INTRODUCCIÓN





El cerebro humano es, en relación con su peso (2% de la masa corporal), el órgano que mayor cantidad de energía consume; recibe el 20% del gasto cardíaco y consume el 25% de O<sub>2</sub> y glucosa disponibles. Por su falta de sistemas de almacenamiento de sustratos energéticos, el cerebro humano es absolutamente dependiente del aporte continuado de sangre: bastan 10 segundos de interrupción del flujo sanguíneo para que un humano pierda la consciencia; después de 20 segundos cesa la actividad eléctrica, y al cabo de unos pocos minutos se manifiestan déficits neurológicos que pueden persistir durante toda la vida del individuo o incluso ocasionarle la muerte. El cerebro se protege frente a estas situaciones mediante determinados mecanismos anatómicos y funcionales que tienden a preservar el flujo sanguíneo en territorios deficitarios a partir de la irrigación de territorios perfundidos normalmente. Únicamente cuando se saturan estos sistemas de seguridad empieza a desarrollarse el daño cerebral.

## **1. EPIDEMIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DEL ICTUS**

El *accidente cerebrovascular agudo (ictus)* es un trastorno neurológico originado por la disminución brusca del aporte sanguíneo cerebral. En todo el mundo el ictus es responsable de la muerte de 5'5 millones de personas cada año. En Estados Unidos alrededor de 700.000 personas sufren un ictus cada año, lo que supone una incidencia de algo más de 200 casos por cada 100.000 habitantes. Una cifra similar se registra en España, lo que origina que cada año unos 80.000 españoles sufran algún tipo de accidente cerebrovascular. De ellos, un 10-12% mueren antes de los 30 días, y los que logran sobrevivir presentan un riesgo muy alto de sufrir un nuevo ictus durante los 6 meses posteriores. De los pacientes que sobreviven, dos tercios viven con déficits moderados, y el tercio restante quedan completamente incapacitados. En España el ictus es la segunda causa de muerte en los hombres después de las enfermedades isquémicas cardíacas, y en las mujeres la primera. Además, supone la primera causa de invalidez permanente y la segunda de

demencia. En la Comunidad Valenciana se registran aproximadamente 10.000 ictus al año, de los cuales alrededor de 600 ingresan en el Hospital La Fe de Valencia.

El ictus es una enfermedad heterogénea con más de 150 causas descritas. La mayoría de los registros de ictus han fracasado en el intento de establecer la causa en un 25-39% de los pacientes. Este grupo de ictus (los llamados “ictus criptogénicos”) deberían ser objeto de investigación clínica en el futuro. La clasificación de los subtipos de ictus puede tener diferentes propósitos; por ejemplo, describir las características de los pacientes en un ensayo clínico, agrupar pacientes en un estudio epidemiológico, fenotipar cuidadosamente pacientes en un estudio genético, y clasificar pacientes para la toma de decisiones terapéuticas en la práctica diaria. A lo largo de los años se han propuesto diferentes tipos de clasificación del ictus: 1) la clasificación del “National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Stroke Data Base”; 2) la clasificación del “Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP)”; la clasificación mayoritariamente utilizada del Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST); y 4) otras clasificaciones como la del “Laussane Stroke Registry” y el “Étude du profil Génétique de l’Infarctus Cérébral (GÉNIC)”. Todas ellas tienen sus debilidades y sus fortalezas (Amarencu y cols., 2009a).

Recientemente se ha propuesto una nueva clasificación de “fenotipado de ictus” completo, es decir, la etiología del ictus y la presencia de todas las patologías subyacentes divididas por grados de severidad, a diferencia de las clasificaciones anteriores basadas únicamente en la causa más probable del ictus. El primer paso consiste en graduar a cada paciente en cada uno de los 4 grupos principales de ictus isquémico: “A” de “atherosclerosis”; “S” de “small vessel disease” (enfermedad de vasos pequeños); “C” de “cardiac source” (origen cardíaco); y “O” de “other causes” (otras causas). Cada uno de estos fenotipos viene graduado del 1 al 3: 1 de “indudablemente una causa potencial de ictus”; 2 de “causalidad dudosa”; y 3 de “improbable causa directa del ictus” (pero la patología está presente). Cuando la patología está completamente ausente, el grado es “0”; cuando la gradación no es

posible debido a una información insuficiente o ausente, el grado es 9. Por último, se añaden 3 niveles para los instrumentos diagnósticos utilizados: nivel A, demostración directa por criterios o tests “gold-standard”; nivel B, evidencia indirecta o tests y criterios menos sensibles o específicos; nivel C, evidencia débil en ausencia de tests o criterios específicos. Por ejemplo, un paciente con una estenosis sintomática ipsilateral del 70%, leucoaraiosis, fibrilación auricular y recuento plaquetario de  $700.000/\text{mm}^3$  se clasificaría como A1-S3-C1-O3. El mismo paciente con una estenosis ipsilateral del 70%, sin imagen cerebral, ECG normal e imagen cardíaca normal se clasificaría como A1-S9-C0-O3. La clasificación exhaustiva de los diferentes tipo de ictus según esta aproximación puede consultarse en la descripción original de Amarencó y cols. (2009b).

## **2. ISQUEMIA CEREBRAL**

El fenómeno común a todos los tipos de ictus isquémicos es la *isquemia cerebral*, que se define como “*la reducción del aporte sanguíneo hasta unos niveles insuficientes para mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células cerebrales*”. Dependiendo de la intensidad y la duración de la isquemia, de su localización en el cerebro, y del calibre y distribución de los vasos sanguíneos implicados, el deterioro de la función cerebral puede ser temporal o permanente, focal o más generalizado, debutar de forma súbita o aparecer de forma progresiva, y abarcar desde síntomas imperceptibles hasta la muerte. Si la perfusión cerebral se restablece de forma espontánea y los síntomas neurológicos desaparecen, el episodio se denomina *accidente isquémico transitorio* (“transient ischemic attack”, TIA). Si la situación desencadenante persiste, se instaura el daño cerebral permanente y los déficits neurológicos se vuelven irreversibles, episodio denominado *ictus isquémico* (Flynn y cols., 2008). Recientemente se ha postulado que los términos convencionales TIA e ictus isquémico son principalmente descriptivos y basados en los síntomas y signos clínicos y, como tales, proporcionan escasa información acerca de la patología subyacente. Con la

creciente disponibilidad de las técnicas de imagen cerebral se han difuminado los límites entre ambas condiciones: los TIA se asocian de hecho con daño cerebral permanente, mientras que evidencias de daño cerebral permanente pueden hallarse en pacientes que no han experimentado ningún síntoma (Flynn y cols., 2008).

De acuerdo con el “estudio Framingham”, el 87% de los ictus son de tipo isquémico, y tienen su origen en el estrechamiento gradual (aterotrombosis) o en la oclusión súbita (trombo-embolismo) de alguna de las grandes arterias cerebrales; el 13% restante son de tipo hemorrágico y están originados por la rotura de un vaso sanguíneo en el parénquima (hemorragia intracerebral) o en la superficie cerebral (hemorragia subaracnoidea) (Wolf y cols., 1992). Si bien estos porcentajes son válidos para Estados Unidos y Europa, no lo son para países del Lejano Oriente, en los que la incidencia de los episodios hemorrágicos es de 2 a 3 veces superior (Flynn y cols., 2008). Un total del 65% de ictus de tipo oclusivo presentan lesiones en el territorio de la arteria cerebral media, el 2% en el de la arteria cerebral anterior, y el 9% en el de la arteria cerebral posterior. Un 15% presentan lesiones en el tronco encefálico y en el cerebelo, y el resto en regiones múltiples o limítrofes (Bogousslavsky y cols., 1988). Estos y otros muchos estudios epidemiológicos demuestran que la isquemia focal en el territorio de la arteria cerebral media es la causa dominante de ictus.

En el caso del ictus isquémico se establece la llamada *lesión de ictus* (Symon y cols., 1974), que consiste en un núcleo central densamente isquémico en el que tiene lugar la pérdida celular irreversible (*infarto*), rodeado por áreas de isquemia de menor intensidad en las que las células se encuentran estructuralmente intactas pero funcionalmente inactivas (*penumbra* isquémica). La penumbra isquémica incluye a su vez dos áreas: las isquémicas, que se recuperan espontáneamente (oligohemia benigna), y las que progresan a cambios irreversibles a menos que se instaure un tratamiento adecuado. Los factores que determinan la progresión de la penumbra al infarto son: la eficacia de la circulación colateral, la duración de la isquemia, y el estado funcional y metabólico previos de la célula. Desde el punto

de vista clínico, la penumbra es la diana más relevante y el foco de las investigaciones más numerosas.

La lesión de ictus se corresponde con los denominados “umbrales de flujo sanguíneo cerebral (FSC)”. Los umbrales de FSC más ampliamente aceptados son 20 y 10 ml/min por 100 g de tejido (40% y 20% del valor basal de 50 ml/min por 100 g, respectivamente). El tejido sano (incluyendo la oligohemia benigna) registra tasas de FSC superiores a 20 ml/min por 100 g; la penumbra registra tasas de entre 20 y 10 ml/min por 100 g; el núcleo isquémico registra tasas inferiores a 10 ml/min por 100 g. Debe destacarse que estos umbrales de FSC se han registrado en experimentos con animales, y su fiabilidad diagnóstica en humanos aún no ha sido establecida (Ginsberg, 2003). Una revisión reciente de las evidencias disponibles acerca de los umbrales de FSC para la penumbra y el núcleo isquémico en pacientes de *ictus*, demuestra que la variabilidad de dichos umbrales es muy elevada: entre 14.1 y 35.0 ml/min por 100 g para la penumbra, y entre 4.8 y 8.4 ml/min por 100 g para el núcleo isquémico (Bandera y cols., 2006).

### **3. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL: la cascada isquémica**

La persistencia de la isquemia desencadena una sucesión de eventos bioquímicos y moleculares que han recibido la denominación conjunta de *cascada isquémica*, la cual culmina en la muerte celular y en la instauración del infarto cerebral. El conocimiento de la cascada isquémica constituye la base para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento o prevención del ictus.

Las etapas principales de la cascada isquémica son las siguientes:

- a) Excitotoxicidad: el binomio  $\text{Ca}^{2+}$ -glutamato (Figura 1).

Como consecuencia de la interrupción del aporte de  $\text{O}_2$  las reservas energéticas (ATP y fosfocreatina) se agotan, y las células empiezan a metabolizar la glucosa de forma anaerobia. El resultado es, por una parte, la generación de ácido láctico (lactoacidosis), y por otra el cese de todas las reacciones y

mecanismos dependientes de ATP, entre los que se encuentran las bombas intercambiadoras de iones como la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependiente de ATP. Esto se traduce en la incapacidad de la célula para recaptar  $\text{K}^+$  por lo que se produce finalmente la *despolarización anóxica* con entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  y el consiguiente incremento de su concentración intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Otros mecanismos, como la inhibición de la bomba  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico o la acidosis causada por la acumulación de ácido láctico, contribuyen al incremento adicional de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Folbergrová y cols., 1990; Doyle y cols., 2008). A los fenómenos descritos se suma la liberación masiva del neurotransmisor excitador glutamato, cuyo efecto tóxico sobre las células ha sido acuñado con el término de *excitotoxicidad*. De forma resumida, la grave caída de los niveles de ATP en el núcleo isquémico da lugar a la despolarización de neuronas presinápticas que liberan un exceso de glutamato al medio extracelular, a la vez se produce una reversión de los transportadores encargados de su recaptación, lo que en conjunto, provoca una acumulación de glutamato en la hendidura sináptica y por tanto una sobreactivación de sus receptores específicos (Rossi y cols., 2000). Como consecuencia aún se incrementa más la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Tsubokawa y cols., 1994; 1996; Paschen, 1996). La consecuencia de este fenómeno es la activación masiva de enzimas catabólicos (Edvinsson y Krause, 2002).

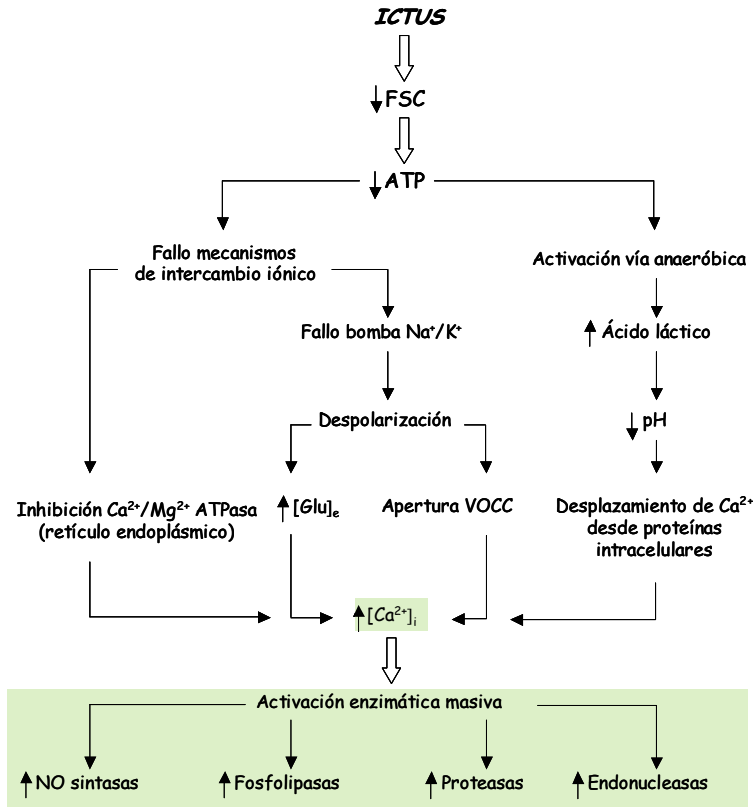


Figura 1. Consecuencias del agotamiento de energía en la fase hiperaguda de la isquemia cerebral. La disfunción de las bombas intercambiadoras de iones junto con la lactoacidosis originada por la activación de la vía anaeróbica, determinan la sobrecarga intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación masiva de enzimas catabólicas.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  = concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $[\text{Glu}]_e$  = concentración extracelular de glutamato; FSC = flujo sanguíneo cerebral; VOCC = canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje.

#### b) Estrés oxidativo (Figura 2).

El funcionamiento normal de las células produce radicales libres (RLs) y especies reactivas del oxígeno (EROs) que son eliminados tanto por mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa) como no enzimáticos (vitaminas E y C o glutatión). Sin embargo, la exposición de las células a concentraciones anormalmente elevadas de RLs y EROs resulta nociva; es lo que se conoce como *estrés oxidativo*. El estrés oxidativo participa en la etiología de numerosas enfermedades degenerativas del sistema nervioso, como la

enfermedad de Parkinson (Adams y Odunze, 1991) o la enfermedad de Alzheimer (Markesbery, 1997), así como en el envejecimiento (Samson y Nelson, 2000) y la isquemia cerebral (Peters y cols., 1998). En el caso de la isquemia focal permanente, la producción de radicales libres ocurre especialmente en la zona de penumbra isquémica, debido a que en esta zona la  $pO_2$  está parcialmente preservada por la circulación colateral. Si tiene lugar la reperfusión, la reoxigenación del tejido genera numerosas reacciones de oxidación enzimáticas y no enzimáticas que originan oxidantes altamente reactivos y por lo tanto una exacerbación del estrés oxidativo (Chan, 2001).

De entre los diferentes tipos de RLs generados durante la isquemia y reperfusión cabe destacar el papel del óxido nítrico (NO). El NO se sintetiza en muchos tipos celulares a partir de L-arginina por una familia de tres isoenzimas denominadas NO sintasas (NOS): neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). Las isoformas nNOS y eNOS se expresan constitutivamente en las neuronas y el endotelio respectivamente, la isoforma iNOS, en cambio, es la isoforma inducible que se expresa fundamentalmente como respuesta a estímulos inflamatorios. Se ha demostrado que durante y tras la isquemia cerebral se produce un incremento rápido y transitorio de NO (Kader y cols., 1993; Malinski y cols., 1993; Tominaga y cols., 1993). Esta sobreproducción de NO en el cerebro es consecuencia de la sobreactivación de las tres isoformas de la NOS, de forma que mientras que el NO producido por eNOS es beneficioso ya que induce una vasodilatación local, el NO producido por las isoformas nNOS e iNOS tiene efectos neurotóxicos que se deben fundamentalmente a su capacidad para reaccionar con el radical superóxido ( $O_2^-$ ) y formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), uno de los oxidantes más potentes y en gran parte responsable del daño celular causado por estrés oxidativo como nitración de proteínas, peroxidación lipídica y daño al ADN.

Otra fuente importante de radicales libres durante la isquemia son las fosfolipasas  $A_2$ . Éstas, son un grupo de enzimas cuya función es hidrolizar



fosfolípidos de membrana liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos como el araquidónico (AA) y el ácido docosahexanoico (DHA), ambos presentes en los fosfolípidos de las membranas neuronales. Durante la isquemia el aumento de la  $[Ca^{+2}]$  intracelular induce su sobreactivación provocando acumulación de los ácidos grasos AA y DHA, sustratos a partir de los cuales las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX) generan radicales libres y especies reactivas del oxígeno como anión superóxido ( $O_2^-$ ) y radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Este anión superóxido reacciona con el NO producido por las diferentes isoformas de NOS formando peroxinitrito cuyo potente papel como oxidante ya ha sido comentado (Torregrosa y cols., 2007).

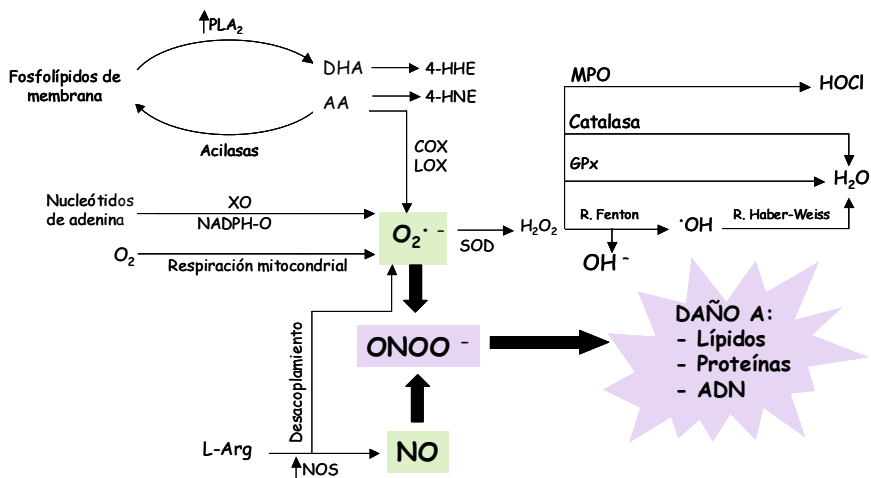


Figura 2.- Principales vías de formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno. En condiciones fisiológicas el anión superóxido ( $O_2^-$ ) generado por diferentes vías enzimáticas es catalizado por el enzima superóxido dismutasa (SOD) a  $H_2O_2$ , el cual sigue las vías de detoxificación que se indican. Cuando durante la isquemia se produce en exceso, el  $O_2^-$  reacciona con el NO generado tras el aumento de la actividad NO sintasa (NOS), dando lugar a peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) el cual degrada a las biomoléculas principales. La peroxidación no enzimática de los ácidos grasos libres, ácido araquidónico (AA) y ácido docosahexanoico (DHA), genera los aldehídos 4-hidroxinonenal (4-HNE) y 4-hidroxihexenal (4-HHE) respectivamente, los cuales contribuyen a la degradación de las biomoléculas principales. L-Arg = L-Arginina; COX = ciclooxigenasa; GPx = glutathion peroxidasa; LOX = lipoxigenasa; MPO = mieloperoxidasa; NADPH-O = NADPH oxidasa; PLA<sub>2</sub> = fosfolipasa A<sub>2</sub>; XO = xantina oxidasa.

c) Inflamación (Figura 3).

Durante la isquemia se originan factores proinflamatorios como citoquinas y quimioquinas en un amplio grupo de tipos celulares: células endoteliales, microglía, neuronas, plaquetas, leucocitos y fibroblastos (Huang y cols., 2006). Las citoquinas son mediadores críticos de la inflamación que regulan al alza la expresión de moléculas de adhesión como integrinas (ICAM-1, ICAM-2) o selectinas (E-selectina, P-selectina) favoreciendo con ello la adhesión de leucocitos a las paredes de las células endoteliales. La rotura de la barrera hemato-encefálica subsiguiente a la isquemia favorecerá la entrada de estos leucocitos adheridos hacia el parénquima cerebral, proceso determinante para la inducción del daño isquémico (Doyle y cols., 2008).

Una vez infiltrados en el parénquima cerebral, los neutrofilos promueven el daño tisular liberando RLs y enzimas proteolíticos (Doyle y cols., 2008). Este fenómeno, unido a la activación de la microglía, podría ser el responsable del agravamiento de la lesión isquémica. Sin embargo, es importante señalar que no todos los factores proinflamatorios contribuyen a la muerte neuronal; algunos de ellos como la citoquina TGF- $\beta$  (Doyle y cols., 2008) o la IL-10 (Planas y cols., 2006; Wang y cols., 2007; Mehta y cols., 2007) podrían tener un papel importante en la supervivencia celular.

También juegan un papel importante en los procesos inflamatorios determinados enzimas relacionados con el estrés oxidativo como son la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y algunas fosfolipasas. La presencia de estímulos inflamatorios induce intensamente la actividad de iNOS (presente en los neutrofilos infiltrados y las neuronas) y de otros enzimas inducibles (ej. ciclooxigenasa, COX-2), que generan un incremento en la producción de NO y prostanoïdes respectivamente, lo que al parecer contribuyen a la citotoxicidad inducida por la inflamación (Iadecola y cols., 1995).

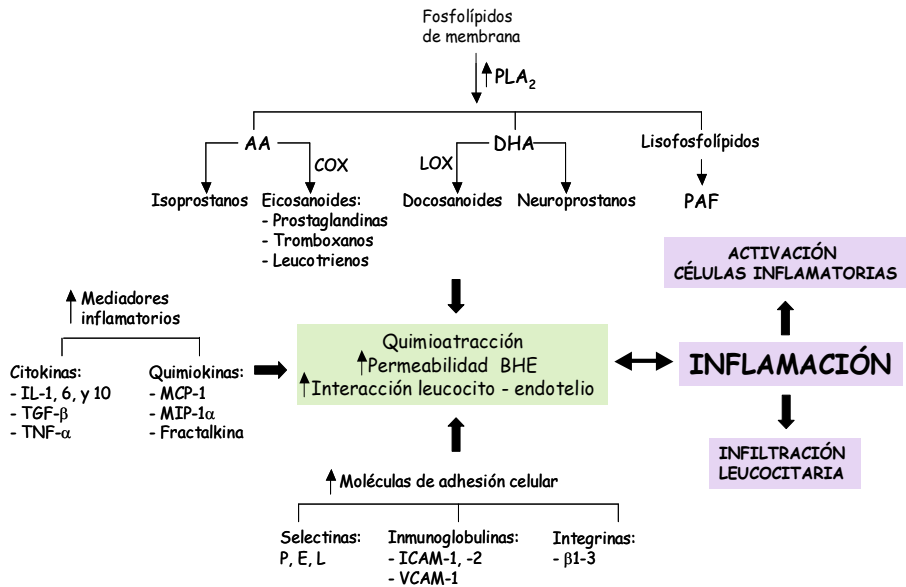


Figura 3.- Rutas que contribuyen al desarrollo de la respuesta inflamatoria durante la isquemia. La acción conjunta de los productos de degradación de los fosfolípidos de membrana (parte superior), la producción de otros mediadores inflamatorios como las citocinas y las quimiocinas (parte izquierda), y la expresión de moléculas de adhesión celular (parte inferior), contribuyen al deterioro de la barrera hematoencefálica (BHE) y a la infiltración de los leucocitos en el tejido cerebral. AA = ácido araquidónico; COX = ciclooxigenasa; DHA = ácido docosahexaenoico; ICAM = molécula de adhesión intercelular; IL = interleukina; LOX = lipoxigenasa; MCP-1 = proteína quimioatrayente de monocitos-1; MIP-1 $\alpha$  = proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$ ; PAF = factor activador de las plaquetas; PLA<sub>2</sub> = fosfolipasa A<sub>2</sub>; TGF- $\beta$  = factor de crecimiento transformante- $\beta$ ; TNF- $\alpha$  = factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ; VCAM = molécula de adhesión celular vascular.

d) Muerte neuronal: necrosis y apoptosis (Figura 4).

El conjunto de estímulos nocivos sufridos por las células como consecuencia de la isquemia conduce finalmente a la muerte neuronal. La necrosis es el mecanismo fundamental de muerte neuronal en el núcleo isquémico. En la penumbra, sin embargo, la preservación del flujo sanguíneo gracias a la circulación colateral ocasiona que las células mueran más lentamente y lo hagan por mecanismos de apoptosis.

Durante la isquemia, la apoptosis se desencadena como respuesta a diferentes estímulos: glutamato,  $\text{Ca}^{2+}$ , radicales libres, daño mitocondrial, factores inflamatorios, etc. La célula sufre entonces una serie de cambios morfológicos y bioquímicos a través de diferentes etapas que terminan con la degradación del ADN y de la infraestructura celular. La mitocondria tiene un papel importante en la apoptosis. Como consecuencia de los estímulos deletéreos anteriormente mencionados, la mitocondria puede formar poros en su membrana externa por donde escapan determinadas proteínas apoptogénicas como el citocromo c. Esta proteína, junto a otras forma el apoptosoma responsable en último término de la activación de la caspasa-3, verdadero ejecutor que activa la fragmentación del ADN (Doyle y cols., 2008). Cabe destacar el papel de las proteínas de la familia Bcl-2 en la apoptosis: mientras que miembros de esta familia como Bak, Bad, Bim o Bid son proapoptóticas porque promueven la formación de poros en la membrana mitocondrial por donde escapan las proteínas apoptogénicas, otros como Bcl-2, Bcl-XL o Bcl-w tienen la acción opuesta: impiden la formación de poros y por tanto tienen un papel antiapoptótico (Christophe y Nicolas, 2006).

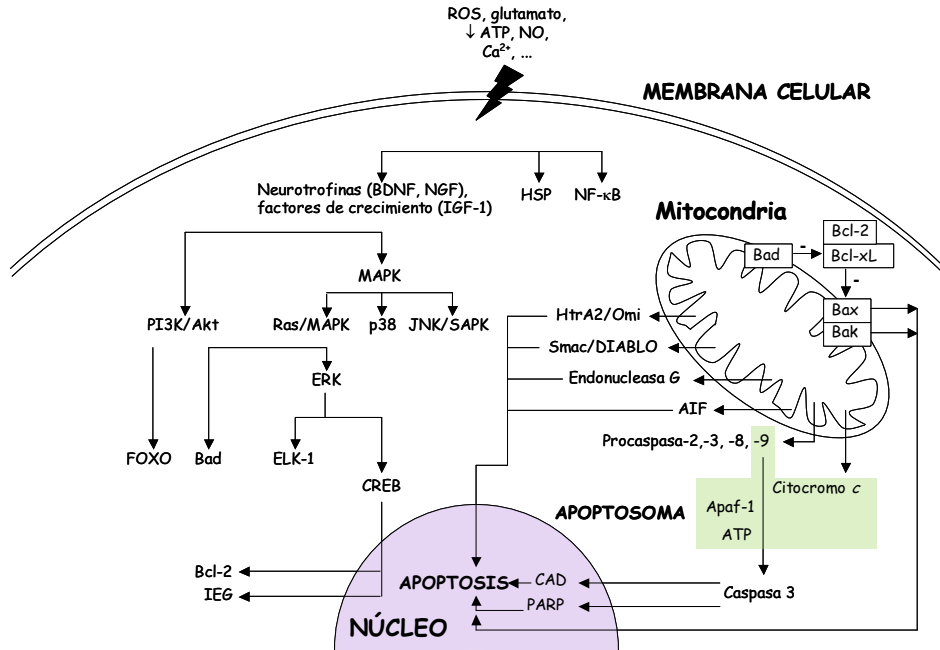


Figura 4.- Principales vías de señalización intracelular activadas por la isquemia. En la parte derecha se muestran los principales factores procedentes de la mitocondria, cuyas interacciones conducen a la apoptosis. En la parte izquierda se esquematizan las vías de señalización cuya activación tiene efectos antiapoptóticos. AIF = factor inductor de apoptosis; Apaf-1 = factor-1 de actividad proteasa apoptótico; BDNF = factor neurotrófico derivado del cerebro; CAD = DNasa activada por caspasas; CREB = unión a los elementos de respuesta AMPc; ELK-1 = factor de transcripción nuclear-1; ERK = kinasas reguladas por señal extracelular; FOXO = forkhead box subgrupo O; HSP = proteínas de estrés térmico; IEG = genes de expresión inmediata; IGF-1 = factor de crecimiento semejante a la insulina-1; JNK/SAPK = kinasa c-Jun N-terminal/kinasa de proteínas activada por estrés; MAPK = kinasas de proteínas activadas por mitógenos; NF-κB = factor nuclear-κB; NGF = factor de crecimiento nervioso; PI3K/Akt = kinasa de proteína B; PARP = poli-ADP ribosa polimerasa; ROS = especies reactivas del oxígeno. Smac/DIABLO = segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína directa de unión IAP con bajo p/.

#### **4. TERAPÉUTICA DEL ICTUS**

A pesar de los importantes progresos en el conocimiento de la fisiopatología del ictus, hasta la fecha los fármacos que han resultado ser eficaces en los ensayos preclínicos no han confirmado su eficacia en los pacientes de ictus. Las aproximaciones al tratamiento del ictus desarrolladas hasta el momento pueden agruparse en tres clases: 1) terapias para favorecer la disolución del elemento ocluidor (trombolíticas); 2) terapias dirigidas a aumentar la tolerancia celular a la isquemia promoviendo finalmente su recuperación funcional (neuroprotección); y 3) terapias, farmacológicas o celulares, dirigidas a potenciar los mecanismos de supervivencia celular endógenos y la generación de nuevas neuronas (neurorreparación).

El análisis del Stroke Trials Registry (<http://www.strokecenter.org/trials/>) en Octubre de 2008 revela 235 ensayos clínicos acerca del ictus isquémico agudo. De éstos, 81 (34%) han utilizado terapias anticoagulantes o trombolíticas; 12 (5%) han examinado intervenciones mecánicas (cirugía); y 5 (2%) han examinado ambas modalidades combinadas. Por lo tanto, aproximadamente el 42% se han centrado en mecanismos para recanalizar los vasos ocluidos. El otro gran grupo incluye las terapias contra la excitotoxicidad tras la isquemia-reperusión: 35 ensayos (15%) han utilizado antagonistas del glutamato, del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), de los canales iónicos, etc.

Por lo que respecta a las terapias de recanalización, la única aprobada por la FDA (US Food and Drug Administration) para el tratamiento agudo del ictus consiste en la administración intravenosa del activador de plasminógeno tisular (tPA), agente trombolítico que promueve la disolución del trombo ocluidor permitiendo la rápida restauración del flujo sanguíneo cerebral. Sin embargo, la realidad es que el uso de tPA queda restringido al 3-5% de los pacientes debido a su corta ventana terapéutica, de tan sólo 3 horas, y al aumento de complicaciones hemorrágicas tras su administración (Weinberger, 2006; Green, 2008). Con el fin de salvar estas limitaciones se siguen desarrollando nuevas terapias trombolíticas

que van desde la búsqueda de agentes fibrinolíticos, como la prourokinasa (Furlan y cols., 1999) o la desmoteplasa (Hacke y cols., 2005; Furlan y cols., 2006), hasta el desarrollo de agentes físicos que permitan la rápida disolución del trombo como pueden ser el uso de catéteres endovasculares, la sonolisis o la embolectomía (Sacco y cols., 2007).

El uso de sustancias anticoagulantes, como la heparina y el argatroban, o de sustancias antiagregantes como la aspirina, el clopidogrel o los inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria, que permitan mejorar el flujo sanguíneo en la zona de isquemia, es otra de las posibilidades que se contemplan para el tratamiento y/o prevención del ictus (terapia antitrombótica) (International Stroke Trial Collaborative Group, 1997; Tanahashi y Fukuuchi, 2002; Khaja y Grotta., 2007).

Sin embargo, tanto la terapia trombolítica como la antitrombótica únicamente serían eficaces en la restauración rápida del flujo sanguíneo cerebral pero no en la recuperación neuronal. Para ello se han desarrollado sustancias capaces de interferir en la cascada isquémica reduciendo o previniendo la muerte celular de la zona de penumbra; estas sustancias reciben el nombre de agentes neuroprotectores. Por tanto, podemos definir la neuroprotección como *la estrategia que antagoniza, interrumpe o enlentece la secuencia de los eventos bioquímicos y moleculares que componen la cascada isquémica* (Ginsberg, 2008), y que han sido descritos en el apartado anterior. Así pues, se han desarrollado fármacos antagonistas de los canales de  $Ca^{2+}$ , fármacos que atenúan el daño causado por la excitotoxicidad, ya sea por inhibición de la liberación de glutamato o bloqueando los receptores NMDA, fármacos inhibidores de la apoptosis, fármacos que disminuyen el daño causado por estrés oxidativo, o fármacos que actúan minimizando los procesos inflamatorios que acompañan a la isquemia (Weinberger, 2006; Green, 2008; Ginsberg, 2008).

Un gran número de estos fármacos neuroprotectores han demostrado ser muy prometedores para el tratamiento del ictus en modelos animales; sin embargo, han

fallado estrepitosamente cuando su uso se ha trasladado a humanos en los diferentes estudios clínicos (Ginsberg, 2008). Las razones propuestas para explicar estas discrepancias entre los resultados son muchas y variadas (De Keyser y cols., 1999; Alonso de Leciana y cols., 2001; Wahlgreen y Ahmed, 2004). El uso de animales jóvenes y sanos con tamaños de infarto homogéneos y bien localizados, a los que se administran los fármacos en cortas ventanas terapéuticas (menos de 3 horas) y en dosis elevadas (incluso tóxicas) sin causarles ningún daño, unido a las diferencias anatómicas, fisiológicas y de respuesta al daño celular existentes entre animales y humanos, han sido las principales críticas formuladas contra estos modelos (Danton y Dalton Dietrich, 2004; Martínez-Vila e Irimia, 2005). Por otro lado, la inclusión en los diferentes estudios clínicos de pacientes de avanzada edad, con múltiples factores de riesgo vascular e infartos de tamaño y localización muy variables, a los que se les administra el fármaco presuntamente neuroprotector con una amplia ventana terapéutica (superior a 6 horas en la mayoría de los casos, tiempo en el que ningún fármaco ha demostrado tener eficacia neuroprotectora), y en dosis inferiores a las utilizadas en animales para evitar posibles efectos secundarios, también contribuyen a la discrepancia entre resultados, lo que ha llevado, en la mayoría de las ocasiones, al rechazo prematuro de muchos fármacos con elevado potencial neuroprotector (Martínez-Vila e Irimia., 2005; Weinberger, 2006; Ginsberg, 2008).

Pese a todo ello, se siguen depositando grandes esperanzas en la búsqueda de nuevas terapias neuroprotectoras. Actualmente el concepto de que un único fármaco pueda bloquear la cascada isquémica y disminuir la muerte neuronal es poco realista, por lo que las terapias neuroprotectoras que se siguen desarrollando pasan por la combinación de diferentes terapias (por ejemplo la trombolítica con la neuroprotectora con el uso de tPA y Magnesio) (Ginsberg, 2008), o la búsqueda de una combinación de diferentes fármacos neuroprotectores que bloqueen la cascada isquémica en diferentes niveles o incluso un único fármaco que tenga varios mecanismos de acción que le permitan actuar sobre diferentes puntos de la cascada



isquémica. Además, un nuevo tipo de tratamiento está cobrando interés en los últimos tiempos; es la llamada “terapia neurorreparadora”, terapia basada en el uso de células madre (Gao y cols., 2005; Qu y cols., 2007; Zacharek y cols., 2007; Locatelli y cols., 2009) o sustancias farmacológicas (Zhang y cols., 2006; Cui y cols., 2007; Chopp y Li, 2008) con capacidad para estimular mecanismos de reparación endógenos que están presentes pero en bajos niveles, que permitirían una mejora funcional del individuo administrados incluso semanas o meses después del accidente isquémico.

## **5. PREVENCIÓN DEL ICTUS**

Parece evidente, después de lo expuesto, que la mayoría de los esfuerzos se han concentrado en las intervenciones agudas una vez se ha producido el ictus. Sin embargo, algunas de estas aproximaciones podrían ser mucho más eficaces si se instauraran antes del ictus en grupos con alto riesgo de padecer la enfermedad: es la “neuroprotección profiláctica” o “prevención primaria” del ictus. El primer paso de esta vía consiste en la identificación de los factores de riesgo.

La estimación del riesgo de padecer un primer ictus es de la máxima importancia. Numerosos factores pueden contribuir al riesgo de ictus, y no son pocos los pacientes que presentan más de uno. Sin embargo, algunos de estos factores no están suficientemente documentados, por lo que se carece de tratamientos específicos. Los factores de riesgo se clasifican de acuerdo con su potencial para ser modificados (no modificables, modificables y potencialmente modificables) y la solidez de las evidencias (bien documentados o no tan bien documentados). Los factores de riesgo no modificables son: edad, sexo, bajo peso en el nacimiento, raza/etnia y factores genéticos. Los factores de riesgo modificables y bien documentados son: hipertensión, exposición al humo del tabaco, diabetes, fibrilación auricular y otras condiciones cardíacas, dislipemia, estenosis carotídea, anemia falciforme, terapia hormonal postmenopáusica, dieta pobre, inactividad física, y obesidad y distribución de la grasa corporal. Factores de

riesgo peor documentados o potencialmente modificables son: síndrome metabólico, alcoholismo, drogadicción, anticonceptivos orales, alteraciones de la respiración durante el sueño, migraña, hiperhomocisteinemia, lipoproteína A elevada, fosfolipasa asociada a lipoproteínas elevada, hipercoagulabilidad, inflamación e infección (Goldstein y cols., 2006).

Algunos de los factores de riesgo que se acaban de mencionar están en relación directa con la dieta, por lo que la influencia de la dieta sobre el riesgo de ictus se ha convertido en un área de investigación preferente. Un extenso estudio epidemiológico sobre las pautas dietéticas y el riesgo de ictus en 71.768 mujeres estadounidenses de edades comprendidas entre los 38 y los 63 años, sugiere que las mujeres con una dieta que los autores denominan “prudente” (ingesta elevada de frutas, verduras, legumbres, pescado y cereales integrales), presentaron un riesgo relativo de ictus inferior al de mujeres que siguieron una dieta “Oeste” (ingesta elevada de carnes rojas, cereales refinados y dulces) (Fung y cols., 2004). Por otra parte, diferentes estudios experimentales sugieren que la inclusión en la dieta de determinados componentes o suplementos de origen vegetal como polifenoles del té (Negishi y cols., 2004; Suzuki y cols., 2004), extractos de Ginkgo biloba (Sasaki y cols., 2002) y flavonoides de Crataegus (Zhang y cols., 2004), pueden tener un efecto neuroprotector en el ictus.

### **5.1. Ictus e hipertensión**

Estudios epidemiológicos tan completos como el conocido “estudio Framingham” demuestran que la hipertensión arterial, especialmente la sistólica, es el factor de riesgo modificable más importante en el ictus. Varias son las causas que explican la estrecha relación entre hipertensión e incremento del riesgo de ictus. La primera es su capacidad para acelerar los procesos ateroscleróticos. La hipertensión contribuye a la rotura de la barrera endotelial, causando daños severos sobre las células endoteliales que conducen a la formación de las placas de ateroma iniciando el proceso aterosclerótico (Veglio y cols., 2009). El crecimiento o la rotura de estas placas ateroscleróticas ocasiona ictus de tipo isquémico por

estenosis o embolismo arterial, respectivamente. En segundo lugar, la hipertensión induce cambios adaptativos en las arterias cerebrales que provocan una reducción del diámetro interno vascular, ya sea por crecimiento (remodelación hipertrófica) o reordenación (remodelación eutrófica) de las células musculares, y rigidez de la pared vascular debido al incremento del contenido de colágeno (Baumbach y Heistad, 1988). Estos cambios en la arquitectura vascular inducen cambios funcionales tales como la alteración de los mecanismos de relajación endotelio-dependientes de los vasos sanguíneos cerebrales (Yang y cols., 1991; Didion y cols., 2000; Kazama y cols., 2003), o la alteración de los mecanismos de autorregulación cerebral. En este último caso, la reducción de la luz vascular y el incremento de la resistencia cerebrovascular provocan el desplazamiento de la curva de autorregulación hacia la derecha; es decir, que se requieren mayores presiones de perfusión para mantener constante el flujo sanguíneo cerebral (Barry, 1985; Baumbach y Heistad, 1988), lo que se traduce en un aumento de la susceptibilidad del cerebro a la isquemia, ya que los vasos cerebrales no son capaces de compensar caídas de la presión de perfusión (Immink y cols., 2004).

Por otro lado, diferentes evidencias experimentales sugieren que el estrés oxidativo participa en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. Estudios recientes demuestran un aumento del estrés oxidativo en el cerebro de las dos cepas de ratas ampliamente utilizadas para el estudio de la hipertensión, las ratas SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) y las ratas SHRSP (Stroke Prone Spontaneously Hipertensive Rats) (Lee y cols., 2004; Kishi y cols., 2004; Tai y cols., 2005), y un incremento de los marcadores de estrés oxidativo en pacientes con hipertensión esencial (Fortuño y cols., 2004; Ward y cols., 2004). En condiciones fisiológicas las células vasculares producen, de una forma controlada y a bajas concentraciones, EROs que funcionan como moléculas de señalización para el mantenimiento de la integridad vascular regulando la función endotelial y la contracción-relajación vascular (Touyz, 2004). El aumento de los niveles de EROs que se produce bajo condiciones patológicas, ocasiona un aumento del crecimiento

de las células musculares lisas, invasión de monocitos, peroxidación lipídica, inflamación y un aumento de la deposición extracelular de proteínas de matriz, factores importantes que contribuyen al daño vascular causado por hipertensión (Diep y cols., 2002; Taniyama y Griendling, 2003). Además, la capacidad del anión superóxido para reaccionar con el NO y formar peroxinitrito reduce su biodisponibilidad, lo que perjudica la función endotelial causando (entre otros) el descenso de la capacidad vasodilatadora endotelio-dependiente característico de la hipertensión (Zalba y cols., 2001; Polizio y cols., 2009).

## **5.2. Ictus y género**

El género es un factor importante en la epidemiología del ictus. Se ha objetivado que las mujeres en edad fértil presentan una menor incidencia y una menor susceptibilidad al daño cerebral tras el ictus que los hombres de la misma edad (Alkayed y cols., 2000; White, 2002). Sin embargo, esta situación de privilegio se pierde tras la menopausia (Brass, 2004; Bushnell, 2006). Resulta inevitable sugerir, por lo tanto, que las hormonas ováricas constituyen un mecanismo de prevención de determinadas patologías vasculares, entre ellas el ictus.

## **6. POTENCIAL DEL ESTRÓGENO EN LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL ICTUS**

Además de las evidencias obtenidas en humanos, diferentes estudios experimentales con modelos de isquemia cerebral han demostrado que los animales hembra presentan volúmenes de infarto menores que los machos de la misma edad y las hembras ovariectomizadas (Alkayed y cols., 1998; Park y cols., 2006), y que la administración exógena de estrógeno reduce el volumen de infarto cerebral tras la isquemia cerebral global y focal en ratas, ratones y jerbos hembra ovariectomizadas (Simpkins y cols., 1997; Rusa y cols., 1999; Jover y cols., 2002; Shughrue y Merchenthaler, 2003), en ratas y jerbos macho (Toung y cols., 1998;

Miller y cols., 2005), y en ratas hembra senescentes (Alkayed y cols., 1999; Dubal y Wise, 2001).

El estrógeno podría estar ejerciendo esta actividad neuroprotectora gracias a diferentes efectos vasculares:

1. *Efectos anti-aterogénicos.* El estrógeno, por sus acciones como inhibidor de la adherencia de monocitos a la pared endotelial (Nathan y cols., 1999), por su capacidad para disminuir las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) y aumentar las de alta densidad (HDLs) (The writing group for the PEPI trial, 1995), y por su capacidad para promover la re-endotelización del vaso sanguíneo (Morales y cols., 1995; Krasinski y cols., 1997; Arnal y cols., 2007), es capaz de prevenir la formación de placas de ateroma.
2. *Efectos vasodilatadores.* El estrógeno, a través del aumento de la expresión génica de enzimas productores de sustancias vasodilatadoras (Weiner y cols., 1994; Binko y Majewski, 1998), a través de la regulación de canales iónicos, y a través del aumento de la liberación de óxido nítrico (NO) (Mikkola y Clarkson, 2002), media la dilatación de los vasos sanguíneos.
3. *Efecto anti-hipertensor.* Los efectos vasodilatadores del estrógeno a nivel sistémico serían los responsables de su acción antihipertensora.

---

\* *Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas bioquímicamente relacionadas que desempeñan un importante papel en la fisiología cardiovascular y de la reproducción en la mujer. Los estrógenos humanos más importantes son la estrona, el estriol y el 17- $\beta$  estradiol, siendo éste último el estrógeno natural más potente. En el presente trabajo, se utilizará tanto el término genérico estrógeno, como los más específicos, estradiol o 17- $\beta$  estradiol.*

Además, el estrógeno podría ejercer neuroprotección por su interferencia en diferentes puntos de la cascada isquémica:

1. *Estrés oxidativo*. El estrógeno disminuyen el daño cerebral ocasionado por los radicales libres, ya sea por su acción directa como agente antioxidante inhibiendo la peroxidación lipídica (Singh y cols., 2006), o a través de la preservación de enzimas antioxidantes endógenos como glutation peroxidasa (GPx) o la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) (Borrás y cols., 2005).
2. *Inflamación*. Diferentes evidencias experimentales ponen de manifiesto que el estrógeno suprime factores pro-inflamatorios como radicales libres, citoquinas, quimioquinas y la iNOS, y aumenta la producción de citoquinas y quimioquinas anti-inflamatorias y otros factores de crecimiento (Maggi y cols., 2004). El estrógeno también tiene efectos sobre la microglia, donde actúa reduciendo la producción de radicales libres y citoquinas pro-inflamatorias, inhibiendo la expresión de iNOS, (Vegeto y cols., 2003), prostaglandinas, y metaloproteasas de matriz (MMP-9), previniendo los cambios morfológicos que ocurren en la microglia durante la respuesta inflamatoria (Vegeto y cols., 2001; 2004) y disminuyendo su actividad fagocítica (Bruce-Keller y cols., 2000). En astrocitos, el estrógeno es capaz de suprimir la expresión de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP), disminuyendo así el daño inflamatorio (Garcia-Ovejero y cols., 2002; Vegeto y cols., 2003).
3. *Aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$* . Tras una estimulación excitotóxica (Nilsen y cols., 2002; Nilsen y Brinton, 2003) o pro-oxidante (Wang y cols., 2001; Wang y cols., 2003), el estrógeno es capaz de prevenir el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  citosólico y mitocondrial, disminuyendo así el daño celular que se produce en los primeros pasos de la cascada isquémica.

4. *Alteraciones de la membrana mitocondrial.* El estrógeno previene la ruptura del potencial de membrana mitocondrial, lo que previene a su vez la liberación de factores pro-apoptóticos (Singh y cols., 2006).
5. *Excitotoxicidad.* El estrógeno aumenta la expresión de transportadores de glutamato, como GLAST (“glutamate/aspartate transporter”) o GLT-1 (“glutamate transporter-1”) en astrocitos, lo que se traduce en la reducción de los niveles de glutamato extracelular y en el menor daño excitotóxico (Pawlak y cols., 2005).
6. *Apoptosis.* A través de mecanismos genómicos el estrógeno induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Hoffman y cols., 2006; Suzuki y cols., 2006; Prokai y Simpkins, 2007) o Bcl-x (Stoltzner y cols., 2001), regula a la baja la expresión de proteínas apoptóticas como BAX (“Bcl-2 associated X protein”) (Sribnik y cols., 2004) o de genes de expresión inmediata (IEGs) como c-fos (Rau y cols., 2003a), atenúa la activación del marcador de apoptosis caspasa-3, e inhibe la fragmentación del ADN (Rau y cols., 2003b). Además el estrógeno puede inducir la expresión de genes esenciales para el mantenimiento de la arquitectura celular (Scoville y cols., 1997; Shah y cols., 2003).

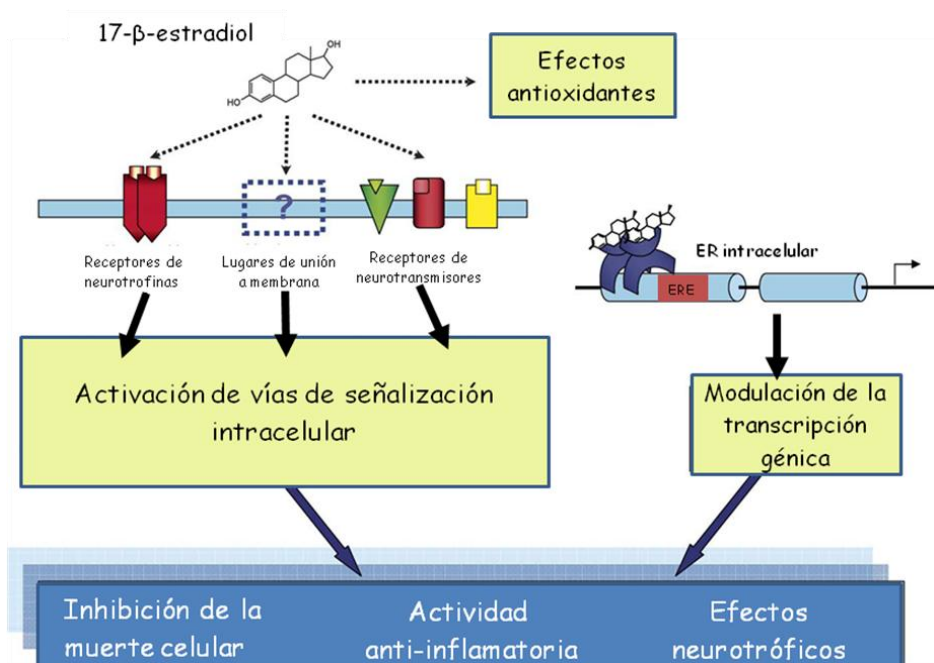
Estos efectos parecen estar mediados por mecanismos genómicos y no genómicos (Figura 5).

Los *mecanismos genómicos* se basan en la activación de los receptores estrogénicos (Estrogen Receptors, ERs) nucleares, que se expresan constitutivamente en muchas áreas cerebrales. Cuando el estrógeno se une a ellos, promueve su dimerización y translocación hasta el núcleo celular, donde se asocian con secuencias específicas del ADN (Estrogen-Response Element, ERE), e inician la transcripción génica (Singh y cols., 2006; Prokai y Simpkins, 2007). Se han identificado dos isoformas del ER: ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ . Estas dos isoformas son genética y funcionalmente diferentes ya que, aunque tienen un 97% de homología en sus secuencias de unión al ADN (Tremblay y cols., 1997), difieren en su afinidad de

unión a ligando (con una homología de tan solo el 60%) y en sus patrones de expresión espacio-temporales (Kuiper y cols., 1997). Así pues, mientras que algunos estudios sugieren que el estrógeno ejerce su papel neuroprotector a través de ER- $\alpha$  (Gollapudi y Oblinger, 1999), otros afirman que lo hace a través de ER- $\beta$  (Sawada y cols., 2000). Además, nuevos miembros de la familia de receptores estrogénicos están siendo identificados en la actualidad, como es el caso de ER- $\gamma$  (Heard y cols., 2000; Hawkins y cols., 2000; Hentschke y Borgmeyer, 2003), de p-ER (Toran-Allerand, 2004) o ER-46 (Li y cols., 2003).

Los *mecanismos no genómicos* parecen ser los responsables de las respuestas rápidas que el estrógeno ejerce sobre las células, y que difícilmente podrían ser explicadas por una modulación transcripcional. Estos mecanismos suponen la activación de diferentes rutas de señalización celular que pueden ser independientes de ER, como es el caso de la acción antioxidante del estrógeno, o dependientes de ERs extranucleares, que podrían ser simplemente pools de ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  presentes en la membrana y citoplasma celulares que al unirse a estrógeno interactuarían con diferentes vías intracelulares regulando rápidamente la expresión de genes neuroprotectores (Toran-Allerand, 2004; Prokai y Simpkins, 2007), o nuevos receptores estrogénicos, como el recientemente identificado ER-X, que estaría asociado a la membrana plasmática y sería capaz de activar la cascada de MAPK e inducir así neuroprotección mediada por estrógeno (Toran-Allerand, 2004).





*Figura 5: Mecanismos genómicos y no genómicos que median el efecto de 17β-estradiol. La unión de la hormona a los ERE (“elementos de respuesta al estrógeno”) modula la transcripción génica (mecanismos genómicos). La interacción de la hormona con receptores localizados en la membrana plasmática, activa determinadas vías de señalización intracelular. La activación de ambos mecanismos, junto con el efecto antioxidante de la hormona, son los responsables de sus efectos beneficiosos sobre la función celular.*

## 7. TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA

En virtud de los aparentes efectos beneficiosos del estrógeno, hace unos 25 años se empezó a prescribir un suplemento hormonal de estrógeno y/o progesterona para mujeres postmenopáusicas, con el fin de eliminar los síntomas indeseables asociados a la menopausia (sofocos, pesadillas, insomnio, sequedad vaginal), así como de evitar la osteoporosis y las complicaciones cardiovasculares.

Este tratamiento recibió la denominación de Terapia Hormonal Sustitutiva (THS), que en principio se suponía eficaz y bien tolerado.

Las expectativas suscitadas por la THS se han visto truncadas durante el desarrollo de diferentes estudios clínicos diseñados para estudiar su eficacia. Los principales son el WHI (“Women’s Health Initiative”) (Rossouw y cols., 2002; Klaiber y cols., 2005; Mohandas y Mehta, 2007), y el HERS (“Heart and Estrogen/progestin Replacement Study”) (Hulley y cols., 1998; Simon y cols., 2001). Los resultados obtenidos han llevado a la interrupción inmediata de la THS porque revelaron que los riesgos derivados del tratamiento hormonal superaban a sus beneficios. En el WHI, por ejemplo, se objetivaron incrementos del 22% de los casos de cáncer de mama, del 29% de enfermedades cardiovasculares, y del 41% de ictus (Manson y cols., 2003; Rossouw y cols., 2002; Anderson y cols., 2004; Mattar y cols., 2008). No obstante, la polémica continúa abierta ya que se han detectado errores metodológicos graves en el diseño de ambos estudios relacionados, principalmente, con la edad de las mujeres incluidas, la dosis y el tipo de administración del preparado hormonal. Más del 70% de las mujeres incluidas en el WHI tenían edades superiores a los 60 años; es decir, habían transcurrido varios años desde el fin de la menopausia hasta el inicio de la terapia hormonal, lo que las predispondría a padecer una arterioesclerosis subclínica (Harman y cols., 2005a; Klaiber y cols., 2005). Por otro lado, muchos de los datos que demuestran un efecto cardiovascular positivo del estrógeno están basados en su administración cíclica (10-14 días al mes) y no diaria (Grodstein y cols., 2003), lo que proporcionaría a la mujer postmenopáusica unos niveles hormonales similares a los de su etapa premenopáusica. Además, deberían estudiarse nuevas vías de administración del combinado hormonal como, por ejemplo, el uso de parches transdérmicos, que permitirían administrar dosis menores de estrógeno (Scarabin y cols., 2003; Mohandas y Mehta, 2007). Así pues, ha surgido la necesidad de diseñar nuevos estudios epidemiológicos, como el KEEPS (“Kronos Early Estrogen Prevention Study”) (Harman y cols., 2005b), con el fin de corregir los errores atribuidos al

WHI y al HERS. No obstante, hasta que se obtengan resultados más prometedores, en la actualidad no se recomienda la prescripción de la THS.

El presunto fracaso de la THS ha estimulado la búsqueda de compuestos alternativos, sustancias que reproduzcan los efectos beneficiosos de la THS y que estén desprovistas de sus efectos nocivos. Unos buenos candidatos son los *moduladores selectivos de los receptores estrogénicos* (“Selective Estrogen Receptor Modulators”, SERMs), compuestos naturales o sintéticos que muestran una actividad agonista o antagonista del estrógeno según el tejido diana sobre el que actúan. Así pues, un SERM ideal funcionaría como antagonista en mama y útero, y como agonista en hueso, cerebro y sistema cardiovascular (Garrido y cols., 2003). Este es el caso de SERMs sintéticos como Tamoxifeno o Raloxifeno, fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer de mama y la osteoporosis respectivamente, y que podrían tener un papel protector frente a la enfermedad cardiovascular (Mikkola y Clarkson., 2002; Nandur y cols., 2004). Otros SERMs son los fitoestrógenos.

## **8. FITOESTRÓGENOS**

Los fitoestrógenos son un grupo de polifenoles presentes en la dieta, procedentes de varias especies vegetales y que se caracterizan por poseer cierta actividad estrogénica debido a su similitud estructural con el 17  $\beta$ -estradiol. Los fitoestrógenos se dividen en tres grupos: las isoflavonas, los lignanos y los cumestanos. De estos, las isoflavonas son las más abundantes y las mejor estudiadas por su interés nutricional y terapéutico. La principal fuente de isoflavonas en la dieta humana es la soja, en la que se encuentran principalmente las isoflavonas genistina, daidzina y glicitina, cuyas formas activas genisteína, daidzeína, y gliciteína han demostrado en el laboratorio tener actividad estrogénica (Vincent y Fitzpatrick, 2000; Krebs y cols., 2004), pero las isoflavonas también están presentes en otros vegetales como el trébol rojo donde las encontramos en

forma de biocanina A y formononetina, precursores de genisteína y daidzeína respectivamente (Setchell y cols., 2001; Ososki y Kennelly, 2003) (Figura 6).

Estudios epidemiológicos realizados en poblaciones asiáticas han demostrado que la incidencia de tumores hormono-dependientes (Mense y cols., 2008), de sintomatología vasomotora propia de la menopausia (sofocos) (Boulet y cols., 1994; Murkies y cols., 1998), de fracturas osteoporóticas (Usui, 2006) y de enfermedad cardiovascular (Beagelhole, 1990), es mucho menor que en poblaciones occidentales. Estas ventajas desaparecen cuando los asiáticos adoptan hábitos nutricionales propios de las poblaciones occidentales, lo que sugiere que su estilo de vida y no los factores genéticos serían los responsables de la baja incidencia de estas enfermedades (Adlercreutz y Mazur, 1997). Estas observaciones han llevado a buscar una respuesta en la dieta asiática. La soja forma parte de la dieta tradicional asiática y puesto que es muy rica en isoflavonas, se ha postulado que éstas podrían ser las responsables de dicha protección. De este modo, las isoflavonas quedarían encuadradas como uno de los grupos de *ingredientes funcionales*, es decir, de ingredientes alimentarios cuyas acciones biológicas van más allá de las puramente nutricionales, aportando beneficios para la salud (Palacios, 2002).



Figura 6: Clasificación de los fitoestrógenos. En rojo se indican los fitoestrógenos de origen vegetal de los tipos isoflavonas, lignanos y cumestanos, y en cursiva los de origen animal tras la biotransformación de sus correspondientes precursores vegetales.

### 8.1.- Metabolismo de las isoflavonas

Los fitoestrógenos, en su forma nativa en los vegetales se encuentran como precursores, y solamente después de ser ingeridos y mediante la acción enzimática de las bacterias intestinales se transforman en sus formas activas, las cuales son entonces absorbidas a través del epitelio intestinal (Adlercreutz, 1990; Setchell y Cassidy, 1999). Las isoflavonas, en concreto, se presentan en la soja en sus formas inactivas (glucósidos) genistina, daidzina y glicitina. Las glucosidasas de la microflora intestinal se encargan de romper el enlace entre la glucosa y la isoflavona, dando lugar a las formas activas (agliconas) genisteína, daidzeína y gliciteína, que son absorbidas por la mucosa intestinal y transportadas por la vena porta al hígado donde, por acción de las enzimas glucuroniltransferasas y sulfottransferasas, forman conjugados de glucurónidos y sulfatos, siendo la

glucuronización la principal vía de biotransformación de las isoflavonas (Stafiakos, 1997). Tras este primer paso hepático las formas activas pueden pasar a la circulación general o seguir la vía enterohepática por la que vuelven al intestino donde la microflora colónica vuelve a actuar sobre ellas produciendo metabolitos como equol y O-demetilangolesina (O-DMA), derivados de la daidzeína, o p-etilfenol, derivado de la genisteína (Rice y Whitehead, 2008). Así pues, tan solo un tercio de las isoflavonas circulantes lo hacen como agliconas libres; los dos tercios restantes son convertidos a metabolitos cuya acción, al menos en el caso del equol, es mucho más potente que la de su forma nativa (Atkinson y cols., 2005). Tanto las isoflavonas libres como sus metabolitos circulan libremente por el plasma con tiempos de vida media variables pero cortos (entre 3-7 horas) (Barnes, 1998), y son excretados en la orina o las heces durante las 24 horas posteriores a su ingesta (Axelson y cols., 1984; Joannou y cols., 1995).

## **8.2.- Efectos biológicos de las isoflavonas**

Las posibilidades terapéuticas de las isoflavonas han recibido mucha atención en los últimos años. Se ha postulado que este grupo de fitoestrógenos podrían tener aplicaciones clínicas en:

*1. Cáncer.* Varios estudios (Cassidy y cols., 1995; Nagata y cols., 1998; Lu y cols., 2000) han demostrado que las mujeres premenopáusicas que incluyen soja en sus dietas presentan menores niveles de estrógenos, hormona altamente relacionada en la iniciación y promoción del cáncer de mama. Además, se ha evidenciado que las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama presentan una excreción urinaria de isoflavonas más baja, y que altas concentraciones de estos compuestos se asocian a una menor incidencia de cáncer de mama (Zheng y cols., 1999). Todo esto unido a la evidencia de que las mujeres de poblaciones asiáticas, grandes consumidoras de soja, presentan menores tasas de aparición de este tipo de cáncer que mujeres occidentales (Adlercreutz, 2002; Nichenametla y cols., 2006; Usui, 2006) ha llevado a postular que el consumo de soja, y por tanto de

isoflavonas, podría estar implicado en la reducción el riesgo de padecer dicha enfermedad.

2. *Sintomatología climatérica.* Datos epidemiológicos han revelado que en Asia la incidencia de sofocos en mujeres postmenopáusicas es tan solo del 10-20%, frente al 70-80% observado en mujeres occidentales (Lock, 1994; Boulet y cols., 1994; Tang, 1994). Esto ha llevado a postular que los fitoestrógenos podrían ser los causantes de esta reducción en el número de sofocos ya que competirían con el estrógeno por un receptor al que ellos estimulan débilmente (Palacios, 2002). Se han diseñado diferentes estudios clínicos para comprobar los efectos de los fitoestrógenos sobre la sintomatología climatérica (Krebs y cols., 2004; Low Dog, 2005; Nelson y cols., 2006), y sus resultados son contradictorios: algunos muestran beneficio en mujeres tratadas con fitoestrógenos frente a las placebo y otros no. Así pues, los datos de los que se dispone hasta el momento no permiten obtener conclusiones definitivas sobre la eficacia de los fitoestrógenos en la prevención de los sofocos característicos de la menopausia.

3. *Osteoporosis.* La osteoporosis es una enfermedad mucho más frecuente en la mujer que en el varón y su origen se encuentra en una deficiencia hormonal ovárica. El estrógeno juega un importante papel en la fisiología del hueso inhibiendo la actividad de los osteoclastos. Así pues, la reposición estrogénica realizada mediante la THS es muy eficaz en el mantenimiento de masa ósea pero sus efectos negativos a nivel vascular y sobre el cáncer de mama han llevado a pensar en los fitoestrógenos como alternativas y, en concreto, en las isoflavonas de la soja que han demostrado disminuir la incidencia de osteoporosis en mujeres asiáticas (Report a WHO Study Group, 1994). Las isoflavonas han demostrado tener capacidad para mantener la masa ósea tanto en animales (Mayo, 1998; Sugimoto y Yamaguchi, 2000) como en mujeres peri y posmenopáusicas (Potter y cols., 1998; Wangen y cols., 2000; Alekel y cols., 2000) ya que su mayor afinidad por ER- $\beta$  presente en hueso impediría, de un modo similar al que lo hace el

estrógeno, la activación de los osteoclastos y, por tanto, la pérdida acelerada de masa ósea (Ishimi y cols., 1999).

4. *Patologías cardiovasculares.* Las isoflavonas parecen jugar un importante papel en la prevención primaria y/o secundaria de accidentes vasculares como la enfermedad coronaria o el ictus. Las células vasculares (endoteliales y musculares lisas) expresan tanto ER- $\alpha$  como ER- $\beta$ , sin embargo se ha demostrado que la expresión de ER- $\beta$  en la arteria carótida de rata es 40 veces superior a la de ER- $\alpha$  (Mäkelä y cols., 1999), y que la ausencia de ER- $\beta$  en ratones hace que éstos tengan una función vascular anormal y desarrollen hipertensión (Zhu y cols., 2002). Así pues, estos resultados sugieren que los ligandos de ER- $\beta$  podrían tener un efecto protector vascular, puesto que las isoflavonas se unen con gran afinidad a ER- $\beta$ , se postula sobre si estas sustancias tienen un papel protector en el sistema cardiovascular.

Las isoflavonas poseen *efectos anti-aterogénicos*. La aterosclerosis es un importante factor de riesgo en la enfermedad cardiovascular. Las isoflavonas han demostrado ser capaces de enlentecer el desarrollo de la placa ateromatosa produciendo inhibición de la adhesión celular y alterando la actividad de factores de crecimiento específicos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y citoquinas que influyen en la formación de la lesión (Raines y Ross, 1995). Además la genisteína, por un lado, ha demostrado tener un efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria al evitar la formación de trombina en la placa aterosclerótica, efecto probablemente muy relacionado con su actividad como inhibidora del enzima tirosin quinasa que juega un papel relevante en la formación de trombina y en los procesos inflamatorios generales (Wilcox y Blumenthal, 1995), y por otro lado, *in vitro*, es capaz de inhibir la angiogénesis y la proliferación de muchas células vasculares, procesos ateroscleroticamente muy importantes (Raines y Ross, 1995). Otro mecanismo que juega un papel importante en la progresión de la lesión aterosclerótica es la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Trabajos experimentales demuestran que las



LDLs aisladas en individuos que han ingerido soja son menos susceptibles a la oxidación que las de aquellos que ingieren una dieta libre de soja (Meng y cols., 1999) o que la genisteína puede, *ex vivo*, inhibir la oxidación de las LDL en presencia de agentes oxidantes (Kapiotis y cols., 1997). Es decir, en conjunto estos resultados parecen indicar que las isoflavonas poseen *efectos antioxidantes* que también contribuyen en gran medida a sus acciones vasculo-protectoras.

Por otro lado, el consumo de dietas ricas en soja ha demostrado tener *efectos hipocolesterolémicos* y ser, por tanto, otro mecanismo que contribuye a la protección frente a la enfermedad cardiovascular. Tanto en modelos animales (Anthony y cols., 1997) como en humanos (Anderson y cols., 1995; Potter y cols., 1998; Washburn y cols., 1999) el consumo de dietas ricas en soja provoca una marcada disminución de los niveles de LDL (y triglicéridos en algunos casos) y un modesto (y a veces nulo) aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sin embargo estos efectos sobre el perfil lipídico, aunque no puede descartarse, podrían no estar mediados por las isoflavonas sino por otros componentes diferentes de la soja como son la proteína de soja (que aumenta la excreción fecal de ácidos biliares, esenciales para la eliminación del colesterol) o los fitoesteroles.

En diferentes estudios experimentales (Nevala y cols., 2000; Martin y cols., 2001; 2002) y clínicos (Rivas y cols., 2002; Welty y cols., 2007), el consumo de soja ha demostrado tener una *acción anti-hipertensora*; de hecho, parece que son las isoflavonas presentes en la soja las responsables mayoritarias de este efecto, lo que permite considerar a estas sustancias como buenas candidatas para la prevención y/o tratamiento del ictus. Este efecto anti-hipertensor postulado para las isoflavonas podría deberse, en primer lugar, a su capacidad para actuar como agentes vasodilatadores. Diferentes trabajos han demostrado que las isoflavonas son capaces de inducir relajación de segmentos arteriales aislados (Mishra y cols., 2000; Torregrosa y cols., 2003; Lee y Man, 2003; Sobey y cols., 2004) y de aumentar el flujo sanguíneo de determinados lechos vasculares, como el cerebral, *in vivo* (Chin Disting y cols., 2004; Salom y cols., 2006). Varios son los

mecanismos propuestos para explicar esta actividad vasodilatadora de las isoflavonas, el primero postula que las isoflavonas median relajación arterial porque bloquean los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje e impiden su entrada a la célula muscular (Figtree y cols., 2000; Torregrosa y cols., 2003). El segundo, en cambio, apuesta por una acción dependiente de endotelio que consiste en aumentar los niveles de NO, un potente agente vasodilatador que protege la pared de los vasos sanguíneo frente a la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares. Las isoflavonas, y fundamentalmente la genisteína, son capaces de aumentar la biodisponibilidad de NO en el endotelio vascular, ya sea directamente aumentando la expresión de eNOS, o indirectamente por su actividad antioxidante, reduciendo los niveles de las EROs, como el anión superóxido, y por tanto disminuyendo la oxidación del NO (Mahn y cols., 2005; Siow y cols., 2007). Este aumento de los niveles de NO, en primer lugar, mejora la función endotelial restaurando la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio y por tanto disminuyendo la presión arterial (Park y cols., 2005; Mahn y cols., 2005; Siow y cols., 2007) y, en segundo lugar, juega un importante papel protector al poseer una serie de potentes efectos anti-aterogénicos que incluyen la inhibición de la interacción leucocito-endotelio, la proliferación de las células musculares lisas y la agregación plaquetaria (Kerr y cols., 1999).

Además otros efectos postulados para las isoflavonas podrían contribuir a sus acciones protectoras frente a la hipertensión. Se ha observado que las isoflavonas pueden disminuir los niveles de endotelina-1 lo que favorece la vasodilatación y por tanto a la disminución de la presión arterial (Rimbach y cols., 2008; Siow y cols., 2007). Por otro lado los efectos antioxidantes de las isoflavonas parecen contribuir en gran medida a la disminución de estrés oxidativo y de los niveles del potente agente oxidante peroxinitrito (Mizutani y cols., 2000; Yen y Lai., 2003). Y por último hemos de señalar una contribución de los efectos anti-aterogénicos de las isoflavonas e hipocolesterolemicos de la soja a las acciones protectoras de las isoflavonas en presencia de hipertensión. En conclusión, las

isoflavonas por el conjunto de sus acciones sobre el sistema vascular podrían convertirse en unas firmes candidatas en la prevención del accidente cerebrovascular, sin embargo poco se conoce acerca de su efecto terapéutico en presencia de hipertensión.

Las isoflavonas tienen una configuración espacial similar a la del estrógeno lo que les permite unirse al receptor estrogénico y actuar como agonistas o antagonistas aunque con una potencia estrogénica entre 100 y 1000 veces menor a la del estrógeno, pese a ello, el potencial biológico de estas sustancias no debe ser ignorado ya que el consumo de una dieta rica en soja puede aumentar 10.000 veces los niveles de isoflavona respecto a los de estrógeno (Adlercreutz y cols., 1993a; 1993b). Las isoflavonas poseen mayor afinidad de unión a ER- $\beta$ , presente en cerebro, hueso vejiga y epitelio vascular (Setchell y Cassidy, 1999) que a ER- $\alpha$ , presente sobretudo en los órganos reproductores. Así pues, se ha demostrado que la genisteína tiene, respecto al estrógeno, una afinidad de unión a ER- $\alpha$  tan solo del 4%, mientras que la afinidad por ER- $\beta$  es del 87%; sin embargo la daidzeína es menos potente con afinidades del 0.1% para ER- $\alpha$  y 0.5% para ER- $\beta$  (Kuiper y cols., 1998). Esta mayor afinidad de unión a ER- $\beta$  y la diferente distribución de ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  en el organismo han llevado a considerar a las isoflavonas como SERM's sugiriendo que éstas podrían poseer las mismas acciones fisiológicas beneficiosas atribuidas para el estrógeno pero sin estar asociadas a sus efectos negativos (Setchell y cols., 2001). Por todo ello se ha postulado que los fitoestrógenos, y más concretamente las isoflavonas, podrían ser unos buenos sustitutos del combinado hormonal utilizado en la THS, puesto que estos mimetizarían las acciones vasoprotectoras del estradiol sin afectar al tejido reproductor y por tanto disminuyendo el riesgo de aparición de cáncer de mama.

### **8.3. Cerebro, estrógenos y fitoestrógenos.**

Es sobradamente conocido que los órganos del aparato reproductor y las glándulas mamarias no son las únicas dianas de las hormonas sexuales. El corazón, el hígado, los huesos y el cerebro también resultan influenciados por dichas

hormonas. A continuación se describen algunos de los efectos de los estrógenos y los fitoestrógenos en el cerebro.

Tanto las gónadas como el cerebro comienzan su desarrollo como órganos bipotenciales, diferenciándose en masculino o femenino en virtud de determinados estímulos en el contexto del desarrollo. La diferenciación sexual del cerebro ocurre en el periodo que se extiende desde la embriogénesis tardía al periodo postnatal temprano, periodo de máxima sensibilidad de dicho órgano a las hormonas sexuales denominado “periodo crítico de diferenciación sexual del cerebro” (Schwarz y McCarthy, 2008a; 2008b). Durante este periodo el cerebro en desarrollo es muy vulnerable a la perturbación inducida por compuestos endocrinológicamente activos (“endocrine-active compounds”, EAC). La “United States Environmental Protection Agency” define al EAC como “una sustancia química exógena o una mezcla de ellas, que altera la estructura o la función del sistema endocrinológico y causa efectos adversos en el organismo, su progenie, o en determinadas poblaciones o subpoblaciones”. Hasta la fecha se han identificado centenares de sustancias que se ajustan a esta definición, y que van desde sustancias sintéticas presentes en toda clase de plásticos (e. g. Bisfenol-A), a sustancias naturales como los fitoestrógenos. Dicha identificación se basa sobre todo en la afinidad del presunto EAC por los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  del ER (Patisaul y Polston, 2008).

Existe gran interés en la identificación de biomarcadores de la exposición a EAC tanto en animales como en humanos. El biomarcador tradicionalmente utilizado para evaluar la perturbación que el presunto EAC pudiera inducir en el desarrollo, ha sido los cambios volumétricos de los núcleos cerebrales sexualmente dimórficos. Los estudios se han centrado fundamentalmente en dos regiones hipotalámicas sexualmente dimórficas en rata: el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), y el núcleo sexualmente dimórfico (“sexually dimorphic nucleus”, SDN) del área preóptica. El núcleo SDN es 2-5 veces mayor en machos que en hembras, y parece regular el comportamiento sexual y los niveles de

gonadotropina. El núcleo AVPV es unas 2 veces mayor en hembras que en machos y regula la “hormona liberadora de la hormona luteinizante”. Ambos se encuentran bajo la influencia de las hormonas esteroideas y/o moléculas pseudo-estrogénicas, y muestran una plasticidad durante el desarrollo postnatal mayor de lo que se suponía en los primeros estudios (Patisaul y Polston, 2008).

Diferentes estudios han demostrado que los fitoestrógenos afectan al volumen de los núcleos SDN y AVPV. De particular interés es el estudio del efecto de la exposición a dietas con diferentes concentraciones de fitoestrógenos. Los resultados demuestran que el consumo continuado de fitoestrógenos altera el volumen de los núcleos SDN y AVPV (Lund y cols., 2001a; Lephart y cols., 2003). Por otra parte, la exposición aguda al fitoestrógeno genisteína durante períodos críticos del desarrollo, también altera el volumen de los núcleos cerebrales dimórficos (Patisaul y cols., 2007; Patisaul y Polston, 2008). En conjunto, estos resultados sugieren que los fitoestrógenos, concretamente las isoflavonas de la soja, influyen sobre el volumen de aquellos núcleos cerebrales sexualmente dimórficos que dependen de los niveles basales de estrógeno.

Los efectos de los estrógenos y los fitoestrógenos sobre el cerebro no se limitan al aspecto anatómico, sino también al funcional. Evidencias experimentales han puesto de manifiesto que las hormonas ováricas, estradiol y progesterona, ejercen un efecto ansiolítico en diferentes modelos como el “laberinto plus elevado” o el “ensayo en campo abierto”. De manera similar, utilizando dietas con diferentes concentraciones de fitoestrógenos se ha puesto de manifiesto que los fitoestrógenos presentes en la soja ejercen una potente acción ansiolítica tanto en ratas macho como hembra (Lund y Lephart, 2001).

Otro de los aspectos relativos a la función cerebral influenciado por los estrógenos y los fitoestrógenos es la función cognitiva. En este contexto se ha investigado especialmente la memoria visual-espacial, la cual implica la capacidad para representar, transformar, generar y evocar información simbólica. En tareas de memoria y aprendizaje que requieren referencias visuales y espaciales (memoria de

adquisición), los machos muestran un rendimiento superior al de las hembras, hecho que se ha atribuido al efecto inhibitor del estradiol sobre la memoria (Lephart y cols., 2002). En estudios con dietas ricas y carentes de fitoestrógenos se ha observado que las hembras alimentadas con dietas ricas en fitoestrógenos aprendieron el laberinto más rápidamente que las alimentadas con la dieta libre de fitoestrógenos. Por su parte, los machos alimentados con la dieta libre de fitoestrógenos tuvieron un rendimiento superior al de las hembras de cualquiera de los dos grupos. No hubo diferencias a causa de las dietas en la memoria de trabajo (Lund y cols., 2001b). El efecto beneficioso de los fitoestrógenos sobre la función cognitiva en ratas hembra así como en mujeres postmenopáusicas se ha observado en otros estudios, aunque no existe completa unanimidad a este respecto (Lee y cols., 2005).

Por último, se han acumulado numerosas evidencias acerca de la influencia de los fitoestrógenos sobre la neurotransmisión a nivel central. Fitoestrógenos como la genisteína y la daidzeína modulan la neurotransmisión catecolaminérgica, colinérgica, GABAérgica, etc. en diferentes preparaciones experimentales (Lee y cols., 2005; Yanagihara y cols., 2008; Lee y cols., 2009a).

# HIPÓTESIS y OBJETIVOS





Mientras no se superen las limitaciones que impiden que los resultados positivos obtenidos en modelos experimentales de ictus sean trasladables a la clínica, un planteamiento más razonable es su prevención. Por otra parte, los estudios preclínicos con candidatos al tratamiento del ictus ignoran a menudo factores de riesgo comunes en los pacientes, siendo el más importante de ellos la hipertensión.

Existe una concienciación cada vez mayor entre la población hacia la importancia de la dieta en el mantenimiento de la salud. A este respecto existe un interés creciente por las propiedades saludables de determinados ingredientes dietéticos con efectos beneficiosos más allá de los puramente nutricionales: los denominados “ingredientes funcionales”. Un grupo de ingredientes funcionales son las isoflavonas derivadas de la soja, grupo de fitoestrógenos cuyos efectos beneficiosos sobre la salud parecen deberse a su capacidad para actuar a través de los mismos mecanismos que los estrógenos. Por otra parte, y como ya se ha descrito en la sección de Introducción, el cerebro es sensible a las isoflavonas igual que lo es a los estrógenos. Ambas premisas justifican el estudio del posible efecto neuroprotector de este grupo de fitoestrógenos en el ictus isquémico.

La **hipótesis** del presente estudio es: *“Las isoflavonas contenidas en la soja reducen la gravedad del ictus isquémico, tanto si están presentes como ingredientes dietéticos con anterioridad al ictus, como si se administran en la fase superaguda una vez se ha producido el ictus”*. Por lo tanto, el presente estudio se ha diseñado desde una doble vertiente: la neuroprotección preventiva (ingesta de una dieta rica en isoflavonas) y la neuroprotección aguda (administración de isoflavonas puras en la fase superaguda del ictus).

Los **objetivos** planteados incluyen dos variables: el género (animales macho *versus* hembra) y la hipertensión (animales normotensos *versus* hipertensos).

Objetivo 1: Analizar el efecto de la dieta rica en isoflavonas sobre la presión arterial sistémica registrada al final de la etapa de crecimiento de los animales experimentales.

Objetivo 2: Analizar el efecto de la dieta rica en isoflavonas sobre la hemodinámica cerebral y sistémica durante un episodio de ictus isquémico (isquemia cerebral focal transitoria).

Objetivo 3: Neuroprotección preventiva. Análisis del efecto de la dieta rica en isoflavonas sobre el daño cerebral isquémico evaluado en base a la valoración neurológica y el volumen de infarto.

Objetivo 4: Neuroprotección aguda. Análisis del efecto de las isoflavonas puras administradas en la fase aguda del ictus, sobre el daño cerebral isquémico evaluado en base a la valoración neurológica y el volumen de infarto.

# MATERIAL y MÉTODOS



Los experimentos se han llevado a cabo de acuerdo con el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre “Protección de los Animales utilizados para Experimentación y otros Fines Científicos” (BOE nº 252, de 21 de octubre, p. 34367), y con la Ley 32/2007 de 7 de Noviembre. Los protocolos experimentales han sido revisados y aprobados por el Comité Ético del Hospital “La Fe” de Valencia.

## **1. ANIMALES Y DIETAS**

En el presente estudio se han empleado un total de 283 ratas distribuidas en los siguientes grupos en función de la cepa y el género: 1) 96 ratas macho Wistar; 2) 48 ratas hembra Wistar; 3) 72 ratas macho SHR; y 4) 67 ratas macho normotensas Wistar-Kyoto (WKY) (Charles River).

Todos los animales se recibieron en nuestras instalaciones con 3 semanas de edad y 50 g de peso aproximadamente y se alimentaron, según el grupo experimental al que fueron asignados, con una de las tres dietas utilizadas. Las dietas proceden de la casa Harlan y tienen las siguientes referencias: 8604, TD.04015 y TD.94095 (Tabla 1). Las dos primeras están formuladas con ingredientes tanto naturales como refinados, y ambas contienen ingredientes de origen animal (harina de pescado y suero de leche). La diferencia entre las dos consiste en que la soja se ha excluido de la lista de cereales en la dieta TD.04015. Puesto que la soja es la fuente principal de fitoestrógenos, concretamente del tipo de las isoflavonas, a dicha dieta se le ha asignado la denominación “Fito-0n” que significa “dieta natural libre de fitoestrógenos”. La dieta 8604 se denominará en adelante “Fito-600”, que significa “dieta natural con un contenido aproximado de 600 µg de fitoestrógenos por g de dieta”. En ambas dietas las fuentes de los principales macronutrientes son las siguientes: 1) proteínas de la harina de pescado, de la levadura de cerveza y, en menor medida, del suero de leche; 2) hidratos de carbono del almidón de los cereales, del suero de leche (lactosa) y de la melaza; y 3) grasas de la harina de pescado (ricas en ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3) y del

aceite de soja (ácidos linoleico y linolénico). Ambas dietas contienen una mezcla de minerales y una mezcla de vitaminas cuyas composiciones se presentan en las Tablas 2 y 3, respectivamente. Hay que reseñar que algunas vitaminas y algunos minerales proceden de los propios ingredientes y no se reflejan necesariamente en los valores presentados.

Por su parte, la dieta TD.94095 corresponde a la dieta AIN-93G, cuya composición resulta de la reformulación de la dieta AIN-76 publicada en 1977 por el American Institute of Nutrition (AIN). En adelante se denominará “Fito-0r”, que significa “dieta refinada libre de fitoestrógenos”. Esta dieta está formulada completamente con ingredientes purificados o refinados, de modo que la fuente principal de proteínas es la caseína, los hidratos de carbono proceden del almidón de maíz y de la sacarosa, las grasas del aceite de soja, y la fibra es aportada por la celulosa. En contra de lo que pudiera pensarse en un principio, el aceite de soja no contiene isoflavonas, y es la única fuente natural que proporciona simultáneamente los dos ácidos grasos esenciales, linoleico y linolénico, en las proporciones adecuadas. Para prevenir la oxidación de dichos ácidos se ha añadido el antioxidante *tert*-butilhidroquinona y para compensar la falta de aminoácidos con restos sulfuro (la caseína contiene muy pocos), L-cistina. También se ha añadido colina, nutriente esencial de la familia de las vitaminas B, que no figura en la lista de la mezcla de vitaminas que se añaden como suplemento. La dieta contiene una mezcla de minerales y una mezcla de vitaminas cuyas composiciones se presentan en las Tablas 2 y 3, respectivamente. Por último, a la dieta Fito-0r se le añaden ultratrazas de los siguientes elementos: níquel, litio, molibdeno, vanadio, silicio, cromo, azufre, boro y flúor, los cuales se encuentran en cantidades significativas en las dietas naturales pero no en las purificadas.

Tabla 1: Composición nutricional de las diferentes dietas utilizadas		
Ingredientes naturales y refinados		Ingredientes refinados
Fito-600 (8604)	Fito-0n (TD.04015)	Fito-0r (TD.94095)
<b>Harina de soja</b>		
Maiz (molturado + copos)	Maiz (molturado + gluten 60%)	Maiz (almidón)
Trigo (ahechaduras)	Trigo (molturado + ahechaduras)	Almidón de maíz dextrinizado (90-94% tetrasacáridos)
		Celulosa
Levadura de cerveza (seca)	Levadura de cerveza (seca)	Caseína (> 85% proteína)
<i>Harina de pescado</i>	<i>Harina de pescado</i>	
<i>Suero de leche (polvo)</i>	<i>Suero de leche (polvo)</i>	
Melaza (seca)	Melaza (seca)	Sacarosa
Aceite de soja	Aceite de soja	Aceite de soja
		<i>tert</i> -Butilhidroquinona (TBHQ)
		L-Cistina
Minerales (mezcla)	Minerales (mezcla)	Minerales (mezcla)
Vitaminas (mezcla)	Vitaminas (mezcla)	Vitaminas (mezcla)
		Colina (bitartrato, 41.1% colina)

*En cursiva, ingredientes de origen animal. En negrilla, fuente de isoflavonas.*

Tabla 2.- Composición en minerales de las diferentes dietas utilizadas			
	Unidades	Dietas Fito-600 y Fito-0n	Dieta Fito-0r
Calcio	%	1,4	0,5
Fosforo	%	1,1	0,3
Sodio	%	0,3	0,1
Cloro	%	0,5	0,2
Potasio	%	1,0	0,4
Magnesio	%	0,3	0,05
Hierro	mg/kg	352,1	45,0
Manganeso	mg/kg	105,4	10,0
Zinc	mg/kg	82,9	35,0
Cobre	mg/kg	24,4	6,0
Iodo	mg/kg	2,5	0,2
Cobalto	mg/kg	0,7	ND
Selenio	mg/kg	0,3	0,2
Niquel	mg/kg	ND	0,6
Litio	mg/kg	ND	0,1
Molibdeno	mg/kg	ND	0,2
Vanadio	mg/kg	ND	0,1
Silicio	mg/kg	ND	5,0
Cromo	mg/kg	ND	0,9
Boro	mg/kg	ND	0,3
Flúor	mg/kg	ND	0,5
Azufre	g/kg	ND	1,0

Tabla 3.- Composición en vitaminas de las diferentes dietas utilizadas			
	Unidades	Dietas Fito-600 y Fito-0n	Dieta Fito-0r
Vitamina A	UI/kg	12.900	4.000
Vitamina D <sub>3</sub>	UI/kg	2.400	1.000
Vitamina E	UI/kg	90,18	75
Colina	mg/kg	2.530	*
Niacina (á. nicotínico)	mg/kg	63,4	30,0
Á. pantoténico	mg/kg	21,0	16,0
Vit. B <sub>6</sub> (piridoxina)	mg/kg	13,0	7,0
Vit. B <sub>2</sub> (riboflavina)	mg/kg	7,9	6,0



Vit. B <sub>1</sub> (tiamina)	mg/kg	28,0	6,0
Vit. K <sub>3</sub> (menadiona)	mg/kg	4,1	ND
Vit. K <sub>1</sub> (filoquinona)	mg/kg	ND	0,75
Vit. B <sub>12</sub> (cianocobalamina)	µg/kg	51,2	25,0
Á. fólico	mg/kg	2,7	2,0
Biotina	mg/kg	0,4	0,2

\* Se añade individualmente a la dieta y no como parte de la mezcla de vitaminas

Los animales se mantuvieron con sus respectivas dietas, estabulados en condiciones de luz/oscuridad con ciclos de 12 h de duración, y con agua y comida *ad libitum*. Se les realizó un seguimiento semanal del peso hasta que alcanzaron valores estables (300-350g en machos Wistar y SHR, 350-400g en machos WKY y 200-250g en hembras Wistar), lo que supuso 7-11 semanas de estabulación para machos Wistar y 11-14 para hembras Wistar. Las ratas SHR, aunque alcanzaron pesos estables hacia la semana 12-14 de estabulación, se mantuvieron estabuladas un total de 17 semanas hasta que adquirieron la condición de hipertensas, ya que estos animales nacen normotensos y desarrollan hipertensión con la edad. Puesto que las ratas WKY constituyen los controles normotensos de las ratas SHR, y pese a que éstas también habían alcanzado un peso estable hacia la semana 11-12, se mantuvieron hasta la semana 14 para homogeneizar en lo posible los protocolos.

## 2. MODELOS EXPERIMENTALES

### 2.1. Modelo animal de ictus isquémico: oclusión-reperfusión de la arteria cerebral media mediante la técnica del filamento intraluminal en rata

La preparación del modelo se lleva a cabo en dos días. En el primer día, el animal se anestesia mediante inyección i.p. de 5 mg/kg diazepam (Valium<sup>®</sup>, Roche Pharma) y 100 mg/kg ketamina (Ketolar<sup>®</sup>, Parke-Davis), y se le proporciona analgesia mediante inyección s.c. de 0.1 mg/kg buprenorfina (Buprex<sup>®</sup>, Schering-Plough). A continuación se coloca en decúbito prono en un aparato estereotáxico

(Kopf® Instruments, mod. 900) y se realiza una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza. Se separan la piel y el periostio y se expone el cráneo. Con la ayuda de un microscopio quirúrgico se realiza un trépano de 1 mm de diámetro a 2 mm de Bregma en dirección caudal y 3.5 mm a la derecha de la sutura sagital, y otros dos trépanos adicionales de 0.8 mm de diámetro, sin llegar a perforar completamente el hueso, uno situado a 3.5 mm a la derecha de la sutura sagital y a 4.5 mm posterior a la sutura coronal, y otro situado a 1 mm a la derecha de la sutura sagital y 2 mm posterior a bregma (Figura 7). En cada uno de estos dos trépanos se enrosca un minitornillo de acero inoxidable (Fine Science Tools). A continuación se coloca en el trépano de 1 mm de diámetro un cono de aguja de 21G cortada y limada que servirá posteriormente de guía para la fibra óptica que se conecta a la sonda láser-Doppler. Este cono se fija al cráneo con cemento dental, aprovechando el anclaje al mismo que ofrecen los tornillos. Posteriormente se sutura la herida. Tras la intervención se recupera al animal de la anestesia y se estabula en condiciones de ayuno con libre acceso al agua hasta el día siguiente.

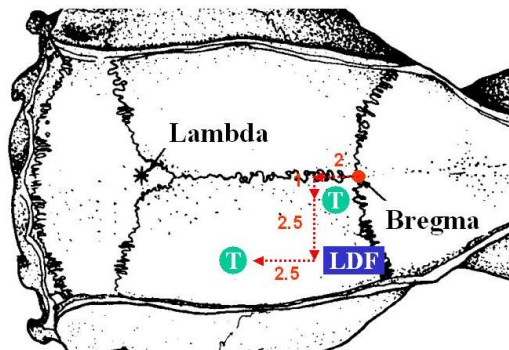


Figura 7: Localización del soporte de la sonda LDF y tornillos de fijación. **LDF**: soporte para la sonda láser-Doppler; **T**: tornillos de fijación.

En el segundo día se anestesia el animal con una inyección i.p. de clorhidrato de ketamina (100 mg/Kg), diazepam (5 mg/kg) y sulfato de atropina (0.3 mg/Kg) (B. Braun Medical) para permitir la intubación orotraqueal con una cánula de 16G

y, al igual que el día anterior, se le proporciona analgesia mediante inyección s.c. de 0.1 mg/kg buprenorfina. Una vez intubado se monitorizan los siguientes parámetros: flujo sanguíneo láser-Doppler cerebro-cortical (indicativo de la perfusión cerebral, (PC), presión arterial sistémica (PAS), temperatura corporal, presión parcial de oxígeno arterial ( $P_aO_2$ ), presión parcial de dióxido de carbono arterial ( $P_aCO_2$ ), pH arterial y glucemia.

Para la monitorización de la PC se aloja la fibra óptica (mod. MT B500-0 L 120, Perimed AB) en su correspondiente guía, avanzando su extremo hasta que establece contacto suave con la corteza cerebral. Esta fibra se conecta, por el extremo opuesto al que está en contacto con el tejido cerebral, a la sonda láser-Doppler (Probe 418, Perimed AB) que está a su vez conectada a un medidor láser-Doppler (Periflux 4001 Master, Perimed AB). A continuación, el animal se coloca en posición de decúbito supino, fijado a la mesa de trabajo y se conecta a un respirador (Harvard Rodent Ventilator, mod. 683). La anestesia se mantiene con una mezcla de 0.5-1% de sevoflurano (Sevorane<sup>®</sup>, Abbot Laboratories) en  $N_2O$  y  $O_2$  (70:30, respectivamente), un volumen de 2.5 mL por pulso y una frecuencia inicial de 55-60 pulsos/minuto. La proporción de gases, volumen y frecuencia son modificados en función de los requerimientos del animal.

La temperatura corporal se mantiene a 37.5 °C durante todo el experimento con la ayuda de una manta calefactora y una sonda rectal conectada al medidor de temperatura que apaga o enciende la manta calefactora según sí la temperatura es superior o inferior a la fijada.

Para el registro de la PAS se introduce un catéter de 0.9 mm de diámetro externo (Vasocan<sup>®</sup> Braunüle<sup>®</sup>, Braun Medical S.A.) en la arteria femoral izquierda, y se conecta a un transductor de presión (Hewlett-Packard Medical Products Group, mod. 1290C) a través de una cúpula estéril (Hewlett-Packard Medical Products Group, mod. 1295C) que va conectada a una unidad de registro de presión arterial (Stoelting mod.). Este catéter permite, además, obtener muestras de sangre arterial y realizar una monitorización discontinua de la glucemia (Glucometer

Elite<sup>®</sup>, Química Farmacéutica Bayer) y del  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$  y pH, con un analizador de gases (ABL<sup>™</sup>5, Radiometer Medical A/S) mediante la extracción de 0.2 ml de sangre arterial a tres tiempos, antes (valor control), durante (valor representativo de la isquemia) y después (valor representativo de la reperfusión) del episodio de isquemia-reperfusión. Las señales de PC, PAS y temperatura corporal, son digitalizadas (PF 472, Perimed AB) y enviadas a un ordenador equipado con un programa de adquisición y almacenamiento de datos para su posterior análisis (Perisoft v5.10, Perimed AB).

Una vez monitorizados los parámetros se procede a la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) mediante la “técnica del filamento intraluminal” (Zea Longa y cols., 1989), esquematizada en la Figura 8.

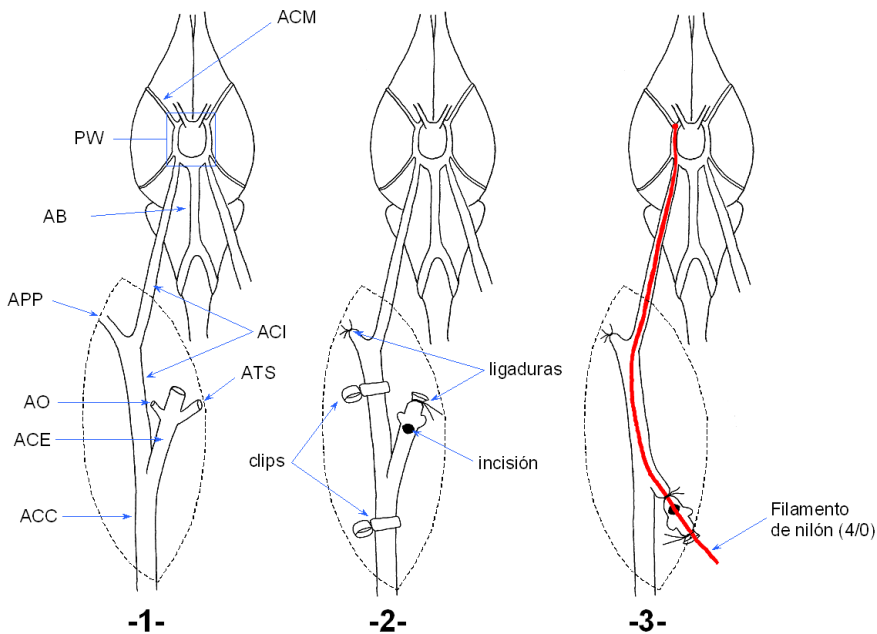


Figura 8: Anatomía vascular de la zona ventral derecha del cuello y de la base del encéfalo de la rata, mostrando la secuencia quirúrgica para la introducción de la sutura intraluminal. La línea discontinua delimita el campo quirúrgico.

- 1- Arteria basilar (AB); arteria carótida común (ACC); arteria carótida externa (ACE); arteria carótida interna (ACI); arteria cerebral media (ACM); arteria occipital (AO); arteria pterigopalatina (APP); arteria tiroidea superior (ATS); polígono de Willis (PW).

- 2- *Termocoagulación y sección de las ramas de la ACE; ligadura y sección de la ACE; colocación de clips microvasculares para impedir el aporte sanguíneo y realización de una incisión en la ACE.*
- 3- *Retirada de los clips microvasculares e introducción de la sutura de nilón con la cabeza redondeada hasta la base de la ACM en el polígono de Willis.*

La técnica consiste en la exposición de la arteria carótida común derecha tras una incisión longitudinal en la línea media ventral del cuello y posterior separación por disección roma de las glándulas submaxilares y los músculos omohioideo y esternohioideo. Seguidamente se disecan las arterias carótida común y carótida externa y se termocoagulan las dos primeras ramas de la última: la arteria tiroidea superior y la arteria occipital. Por encima de estas ramificaciones se colocan dos ligaduras y se corta la arteria carótida externa entre ambas, dejando un muñón. Se disecciona la arteria carótida interna, separándola del nervio vago y del cuerpo carotídeo, hasta visualizar la bifurcación donde surge la arteria pterigopalatina que se liga en su parte distal. El siguiente paso es introducir un filamento de nilón (4/0) con la punta redondeada por acercamiento a una fuente de calor, que ocluirá la ACM. Para ello se colocan dos clips microvasculares, uno en la arteria carótida común y otro en la arteria carótida interna, interrumpiéndose momentáneamente el flujo sanguíneo, y se realiza una pequeña incisión en el extremo distal del muñón de la arteria carótida externa por donde se introduce el filamento de nilón. Después de comprobar que el filamento se encuentra en la luz de la arteria se coloca una ligadura para impedir que sangre por la incisión, se retiran los clips y se restaura la circulación normal de la sangre.

Tras unos minutos de registro de las señales de PC, PAS y temperatura corporal y tras la extracción de la primera muestra de sangre arterial (muestra control), se hace avanzar el filamento hasta el origen de la ACM en el polígono de Willis. La colocación óptima del filamento se pone de manifiesto por el descenso brusco de la PC. La oclusión se mantiene durante 90 min, tras los cuales se extrae una nueva muestra de sangre arterial (muestra de isquemia) y se retira el filamento permitiendo la reperfundación, la cual se pone de manifiesto por la recuperación de los

valores de PC. Tras 30 min de reperfusión se extrae una nueva muestra de sangre arterial (muestra de reperfusión). Por último, se extrae el filamento y el catéter introducido en la arteria femoral, se suturan las heridas quirúrgicas del cuello y la pata y se estabula al animal con libre acceso a agua y comida.

## **2.2. Modelo animal de hipertensión: la rata SHR**

Los modelos animales de hipertensión se introdujeron hace algo más de 70 años, habiéndose utilizado extensamente para el estudio de la fisiopatología y de la terapéutica de esta enfermedad. Se han puesto a punto modelos de hipertensión agudos (quirúrgicos), genéticos (selección animal) y transgénicos. Uno de los más utilizados es el modelo de la rata SHR. Esta cepa se separó de la cepa normotensa WKY en 1959, y se estableció como cepa consanguínea en 1971. Los animales son normotensos en el momento del nacimiento, y desarrollan gradualmente hipertensión severa en los primeros 2-4 meses de vida (Amenta y cols., 2003). El modelo de la rata SHR es el más utilizado para el estudio del daño cerebral de origen hipertensivo y el que se ha utilizado en el presente estudio.

## **3. EVALUACIÓN DEL DAÑO CEREBRAL ISQUÉMICO**

### **3.1. Valoración neurológica**

Transcurridos 3 días de reperfusión y justo antes de la eutanasia, se evalúa la afectación neurológica del animal mediante un test que permite cuantificar (de 0 a 9, siendo 0 la ausencia de afectación neurológica y 9 la máxima) el grado de deterioro neurológico. El test se basa en la observación de las siguientes respuestas:

- Desplazamiento/exploración: 0.-Normal; 1.-Desplazamiento sin exploración; 2.-Desplazamiento sólo al estimular o no se desplaza en absoluto.
- Deriva a la izquierda: 0.-Nunca; 1.-Al elevar por la cola (hacia adelante y hacia atrás); 2.-Espontáneamente; 3.-“Peonza” (giro sin desplazamiento).
- Sujeción de la pata delantera izquierda: 0.-No permite; 1.-Permite con resistencia; 2.-No opone resistencia.

- Reflejo paracaídas (extensión de las patas delanteras al simular una caída libre, manteniendo al animal sujeto por la cola): 0.-Simétrico; 1.-Asimétrico; 2.-Pata izquierda retraída hacia el cuerpo.

### 3.2. Evaluación del volumen de infarto cerebral

El volumen de infarto se determina 72 h después de la inducción de la isquemia. A las 24 h el volumen de infarto es variable, ya que todavía existe una propagación de la zona de penumbra, pero a las 48-72 horas el volumen de infarto es máximo y se ha estabilizado. El volumen de infarto cerebral se determina con el método del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio ("TTC"; Sigma-Aldrich<sup>TM</sup>) (Bederson y cols., 1986). Esta sal es un sólido blanco hidrosoluble capaz de reducirse dando un compuesto de color rojo. En tejidos sanos el TTC alcanza la mitocondria y se reduce al aceptar protones de complejos enzimáticos de la cadena respiratoria asociados a la membrana interna lo que confiere una coloración roja. En tejidos donde la actividad mitocondrial está comprometida, como el tejido cerebral infartado, el TTC no llega a reducirse, por lo que no se produce coloración alguna.

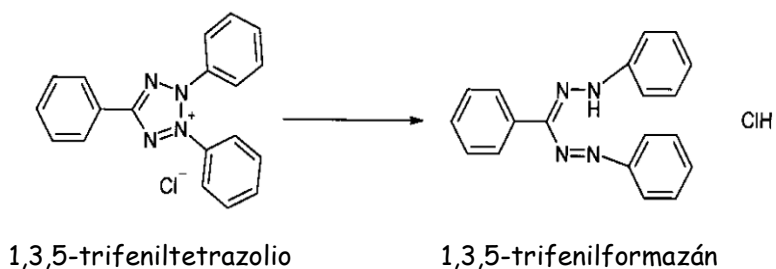


Figura 9: Reducción del TTC en mitocondrias funcionales dando lugar a un compuesto estable y de color rojo (1,3,5 trifenilformazan), que permite distinguir el tejido sano del infartado.

El protocolo para la determinación del volumen de infarto es el siguiente. El animal se anestesia mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de clorhidrato de ketamina (100 mg/Kg) y diazepam (5 mg/Kg) y se sacrifica por inyección intracardíaca de una solución de cloruro potásico (Antibióticos Farma, S.A.) (75 mg/Kg). Se extrae rápidamente el cerebro, se sumerge en solución salina fisiológica fría (4°C) durante 5 min y a continuación se corta en secciones coronales de 2 mm de grosor con un cortador de tejido (Stoelting tissue slicer, mod. 51425). Se obtienen 7 lonchas, las cuales se incuban durante 10 min a 37 °C en una solución de TTC al 2% en salino fisiológico y se fijan durante 24 h en una solución de formaldehído al 10% en tampón fosfato sódico (0.1 M, pH 7.4). Una vez procesado el tejido se fotografían las dos caras de cada loncha con una cámara digital (Olympus C-5050, Olympus Optical Co.LTD) y se cuantifica el área de infarto de cada sección, diferenciando las regiones corticales de las subcorticales, con la ayuda de un software de análisis de imagen (software desarrollado por el Prof. Mateo Buendía del Departamento de Fisiología de la Universitat de València). Para excluir los efectos del edema, el área de infarto se corrige con el índice de edema que resulta de multiplicar esta área por la relación entre el área total del hemisferio contralateral y el ipsilateral. El volumen de infarto cortical y subcortical ( $\text{mm}^3$ ) se calcula sumando las áreas de infarto corregidas de las dos caras de cada sección y multiplicando esta suma por el grosor de la loncha (2 mm). El volumen de infarto total se calcula como la suma de los volúmenes de infarto cortical y subcortical. Por último se calcula el porcentaje de tejido infartado respecto al tamaño total del hemisferio contralateral (sano).

## **4. TÉCNICAS ANALÍTICAS**

### **4.1.- Análisis del contenido de isoflavonas en las dietas**

Las isoflavonas genistéina, daidzeína y gliciteína y sus respectivos glucósidos genistina, daidzina y glicitina (Sigma-Aldrich<sup>TM</sup>) fueron determinados, por duplicado, en las tres dietas empleadas mediante un análisis por HPLC en fase



reversa de acuerdo con el método descrito por Brown y Setchell (2001). Para ello, a 5 g de dieta finamente molida con un mortero se le añaden 50 ml de metanol al 80%, esta mezcla se mantiene en un sistema de reflujo durante 1 h a 60°C, se filtra y se repite de nuevo el procedimiento para obtener finalmente un extracto metanólico que se enrasa hasta 100 ml con metanol al 80%. A 2 ml de este extracto se le añaden 60 µl del patrón interno fluoresceína (1000 ppm en metanol) y la misma cantidad de hexano (2 ml), polisacárido que nos permite arrastrar sustancias orgánicas que hubiesen podido quedar en la muestra, como por ejemplo lípidos. La mezcla se agita, se centrifuga y se desecha la parte superior correspondiente al hexano. Esta operación se repite 2 veces y se conserva únicamente la fase metanólica que es la que se destina directamente al análisis por HPLC.

Las isoflavonas se separan mediante un sistema de HPLC consistente en una bomba P680A modelo Dionex (Sunnyvale, CA, USA) conectada a un detector de fotodiodos modelo Dionex PDA-100 y una columna C-18 de fase reversa (250×4.6 mm i.d., con 5 µm de tamaño de partícula; Supelcosil LC-18 [Supelco, Bellefonte, PA, USA]) conectada a su vez a una precolumna Security Guard (20×4.6 mm i.d., con 5 µm de tamaño de partícula, LC-18 Supelguard, Supelco) bajo condiciones de un gradiente de elución binario. La fase móvil consiste en ácido trifluoroacético al 0.1% en agua (eluyente A) y ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo (eluyente B) con una elución de gradiente lineal a una tasa de flujo de 1 mL/min. El programa de elución es el siguiente: 10% B (0-10 min), 10-40% B (10-20 min), 40-100% B (20-22 min), 100% B (22-23 min), 100-10% B (23-25 min) and 10% B (25-27 min). El espectro de absorción UV de la columna eluyente es de 190 a 400 nm. Los cromatogramas se registran a una longitud de onda de 254 nm.. Se inyectan 20 µl de la muestra en la columna, así como una serie de patrones de las isoflavonas daidzeína, genisteína, gliciteína, daidzina, genistina y glicitina en concentraciones conocidas.

Una vez detectados los fitoestrógenos en la dieta se cuantifican obteniendo una recta de regresión mediante el método de mínimos cuadrados. En

cromatografía se pretende relacionar la concentración a la que se encuentran los compuestos en la muestra problema, con el área de su pico en el cromatograma. Para ello se construye una recta patrón que se utiliza para calcular las concentraciones de los compuestos en la muestra problema.

#### **4.2. Análisis del contenido de isoflavonas en el plasma.**

Con el fin de determinar la concentración plasmática de isoflavonas, se extrajeron dos muestras de sangre arterial. Una inmediatamente antes de la isquemia (muestra control), a través del catéter introducido en la arteria femoral, y la otra antes del sacrificio, es decir 3 días después del inicio del tratamiento (muestra 72 h). Esta muestra de sangre se obtiene durante el sacrificio del animal mediante punción de la aorta abdominal. En ambos casos se extraen un total de 0.5 ml de sangre arterial que se anticoagulan con EDTA y se centrifugan (12.000 r.p.m, 6 min, 4 °C) para la obtención del plasma (sobrenadante) que se conserva a -20°C hasta su posterior análisis mediante HPLC según el método de Degen y cols. (2002).

Este método consiste en incubar 100 µl de plasma, durante 15 h a 37 °C, con un tampón de hidrólisis cuyo contenido es: acetato de sodio 0.1 M pH 5, ácido ascórbico 0.1% (w/v), EDTA 0.01% (w/v) y 8 µl de glucuronidasa-sulfatasa. A continuación se añaden 10 µl del patrón interno formononetina (5 µg/ml en DMSO), 120 µl de agua, 75 µl de acetato de amonio (1 mM, pH 7) y 83 µl de trietilamonio sulfato (3 M, pH 7) y se incuba la mezcla durante 10 minutos a 60°C para conseguir la disociación de las isoflavonas de las proteínas plasmáticas. Tras centrifugación se descarta el pellet, y el sobrenadante con las muestras desproteinizadas se pasa a través de los cartuchos cromatográficos de extracción en fase sólida C18 (Sep-Pak® Vac RC, Waters Cromatografía S. A.), que previamente habían sido activados con metanol y agua. A continuación, se lavan con 5 ml de acetato de amonio (10 mM, pH 5) y 5 ml de agua, y se eluyen las isoflavonas de la columna cromatográfica con 1.5 ml de metanol, se desecan por evaporación del metanol bajo corriente de nitrógeno a 45°C, se disuelven en 100 µl de

metanol/ácido trifluoroacético 0.1% en una proporción de 40:60 v/v, y se guardan a -20°C hasta su posterior análisis mediante HPLC.

La separación, detección y cuantificación de las isoflavonas mediante HPLC, se realiza siguiendo el mismo método indicado en el apartado 4.1 de material y métodos.

## **5. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES**

### **5.1. Criterios de exclusión**

No todos los animales que iniciaron el estudio fueron considerados finalmente para la determinación del volumen de infarto cerebral, sino que algunos se excluyeron siguiendo los siguientes criterios:

1. No lograr un descenso en la PC al introducir la sutura intraluminal o no conseguir mantenerlo estable durante los 90 min de isquemia.
2. No observar reperusión, aunque sea parcial, tras retirar el filamento ni durante los 30 min siguientes, por la posibilidad de que sea una isquemia permanente.
3. Muerte del animal durante los 3 días de reperusión.
4. No mostrar signos de infarto cerebral. Este resultado suele aparecer en animales con un bajo descenso de la PC durante la isquemia, pero estos ya se excluyen por el criterio 1. Los animales incluidos en este grupo tienen patrones normales de PC durante la isquemia y reperusión pero esto no resulta en un daño cerebral visible con el TTC.

## **5.2. Neuroprotección preventiva: estudio del efecto de los fitoestrógenos dietéticos en la prevención del ictus.**

### *5.2.1. Influencia del género*

Un total de 32 ratas Wistar macho recibidas en nuestro estabulario tras el destete (3 semanas de edad) y con 50 g de peso, se dividieron aleatoriamente en dos grupos, uno formado por 17 animales que se alimentaron con la dieta Fito-600, y otro de 15 animales alimentados durante el mismo tiempo con la dieta Fito-0n. Tras 8-9 semanas estabulados y cuando habían alcanzado los 300-350 g de peso, todos los animales fueron sometidos a una isquemia focal transitoria de 90 min y 3 días de reperusión, tras los cuales se determinó el estado neurológico y el volumen de infarto cerebral. El transcurso temporal de los experimentos se muestra en la Figura 10.

Para estudiar un posible efecto de género, el mismo protocolo experimental se siguió con 27 ratas Wistar hembra de las cuales 13 se alimentaron con la dieta Fito-600 y 14 con la dieta Fito-0n. Tras mantenerlas estabuladas durante 12-14 semanas y cuando alcanzaron un peso estable entre 200-250 g fueron sometidas, al igual que los machos, a la isquemia focal transitoria de 90 min y 3 días de reperusión. También se determinó en estos animales el estado neurológico y el volumen de infarto cerebral. En la Figura 10 se muestra la secuencia temporal del protocolo empleado.

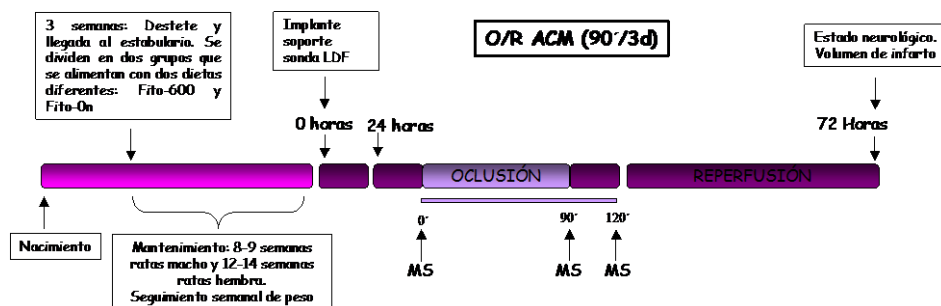


Figura 10: Cronograma de los protocolos para el estudio de la neuroprotección preventiva de los fitoestrógenos en ratas Wistar macho y hembra. En la barra rosa se representa el tiempo de estabulación de los animales. En la granate los eventos que se suceden durante la oclusión-reperusión de la arteria cerebral media (O/R ACM) incluidos los puntos de toma de sangre arterial (MS) para la determinación de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucosa.

Tras la realización del protocolo experimental algunos animales fueron excluidos del experimento por cumplir alguno de los criterios de exclusión indicados en el punto 5.1 de Material y Métodos. El número de animales excluidos y las causas de su exclusión se han indicado en la Tabla 4:

		Criterios de exclusión					n Final
	Tratamiento	n Inicial	1	2	3	4	
Macho	Dieta Fito-600	17	2	0	4	2	9
	Dieta Fito-0n	15	1	0	0	5	9
Hembra	Dieta Fito-600	13	2	2	2	0	7
	Dieta Fito-0n	14	1	1	3	0	9

Tabla 4: Resumen del número de ratas Wistar macho y hembras alimentadas con la dieta rica en isoflavonas (Fito-600) o libre de isoflavonas (Fito-0n) que iniciaron el experimento, del número de animales excluidos según los 4 criterios considerados, y del número de animales que finalmente fueron considerados para el estudio de las variables hemodinámicas, de la valoración neurológica y del volumen de infarto.

### 5.2.2. Influencia de la hipertensión

Puesto que las ratas SHR desarrollan la hipertensión durante los primeros 2-4 meses de vida, las 36 ratas macho SHR recibidas tras el destete fueron estabuladas durante 17 semanas con el fin de que alcanzasen niveles elevados de presión arterial antes de ser sometidas al episodio de isquemia-reperfusión. Durante este tiempo 18 de los animales fueron alimentados con la dieta Fito-600 y 18 con la dieta Fito-0n. Puesto que la cepa SHR es una cepa consanguínea de las ratas WKY, 36 animales WKY macho fueron recibidos tras el destete para ser utilizados como los controles normotensos; 19 de estos animales fueron alimentados con la dieta Fito-600 y 17 con la dieta Fito-0n. Transcurridas las 14-17 semanas de estabulación se practicó, a todos los animales, la isquemia focal transitoria de 90 min y 3 días de reperfusión, tras los cuales se realizó la valoración neurológica y se determinó el volumen de infarto cerebral. Todo el procedimiento se muestra de forma temporal en la figura 11.

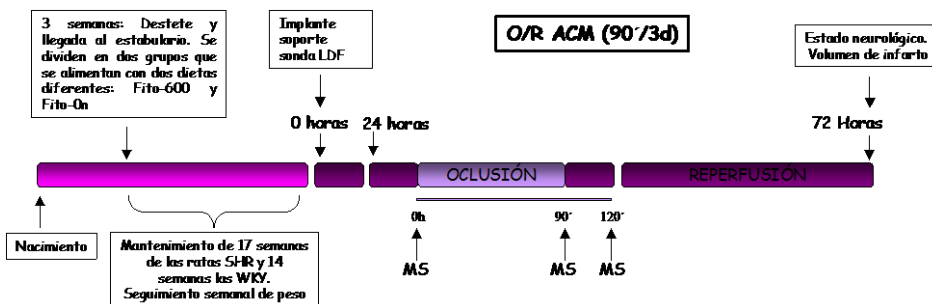


Figura 11: Cronograma para el estudio de la neuroprotección preventiva de los fitoestrógenos en ratas WKY y SHR macho. En la barra rosa se representa el tiempo de estabulación de los animales. En la granate los eventos que se suceden durante la oclusión-reperfusión de la arteria cerebral media (O/R ACM) incluidos los puntos de toma de sangre arterial (MS) para la determinación de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucosa.

Tras la aplicación de los criterios de exclusión 22 ratas SHR y 17 ratas WKY completaron el estudio. La distribución por grupos de estos animales y las causas de su exclusión se muestran en la Tabla 5:

		Criterios de exclusión					
	Tratamiento	n Inicial	1	2	3	4	n Final
WKY	Dieta Fito-600	19	4	2	1	2	10
	Dieta Fito-0n	17	3	1	4	2	7
SHR	Dieta Fito-600	18	0	0	7	0	11
	Dieta Fito-0n	18	1	2	4	0	11

Tabla 5: Resumen del número de ratas SHR y WKY macho alimentadas con la dieta rica en isoflavonas (Fito-600) o libre de isoflavonas (Fito-0n) que iniciaron el experimento, del número de animales excluidos según los 4 criterios considerados, y del número de animales que finalmente fueron considerados para el estudio de las variables hemodinámicas, de la valoración neurológica y del volumen de infarto.

### 5.3. Neuroprotección aguda: estudio de la administración de isoflavonas puras en la fase superaguda del ictus

#### 5.3.1. Influencia del género

Para el estudio de los efectos terapéuticos de los fitoestrógenos se utilizaron un total de 64 ratas Wistar macho que tras el destete fueron alimentadas con la dieta Fito-0r. Los animales se mantuvieron con esta dieta 10-11 semanas hasta que alcanzaron 300-350 g de peso, momento en el que se les indujo la isquemia focal transitoria de 90 min. Transcurridos 30 min de reperusión los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 1 mg/kg de una de las tres isoflavonas estudiadas, daidzeína, genisteína, y biocanina A, o del solvente (DMSO al 50% en agua) en el caso del grupo control. Con el fin de mantener el tratamiento durante los 3 días de reperusión se introdujo en el peritoneo, mediante una pequeña incisión, una

bomba osmótica Alzet® (Charles-River) modelo 2ML1 de 2 ml de capacidad y una tasa de liberación de 10 µl/h, que permitió administrar una tasa constante de 1mg/kg/día de la misma isoflavona inyectada intraperitonealmente o del solvente en el caso del grupo control. Finalmente, y tras los 3 días de reperusión, se realizó la valoración neurológica, se sacrificó el animal y se determinó su volumen de infarto cerebral. El desarrollo temporal de los experimentos se muestra en la Figura 12. Con el fin de determinar el correcto funcionamiento de la bomba osmótica Alzet y corroborar la presencia de isoflavonas en la sangre de estos animales se tomaron dos muestras de sangre arterial según el procedimiento indicado en el apartado 4.2 de Material y Métodos.

En la Figura 12, se muestra el protocolo experimental que se siguió con 21 ratas Wistar hembra alimentadas también desde su destete, y durante 12 semanas, con la dieta Fito-0r. Transcurrido este tiempo, se siguió con el mismo procedimiento experimental descrito para las ratas macho, aunque en este caso los animales tan solo se trataron con la isoflavona genistéina (1 mg/kg) o el solvente. (DMSO al 50% en agua).

La distribución de los animales en los diferentes grupos experimentales se muestra en la Tabla 6. De todos los animales que iniciaron el experimento se excluyeron 21 ratas macho y 13 ratas hembra, siguiendo los criterios que ya se han indicado. También se muestra la distribución por grupos de tratamiento de los animales excluidos y las causas de su exclusión.



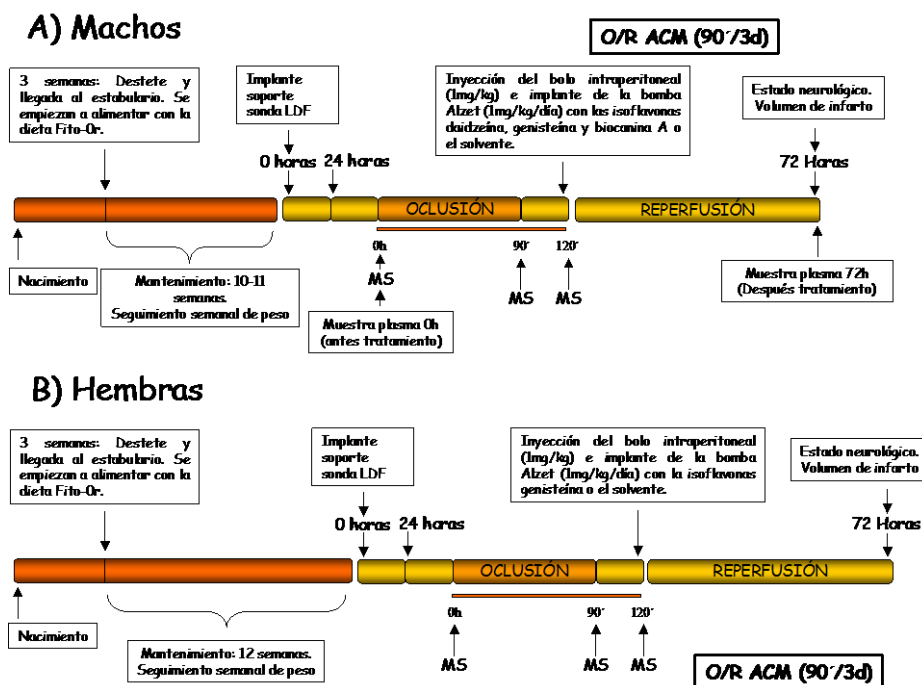


Figura 12: Cronograma de los protocolos para el estudio del efecto terapéutico de las isoflavonas daidzeína, genisteína y biochanina A en ratas Wistar macho y genisteína en ratas Wistar hembra. En la barra naranja se indica el tiempo de estabulación de los animales y el tipo de dieta administrada. En la barra amarilla se muestran los eventos que se suceden durante la oclusión-reperusión de la arteria cerebral media (O/R ACM) incluidos los puntos de toma de sangre arterial (MS) para la determinación de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucosa y los puntos de toma de sangre para la obtención del plasma con el que determinar el contenido de isoflavonas antes y después del tratamiento.

		Criterios de exclusión					
	Tratamiento	n Inicial	1	2	3	4	n Final
Macho	Control	18	1	4	1	2	10
	Daidzeína	14	0	2	2	0	10
	Genisteína	14	0	1	1	0	12
	Biocanina A	18	2	1	4	0	11
Hembra	Control	9	0	3	2	0	4
	Genisteína	12	0	2	6	0	4

Tabla 6: Relación de ratas Wistar macho y hembra utilizadas para el estudio del efecto neuroprotector de las isoflavonas daidzeína, genisteína o biocanina A. Se muestra el número de animales que iniciaron el experimento, el número de animales que se excluyeron según los 4 criterios de exclusión determinados y el número de animales finales con los que se realizó el estudio de las variables hemodinámicas, la valoración neurológica y el volumen de infarto cerebral.

### 5.3.2. Influencia de la hipertensión

Un procedimiento experimental similar al ya descrito para las ratas Wistar, se siguió en ratas SHR y WKY macho con el fin de comprobar el potencial terapéutico de los fitoestrógenos en condiciones de hipertensión.

Para ello un total de 36 ratas SHR y 31 ratas WKY macho fueron recibidas en nuestro estabulario tras el destete y alimentadas desde este momento con la dieta libre de isoflavonas Fito-0r. Transcurridas 14-17 semanas todos los animales fueron sometidos a una isquemia focal transitoria de 90 min por oclusión de la ACM y, al igual que en las ratas Wistar, 30 min después de permitir la reperfusión recibieron el tratamiento, primero de forma aguda, mediante inyección intraperitoneal, y después de forma crónica mediante el implante intraperitoneal de la bomba Alzet. Trascurridos los 3 días de reperfusión, y tras realizar una

valoración del estado neurológico de los animales, se les sacrificó y se midió su volumen de infarto cerebral.

Los tratamientos administrados a este grupo de animales fueron: genisteína 1 mg/kg, genisteína 10 mg/kg o el solvente DMSO (ratas control), de modo que dividiendo aleatoriamente las ratas SHR y las WKY para cada uno de los tratamientos se establecieron 6 grupos experimentales: *i*) ratas WKY control, *ii*) ratas WKY tratadas con genisteína 1 mg/kg, *iii*) ratas WKY tratadas con genisteína 10 mg/kg, *iiii*) ratas SHR control, *iiiii*) ratas SHR tratadas con genisteína 1 mg/kg, *iiiiiii*) ratas SHR tratadas con genisteína 10 mg/kg. El transcurso temporal de todo el procedimiento se muestra en la Figura 13. El número de animales incluidos en cada uno de los grupos experimentales así como también el número de animales excluidos y sus causas de exclusión se muestran en la Tabla 7:

		Criterios de exclusión					
	Tratamiento	n Inicial	1	2	3	4	n Final
WKY	Control	13	0	1	2	3	7
	Genisteína 1 mg/kg	9	0	0	0	3	6
	Genisteína 10 mg/kg	9	0	0	0	4	5
SHR	Control	9	0	1	2	0	6
	Genisteína 1 mg/kg	12	0	2	4	0	6
	Genisteína 10 mg/kg	15	1	1	7	0	6

Tabla 7: Relación de animales WKY y SHR utilizados para el estudio del efecto neuroprotector de genisteína 1 mg/kg y 10 mg/kg. Se muestra el número de animales que iniciaron el experimento, el número de animales que se excluyeron según los 4 criterios de exclusión determinados y el número de animales finales con los que se realizó el estudio de las variables hemodinámicas, la valoración neurológica y el volumen de infarto cerebral.

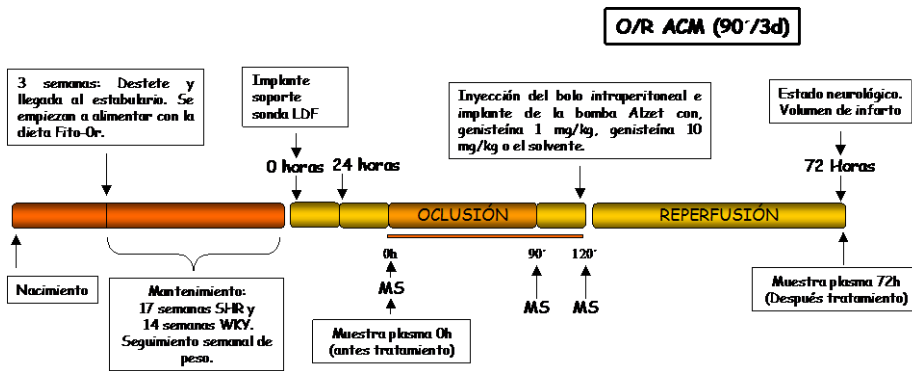


Figura 13: Cronograma para el estudio del efecto terapéutico de la isoflavona genisteína con dosis 1 mg/kg y 10 mg/kg A en ratas WKY y SHR macho. En la barra naranja se indica el tiempo de estabulación de los animales y el tipo de dieta administrada. En la barra amarilla se muestran los eventos que se suceden durante la oclusión/reperfusión de la arteria cerebral media (O/R ACM) incluidos los puntos de toma de sangre arterial (MS) para la determinación de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucosa y los puntos de toma de sangre para la obtención del plasma con el que determinar el contenido de isoflavonas antes y después del tratamiento.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para la comparación estadística de variables hemodinámicas como PAS o de los valores de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucosa dentro de un mismo grupo se utilizó un ANOVA para muestras repetidas seguido de un post-test Dunnet, mientras que para la comparación de estos parámetros entre grupos el test estadístico utilizado fue un ANOVA de 2 vías para muestras emparejadas seguido de un post-test de Bonferroni.

El análisis estadístico del volumen de infarto cerebral total o en secciones se realizó con un test-t para muestras independientes, cuando tan solo se querían comparar dos grupos, o con un ANOVA para muestras independientes seguido de un post-test Dunnet cuando se querían comparar 3 ó mas grupos respecto a un grupo control, o bien, con un ANOVA de 2 vías seguido de un post-test de Bonferroni cuando se quisieron comparar 2 variables al mismo tiempo.

El estado neurológico de los animales se comparó utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar dos grupos o el test no paramétrico

de Kruskal-Wallis con post-test Dunn cuando se quisieron comparar entre sí 3 grupos o más.

Las significaciones estadísticas se indican en el pie de cada figura o gráfica. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .



# RESULTADOS





## **A. NEUROPROTECCIÓN PREVENTIVA**

### **CONTENIDO DE ISOFLAVONAS EN LAS DIETAS**

El análisis mediante HPLC de las tres dietas empleadas en el presente estudio, mostró presencia de las isoflavonas de la soja daidzina, glicitina y genistina (glucósidos), así como de daidzeína, gliciteína y genisteína (agliconas), en la dieta Fito-600 (Tabla 8). La concentración total fue de  $434.3 \pm 37.6$   $\mu\text{g/g}$  de dieta. Por el contrario, no se detectó ninguna de las isoflavonas ni en la dieta Fito-0n, ni en la Fito-0r.

Glucósidos	Daidzina	$198.8 \pm 16.1$
	Glicitina	$18.7 \pm 1.9$
	Genistina	$157.2 \pm 12.1$
Agliconas	Daidzeína	$7.34 \pm 0.5$
	Gliciteína	$37.6 \pm 1.4$
	Genisteína	$9.6 \pm 1.6$
Total		$434.3 \pm 37.6$

*Los datos se han obtenido mediante HPLC, se expresan en  $\mu\text{g/g}$  de dieta, y se representan como media  $\pm$  desviación estándar de la media de los resultados obtenidos por duplicado.*

## **1. NORMOTENSIÓN**

### **1.1. Evolución ponderal**

Las curvas de crecimiento de las ratas Wistar macho y hembra alimentadas con las dietas Fito-600 o Fito-0n se muestran en la Figura 14. Se evidenciaron diferencias entre sexos pero no entre dietas: mientras que las ratas macho estabilizaron su peso en 300-350 g tras 7-8 semanas de estabulación, las ratas hembra se estabilizaron en 200-250 g alrededor de la semana 11-12. Este comportamiento fue similar en cada uno de los sexos independientemente de la dieta consumida.

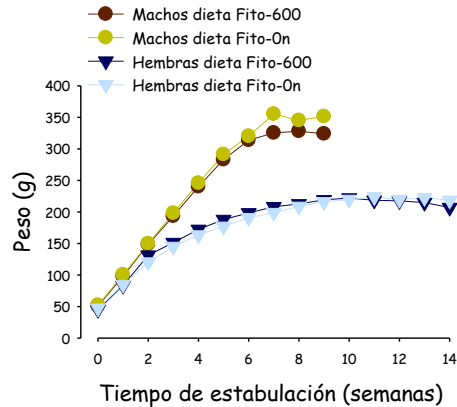


Figura 14. Evolución ponderal de las ratas Wistar macho y hembra alimentadas con las dietas Fito-600 y Fito-0n. Los valores se han representado como la media de 17 (macho-Fito-600), 15 (macho-Fito-0n), 13 (hembra-Fito-600) y 14 (hembra-Fito-0n) animales.

## 1.2. Hemodinámica cerebral y sistémica durante la oclusión-reperfusion de la ACM

### 1.2.1. Ratas macho

En la Figura 15 se presenta un registro representativo del episodio de isquemia-reperfusion.

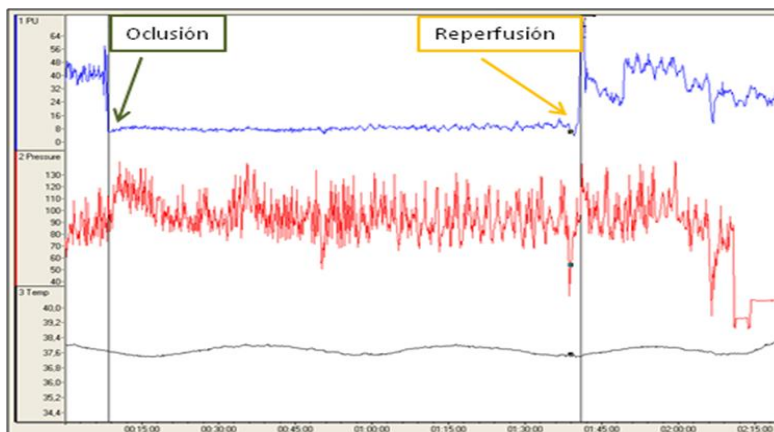


Figura 15. Registro completo y comprimido de los cambios de perfusión cerebral (trazado azul), presión arterial sistémica (trazado rojo) y temperatura (trazado negro) durante el episodio de isquemia-reperfusion. Sobre el trazado de perfusión cerebral quedan indicados la oclusión de la ACM (flecha verde) y la reperfusion (flecha amarilla).

El deslizamiento del filamento intraluminal hasta el origen de la ACM se tradujo en una disminución de la PC de aproximadamente el 50% respecto de su valor basal, tanto en el grupo de animales alimentados con la dieta Fito-600 como en el alimentado con la dieta Fito-0n. En ambos grupos, la retirada del filamento tras los 90 min de isquemia indujo un incremento aproximado del 70% de la PC respecto de su valor basal. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los datos obtenidos con cada una de las dietas dentro de una misma fase del episodio de isquemia-reperfusión (Figura 16, panel izquierdo).

En cuanto a la PAS, no se evidenciaron cambios significativos durante la isquemia y la reperfusión dentro de cada uno de los dos grupos, ni tampoco entre los grupos para cada una de las fases de la isquemia-reperfusión (Figura 16, panel derecho).

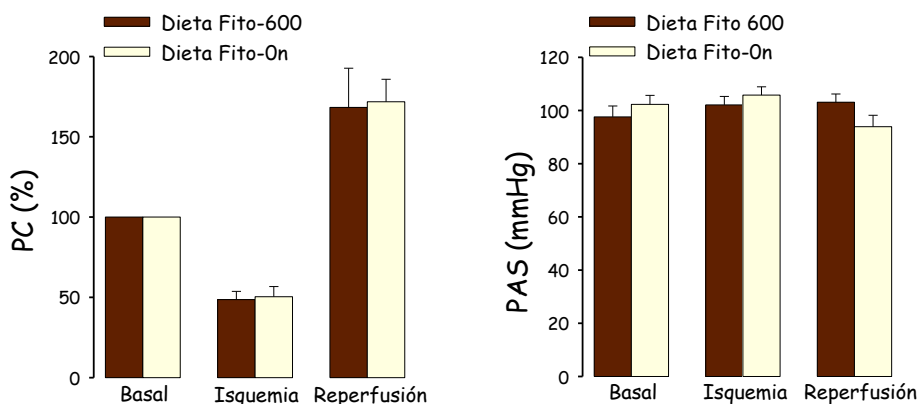


Figura 16. Valores de perfusión cerebral (PC, panel izquierdo) y presión arterial sistémica (PAS, panel derecho), antes (basal), durante (isquemia) y después (reperfusión) del episodio isquémico de 90 min en ratas Wistar macho alimentadas con las dietas Fito-600 y Fito-0n. Los valores de PC se expresan como porcentaje de los valores basales, y los de PAS en unidades de presión. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 9 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) animales.

En cuanto al resto de parámetros perioperatorios, los valores medios de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucemia obtenidos antes, durante y después de la isquemia se muestran en la Tabla 9, donde puede observarse la disminución significativa de los valores de  $P_aO_2$  (hipoxia), pH (acidosis) y glucemia (hipoglucemia) y el incremento de  $P_aCO_2$  (hipercapnia) durante la isquemia en ambos grupos experimentales. No se registraron diferencias significativas para cada uno de los cuatro parámetros en situación basal y durante la isquemia entre los dos grupos experimentales. Durante la reperfusión todos los valores tendieron a recuperarse alcanzando su estado basal, con la excepción de pH en el grupo de animales alimentados con la dieta Fito-600 y  $P_aCO_2$  de los animales alimentados con la dieta Fito-0n, que permanecieron significativamente más bajos respecto de su nivel basal.

Por lo tanto todos los animales, independientemente del tipo de dieta con el que habían sido alimentados, se comportaron de manera similar durante el episodio de isquemia-reperfusión.

Tabla 9. Parámetros gasométricos y glucemia en muestras de sangre arterial procedentes de ratas Wistar macho alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas al episodio de isquemia-reperfusión.

		Basal	Isquemia	Reperfusión
Dieta Fito-600	$P_aO_2$	127.0 ± 29.2	104.0 ± 18.6**	118.0 ± 12.2
	$P_aCO_2$	32.0 ± 6.5	38.0 ± 2.4*	34.0 ± 6.1
	pH	7.48 ± 0.06	7.37 ± 0.06**	7.39 ± 0.06**
	Glucosa (mg/dL)	78.0 ± 11.1	63.0 ± 17.8*	69.0 ± 24.6
Dieta Fito-0n	$P_aO_2$	130.0 ± 21.8	105.0 ± 16.0**	101.9 ± 13.6
	$P_aCO_2$	36.0 ± 6.9	42.0 ± 6.1**	27.0 ± 6.0**
	pH	7.45 ± 0.06	7.36 ± 0.03**	7.45 ± 0.04
	Glucosa (mg/dL)	91.0 ± 18.3	72.0 ± 13.6*	79.0 ± 13.8

Las muestras de sangre se tomaron antes (basal), durante (isquemia) y después (reperfusión) del episodio isquémico de 90 min. Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media ± desviación estándar de la media de 9 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ , significativamente diferente del correspondiente valor basal (ANOVA muestras repetidas y post-test Dunnet).

### 1.2.2. Ratas hembra

Las ratas Wistar hembra presentaron un patrón de PC semejante al de las ratas macho durante el episodio de isquemia-reperfusión, con una caída de la PC de 54-66% durante la isquemia, y un incremento de 120-150% durante la reperfusión (Figura 17, panel izquierdo). Por su parte, la PAS no varió respecto de su valor basal ni durante la isquemia ni en la reperfusión (Figura 17, panel derecho). No se registraron diferencias significativas en cada una de las fases para ambos parámetros cuando se compararon las dos pautas alimentarias.

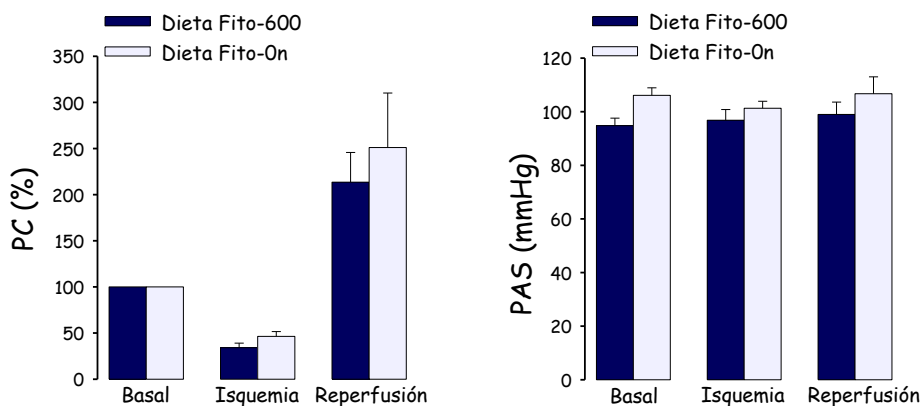


Figura 17. Valores de perfusión cerebral (PC, panel izquierdo) y presión arterial sistémica (PAS, panel derecho), antes (basal), durante (isquemia) y después (reperfusión) del episodio isquémico de 90 min en ratas Wistar hembra alimentadas con las dietas Fito-600 y Fito-0n. Los valores de PC se expresan como porcentaje de los valores basales, y los de PAS en unidades de presión. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 7 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) animales.

La variación de los valores de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucemia fue similar independientemente de la dieta suministrada. Así pues, durante la isquemia en ambos grupos se produjo hipoxia, hipercapnia, acidosis e hipoglucemia. No se registraron diferencias significativas para cada uno de los cuatro parámetros en situación basal y durante la isquemia entre los dos grupos experimentales. Durante la reperfusión, y con la excepción del pH que permaneció significativamente más bajo, el resto de los valores tendieron a alcanzar su estado basal, incluso

superándolo de forma significativa como es el caso de la  $P_aO_2$  en el grupo de animales alimentados con la dieta Fito-600. Todos estos valores se muestran en la Tabla 10.

Por lo tanto todos los animales, independientemente del tipo de dieta con la que habían sido alimentados, se comportaron de manera similar durante el episodio de isquemia-reperusión.

Tabla 10. Parámetros gasométricos y glucemia en muestras de sangre arterial procedentes de ratas Wistar hembra alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas al episodio de isquemia-reperusión.

		Basal	Isquemia	Reperusión
Dieta Fito-600	$P_aO_2$	125.0 ± 13.5	101.6 ± 24.6*	134.2 ± 16.3**
	$P_aCO_2$	23.9 ± 4.5	38.7 ± 10.2**	26.9 ± 6.1
	pH	7.55 ± 0.05	7.37 ± 0.07**	7.46 ± 0.06**
	Glucosa (mg/dL)	106.1 ± 39.0	78.8 ± 13.1*	86.6 ± 21.5
Dieta Fito-0n	$P_aO_2$	117.0 ± 13.8	98.5 ± 17.2*	127.4 ± 15.7
	$P_aCO_2$	25.1 ± 4.1	40.8 ± 13.3**	28.4 ± 8.9
	pH	7.53 ± 0.07	7.35 ± 0.10**	7.45 ± 0.09*
	Glucosa (mg/dL)	106.9 ± 25.1	86.1 ± 25.8*	95.6 ± 19.2

Las muestras de sangre se tomaron antes (basal), durante (isquemia) y después (reperusión) del episodio isquémico de 90 min. Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media ± desviación estándar de la media de 7 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ , significativamente diferente del correspondiente valor basal (ANOVA muestras repetidas y post-test Dunnet).

### 1.3. Evaluación del daño cerebral isquémico: valoración neurológica y tamaño de infarto

#### 1.3.1. Ratas macho

A los tres días del episodio isquémico, la puntuación neurológica de los animales alimentados con la dieta Fito-600 fue significativamente menor que la de los animales alimentados con la dieta Fito-0n (Figura 18, panel izquierdo), lo que es indicativo de un menor déficit neurológico. Tras la eutanasia de los animales y el procesamiento del cerebro, los animales alimentados con la dieta Fito-600 presentaron un volumen medio de infarto total significativamente menor que el del

grupo alimentado con la dieta Fito-0n. Tanto en las regiones corticales como en las subcorticales, el volumen de infarto mostró una clara tendencia a la disminución en el grupo alimentado con la dieta Fito-600, aunque este aumento no alcanzó significación estadística. Los valores medios de los volúmenes de infarto cortical, subcortical y total se muestran en la Figura 18 (panel derecho, valores relativos) y en la Tabla 11 (valores absolutos).

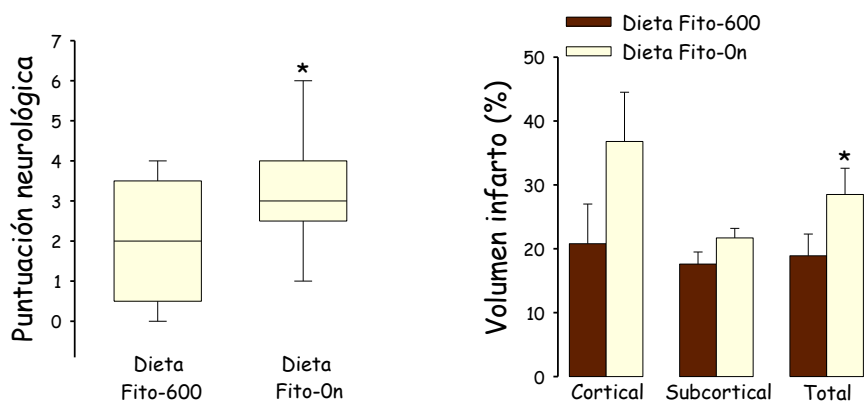


Figura 18. **Panel izquierdo:** puntuación neurológica de 9 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) ratas Wistar macho sometidas a isquemia de 90 min y 3 días de reperusión. Los valores se representan como mediana (línea central de la caja), percentil 75 (línea superior de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja), percentil 90 (barra de error superior) y percentil 10 (barra de error inferior).

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (test no paramétrico de Mann-Whitney).

**Panel derecho:** volumen de infarto cortical, subcortical y total de los mismos animales. Los valores se expresan porcentualmente respecto de la correspondiente región contralateral (sana), y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (test *t*-Student).

Tabla 11. Volumen de infarto de las diferentes regiones cerebrales de ratas Wistar macho, alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas al episodio de isquemia-reperusión.

	Volumen de infarto (mm <sup>3</sup> )		
	Región cortical	Región subcortical	Total
Dieta Fito-600	58.0 ± 47.1	63.1 ± 17.9	121.5 ± 57.2
Dieta Fito-0n	110.0 ± 67.1	80.2 ± 16.3	190.9 ± 80.0*

Los valores se expresan como media ± desviación estándar de la media de 9 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (test *t*-Student).

En la Figura 19 se muestran dos series de las siete lonchas coronales en las que se secciona el cerebro para su procesamiento mediante la incubación en TTC, correspondientes a sendos animales de cada uno de los dos grupos experimentales.

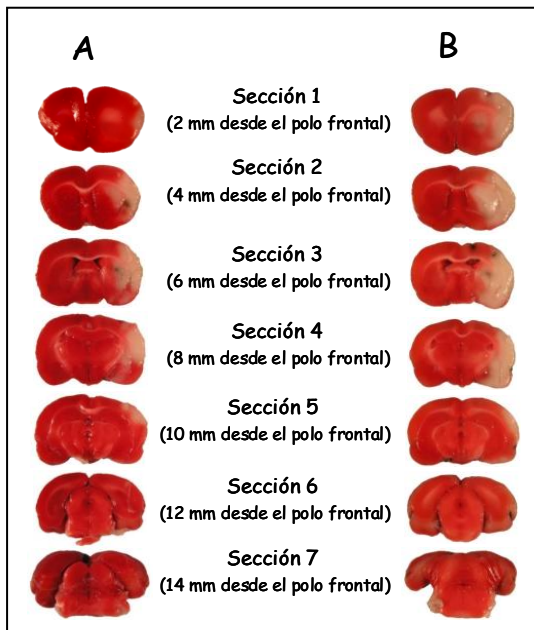


Figura 19. Secciones coronales de sendos animales del grupo Fito-600 (columna A) y Fito-0n (columna B), procesadas mediante la técnica del TTC. Las zonas pálidas corresponden al tejido infartado, y las que muestran coloración roja corresponden al tejido sano.



En lo referente al análisis por secciones, las áreas de infarto cortical, subcortical y total se representan en la Figura 20. El tamaño del infarto fue mayor en el grupo de animales alimentados con la dieta Fito-0n, aunque con diferentes niveles de significación estadística para las diferentes secciones.

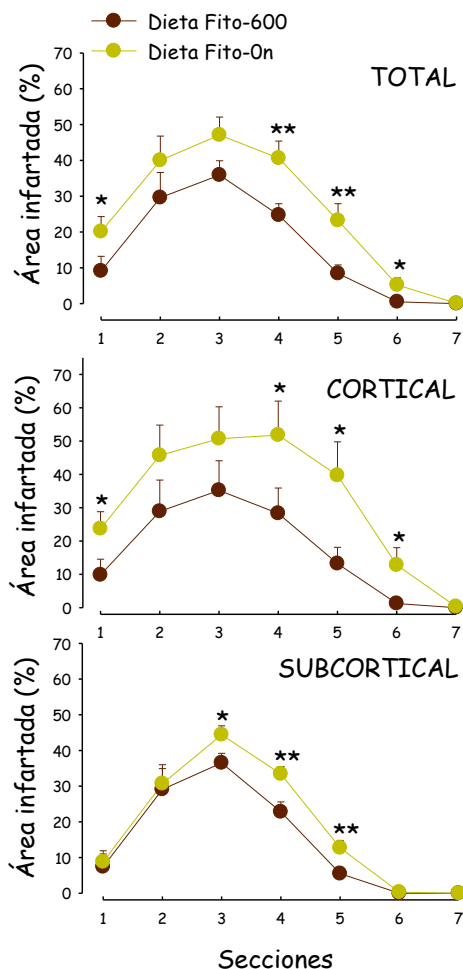


Figura 20. Áreas de infarto de las secciones coronales consideradas cada una de ellas en conjunto (total) y de forma separada para las regiones corticales y subcorticales, en ratas Wistar macho alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas a isquemia de 90 min y 3 días de reperusión. Los datos se expresan como el porcentaje del área de la correspondiente región contralateral y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 9 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (test *t*-Student).

### 1.3.2. Ratas hembra

Después de tres días del episodio isquémico, el estado neurológico de las ratas Wistar hembra alimentadas con la dieta Fito-600 no mejoró respecto del registrado para las ratas alimentadas con la dieta Fito-0n (Figura 21, panel izquierdo). Por el contrario, la variación del valor medio de volumen de infarto cortical, subcortical y total siguió el mismo patrón observado para las ratas macho: un aumento significativo del volumen de infarto total en los animales alimentados con la dieta Fito-0n, y un incremento en el volumen de infarto cortical y subcortical respecto al grupo alimentado con la dieta Fito-600, que no llegó a ser significativamente diferente (Figura 21, panel derecho). Tanto en la Figura 21 como en la Tabla 12, se observa que los mayores volúmenes de infarto se encuentran en las estructuras corticales.

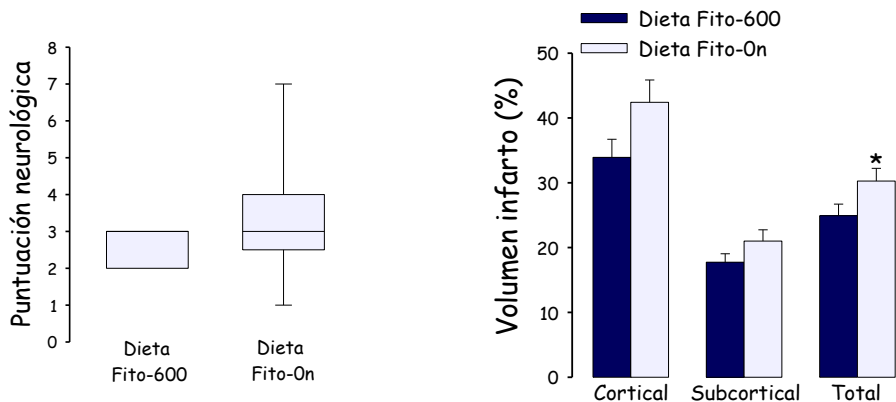


Figura 21. **Panel izquierdo:** puntuación neurológica de 7 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) ratas Wistar hembra sometidas a isquemia de 90 min y 3 días de reperusión. Los valores se representan como mediana (línea central de la caja), percentil 75 (línea superior de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja), percentil 90 (barra de error superior) y percentil 10 (barra de error inferior).

**Panel derecho:** volumen de infarto cortical, subcortical y total de los mismos animales. Los valores se expresan porcentualmente respecto de la correspondiente región contralateral (sana), y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (test *t*-Student).

Tabla 12. Volumen de infarto de las diferentes regiones cerebrales de ratas Wistar hembra, alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas al episodio de isquemia-reperfusión.

	Volumen de infarto (mm <sup>3</sup> )		
	Región cortical	Región subcortical	Total
Dieta Fito-600	76.3 ± 15.6	56.2 ± 10.9	134.7 ± 22.3
Dieta Fito-0n	97.3 ± 22.7	70.9 ± 19.8	170.8 ± 32.2*

Los valores se expresan como media ± desviación estándar de la media de 7 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (test *t*-Student).

El cerebro de las ratas hembra se seccionó en 6 lonchas coronales. El análisis de las secciones completas (total) mostró volúmenes de infarto superiores en las secciones 3 y 4 de las ratas hembra alimentadas con la dieta Fito-0n. Sin embargo, y pese a que el volumen de infarto del grupo de animales alimentados con la dieta Fito-0n fue superior en todos los casos al de los animales alimentados con la dieta Fito-600, no se observaron variaciones significativas al realizar el análisis separando estructuras corticales de las subcorticales (Figura 22).

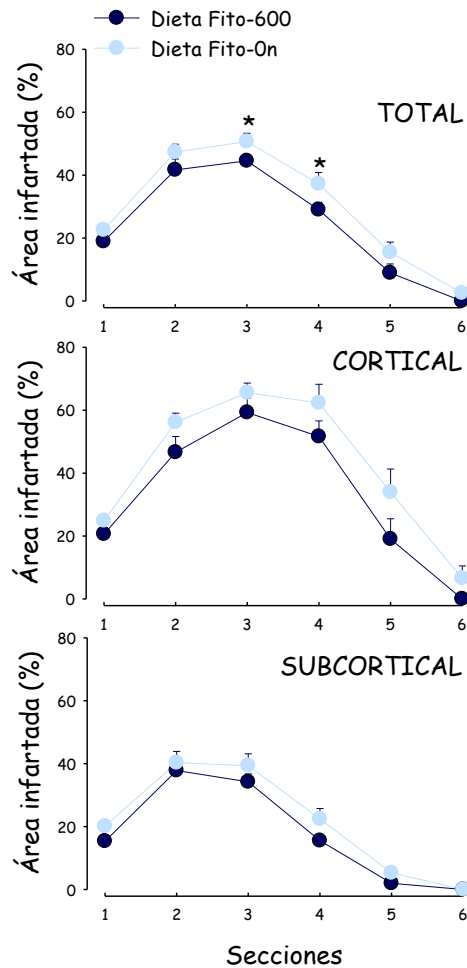


Figura 22. Áreas de infarto de las secciones coronales consideradas cada una de ellas en conjunto (total) y de forma separada para las regiones corticales y subcorticales, en ratas Wistar hembra alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas a isquemia de 90 min y 3 días de reperusión. Los datos se expresan como el porcentaje del área de la correspondiente región contralateral, y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 7 (dieta Fito-600) y 9 (dieta Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (test t-Student).

La comparación estadística del volumen de infarto total entre las ratas Wistar macho y hembra alimentadas con las dietas Fito-600 o Fito-0n, no mostró una influencia significativa del género; es decir, aunque el volumen de infarto de las ratas hembra fue ligeramente superior al de los machos, esta diferencia no alcanzó significación estadística (Figura 23). En ambos casos, la distribución del infarto siguió un patrón similar, con volúmenes mayores en las estructuras corticales que en las subcorticales.

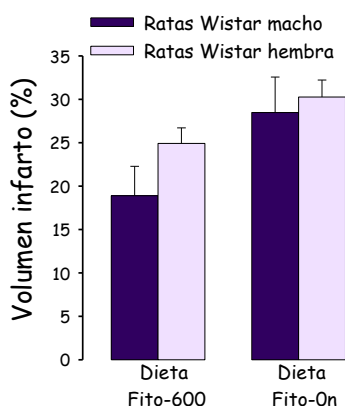


Figura 23. Volumen de infarto total de las ratas Wistar macho y hembra alimentadas con las dietas Fito-600 y Fito-0n. Los valores se expresan porcentualmente respecto de la correspondiente región contralateral (sana), y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 9 (macho-Fito-600), 9 (macho-Fito-0n), 7 (hembra-Fito-600) y 9 (hembra-Fito-0n) animales.

## 2. HIPERTENSIÓN

Los resultados descritos a continuación se han obtenido en ratas macho.

### 2.1 Evolución ponderal

El consumo de la dieta Fito-0n o de la dieta Fito-600 no modificó las curvas de crecimiento de las ratas WKY (normotensas) ni de las SHR (hipertensas). El análisis de la ganancia de peso entre cepas mostró que, con el mismo tiempo de estabulación, se produjo una mayor ganancia de peso en las ratas WKY que en las SHR. Ambas cepas alcanzaron un peso estable tras 12-14 semanas estabuladas

(390-410 g en las ratas WKY, y 330-350 g en las SHR). Las ratas SHR se mantuvieron estabuladas hasta la semana 17 para asegurar el desarrollo de hipertensión que en estos animales viene determinado por la edad (Figura 24).

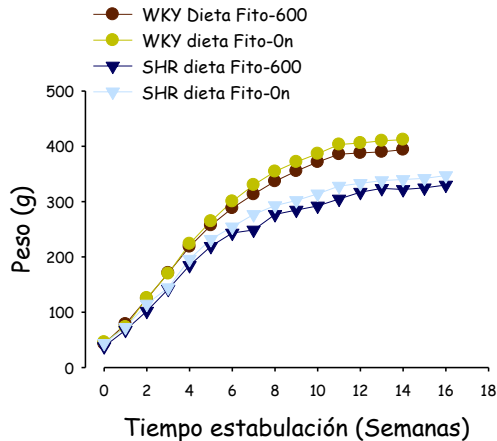


Figura 24. Evolución ponderal de las ratas WKY y SHR macho alimentadas con las dietas Fito-600 y Fito-0n. Los valores se han representado como la media de 17 (WKY-Fito-0n), 19 (WKY-Fito-600), 18 (SHR-Fito-0n) y 18 (SHR-Fito-600) animales.

## 2.2. Hemodinámica cerebral y sistémica durante la oclusión-reperusión de la ACM

Tanto las ratas SHR como las WKY utilizadas para este protocolo experimental mostraron un patrón de variación de la PC durante el episodio de isquemia-reperusión semejante al registrado en las series experimentales previas: descenso de la PC tras la introducción del filamento hasta el origen de la ACM, e incremento posterior tras su retirada que fue, en todos los casos, superior al valor basal (Figura 25, panel izquierdo). No se evidenciaron diferencias de PC ni por efecto de la hipertensión ni como consecuencia del consumo de isoflavonas en la dieta.

La PAS fue significativamente mayor en las ratas SHR (Fito-600  $147 \pm 8.1$ , Fito-0n  $152 \pm 5.6$  mmHg) respecto de las ratas WKY (Fito-600  $110 \pm 5.1$ , Fito-0n  $115 \pm 7.2$  mmHg) independientemente de la dieta consumida. No se registraron

diferencias significativas entre los valores de PAS en las distintas fases del episodio de isquemia-reperfusión para los dos regímenes alimentarios, ni dentro de cada una de las cepas (Figura 25, panel derecho).

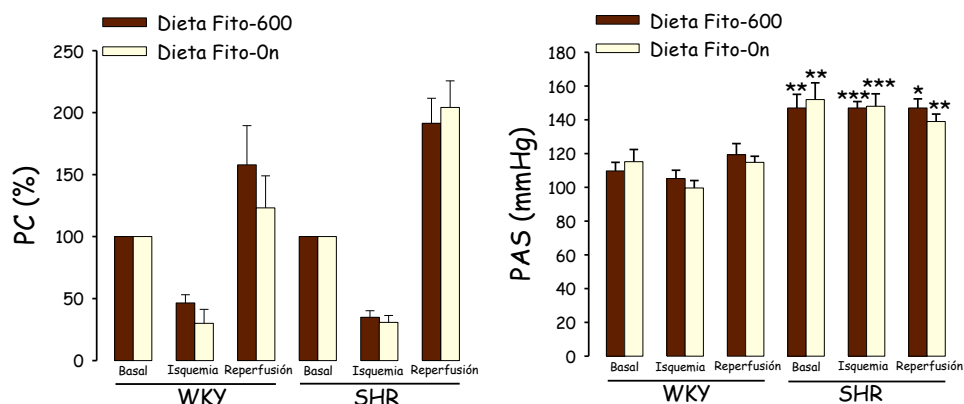


Figura 25. Valores de perfusión cerebral (PC, panel izquierdo) y presión arterial sistémica (PAS, panel derecho), antes (basal), durante (isquemia) y después (reperfusión) del episodio isquémico de 90 min en ratas WKY y SHR alimentadas con las dietas Fito-600 y Fito-0n. Los valores de PC se expresan como porcentaje de los valores basales, y los de PAS en unidades de presión. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 10 (WKY-Fito-600), 7 (WKY-Fito-0n), 11 (SHR-Fito-600) y 11 (SHR-Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo WKY (ANOVA 2 vías, post-test Bonferroni).

Al igual que en los grupos experimentales descritos en apartados anteriores, la tendencia de los parámetros gasométricos durante la isquemia fue hacia la hipoxia, hipercapnia y acidosis. Sin embargo, las variaciones no alcanzaron significación estadística en todos los casos (Tabla 13). En cuanto a la glucemia, sólo se registró una desviación significativa en el grupo SHR-Fito-600, aunque en sentido contrario al registrado previamente; es decir, hacia la hiperglucemia. Las significaciones registradas durante la isquemia se mantuvieron, en general, durante la perfusión, por lo que no se evidenció la tendencia a la normalidad en esta fase, al contrario de lo observado en las series experimentales anteriores.

Tabla 13. Parámetros gasométricos y glucemia en muestras de sangre arterial procedentes de ratas WKY y SHR macho alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas al episodio de isquemia-reperfundición.

			Basal	Isquemia	Reperfundición
WKY	Dieta Fito-600	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	104.9±17.4	93.8±22.0	92.0±19.7
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	35.7 ± 6.1	47.5±9.6**	51.9±10.1**
		pH	7.46±0.06	7.34±0.07**	7.33±0.06**
		Glucosa (mg/dL)	91.5±39.3	100.3±35.3	103.8±24.5
	Dieta Fito-0n	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	95.2±28.0	91.0±20.2	99.6±19.3
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	45.7±13.1	49.0±10.5	44.3±8.2
		pH	7.41±0.13	7.36±0.09	7.35±0.05
		Glucosa (mg/dL)	115.1±24.5	113.4±27.9	133.9±18.7
SHR	Dieta Fito-600	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	114.2±16.6	101.1±13.8	103.3±19.1
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	32.2±6.6	39.0±7.0*	39.9±10.0**
		pH	7.46±0.06	7.41±0.06**	7.38±0.07**
		Glucosa (mg/dL)	106.9±19.8	132.4±28.0*	141.7±40.3**
	Dieta Fito-0n	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	106.1±21.3	86.4±16.0*	93.9±19.9
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	40.1±11.2	45.0±10.7	43.8±21.2
		pH	7.43± 0.08	7.39±0.07	7.43±0.03
		Glucosa (mg/dL)	113.8±28.7	122.7±29.2	130.5±36.4

Las muestras de sangre se tomaron antes (basal), durante (isquemia) y después (reperfundición) del episodio isquémico de 90 min. Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media ± desviación estándar de la media de 10 (WKY-Fito-600), 7 (WKY-Fito-0n), 11 (SHR-Fito-600) y 11 (SHR-Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ , significativamente diferente del correspondiente valor basal (ANOVA muestras repetidas y post-test Dunnet).

### 2.3. Evaluación del daño cerebral isquémico: valoración neurológica y tamaño de infarto

El consumo de la dieta Fito-600 no mejoró el estado neurológico de las ratas WKY ni de las SHR sometidas a isquemia-reperfundición, en comparación con la dieta Fito-0n. La puntuación neurológica no fue estadísticamente significativa entre ambas cepas (Figura 26, panel izquierdo).

El volumen medio de infarto cortical de las ratas SHR fue significativamente superior respecto al de las ratas WKY, independientemente del régimen alimentario, lo que determinó un volumen de infarto total significativamente mayor en las ratas SHR. Es de destacar el reducido tamaño de la lesión cerebral en las ratas WKY, que en términos porcentuales resultó ser de un 15% aproximadamente



en comparación con el 25% de las ratas SHR. No se evidenció disminución del volumen de infarto cortical, subcortical o total como consecuencia del consumo de la dieta Fito-600, ni en las ratas WKY ni en las SHR (Figura 26 panel derecho, y Tabla 14).

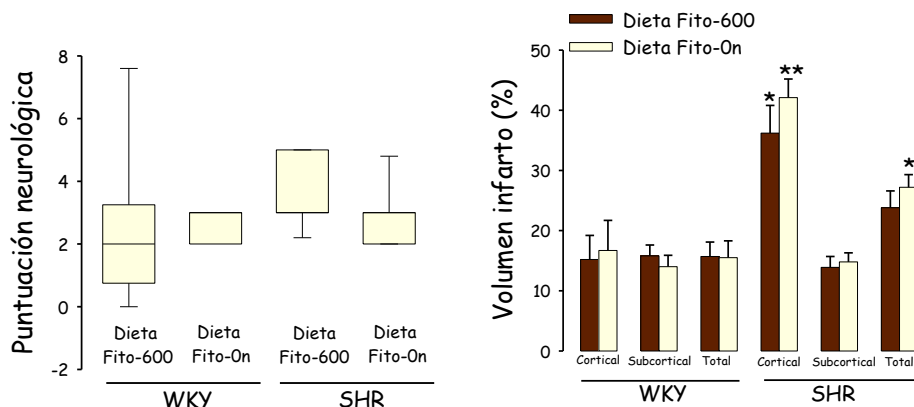


Figura 26. **Panel izquierdo:** puntuación neurológica de 10 (WKY-Fito-600), 7 (WKY-Fito-0n), 11 (SHR-Fito-600) y 11 (SHR-Fito-0n) animales. Los valores se representan como mediana (línea central de la caja), percentil 75 (línea superior de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja), percentil 90 (barra de error superior) y percentil 10 (barra de error inferior).

**Panel derecho:** volumen de infarto cortical, subcortical y total de los mismos animales. Los valores se expresan porcentualmente respecto de la correspondiente región contralateral (sana), y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo WKY (ANOVA 2 vías, post-test Bonferroni).

Tabla 14. Volumen de infarto de las diferentes regiones cerebrales de ratas WKY y SHR macho, alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas al episodio de isquemia-reperfusión.

		Volumen de infarto (mm <sup>3</sup> )		
		Región cortical	Región subcortical	Total
WKY	Dieta Fito-600	44.3 ± 37.1	56.5 ± 17.7	101.6 ± 47.8
	Dieta Fito-0n	53.1 ± 46.1	52.1 ± 18.5	106.4 ± 57.5
SHR	Dieta Fito-600	95.4 ± 43.6*	48.5 ± 22.3	145.3 ± 62.5
	Dieta Fito-0n	120.0 ± 32.1**	50.4 ± 17.8	176.7 ± 48.6*

Los valores se expresan como media ± desviación estándar de la media de 10 (WKY-Fito-600), 7 (WKY-Fito-0n), 11 (SHR-Fito-600) y 11 (SHR-Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo WKY (ANOVA 2 vías, post-test Bonferroni).

El análisis del volumen de infarto por secciones corroboró el hecho de que el menor volumen de infarto cerebral total en las ratas WKY, se debe a que éstas presentan volúmenes de infarto en la corteza significativamente inferiores a las ratas SHR. Los volúmenes de infarto en las estructuras subcorticales son muy similares (Figura 27).

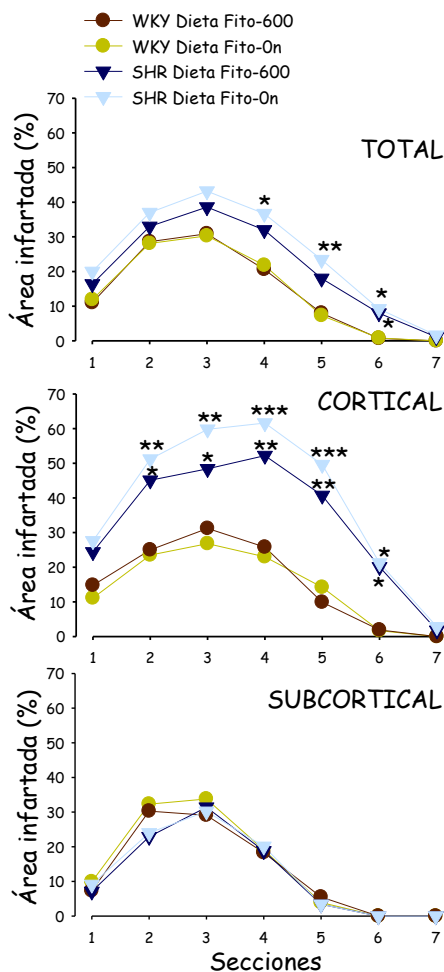


Figura 27. Áreas de infarto de las secciones coronales consideradas cada una de ellas en conjunto (total) y de forma separada para las regiones corticales y subcorticales, en ratas WKY y SHR alimentadas con cada una de las dos dietas y sometidas a isquemia de 90 min y 3 días de reperusión. Los datos se expresan como el porcentaje del área de la correspondiente región contralateral, y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 10 (WKY-Fito-600), 7 (WKY-Fito-0n), 11 (SHR-Fito-600) y 11 (SHR-Fito-0n) animales.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (ANOVA 2 vías, post-test Bonferroni).

## **B. NEUROPROTECCIÓN AGUDA**

### **1. NORMOTENSIÓN**

#### **1.1. Evolución ponderal**

Las ratas Wistar macho alimentadas con la dieta Fito-Or alcanzaron un peso estable de 350 g aproximadamente hacia la semana 9 de estabulación, mientras que las ratas hembra necesitaron 12 semanas para alcanzar un peso estable de unos 250 g. Las curvas de crecimiento se muestran en la Figura 28.

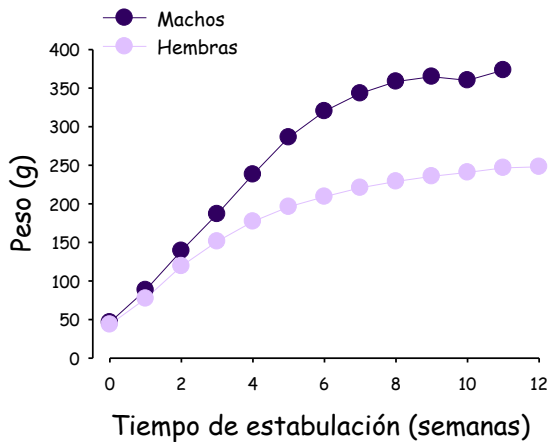


Figura 28. Evolución ponderal de las ratas Wistar macho y hembra alimentadas con la dieta Fito-Or. Los valores se han representado como la media de 64 (machos) y 21 (hembras) animales.

#### **1.2. Hemodinámica cerebral y sistémica durante la oclusión-reperfusión de la ACM**

##### **1.2.1. Ratas macho**

Todos los animales de los cuatro grupos se sometieron a un episodio de isquemia-reperfusión, caracterizado por la caída rápida y mantenida durante 90 min de la PC tras la introducción del filamento, y su aumento tras la retirada del mismo hasta valores superiores a los basales. Estas variaciones de PC se muestran en la

Figura 29 (panel izquierdo). La PAS no varió durante la isquemia y la reperusión respecto del valor basal, en ninguno de los grupos (Figura 29, panel derecho).

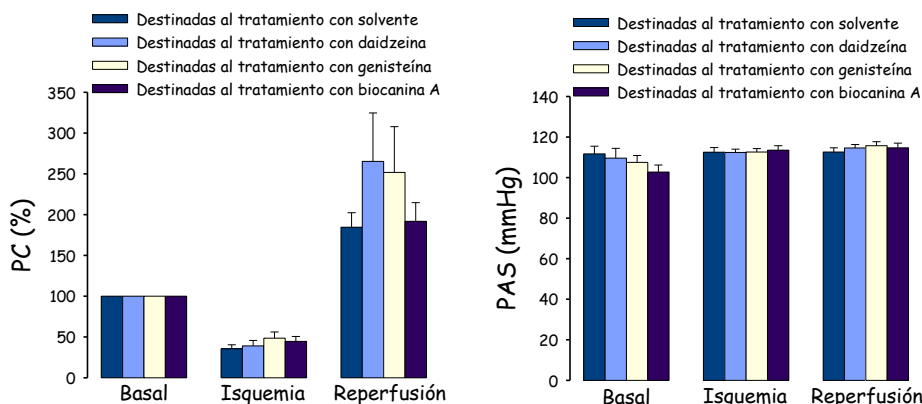


Figura 29. Valores de perfusión cerebral (PC, panel izquierdo) y presión arterial sistémica (PAS, panel derecho), antes (basal), durante (isquemia), y después (reperusión) del episodio isquémico de 90 min en ratas Wistar macho alimentadas con la dieta Fito-0r y destinadas al tratamiento posterior con isoflavonas. Los valores de PC se expresan como porcentaje de los valores basales, y los de PAS en unidades de presión. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 10 (solvente), 10 (daidzeína), 12 (genisteína) y 11 (biocanina A) animales.

Aunque con diferentes niveles de significación, la inducción de la isquemia-reperusión provocó, en todos los grupos, una variación de los valores de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$  y pH propia del episodio isquémico tal y como se ha descrito en las series experimentales previas: hipoxia, hipercapnia y acidosis, con tendencia a la recuperación de los valores basales durante la reperusión. La glucemia, en cambio, sólo disminuyó significativamente en los animales destinados al grupo control (Tabla 15).

Tabla 15. Parámetros gasométricos y glucemia en muestras de sangre arterial procedentes de ratas Wistar macho, destinadas al tratamiento con solvente (control), genisteína, daidzeína y biocanina A y sometidas al episodio de isquemia-reperusión.

		Basal	Isquemia	Reperusión
Destinadas al tratamiento con solvente (control)	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	105.2 ± 12.4	63.8 ± 10.0**	92.6 ± 20.5
	P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	30.0 ± 3.4	58.3 ± 11.5**	45.8 ± 13.2**
	pH	7.49 ± 0.03	7.25 ± 0.05**	7.33 ± 0.09**
	Glucosa (mg/dL)	108.2 ± 20.5	88.9 ± 18.0*	86.0 ± 17.3**
Destinadas al tratamiento con Daidzeína	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	117.2 ± 13.9	91.5 ± 24.0**	101.9 ± 15.1*
	P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	29.4 ± 5.7	46.0 ± 13.2**	37.3 ± 7.0*
	pH	7.48 ± 0.06	7.31 ± 0.09**	7.38 ± 0.07**
	Glucosa (mg/dL)	96.4 ± 20.5	77.0 ± 31.9	79.0 ± 17.5
Destinadas al tratamiento con Genisteína	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	115.8 ± 13.5	92.2 ± 25.6**	103.4 ± 17.8
	P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	29.7 ± 3.7	43.2 ± 14.5**	38.2 ± 10.4*
	pH	7.48 ± 0.05	7.32 ± 0.09**	7.35 ± 0.08**
	Glucosa (mg/dL)	107.7 ± 14.2	104.7 ± 31.9	100.0 ± 41.6
Destinadas al tratamiento con Biocanina A	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	97.0 ± 27.7	78.4 ± 20.9	107.2 ± 14.3
	P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	36.1 ± 17.3	59.1 ± 6.5**	39.7 ± 7.6
	pH	7.44 ± 0.12	7.24 ± 0.03**	7.36 ± 0.06*
	Glucosa (mg/dL)	95.5 ± 25.9	83.5 ± 17.3	101.6 ± 35.2

Las muestras de sangre se tomaron antes (basal), durante (isquemia) y después (reperusión) del episodio isquémico de 90 min. Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media ± desviación estándar de la media de 10 (solvente), 10 (daidzeína), 12 (genisteína) y 11 (biocanina A) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ , significativamente diferente del correspondiente valor basal (ANOVA muestras repetidas y post-test Dunnet).

Por lo tanto, quedó constatado que desde el punto de vista de la hemodinámica cerebral y sistémica, todos los animales incluidos en esta serie experimental se comportaron de manera homogénea, validando la distribución aleatoria previa en 4 grupos destinados a recibir sendos tratamientos con el solvente (control) o con cada una de las isoflavonas a los 30 min de la reperusión.

### 1.2.2. Ratas hembra

Como se detalla más adelante, la genisteína fue la única de las isoflavonas investigadas, cuyo efecto neuroprotector en términos de reducción del volumen de infarto fue significativo en ratas Wistar macho, y es por ello que fue la única isoflavona investigada en ratas hembra.

El perfil de los trazados de PC y PAS durante la isquemia-reperfusión en las ratas hembras destinadas tanto al grupo control como al grupo destinado al tratamiento posterior con genisteína, fue muy similar al descrito en el resto de series experimentales anteriores. La cuantificación de ambos parámetros se presenta en la Figura 30, en la que se evidencia que no hubo diferencias significativas entre los dos grupos dentro de cada parámetro en cada una de las tres fases del episodio de isquemia-reperfusión.

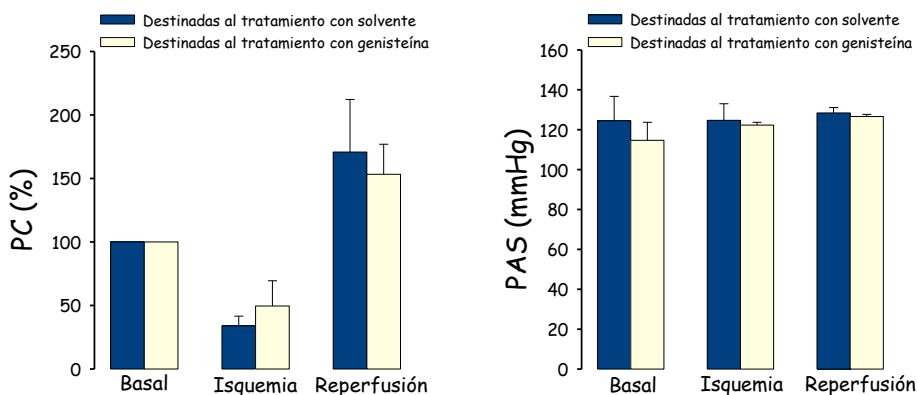


Figura 30. Valores de perfusión cerebral (PC, panel izquierdo) y presión arterial sistémica (PAS, panel derecho), antes (basal), durante (isquemia) y después (reperfusión) del episodio isquémico de 90 min en ratas hembra alimentadas con la dieta Fito-0r y destinadas al tratamiento posterior con genisteína. Los valores de PC se expresan como porcentaje de los valores basales y los de PAS en unidades de presión. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 4 (solvente) y 4 (genisteína).

Las variaciones de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucemia durante la isquemia y la reperfusión siguieron comportamientos similares en los dos grupos, aunque no se registraron diferencias significativas debido probablemente al bajo número de animales (Tabla 16).

Tabla 16. Parámetros gasométricos y glucemia en muestras de sangre arterial procedentes de ratas Wistar hembra destinadas al tratamiento con solvente (control) y genisteína y sometidas al episodio de isquemia-reperfusión.

		Basal	Isquemia	Reperfusión
Destinadas al tratamiento con solvente	$P_aO_2$	97.7 ± 18.8	85.7 ± 24.4	122.0 ± 21.7
	$P_aCO_2$	44.3 ± 12.7	64.0 ± 11.0	45.7 ± 12.5
	pH	7.37 ± 0.09	7.22 ± 0.08	7.33 ± 0.09
	Glucosa (mg/dL)	73.0 ± 16.4	88.3 ± 41.0	87.0 ± 2.6
Destinadas al tratamiento con genisteína	$P_aO_2$	85.5 ± 15.4	84.8 ± 26.0	118.5 ± 16.7
	$P_aCO_2$	41.3 ± 10.3	54.8 ± 7.1	49.3 ± 15.2
	pH	7.35 ± 0.12	7.28 ± 0.03	7.32 ± 0.11
	Glucosa (mg/dL)	96.0 ± 29.2	90.0 ± 34.5	102.5 ± 33.9

Las muestras de sangre se tomaron antes (basal), durante (isquemia) y después (reperfusión) del episodio isquémico de 90 min. Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media ± desviación estándar de la media de 4 (solvente) y 4 (genisteína) animales.

### 1.3. Evaluación del daño cerebral isquémico: valoración neurológica y tamaño de infarto

#### 1.3.1. Ratas macho

El análisis de la concentración plasmática de genisteína, daidzeína y biocanina A puso de manifiesto que tras 72 h de tratamiento, se detectaron diferentes niveles de genisteína en el plasma de las ratas tratadas con genisteína 1 mg/kg y biocanina A 1 mg/kg (Tabla 17). Por el contrario, no se detectó daidzeína en los animales tratados con esta isoflavona. Tampoco se detectó la presencia de ninguna isoflavona en el plasma obtenido antes del implante de la bomba osmótica (plasma 0 h).



Tabla 17. Concentración plasmática de genisteína ( $\mu\text{M}$ ) en ratas Wistar macho tratadas con genisteína o biocanina A.		
	Plasma 0 h	Plasma 72 h
Genisteína (1 mg/kg)	$0 \pm 0$	$0.48 \pm 0.30$
Biocanina A (1 mg/kg)	$0 \pm 0$	$0.30 \pm 0.25$

*Los datos se han obtenido mediante HPLC y se representan como media  $\pm$  desviación estándar de la media de los resultados obtenidos en 10 (genisteína) y 10 (biocanina A) animales.*

En la Figura 31 (panel izquierdo) se han representado los valores de la mediana de la puntuación neurológica de los animales pertenecientes a cada uno de los cuatro grupos experimentales. Se aprecia una tendencia hacia la mejora del estado neurológico de los animales tratados con daidzeína, genisteína y biocanina A respecto de los animales control; sin embargo, esta tendencia no alcanzó significación estadística. En lo referente al volumen de infarto cerebral, los animales tratados con las isoflavonas mostraron una tendencia hacia su reducción; sin embargo, esta disminución sólo alcanzó significación estadística en el grupo tratado con genisteína (Figura 31, panel derecho). En la Tabla 18 se muestran en valores absolutos las medias del volumen de infarto total y dividido en regiones corticales y subcorticales de los animales incluidos en el grupo control y de los tratados con daidzeína, genisteína y biocanina A.

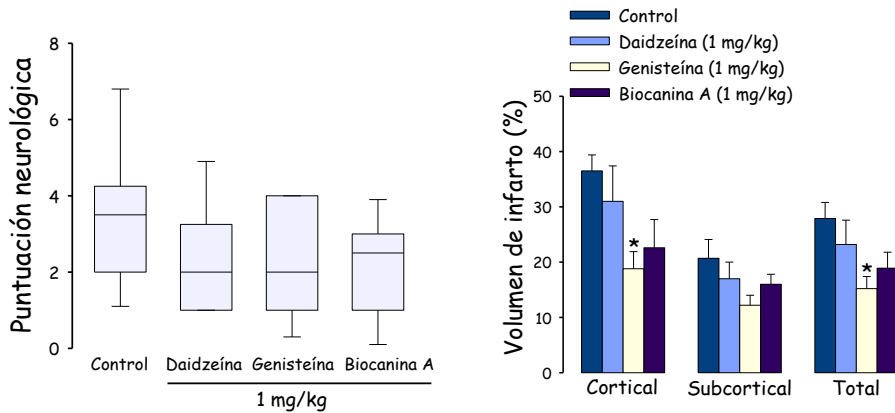


Figura 31. **Panel izquierdo:** puntuación neurológica de 10 (solvente), 10 (daidzeína), 12 (genisteína) y 11 (biocanina A) ratas Wistar macho sometidas a isquemia-reperusión, y tratadas a los 30 minutos de reperusión con la dosis de 1 mg/kg por día durante 3 días. Los valores se representan como mediana (línea central de la caja), percentil 75 (línea superior de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja), percentil 90 (barra de error superior) y percentil 10 (barra de error inferior).

**Panel derecho:** volumen de infarto cortical, subcortical y total de los mismos animales. Los valores se expresan porcentualmente respecto de la correspondiente región contralateral (sana), y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo control (ANOVA muestras independientes y post-test Dunnet).

Tabla 18. Volumen de infarto de las diferentes regiones cerebrales de ratas Wistar macho sometidas al episodio de isquemia-reperusión, y tratadas con solvente (control) o con la dosis de 1 mg/kg por día durante 3 días de daidzeína, genisteína o biocanina A.

	Volumen de infarto ( $\text{mm}^3$ )		
	Región cortical	Región subcortical	Total
Control	109.6 $\pm$ 30.0	79.0 $\pm$ 41.3	190.2 $\pm$ 65.2
Daidzeína	91.2 $\pm$ 59.1	64.9 $\pm$ 35.5	157.1 $\pm$ 93.5
Genisteína	55.9 $\pm$ 31.9*	48.2 $\pm$ 26.5	104.5 $\pm$ 54.3*
Biocanina A	65.7 $\pm$ 48.9	61.0 $\pm$ 25.0	127.5 $\pm$ 66.2

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de la media de 10 (solvente), 10 (daidzeína), 12 (genisteína) y 11 (biocanina A) animales.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo control (ANOVA muestras independientes y post-test Dunnet).

El análisis del área infartada de cada una de las siete secciones coronales mostró reducciones significativas del área de infarto en las secciones 4, 5, 6 y 7 en el grupo tratado con genisteína, y en la sección 6 en el grupo tratado con biocanina A (Figura 32)

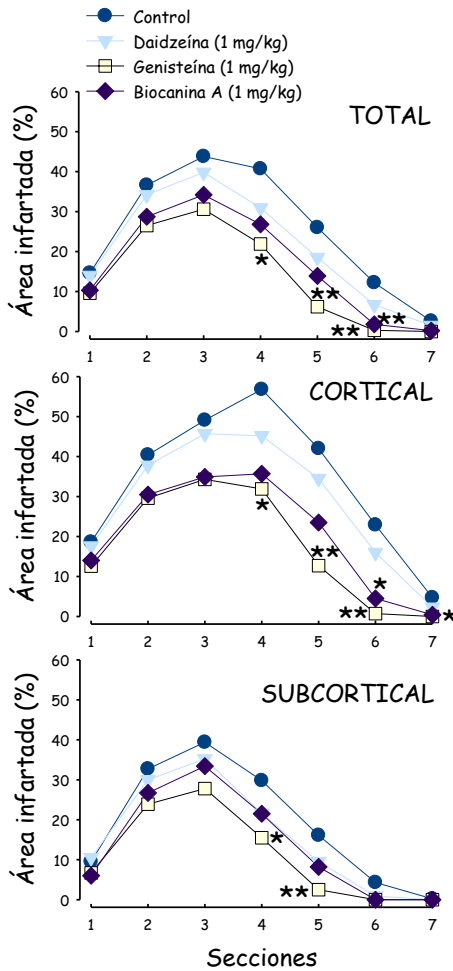


Figura 32. Áreas de infarto de las secciones coronales consideradas cada una de ellas en conjunto (total), y de forma separada para las regiones corticales y subcorticales, en ratas Wistar macho sometidas a 90 min de isquemia y 3 días de reperusión, y tratadas con las diferentes isoflavonas a la dosis de 1 mg/kg por día durante 3 días. Los datos se expresan como el porcentaje del área de la correspondiente región contralateral, y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 10 (solvente), 10 (daidzeína), 12 (genisteína) y 11 (biocanina A) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  significativamente diferente del grupo control (ANOVA, post-test Dunnet).

### 1.3.2. Ratas hembra

El tratamiento con genisteína 1 mg/kg por día durante tres días, mejoró significativamente el estado neurológico (Figura 33, panel izquierdo), e indujo una disminución significativa del volumen de infarto cerebral total en ratas

hembra (Figura 33, panel derecho). Los valores absolutos del volumen de infarto cortical, subcortical y total de los dos grupos se presentan en la tabla 19.

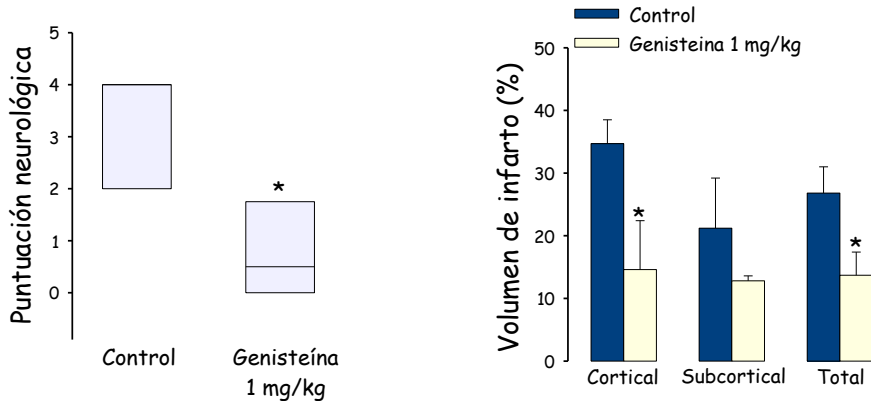


Figura 33. **Panel izquierdo:** puntuación neurológica de 4 (solvente) y 4 (genisteína) ratas Wistar hembra sometidas a isquemia-reperusión, y tratadas con la dosis de 1 mg/kg por día durante 3 días de genisteína a los 30 min de reperusión. Los valores se representan como mediana (línea central de la caja), percentil 75 (línea superior de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja), percentil 90 (barra de error superior) y percentil 10 (barra de error inferior).

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo alimentado con la dieta Fito-600 (test no paramétrico de Mann-Whitney).

**Panel derecho:** volumen de infarto cortical, subcortical y total de los mismos animales. Los valores se expresan porcentualmente respecto de la correspondiente región contralateral (sana), y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo control (test t-Student).

Tabla 19. Volumen de infarto de las diferentes regiones cerebrales de ratas Wistar hembra sometidas al episodio de isquemia-reperusión, y tratadas con solvente o con la dosis de 1 mg/kg por día durante 3 días de genisteína.

	Volumen de infarto (mm <sup>3</sup> )		
	Región cortical	Región subcortical	Total
Solvente	83.5 $\pm$ 8.7	70.2 $\pm$ 42.1	155.2 $\pm$ 38.2
Genisteína	36.2 $\pm$ 38.7*	45.2 $\pm$ 6.7	82.3 $\pm$ 43.2*

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de la media de 4 (solvente) y 4 (genisteína) animales.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo control (test t-Student).

El análisis del área de infarto por secciones puso de manifiesto áreas de infarto menores en las ratas hembra tratadas con genisteína, que alcanzaron diferentes niveles de significación estadística en la corteza, y como consecuencia en el total, de las 3 primeras secciones de tejido cerebral (2-6 mm del polo frontal) (Figura 34).

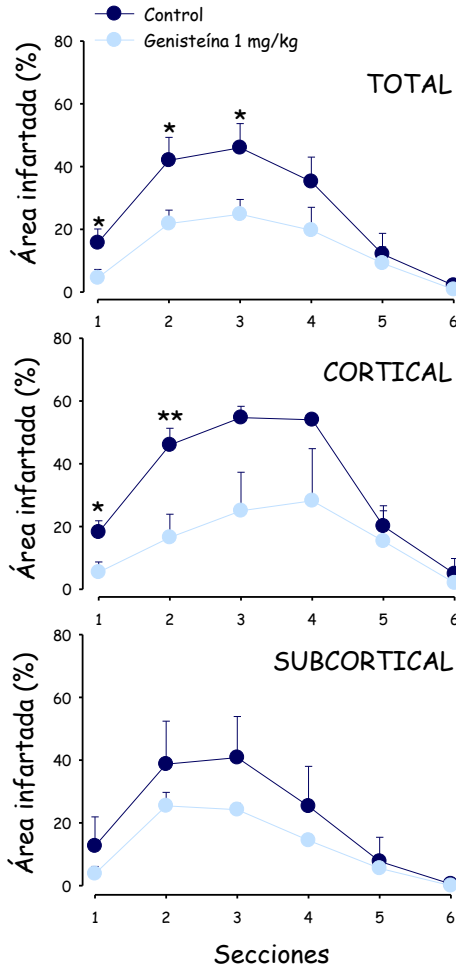


Figura 34. Áreas de infarto de las secciones coronales consideradas cada una de ellas en conjunto (total), y de forma separada para las regiones corticales y subcorticales, en ratas Wistar hembra sometidas a 90 min de isquemia y 3 días de reperusión, y tratadas con genisteína a la dosis de 1 mg/kg por día durante 3 días. Los datos se expresan como el porcentaje del área de la correspondiente región contralateral, y se representan como media ± error estándar de la media de 4 (solvente) y 4 (genisteína) animales. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  significativamente diferente del grupo control (test t-Student).

La comparación estadística del volumen de infarto total entre machos y hembras intactas de los grupos controles y tratados con genisteína puso de manifiesto que dicha isoflavona redujo en un porcentaje similar el volumen de infarto cerebral total (55% en ratas macho vs 53% en ratas hembra) (Figura 35).

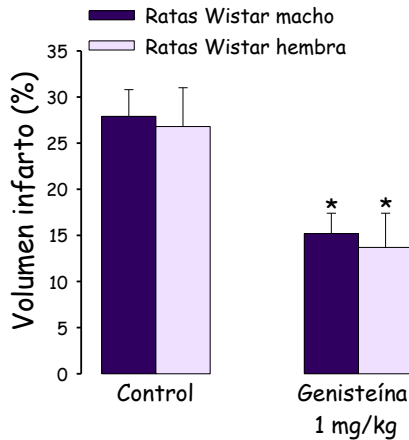


Figura 35. Volumen de infarto total de las ratas Wistar macho y hembra control y tratadas con genisteína. Los valores se expresan porcentualmente respecto de la correspondiente región contralateral (sana), y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 10 (machos-control), 12 (machos-genisteína), 4 (hembras-control) y 4 (hembras-genisteína) animales.

\* $p < 0.05$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo control (test t-Student).

## 2. HIPERTENSIÓN

### 2.1. Hemodinámica cerebral y sistémica durante la oclusión-reperusión de la ACM

Se han empleado ratas SHR macho y sus controles WKY para el estudio del posible efecto neuroprotector de genisteína en condiciones de hipertensión. Para ello se sometió a todos los animales a una isquemia focal transitoria que pudo verificarse al observar, en todos los grupos, un descenso de la PC de entre el 40-75% (respecto al valor basal) tras la oclusión de la ACM, y un aumento posterior de la señal de PC de entre el 40-80% (respecto al valor basal) durante la

reperfusión. Estas variaciones de la PC pueden observarse en la Figura 36 (panel izquierdo).

La PAS fue significativamente mayor en las ratas SHR que en las WKY. No se registraron variaciones significativas de la PAS ni durante la isquemia ni durante la reperfusión respecto de su valor basal tanto en las ratas WKY como en las SHR (Figura 36, panel derecho).

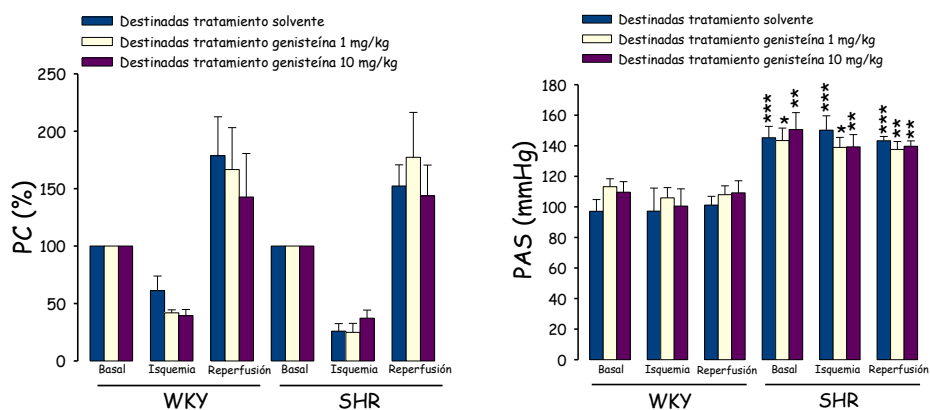


Figura 36. Valores de perfusión cerebral (PC, panel izquierdo) y presión arterial sistémica (PAS, panel derecho), antes (basal), durante (isquemia) y después (reperfusión) del episodio isquémico de 90 min en ratas WKY y SHR alimentadas con la dieta Fito-0r y destinadas al tratamiento posterior con genisteína 1 mg/kg y 10 mg/kg. Los valores de PC se expresan como porcentaje de los valores basales y los de PAS en unidades de presión. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 7 (WKY-control), 6 (WKY-genisteína 1 mg/kg), 5 (WKY-genisteína 10 mg/kg), 6 (SHR-control), 6 (SHR-genisteína 1 mg/kg) y 6 (SHR-genisteína 10mg/kg) animales.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  respecto de las ratas WKY. (ANOVA 2 vías, post-test Bonferroni).

En la Tabla 20 se presentan los valores de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$ , pH y glucemia en situación basal y durante la isquemia y la reperfusión. Salvo determinadas excepciones, la tendencia general fue hacia la disminución de los niveles de  $P_aO_2$  y del pH y hacia el aumento de los niveles de  $P_aCO_2$  y glucosa durante la isquemia. Después de 30 min de reperfusión algunos de los valores siguieron alejados de su valor basal aunque se observó una tendencia a la normalización en el resto.

Tabla 20. Parámetros gasométricos y glucemia en muestras de sangre arterial procedentes de ratas WKY y SHR destinadas al tratamiento con solvente (control), genisteína 1mg/kg ó genisteína 10 mg/kg y sometidas al episodio de isquemia-reperusión.

			Basal	Isquemia	Reperusión
WKY	Destinado tratamiento solvente (control)	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	97.0±20.2	92.0±17.0	106.0±22.6
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	39.9±11.9	49.0±7.9	43.7±8.8
		pH	7.39±0.09	7.34±0.06	7.40±0.05
		Glucosa (mg/dL)	104.7±36.3	121.7±23.4	142.1±25.7**
	Destinado tratamiento genisteína 1 mg/kg	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	98.2±11.3	83.0±10.7	89.0±13.9
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	35.2±1.7	51.7±8.7**	46.7±11.6*
		pH	7.48±0.03	7.36±0.05**	7.37±0.05**
		Glucosa (mg/dL)	117.0±20.4	113.8±9.0	119.5±18.8
	Destinado tratamiento genisteína 10 mg/kg	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	124.0±17.1	97.2±14.2	93.8±23.7*
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	37.6±7.3	43.4±11.9	48.6±13.0
		pH	7.43±0.07	7.40±0.06	7.34±0.06
		Glucosa (mg/dL)	155.2±68.1	150.2±53.6	155.0±28.3
SHR	Destinado tratamiento solvente (control)	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	111.5±9.2	117.5±22.0	124.3±27.9
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	32.5±1.4	36.0±10.4	36.3±2.3
		pH	7.49±0.07	7.42±0.06*	7.45±0.04
		Glucosa (mg/dL)	138.0±41.2	150.5±37.1	176.5±29.1
	Destinado tratamiento genisteína 1 mg/kg	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	123.0±24.4	91.0±20.6**	101.8±26.9*
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	34.5±8.5	40.2±4.4	35.8±4.5
		pH	7.47±0.07	7.42±0.05	7.44±0.04
		Glucosa (mg/dL)	150.0±22.9	166.5±32.2	169.2±49.6
	Destinado tratamiento genisteína 10 mg/kg	P <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	95.7±19.0	101.5±18.1	107.3±15.4
		P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	42.2±13.8	43.2±5.8	39.5±4.5
		pH	7.41±0.09	7.41±0.04	7.43±0.03
		Glucosa (mg/dL)	111.0±22.3	132.3±24.7	160.7±33.5**

Las muestras de sangre se tomaron antes (basal), durante (isquemia) y después (reperusión) del episodio isquémico de 90 min. Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media ± desviación estándar de la media de 7 (WKY-control), 6 (WKY-genisteína 1 mg/kg), 5 (WKY-genisteína 10 mg/kg), 6 (SHR-control), 6 (SHR-genisteína 1 mg/kg) y 6 (SHR-genisteína 10mg/kg) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ , significativamente diferente del correspondiente valor basal (ANOVA muestras repetidas y post-test Dunnet).

Desde el punto de vista de la hemodinámica cerebral y sistémica, todos los animales incluidos en esta serie experimental se comportaron, por lo tanto, de manera homogénea, validando la distribución aleatoria previa en los seis grupos experimentales.



## 2.2. Evaluación del daño cerebral isquémico: valoración neurológica y tamaño de infarto

El análisis de la concentración plasmática de genisteína en ratas WKY y SHR tratadas con esta isoflavona (1 mg/kg ó 10 mg/kg), mostró presencia de genisteína en todos los animales pertenecientes a los cuatro grupos experimentales. Los valores medios de la concentración de genisteína en el plasma de estos animales se muestran en la Tabla 21. No se detectó genisteína en las muestras del plasma de 0 h.

Tabla 21. Concentración plasmática de genisteína ( $\mu\text{M}$ ) en ratas WKY y SHR tratadas con genisteína.

		Plasma 0 h	Plasma 72 h
WKY	Genisteína (1 mg/kg)	$0 \pm 0$	$0.23 \pm 0.11$
	Genisteína (10 mg/kg)	$0 \pm 0$	$0.69 \pm 0.58$
SHR	Genisteína (1 mg/kg)	$0 \pm 0$	$0.69 \pm 0.60$
	Genisteína (10 mg/kg)	$0 \pm 0$	$1.90 \pm 2.37$

*Los datos se han obtenido mediante HPLC y se representan como media  $\pm$  desviación estándar de la media de los resultados obtenidos en 5 (WKY, genisteína 1 mg/kg), 5 (WKY, genisteína 10 mg/kg), 5 (SHR, genisteína 1 mg/kg) y 6 (SHR, genisteína 10 mg/kg) animales.*

No se objetivó una mejora significativa del estado neurológico de las ratas WKY o SHR como consecuencia del tratamiento con genisteína 1 ó 10 mg/kg (Figura 37, panel izquierdo). Las ratas SHR presentaron volúmenes de infarto significativamente superiores a las ratas WKY en la corteza, lo que se reflejó en el total del encéfalo. El tratamiento agudo de las ratas WKY y SHR con genisteína 1 mg/kg no produjo disminución del volumen de infarto cerebral, así como tampoco el aumento de la dosis a 10 mg/kg, que tampoco redujo el volumen de infarto cerebral en ninguna de las dos cepas (Figura 37, panel derecho). Los valores absolutos del volumen de infarto cortical, subcortical y total de los cuatro grupos se presentan en la Tabla 22.

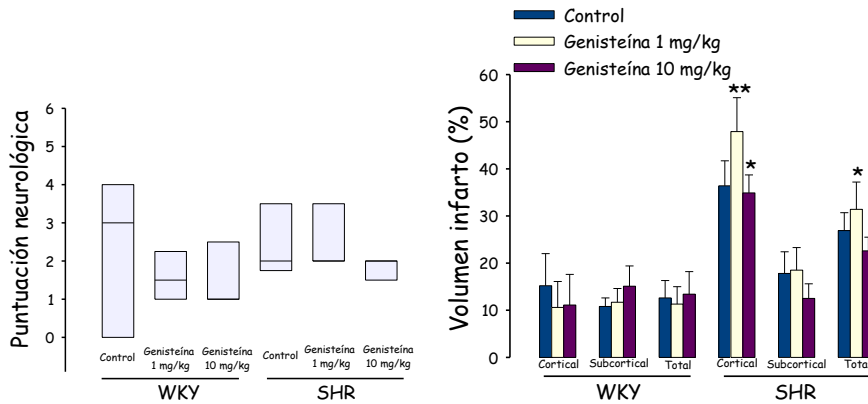


Figura 37. **Panel izquierdo:** puntuación neurológica de 7 (WKY-control), 6 (WKY-genisteína 1 mg/kg), 5 (WKY-genisteína 10 mg/kg), 6 (SHR-control), 6 (SHR-genisteína 1 mg/kg) y 6 (SHR-genisteína 10mg/kg) ratas macho sometidas a isquemia-reperusión, y tratadas con la dosis de 1 mg/kg ó 10 mg/kg por día durante 3 días de genisteína a los 30 min de reperusión. Los valores se representan como mediana (línea central de la caja), percentil 75 (línea superior de la caja), percentil 25 (línea inferior de la caja), percentil 90 (barra de error superior) y percentil 10 (barra de error inferior).

**Panel derecho:** volumen de infarto cortical, subcortical y total de los mismos animales. Los valores se expresan porcentualmente respecto de la correspondiente región contralateral (sana), y se representan como media ± error estándar de la media.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo de ratas WKY (ANOVA 2 vías, post-test Bonferroni).

Tabla 22. Volumen de infarto de las diferentes regiones cerebrales de ratas WKY y SHR sometidas al episodio de isquemia-reperusión, y tratadas con solvente o con 1 ó 10 mg/kg por día durante 3 días de genisteína.

		Volumen de infarto (mm <sup>3</sup> )		
		Región cortical	Región subcortical	Total
WKY	Solvente (control)	44.5 ± 53.5	41.5 ± 16.5	85.8 ± 67.0
	Genisteína 1 mg/kg	33.4 ± 44.1	45.4 ± 28.1	79.3 ± 65.4
	Genisteína 10 mg/kg	31.3 ± 40.9	57.5 ± 35.1	88.6 ± 69.5
SHR	Solvente (control)	101.9 ± 33.8	83.8 ± 85.8	171.1 ± 63.0
	Genisteína 1 mg/kg	127.5 ± 50.1**	63.9 ± 43.9	192.5 ± 91.1*
	Genisteína 10 mg/kg	100.8 ± 30.4*	47.1 ± 27.9	149.5 ± 50.7

Los valores se expresan como media ± desviación estándar de la media de 7 (WKY-control), 6 (WKY-genisteína 1 mg/kg), 5 (WKY-genisteína 10 mg/kg), 6 (SHR-control), 6 (SHR-genisteína 1 mg/kg) y 6 (SHR-genisteína 10mg/kg) animales.

\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  significativamente diferente del correspondiente valor en el grupo de ratas WKY (ANOVA 2 vías, post-test Bonferroni).

El análisis del volumen de infarto por secciones puso de manifiesto que el tratamiento con genisteína no redujo el área de infarto en ninguna de las siete secciones ni en las ratas WKY ni en las SHR (Figura 38).

**WKY**

**SHR**

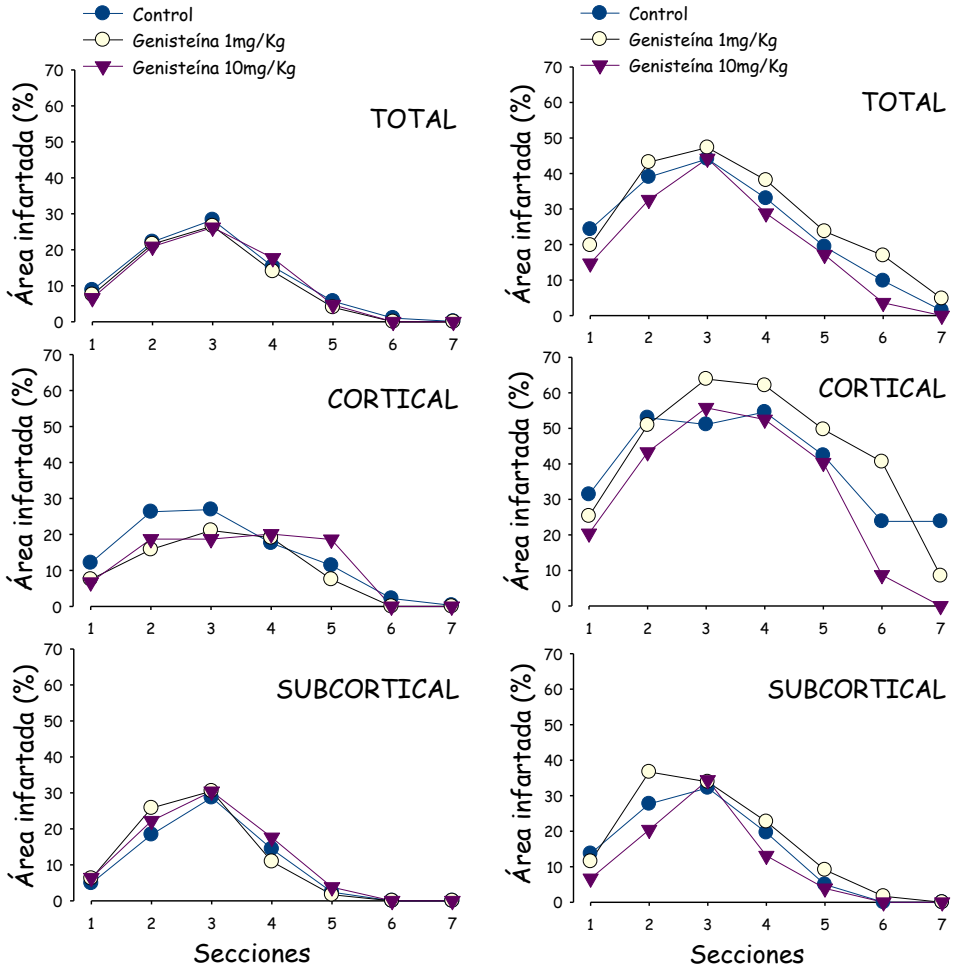


Figura 38. Áreas de infarto de las secciones coronales consideradas cada una de ellas en conjunto (total) y de forma separada para las regiones corticales y subcorticales en ratas WKY y SHR sometidas a 90 min de isquemia y 3 días de reperusión, y tratadas con genisteína a la dosis de 1 ó 10 mg/kg por día durante 3 días. Los datos se expresan como el porcentaje del área total de la correspondiente región contralateral, y se representan como media  $\pm$  error estándar de la media de 7 (WKY-control), 6 (WKY-genisteína 1 mg/kg), 5 (WKY-genisteína 10 mg/kg), 6 (SHR-control), 6 (SHR-genisteína 1 mg/kg) y 6 (SHR-genisteína 10mg/kg) animales.



# DISCUSIÓN



Actualmente las posibilidades de tratamiento del ictus son extremadamente limitadas. La única intervención posible consiste en restaurar el flujo sanguíneo en la zona cerebral afectada o, al menos, impedir que se produzca una disminución aún más severa de dicho flujo, mediante la terapia trombolítica. Desafortunadamente, esta aproximación vascular, a la que también se conoce como “neuroprotección no-farmacológica”, sólo es aplicable en un pequeño número de casos. Por otra parte, continuamos careciendo de fármacos neuroprotectores realmente eficaces, es decir, de sustancias que actúen directamente sobre el tejido cerebral afectado interfiriendo alguno de los pasos de la sucesión de fenómenos deletéreos conocida como “cascada isquémica” y que finaliza con la muerte neuronal.

El presente trabajo de tesis doctoral se ha diseñado con el fin de analizar la posible influencia beneficiosa de los fitoestrógenos sobre el daño cerebral originado por el accidente cerebrovascular agudo de tipo trombo-embólico (ictus isquémico) asociado o no con la hipertensión. El trabajo se ha diseñado desde una doble vertiente: la neuroprotección preventiva y la neuroprotección aguda. La primera hace referencia a la exposición crónica a los fitoestrógenos con anterioridad al episodio isquémico. Dicha exposición se ha llevado a cabo mediante la ingesta de una dieta rica en fitoestrógenos. Puede considerarse, por lo tanto, una “intervención nutricional” cuyas conclusiones podrían aconsejar cambios en los hábitos alimentarios (mayor consumo de fitoestrógenos como las isoflavonas derivadas de la soja, por ejemplo), especialmente en grupos de pacientes con alto riesgo de ictus (hipertensos, diabéticos, hiperlipidémicos, etc.). La segunda hace referencia a la administración de fitoestrógenos una vez se ha producido el episodio isquémico y ha pretendido estudiar el efecto individual de cada uno de los diferentes fitoestrógenos, especialmente aquellos derivados de la soja. Constituye, por lo tanto, una aproximación similar a las que se han venido realizando habitualmente en los estudios sobre el potencial neuroprotector de diferentes fármacos.

## **1.- NEUROPROTECCIÓN PREVENTIVA: Fitoestrógenos dietéticos.**

### **1.1.- Niveles de isoflavonas en la dieta**

Una parte sustancial del presente estudio se basa en el uso de una dieta enriquecida en isoflavonas (Fito-600) frente a una dieta carente en ellas (Fito-0n). Muchas de las dietas utilizadas para roedores de laboratorio están formuladas utilizando soja o alfalfa como fuente de proteínas, ingredientes que contienen fitoestrógenos en forma de isoflavonas o coumestrol respectivamente. Puesto que las isoflavonas han demostrado poseer efectos biológicos, el análisis del contenido de isoflavonas en las dietas de los animales de laboratorio se convierte en un nuevo e importante factor experimental. No obstante, el contenido en isoflavonas depende a su vez de la variedad de soja y de las condiciones de crecimiento: calidad del suelo, temperatura, humedad, duración de la fase de luz diurna, etc. (Jensen y Ritskes-Hoitinga, 2007). Por lo tanto, el paso previo al estudio del posible efecto neuroprotector del consumo de dietas ricas en soja, ha sido el análisis mediante HPLC del contenido de isoflavonas en las tres dietas utilizadas. Este análisis ha puesto de manifiesto que mientras que la dieta rica en fitoestrógenos contiene  $434.3 \pm 37.6$   $\mu\text{g/g}$  de daidzina, glicitina y genistina (glucósidos) y sus respectivas formas aglicona daidzeína, gliciteína y genisteína, las dietas Fito-0n y Fito-0r están efectivamente libres de fitoestrógenos, puesto que no se detecta presencia alguna de dichas isoflavonas.

La dieta Fito-600, formulada a base de proteína de soja, recibe este nombre porque su análisis muestra un contenido total de fitoestrógenos del tipo isoflavona de 600  $\mu\text{g}$  por gramo de dieta (Weber y cols., 2001a). Sin embargo, según nuestros resultados, el contenido total de isoflavonas en esta misma dieta es de 430  $\mu\text{g/g}$ . Esta variación podría deberse a las diferentes estructuras químicas en las que las isoflavonas están presentes en la soja. Nuestros resultados muestran el contenido total de isoflavonas en sus formas glucósido y aglicona, sin embargo, otras formas



químicas como sus derivados acetilo (acetilglucósido daidzeína, acetilglucósido gliciteína, etc...), que no se han determinado, también están presentes e incrementan el contenido total de isoflavonas de esta dieta hasta los 600  $\mu\text{g/g}$ . En 2007, Jensen y Hoitinga analizaron el contenido de fitoestrógenos en una serie de dietas de laboratorio, mostrando que las isoflavonas tienen efectos biológicos cuando su contenido en las dietas supera el umbral de los 300-400  $\mu\text{g/g}$ . Así pues, los niveles de isoflavonas encontrados en la dieta Fito-600 se encuentran en el rango que permite atribuirles los efectos observados en nuestros experimentos.

Se calcula que las poblaciones asiáticas, grandes consumidoras de soja, ingieren aproximadamente 1 mg/kg de isoflavonas al día (Setchell, 1998; Bathena y Velasquez, 2002; Degen y cols., 2002). Las dietas de corte occidental, por su parte, no proporcionan más de 1-2 mg/día de isoflavonas, lo que supone para un adulto de unos 70 kg unos 0.014 mg/kg, es decir, unas 70 veces menos (Boker y cols., 2002; van Erp-Baart y cols., 2003). Asumiendo que una rata adulta ingiere unos 20 g de dieta al día (dato corroborado en nuestro laboratorio), y que la dieta contiene 600  $\mu\text{g/g}$  de isoflavonas, su consumo de isoflavonas es de 12 mg/día ó 40 mg/kg, cantidad muy superior a la de un humano adulto consumidor de una dieta típicamente asiática.

Sin embargo una mayor concentración de isoflavonas en la dieta no implica necesariamente una mayor concentración de metabolitos en los tejidos diana. Aunque la concentración de isoflavonas en la dieta es un factor importante, otros, como el momento y la duración de la exposición a la dieta (*ad libitum versus* forzada, largo plazo *versus* corto plazo, durante la gestación, el crecimiento o la madurez, etc.); el animal utilizado (especie, cepa y género); y la sensibilidad de los parámetros objeto de estudio a los efectos estrogénicos o antiestrogénicos de los fitoestrógenos, resultan importantes para determinar la cinética y biodisponibilidad de las isoflavonas. Diferentes autores han determinado que la concentración de isoflavonas en el plasma de ratas Sprague-Dawley y Long Evans alimentadas con la dieta Fito-600 se sitúa en el rango de 6-10  $\mu\text{M}$  (Weber y cols., 2001a; 2001b;

Lephart y cols., 2002). Nuestros resultados indican que los niveles plasmáticos de isoflavonas en ratas Wistar inmediatamente antes del episodio de isquemia-reperusión, se encuentran por debajo del umbral de detección (resultados no presentados). Esta discrepancia se debe, con toda probabilidad, al momento de la extracción de las muestras de sangre. En un estudio comparativo sobre la biodisponibilidad de 5 isoflavonas administradas conjuntamente por vía oral (3 mg/kg de cada una de ellas), se ha observado que las concentraciones plasmáticas aumentan alrededor de 30 min tras la administración, descienden a continuación, y vuelven a aumentar alcanzando un pico máximo a las 2 h aproximadamente (circulación entero-hepática); a continuación descienden rápidamente hasta las 8 h, y a partir de ahí descienden lentamente para alcanzar niveles no detectables a las 24 h (Mallis y cols., 2003). Puesto que en nuestros protocolos los animales se mantienen en ayunas desde el día anterior a la intervención quirúrgica, no resulta extraño que no se registre presencia de isoflavona alguna en plasma. Por lo tanto, ya que los animales se alimentan con la misma dieta (Fito-600), y a pesar de que la cepa de rata es diferente, no parece arriesgado asumir que nuestros animales también posean una concentración plasmática de isoflavonas de 6-10  $\mu\text{M}$ . Esto, unido a que el análisis mediante HPLC demuestra que la dieta denominada Fito-0n no contiene isoflavona alguna (siendo la dieta la única fuente posible de isoflavonas en nuestros animales), nos permite afirmar que hemos generado un modelo animal que nos permite comparar dos situaciones dietéticamente bien definidas en cuanto al consumo de isoflavonas mediante la dieta.

Aunque no puede considerarse uno de los objetivos principales, el primer parámetro registrado en el transcurso del presente estudio ha sido el peso de los animales. La finalidad era descartar la influencia de la dieta, rica o carente en fitoestrógenos, en la evolución ponderal de los animales durante su estabulación, y confirmar que todos ellos (dentro de cada género y cepa) afrontaban el episodio de isquemia-reperusión en las mismas condiciones de peso. Nuestros resultados ponen de manifiesto que el consumo de la dieta Fito-600 o Fito-0n, no afecta a la

ganancia de peso, ya que pese a que sus curvas de crecimiento varían según el género (las ratas hembra crecen más lentamente y alcanzan valores de peso menores que las ratas macho), o la cepa (con el mismo tiempo de estabulación, las ratas WKY alcanzan valores de peso mayores que las SHR), no sufren variación alguna por ser alimentados con una u otra dieta.

Las evidencias que indicaban que las isoflavonas podrían influir sobre la evolución ponderal de los animales, proceden de experimentos *in vitro* e *in vivo* (Ørgaard y Jensen, 2008). Por lo que respecta a los estudios *in vitro*, las isoflavonas parecen tener una influencia sobre la proliferación del tejido adiposo, dependiente de la concentración: a 0.1-1  $\mu\text{M}$  la genisteína y menos de 20  $\mu\text{M}$  la daidzeína, inhiben la adipogénesis, mientras que entre 10-50  $\mu\text{M}$  la genisteína y mas de 30  $\mu\text{M}$  la daidzeína, la estimulan. Ambas isoflavonas deben su efecto a la activación tanto de receptores ER como PPAR. Sin embargo, hay que tener presente que la concentración plasmática de genisteína en humanos que consumen alimentos ricos en isoflavonas tales como la soja y sus derivados, se sitúa en el rango 1-2  $\mu\text{M}$  (Lephart y cols., 2002). Con el consumo de isoflavonas purificadas se ha llegado a registrar una concentración máxima de isoflavonas de 10  $\mu\text{M}$ , concentración imposible de superar a través de la dieta. Por lo tanto, la relevancia de los resultados obtenidos *in vitro* en la situación *in vivo* está por determinar ya que las concentraciones capaces de aumentar el peso corporal en humanos tan solo pueden alcanzarse bajo determinados regímenes alimenticios.

Por lo que respecta a los estudios *in vivo*, el tema objeto de debate es la influencia de las isoflavonas sobre la interrelación entre tres factores: consumo de comida y bebida, tejido adiposo y peso corporal. Algunos resultados han puesto de manifiesto que las isoflavonas incrementan el consumo de comida y agua, mientras que otros no han registrado efecto alguno. Sin embargo, las tres isoflavonas de la soja han demostrado tener efecto sobre el tejido adiposo sin afectar al consumo de comida y agua. Parece aceptado que las isoflavonas reducen el tejido adiposo, efecto mediado probablemente por la estimulación de la apoptosis de los adipocitos

y por la reducción del volumen individual de los mismos. Por lo que respecta al peso corporal, los resultados también son contradictorios: se ha puesto de manifiesto que la genisteína añadida a la comida no afecta o disminuye el peso corporal.

### **1.2.- Influencia de la dieta sobre la hemodinámica cerebral y sistémica de ratas normotensas e hipertensas.**

El consumo de la dieta rica en isoflavonas (Fito-600) o de la dieta libre de isoflavonas (Fito-0n) en ratas Wistar de ambos sexos, ratas WKY macho (ambas normotensas) y en ratas hipertensas macho (SHR) no provoca variaciones en su hemodinámica cerebral y sistémica antes, durante o después del episodio de isquemia-reperusión. Dentro de cada grupo experimental, e independientemente de la dieta consumida, los animales muestran un patrón de variación de la PC similar, con un descenso del flujo sanguíneo durante la isquemia y un incremento (hasta valores superiores al control) durante la reperusión, y un patrón de PAS constante, sin cambios respecto a su valor basal, durante la isquemia o la reperusión.

Diferentes evidencias sugieren que la soja dietética, o más concretamente los fitoestrógenos presentes en la soja (genisteína, daidzeína y gliciteína fundamentalmente), podrían tener capacidades cardioprotectoras que podrían atribuirse, en parte, a sus acciones directas sobre el sistema vascular. Las isoflavonas genisteína y daidzeína han demostrado tener una actividad vasodilatadora en segmentos aislados de aorta torácica (Nevala y cols., 1998; Mishra y cols., 2000; Squadrito y cols., 2000) y arteria pulmonar (Mishra y cols., 2000; Karamsetty y cols., 2001) de rata; en segmentos de arteria coronaria de cerdo (Lee y Man, 2003) y conejo (Figtree y cols., 2000), o ya más concretamente en el lecho vascular cerebral, en segmentos de arteria basilar de rata (Sobey y cols., 2004) y de conejo (Torregrosa y cols., 2003). Dicha actividad vasodilatadora, como ya demostró nuestro grupo (Salom y cols., 2001), entre otros (Squadrito y cols., 2000; Sobey y cols., 2004), sería equiparable a la mostrada por 17  $\beta$ -estradiol. Se

han propuesto varios mecanismos de acción por los que las isoflavonas podrían mediar estos efectos vasodilatadores, el primero se debe a su capacidad para antagonizar los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figtree y cols., 2000; Torregrosa y cols., 2003), y el segundo a sus efectos sobre el aumento de la producción o liberación de NO (Squadrito y cols., 2000; Sobey y cols., 2004).

Este efecto vasodilatador de las isoflavonas se ha corroborado *in vivo* por la capacidad de estas sustancias para aumentar el flujo sanguíneo de determinados lechos vasculares. Nuestro grupo ya demostró que la inyección intracarotídea de daidzeína y biocanina A ejercía un efecto vasodilatador sobre la microvasculatura cerebral que se traducía en un aumento agudo del flujo sanguíneo cerebral (Salom y cols., 2007). Walker y colaboradores (2001) y Chin-Dusting y colaboradores (2004) también pusieron de manifiesto la capacidad vasodilatadora *in vivo* de los fitoestrógenos genisteína y dehydroequol (metabolito derivado de la daidzeína) respectivamente, en arterias del antebrazo humano, aunque no de la isoflavona daidzeína. Esta capacidad de las isoflavonas para aumentar el flujo sanguíneo es compartida por el estrógeno natural 17  $\beta$ -estradiol. Diferentes estudios muestran que el estrógeno aumenta el flujo sanguíneo del lecho vascular cerebral de humanos (Slopien y cols., 2003; Kochanowicz y cols., 2005), y de otros lechos vasculares como el coronario de perro (Sudhir y cols., 1995), el uterino de oveja (Rosenfeld y cols., 1996; 2002) y el de la piel (Al-Khalili y cols., 1998; Charkoudian y cols., 1999) y antebrazo de humanos (Tagawa y cols., 1997).

Así pues, existen buenas razones para pensar que las isoflavonas de la soja, debido a sus efectos vasodilatadores, podrían tener efectos sobre el flujo sanguíneo cerebral (PC) y sistémico (PAS), convirtiéndose en unas buenas candidatas como sustancias hipotensoras o anti-hipertensoras. Sin embargo, nuestros resultados en ratas normotensas e hipertensas alimentadas con la dieta Fito-600, muestran que el consumo prolongado de una dieta rica en soja no modifica la PC ni la presión arterial media de los animales.

Esta falta de efecto sobre la presión arterial en las ratas normotensas (ratas Wistar de ambos sexos y ratas WKY macho) utilizadas en nuestros experimentos no apoya la hipótesis de que las isoflavonas pudieran actuar como sustancias hipotensoras cuando se administran de forma prolongada mediante la dieta.

Estos resultados son consistentes con el trabajo de Douglas y colaboradores (2006) en el que se demuestra que el consumo de una dieta rica en isoflavonas en ratas Wistar macho y hembra durante 6 meses no produce ningún efecto sobre la presión arterial sistólica o diastólica. Además, diversos estudios clínicos realizados en hombres y mujeres normotensos también muestran una falta de efecto del consumo de soja sobre la presión arterial (Goodman-Gruen y Kritz Silverstein, 2001; de Kleijn y cols., 2002; Kreijamp-Kaspers y cols., 2005). Sin embargo, existe cierta controversia al respecto, ya que se han publicado diferentes trabajos experimentales y estudios clínicos que muestran un claro efecto hipotensor del consumo habitual de soja en la dieta de ratas Wistar macho (Mahn y cols., 2005), en hombres, y en mujeres normotensas pre y post-menopausicas (Teede y cols., 2001; Yang y cols., 2005; Welty y cols., 2007).

Del mismo modo, la administración exógena de isoflavonas mediante la dieta en ratas macho hipertensas (SHR) tampoco corrobora el efecto anti-hipertensor de estas sustancias, ya que los animales, independientemente de la dieta administrada, muestran valores basales de presión arterial media muy similares.

Al igual que ocurre con las ratas normotensas, existe controversia acerca del efecto anti-hipertensor de las dietas ricas en soja. Nevala y colaboradores (2000) demostraron que el consumo de una dieta rica en soja disminuía un 12% la presión arterial de ratas macho SHR pero no la de las hembras, mientras que otros como Martin y colaboradores (2001; 2002) publicaron que una dieta rica en soja disminuía entre un 9 y un 13% la presión arterial de ratas hembra SHR ovariectomizadas pero no la de las intactas ni la de los machos. Otros estudios han puesto de manifiesto que la adición de genisteína a dietas libres de isoflavonas sí disminuye significativamente la presión arterial de ratas SHR macho y ratas SHR

hembra intactas y ovariectomizadas (Cho y cols., 2007; Si y Liu, 2008). Esta misma controversia ha sido trasladada a los estudios en humanos, en los que la ingesta de soja en diferentes presentaciones (leche, proteína más isoflavonas, isoflavonas puras, etc.), o bien ha demostrado tener un efecto anti-hipertensor (Rivas y cols., 2002; Welty y cols., 2007), o bien no ha tenido ningún efecto sobre la presión arterial (Hodgson y cols., 1999; Teede y cols., 2006) de hombres y mujeres hipertensos. De todos modos, los efectos anti-hipertensores descritos para las dietas ricas en soja son modestos, ya que estas producen descensos máximos de presión arterial de un 10-15%.

Nuestros resultados demuestran que no existe una influencia del género sobre la presión arterial. Independientemente del contenido en isoflavonas de la dieta, los valores basales de presión arterial media fueron similares entre ratas Wistar macho y hembra. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Douglas y colaboradores (2006) que demostraron que el consumo de una dieta rica en soja no producía cambios en la presión arterial ni de las ratas Wistar macho ni de las hembras, descartando por tanto un efecto de género. Por el contrario, Nagata y colaboradores (2003) han puesto de manifiesto que el consumo de soja induce un descenso de la presión arterial de hombres pero no de mujeres pre o post-menopáusicas.

Sin embargo, aparte de sus acciones vasodilatadoras, otros muchos efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular han sido descritos para las isoflavonas de la soja, como por ejemplo su habilidad para modular las concentraciones plasmáticas de lípidos, disminuyendo los niveles de (LDLs) (Washburn y cols., 1999; Vincent y Fitzpatrick, 2000), sus efectos para atenuar la aterosclerosis (Yamakoshi y cols., 2000; Adams y cols., 2005), o sus acciones como anti-coagulantes (Stara y Madar, 2002) y como sustancias anti-inflamatorias (Nandur y cols., 2004). Además, hay que tener en cuenta que el alto contenido en ácidos grasos insaturados como el ácido oleico y linolénico y en fosfolípidos como la

lecitina característicos de la soja contribuiría en gran medida a los efectos cardiosaludables del consumo de soja en la dieta.

### **1.3.- Influencia del contenido de isoflavonas en la dieta sobre el daño cerebral isquémico en ratas normotensas.**

En el presente trabajo, la evaluación del daño cerebral isquémico se ha desarrollado a partir de un modelo de isquemia cerebral focal, el equivalente más importante del ictus isquémico. De acuerdo con el estudio Framingham, el 87% de ictus son causados por oclusiones cardioembólicas o aterotrombóticas; el 14% por hemorragias, y el 3% por razones desconocidas. Un total del 65% de ictus que resultan de la oclusión vascular presentan lesiones en el territorio de la ACM, el 2% en el de la arteria cerebral anterior, el 9% en el de la arteria cerebral posterior, el 15% en el tronco cerebral y el cerebelo, y el resto en regiones limítrofes o en regiones múltiples. De acuerdo con estos y otros estudios epidemiológicos, la isquemia focal en el territorio de la ACM es la causa dominante de ictus.

En la investigación experimental del ictus, esta situación se refleja en el uso preferente de los modelos de oclusión de la ACM. Cuando se consigue dicha oclusión se interrumpe el flujo sanguíneo en el tejido que depende de dicha arteria, incluyendo los ganglios basales los cuales son irrigados por las arterias lentículo-estriadas. Éstas son ramas terminales de la ACM las cuales, a diferencia de las ramas corticales, no forman colaterales con los territorios vasculares vecinos. En consecuencia, los ganglios basales sufren reducciones severas de flujo sanguíneo, mientras que la corteza cerebral presenta un gradiente de flujo sanguíneo descendente desde la periferia (oligohemia benigna y penumbra isquémica) hacia el centro (núcleo) del territorio vascular.

Los modelos utilizados para la oclusión de la ACM son los siguientes: 1) oclusión transorbital; 2) oclusión transcraneal; 3) oclusión mediante filamento intraluminal; y 4) oclusión mediante coágulo. Todos ellos tienen sus ventajas y sus limitaciones. En el momento presente la oclusión mediante filamento intraluminal es el método más ampliamente utilizado, y el que se ha empleado en el presente



estudio. Se inserta una sutura de nilón en la arteria carótida interna y se avanza ortógradamente hasta el origen de la ACM. Conseguir el emplazamiento correcto sin dañar la pared vascular es difícil, y debe hacerse bajo un control continuo del flujo sanguíneo. Para ello, lo más adecuado es colocar una sonda de flujo láser-Doppler sobre la corteza cerebral irrigada por las ramas de la ACM, tal y como se ha llevado a cabo en el presente estudio. Como ya se ha mencionado, la técnica determina el cese de flujo sanguíneo en todo el territorio dependiente de la ACM, incluyendo los ganglios basales, y también puede disminuir el flujo en los territorios de las arterias cerebrales anterior y posterior. Ya que se minimiza el flujo colateral, los infartos son grandes y pueden llegar a representar los dos tercios del hemisferio completo. Por la misma razón, la penumbra se circunscribe a una delgada corona alrededor del núcleo isquémico. Debido al gran volumen de los infartos, los animales presentan déficits neurológicos severos y edema cerebral masivo con alto índice de mortalidad si el experimento dura varias horas. Por esta razón, el filamento se suele retirar entre 1 y 2 h después de su inserción. En nuestros protocolos este periodo ha sido exactamente de 90 min. De este modo, la reperfusión protege a las zonas periféricas del territorio de la ACM y los infartos son menores.

Entre las limitaciones que se atribuyen a este modelo, en primer lugar hay que tener presente que la fisiopatología de la isquemia focal transitoria difiere de la permanente, y por esta razón ni los mecanismos de evolución del infarto ni la respuesta al tratamiento farmacológico son equivalentes a los que se obtienen tras la oclusión permanente. Otra limitación que se ha aducido es que la isquemia focal transitoria no reproduce la reperfusión que tiene lugar por la trombolisis espontánea o inducida. El perfil de ambas difiere en la velocidad a la que se recupera el flujo normal: mientras que la retirada del filamento da lugar a una reperfusión instantánea, la trombolisis resulta en una reperfusión progresiva. En tanto en cuanto la recuperación postisquémica se ve influenciada por la dinámica de la reperfusión, el pronóstico y la sensibilidad farmacológica de la oclusión

transitoria son distintos de la mayoría de las situaciones clínicas de isquemia reversible (Hossmann, 2008).

Estudios epidemiológicos muestran una menor prevalencia de ictus en poblaciones orientales con respecto a las occidentales. Sin embargo, esta protección frente a la enfermedad cerebrovascular se pierde cuando las poblaciones asiáticas adoptan hábitos nutricionales propios de las poblaciones occidentales, lo que sugiere que es su estilo de vida, y no factores genéticos, el responsable de la baja incidencia de esta enfermedad (Glazier y Bowman, 2001). Estas observaciones han llevado a pensar que la soja, componente tradicional de la dieta asiática, podría ser la responsable de dicha protección cerebrovascular y convertirse, por tanto, en un factor clave en la prevención primaria del ictus.

Por todo ello nos planteamos estudiar el efecto que el consumo de una dieta rica en soja pudiera tener en la prevención del ictus isquémico. Así pues, tras alimentar desde su destete hasta la edad adulta, a ratas Wistar macho y hembra con dietas que diferían fundamentalmente en su contenido en soja (dieta Fito-0n para las ratas control y dieta Fito-600 para las ratas tratadas), y someterlas a un episodio de isquemia-reperusión, que comprobamos afrontaban en iguales condiciones hemodinámicas tanto a nivel sistémico como cerebral, hemos demostrado que el consumo de una dieta rica en soja se correlaciona con la disminución del volumen de infarto cerebral en ratas de ambos sexos y con una mejora del estado neurológico de ratas macho. Por tanto, dado que la única diferencia entre ambos grupos es el contenido en soja de las dietas, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el consumo de dietas ricas en soja disminuye las consecuencias del ictus.

De entre los diferentes componentes nutricionales de la soja, las isoflavonas han sido las que han cobrado mayor interés como posibles responsables de su efecto neuroprotector. El estrógeno natural, 17  $\beta$ -estradiol, aparte de sus conocidos efectos sobre el sistema reproductor, juega un papel esencial en el desarrollo del sistema nervioso central y en el mantenimiento y protección de la función cerebral normal en la edad adulta (Suzuki y cols., 2006). Gran cantidad de estudios apoyan

el efecto neuroprotector del estrógeno en determinadas patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Callier y cols., 2001) o la enfermedad de Alzheimer (Pike, 1999; Van Duijn, 1999), así como frente al daño y/o disfunción celular causados por el ictus. En roedores, el estrógeno ha demostrado ser efectivo en la reducción del volumen de infarto cerebral en modelos de isquemia focal (Gibson y cols., 2006), isquemia global (Jover y cols., 2002), traumatismo cerebral (Bramlett y Dietrich, 2001), modelos prototrombóticos (Fukuda y cols., 2000) o modelos de inducción de isquemia focal por glutamato (Mendelowitsch y cols., 2001). *In vitro*, similares efectos neuroprotectores han sido demostrados en cultivos de células corticales (Singer y cols., 1999; Honda y cols., 2000; Sribnick y cols., 2004), células del hipocampo (Nilsen y Brinton, 2002; Cimarosti y cols., 2005) y células mesencefálicas (Callier y cols., 2001).

Sin embargo, en la actualidad, y pese al gran número de evidencias sobre sus acciones neuroprotectoras, existe cierta controversia acerca del uso del estrógeno como agente profiláctico en humanos, ya que diferentes estudios clínicos han demostrado que el uso de la terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas está asociado con un aumento del riesgo de desarrollo de cáncer de mama y útero fundamentalmente (Grady y cols., 1995; Anderson y cols., 2004). En contraste con estos resultados, los fitoestrógenos han mostrado no tener ningún efecto deletéreo sobre el sistema reproductor. Mientras que la suplementación hormonal con estradiol parece afectar al tejido reproductor de ratas y conejos hembra ovariectomizadas aumentando su peso uterino (Squadrito y cols., 2000; Lund y cols., 2007), el consumo de dietas a base de soja no varía el peso de útero de conejos y monos hembra (Anthony y cols., 1996; Lund y cols., 2007), así como tampoco lo hace el tratamiento prolongado con genisteína en ratas hembra ovariectomizadas (Squadrito y cols., 2000). Del mismo modo, ni la administración de isoflavonas mediante una dieta rica en soja en monos macho (Anthony y cols., 1996), ni la administración de daidzeína en ratas macho (Sobey y cols., 2004)

parece ejercer ningún efecto sobre el tamaño testicular. Además, varios estudios clínicos han demostrado que el consumo de dietas ricas en soja no afecta o incluso puede prevenir el cáncer de mama, útero y endometrio (Bandera y cols., 2009; Taylor y cols., 2009; Lee y cols., 2009b). Así pues, dado que las isoflavonas, por su analogía estructural con el  $17\beta$ -estradiol, podrían ejercer acciones neuroprotectoras, y que la ingesta habitual de soja parece no tener los efectos adversos que habían sido descritos para el estrógeno, el consumo de dietas ricas en soja se convierte en una alternativa a la terapia estrogénica en la prevención del ictus.

Nuestros resultados han confirmado que la exposición crónica de ratas Wistar macho y hembra a la dieta Fito-600 induce una disminución significativa del volumen de infarto cerebral, desde un 29% a un 19% (dieta Fito-0n vs dieta Fito-600) en ratas macho, y de un 30% a un 25% (dieta Fito-0n vs dieta Fito-600) en ratas hembra. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores en ratas hembra Sprague-Dawley ovariectomizadas, que tras ser alimentadas durante 3 semanas con la dieta Fito-600 y ser sometidas a isquemia focal transitoria (Lovekamp-Swan y cols., 2007a) o permanente (Schreihofer y cols., 2005) por oclusión de la arteria cerebral media, mostraron una reducción significativa del volumen de infarto cerebral. Por otro lado, la inyección intraperitoneal de un extracto de soja en ratas hembra ovariectomizadas antes de ser sometidas a excitotoxicidad por inyección de ácido kaínico, tiene efectos neuroprotectores sobre células del hipocampo (Azcoitia y cols., 2006). La genisteína administrada antes y después de isquemia focal por fototrombosis en ratones macho (Trieu y Uckun, 1999), y 30 min antes de someter a jerbos (Kindy, 1993) y ratas (Liang y cols., 2008) macho a un episodio de isquemia global, induce neuroprotección. Por último, estudios clínicos recientes han mostrado una relación inversa entre el consumo de soja y el riesgo de ictus de tipo isquémico en hombres y mujeres chinos (Liang y cols., 2009) y en mujeres pero no en hombres japoneses (Kokubo y cols., 2007).

Nuestros resultados no muestran una influencia del género en la neuroprotección inducida por la administración prolongada de fitoestrógenos dietéticos, ya que tanto las ratas Wistar macho como las hembra alimentadas con la dieta Fito-600 presentan volúmenes de infarto similares, lo que parece evidenciar que el sexo de los animales no influye en la disminución del volumen de infarto observada tras el consumo de la dieta rica en isoflavonas. El consumo de la dieta libre de isoflavonas Fito-0n tampoco produce diferencias entre el volumen de infarto de las ratas Wistar macho y hembra.

La isquemia cerebral focal transitoria resulta en una pérdida masiva de células por necrosis en el núcleo isquémico, mientras que en la penumbra la muerte celular se produce por apoptosis (Ferrer y Planas, 2003). En esta zona de penumbra, la reducción del flujo sanguíneo y la exposición a factores deletéreos procedentes de las células vecinas, hace que en las horas o días siguientes a la isquemia las células mueran por apoptosis provocando una expansión del área de infarto cerebral. Así pues, la restauración del flujo sanguíneo cerebral y la inhibición de la apoptosis, podrían contribuir al rescate de estas células del área de penumbra y por tanto, a la disminución del volumen de infarto cerebral (Rau y cols., 2003b; Wise y cols., 2005). Recientemente, Lovekamp-Swan y colaboradores (2007a) han demostrado que el consumo de la dieta rica en soja Fito-600 inhibe la apoptosis, atenuando los mecanismos dependientes e independientes de caspasa e incrementando la expresión de la proteína anti-apoptótica bcl-2, en ratas hembra ovariectomizadas sometidas a isquemia focal transitoria. Así pues, este efecto anti-apoptótico del consumo de dietas ricas en soja, unido a los efectos vasodilatadores postulados para las isoflavonas (ver apartado 1.2), que contribuirían a la restauración del flujo sanguíneo cerebral, podrían ser, al menos, dos de los mecanismos que expliquen esta disminución del volumen de infarto cerebral encontrada en las ratas Wistar de ambos sexos alimentadas con la dieta rica en soja Fito-600.

Se sabe que la sobreexpresión de la proteína bcl-2 inhibe el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior producido por oxidantes (Liang y cols., 2008), atenúa la peroxidación lipídica y protege a las células del peróxido de hidrógeno causante del daño oxidativo en el ADN (Jang y Surh, 2003). Además, las dos isoflavonas mayoritarias de la soja, genisteína y daidzeína, han demostrado *in vitro* (Wei y cols., 1995) e *in vivo* (Siow y cols., 2007) tener capacidad para aumentar de forma significativa enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y citocromo c oxidasa. Estos efectos anti-apoptóticos y antioxidantes podrían explicar, al menos en parte, la capacidad neuroprotectora de la dieta rica en isoflavonas procedentes de la soja. Por otro lado, trabajos recientes han demostrado que el consumo de soja en la dieta induce sobreexpresión de algunos genes neuroprotectores en ratas hembra ovariectomizadas (Lovekamp-Swan y cols., 2007b) y activación de la vía de señalización Notch en ratas macho, que además de contribuir a las propiedades anti-apoptóticas postuladas para la soja también es la responsable del mantenimiento de la capacidad proliferativa de las células madre neuronales (Huang y cols., 2009). A la vista de todos estos resultados, podemos concluir que los mecanismos de acción por los que las dietas ricas en soja median neuroprotección *in vivo* son muy variados y todavía desconocidos. Incluso puede que no sólo las isoflavonas sean las responsables del efecto profiláctico del consumo de soja en la dieta, sino que también otros de sus componentes nutricionales contribuyan a su actividad neuroprotectora.

## **2. - NEUROPROTECCIÓN AGUDA.**

### **2.1. - Niveles de isoflavonas en el plasma**

La segunda vertiente del presente trabajo consiste en el estudio de la neuroprotección aguda en el ictus. En este sentido ya no es tanto la pauta alimentaria sino el efecto neuroprotector individual de cada una de las diferentes isoflavonas el objeto de estudio. Para ello, los animales se alimentan con la dieta

Fito-0r, dieta sin soja formulada a base de ingredientes refinados libre de isoflavonas, y se tratan después de la inducción del episodio de isquemia-reperusión durante 3 días con las formas puras genisteína, daidzeína o biocanina A. El análisis del plasma antes (plasma 0 h) y después (plasma 72 h) del tratamiento confirma, en primer lugar y tal y como cabía esperar, la ausencia de las isoflavonas genisteína, daidzeína, biocanina A y sus glucósidos correspondientes en el plasma de 0 h y en segundo lugar su presencia en el plasma de 72 h, lo que indica la eficacia en la forma de administración del tratamiento y capacidad de estos animales para la absorción y metabolismo de estas sustancias.

Un punto importante a tener en cuenta es la ruta de administración, la dosis y la forma química de las isoflavonas utilizadas, ya que estos son parámetros esenciales para determinar su biodisponibilidad en el organismo. En ratas, Mallis y colaboradores (2003) demostraron que los parámetros farmacocinéticos de las isoflavonas cambiaban según si éstas se administraban de forma oral o de forma subcutánea. Mediante administración subcutánea (modo similar al utilizado en el presente trabajo) las isoflavonas tenían tiempos de vida media más cortos, pero una mayor biodisponibilidad, alcanzando mayores concentraciones en el plasma en menor tiempo. Trabajos posteriores de Moon y colaboradores (2006) también han demostrado que la administración intraperitoneal de genisteína y biocanina A aumenta la biodisponibilidad y permite alcanzar mayores concentraciones plasmáticas que su administración oral. En el presente trabajo las isoflavonas se administran a los animales mediante el implante intraperitoneal de bombas osmóticas que liberan una tasa constante de su carga (solvente o isoflavona) durante los 3 días que dura el tratamiento. Esta ruta de administración proporciona dos ventajas: en primer lugar, la administración intraperitoneal, tal y como se acaba de describir, permite aumentar la biodisponibilidad y la concentración máxima de las isoflavonas en el plasma; y en segundo lugar, el que sea una infusión continua asegura un nivel constante en el plasma evitando las fluctuaciones que se producen al administrarlas mediante inyecciones repetidas, las cuales provocan un aumento

rápido de su concentración plasmática tras la inyección y su desaparición del plasma en 3-4 horas (tiempo de vida medio de las isoflavonas cuando se inyectan de forma subcutánea) (Mallis y cols., 2003).

El segundo parámetro a tener en cuenta para determinar la biodisponibilidad de las isoflavonas es la forma química en la que se administran. Cuando se suministran de forma oral, a través de la dieta, genisteína y daidzeína se encuentran fundamentalmente en sus formas glucósido genistina y daidzina. Sin embargo, la ausencia de estas formas en el plasma de humanos (Setchell y cols., 2002) y las mayores tasas de absorción descritas para las isoflavonas en forma aglicona respecto de su forma glucósido (Izumi y cols., 2000), demuestran que las isoflavonas antes de ser absorbidas han de ser desglucosiladas. Por tanto, con el fin de evitar esta primera fase del metabolismo y aumentar su biodisponibilidad, las isoflavonas se administran a nuestros animales en sus formas aglicona. Así pues, las ratas Wistar se tratan con las agliconas genisteína y daidzeína predominantes en la soja, y con una forma metilada de la genisteína (y por tanto precursora de ésta) presente fundamentalmente en el trébol rojo, la biocanina A. Nuestros resultados muestran presencia de genisteína en el plasma de los animales tratados con genisteína y biocanina A, y ausencia de cualquier isoflavona en el plasma de los animales tratados con daidzeína o solvente (grupo control). La explicación de estos resultados podría radicar en el papel que la microflora intestinal tiene sobre el metabolismo y la biodisponibilidad de las isoflavonas. Tanto bacterias intestinales como enzimas microsomales hepáticos se encargan de la rápida desmetilación de la biocanina A hasta una serie de metabolitos secundarios, entre los que se encuentra la genisteína (Moon y cols., 2006). Este proceso explicaría la ausencia de biocanina A y la presencia de genisteína en el plasma de los animales tratados con biocanina A. La ausencia de daidzeína en el plasma de los animales tratados con esta isoflavona podría deberse a su metabolismo hasta diferentes metabolitos secundarios siendo los más abundantes la o-desmetilangolesina y el equol, al que se le considera incluso más estrogénico que la propia daidzeína (Tamura, 2006).



También se ha determinado el contenido de genisteína en el plasma de las ratas WKY y SHR. Estos animales únicamente se trataron con genisteína por ser la que muestra mayor efecto neuroprotector en los experimentos previos con ratas Wistar. En principio, la dosis inicial de elección a la que se administraron las isoflavonas en todos los grupos fue de 1 mg/kg, debido a que esta es la dosis que se considera más próxima al rango en el que las isoflavonas ejercen sus acciones biológicas positivas (Keinan-Boker y cols., 2002; Valtueña y cols., 2003; Mahady, 2005; Michelfelder, 2009). Sin embargo, la falta de efecto neuroprotector de esta dosis en las ratas WKY y SHR determinó el ensayo de una dosis superior de 10 mg/kg.

Los resultados obtenidos muestran, al igual que para las ratas Wistar, presencia de genisteína en el plasma de las ratas WKY y SHR tras 72 h de tratamiento. Sin embargo, se objetivan notables diferencias en la concentración plasmática de la genisteína (cuando ésta es administrada a una dosis de 1 mg/kg) entre las ratas Wistar (0.46  $\mu$ M), WKY (0.23  $\mu$ M) y SHR (0.69  $\mu$ M). Resultados similares han sido obtenidos por Lephart y colaboradores (2002) quienes tras alimentar ratas Sprague-Dawley y Long-Evans con la dieta Fito-600 observaron mayores niveles de isoflavonas en el plasma de las ratas Long-Evans. Por tanto, estos resultados en conjunto, sugieren una variabilidad en la absorción, metabolismo y biodisponibilidad de las isoflavonas dependiente de la cepa utilizada. Aunque esta disparidad de resultados sigue cumpliéndose al utilizar la dosis de 10 mg/kg en las ratas WKY y SHR, en ambos casos los valores plasmáticos de la genisteína son hasta 3 veces superiores en las ratas tratadas con la dosis de 10 mg/kg.

## **2.2.- Efectos de las isoflavonas sobre el daño cerebral isquémico en ratas normotensas**

El análisis de la hemodinámica cerebral y sistémica de las ratas Wistar macho y hembra demuestra la homogeneidad de los grupos experimentales ya que, independientemente del tratamiento al que iban a ser asignados, todos los animales

de cada grupo experimental se enfrentaron al episodio de isquemia-reperfusión en iguales condiciones hemodinámicas. Además, en todos los grupos la PC siguió un mismo patrón de isquemia-reperfusión, con descenso del flujo durante la isquemia y aumento durante la perfusión, y la PAS se mantuvo constante respecto de su valor basal durante la isquemia y la perfusión.

Los resultados obtenidos tras administrar intraperitonealmente las isoflavonas genisteína, daidzeína o biochanina A en ratas Wistar macho muestran que, en general, las isoflavonas, y más concretamente la genisteína, mejoran las consecuencias del ictus mediante la reducción del volumen de infarto cerebral cuando se administran de forma temprana tras un episodio de isquemia-reperfusión. Por otro lado, aunque la biochanina A no consigue disminuir el volumen de infarto total, el análisis por secciones del tejido cerebral muestra una modesta tendencia hacia la reducción del tamaño del infarto con un efecto significativo en la reducción del área de infarto en la loncha número 6.

A continuación, y puesto que la genisteína es la isoflavona que demuestra tener un mayor efecto neuroprotector, decidimos comprobar también su efecto en ratas hembra. Los resultados muestran de nuevo un efecto beneficioso de la genisteína en la disminución del volumen de infarto y en la mejora del estado neurológico, sin objetivarse una influencia del género ya que el efecto neuroprotector, en términos de volumen de infarto, fue similar en machos y hembras. Por tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las isoflavonas, fundamentalmente la genisteína, podrían ser agentes terapéuticos con potencial para limitar las consecuencias negativas del ictus isquémico, tanto en ratas macho como en hembras, cuando se administran en etapas tempranas.

Trabajos realizados en cultivos celulares han demostrado que las isoflavonas genisteína y daidzeína tienen efectos neuroprotectores sobre células neuronales del cortex y el hipocampo de roedores (Zhao y cols., 2002; Kajta y cols., 2007; Schreihofner y Redmond, 2009) y humanos (Sonee y cols., 2004). Respecto de la genisteína, varios estudios sugieren que esta isoflavona protege cultivos de

neuronas primarias frente a toxicidad por glutamato (Zhao y cols., 2002; Kajta y cols., 2007; Schreihofner y Redmond, 2009), apoptosis inducida por el inhibidor de la ATPasa dependiente de calcio del retículo endoplásmico, thapsigargin (Linford y Dorsa, 2002), toxicidad inducida por  $\beta$ -amiloide (Zhao y cols., 2002; Zeng y cols., 2004), estrés oxidativo (Sonee y cols., 2004) y daño neuronal debido a isquemia por privación de oxígeno y glucosa (Schreihofner y Redmond, 2009).

*In vivo*, la genisteína también ha demostrado efectos neuroprotectores en ratones macho y hembra sometidos a isquemia cerebral fotoquímica (Trieu y Uckun, 1999), ratas macho sometidas a isquemia global (Liang y cols., 2008) y ratas hembra ovariectomizadas sometidas a un modelo neurodegenerativo por excitotoxicidad mediante la inyección de ácido kaínico (Azcoitia y cols., 2006). Sin embargo, existen importantes diferencias metodológicas entre estos trabajos y el nuestro. En primer lugar el tipo de dieta, que o bien no se especifica (en el caso del trabajo de Liang y colaboradores), o bien es una dieta estándar de laboratorio, muy probablemente formulada a base de proteína de soja, y que por tanto proporciona un nivel basal de isoflavonas que podría estar interfiriendo en los efectos de la genisteína. En segundo lugar, el modo de administración de la genisteína. Tanto Trieu y colaboradores como Liang y colaboradores inyectaron intraperitonealmente dosis similares de genisteína (16 mg/kg y 15 mg/kg respectivamente) 30 minutos antes y hasta 24 horas después de la inducción de la isquemia; Azcoitia y colaboradores, en cambio, administraron una única inyección intraperitoneal de genisteína 10 mg/kg 30 minutos antes del episodio isquémico. Por tanto, en ninguno de los casos se puede considerar un efecto exclusivamente terapéutico del uso de genisteína ya que su administración previa al episodio isquémico de algún modo podría tener un efecto preventivo frente al ictus. Finalmente, en todos los casos el accidente isquémico fue permanente en lugar de transitorio evitando por tanto el daño causado por la reperfusión. Así pues, tomando en cuenta estas consideraciones, podemos concluir que nuestros resultados son los primeros que demuestran un efecto terapéutico *per se* de las isoflavonas genisteína, daidzeína y

biocanina A ya que, aunque la genisteína fue la única en disminuir el volumen de infarto cerebral en ratas macho y hembra de forma significativa (15% tratadas vs 28% control en ratas macho y 14% tratadas vs 27% control en ratas hembra no ovariectomizadas), las otras dos isoflavonas utilizadas también mostraron una tendencia similar (volumen de infarto del 23% en ratas tratadas con daidzeína y 19% en ratas tratadas con biocanina A vs 28% de las ratas control) aunque sin alcanzar significación estadística.

La hormona 17  $\beta$ -estradiol ha demostrado tener efectos neuroprotectores similares a los de la genisteína. Por ejemplo, estudios *in vitro e in vivo* han demostrado que el estrógeno protege frente a toxicidad por glutamato (Mendelowitsch y cols., 2001; Schreihofner y Redmond, 2009), toxicidad por  $\beta$ -amiloide (Gridley y cols., 1997; Green y Simpkins, 2000; Aguado-Llera y cols., 2007), estrés oxidativo (Gridley y cols., 1998; Sawada y Shimohama, 2000), frente a isquemia inducida por privación de oxígeno y glucosa (Wilson y cols., 2000; Schreihofner y Redmond, 2009), isquemia inducida por oclusión de la ACM con endotelina (Glendenning y cols., 2008), isquemia global (Jover y cols., 2002) o isquemia focal (Toung y cols., 1998; Rusa y cols., 1999). Esto unido a que las isoflavonas en general, y la genisteína en particular, son estructuralmente muy similares al estrógeno natural, sugiere que el mecanismo por el que las isoflavonas median neuroprotección sea su capacidad para modular al receptor estrogénico. Se sabe que las células cerebrales pueden expresar los dos subtipos conocidos del receptor: ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  (Shughrue y cols., 1997), que las isoflavonas se unen con mayor afinidad al ER- $\beta$  (Belcher y Zsarnovszky, 2001) y que la genisteína media neuroprotección a través de su unión al receptor estrogénico (Zeng y cols., 2004; Kajta y cols., 2007). Sin embargo, todavía existe cierta controversia acerca de si es el subtipo ER- $\alpha$  el responsable (Nilsen y cols., 2000; Sampei y cols., 2000; Kim y cols., 2001; Schreihofner y Redmond, 2009) o lo es ER- $\beta$  (Sawada y cols., 2000; Linford y Dorsa, 2002). Además, la genisteína ejerce otras acciones independientes de receptor estrogénico como son su capacidad para inhibir enzimas del tipo tirosin

quinasa (Wang y Salter, 1994; Phillis y cols., 1996), o sus acciones antioxidantes como captadora de radicales libres (Kruk y cols., 2005). Estos podrían ser otros potenciales mecanismos de acción que explicasen la capacidad neuroprotectora de la genisteína observada en nuestro estudio.

De todos modos, ya sea por mecanismos dependientes o independientes del receptor estrogénico, la genisteína ha demostrado en diferentes estudios su efecto, neuroprotector fundamentalmente debido a sus efectos anti-apoptóticos, que consisten en la disminución de los niveles de caspasa-3 activada *in vitro* (Linford y Dorsa, 2002) e *in vivo* (Liang y cols., 2008) y el aumento de los niveles de la proteína anti-apoptótica bcl-2 (Sonee y cols., 2004), y a su actividad antioxidante, que le permite actuar directamente como captadora de radicales libres y además disminuir la peroxidación lipídica, *in vitro* en células corticales humanas e *in vivo* en ratas sometidas a isquemia global (Zhao y cols., 2002; Liang y cols., 2008).

Nuestros resultados muestran que la reducción del volumen de infarto en las ratas macho y hembras tratadas con genisteína es significativamente mayor en las estructuras corticales que en las subcorticales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hong y colaboradores (2000) quienes usando un modelo similar al nuestro de isquemia-reperfusión en ratas han demostrado que la administración de un extracto de té verde disminuye el número de células apoptóticas en mayor medida en el cortex que en el estriado. Por otro lado, la genisteína ha demostrado *in vitro* tener efectos protectores en células corticales humanas (Sonee y cols., 2004), de rata (Linford y Dorsa, 2002; Schreihofner y Redmond, 2009) y de ratón (Kajta y cols., 2007). Puesto que el cortex cerebral de la rata adulta expresa predominantemente ER- $\beta$  (Shughrue y cols., 1997), quizá la genisteína disminuya el volumen de infarto en las estructuras corticales de nuestros animales a través de la modulación de este subtipo del receptor estrogénico, traducándose finalmente este efecto en una disminución del volumen de infarto total de estos animales.

### **3.- HIPERTENSIÓN: efectos preventivos y agudos de los fitoestrógenos sobre el daño cerebral isquémico.**

La hipertensión es el primer factor modificable y el segundo factor más importante de riesgo, después de la edad, de ictus de tipo trombótico y hemorrágico (Amenta y cols., 2003; Veglio y cols., 2009). De hecho, el uso de terapias anti-hipertensoras ha sido asociado con una reducción del 35-40% de incidencia de ictus (Neal y cols., 2000). Puesto que el uso de dietas ricas en soja había demostrado en algunos trabajos tener un efecto anti-hipertensor, nos propusimos estudiar, al igual que en las ratas Wistar normotensas, el efecto preventivo que el consumo de una dieta rica en soja pudiera tener sobre el ictus en ratas hipertensas (SHR) y sus controles normotensos, las ratas WKY, así como también el efecto neuroprotector de la genistéina cuando ésta se administra de forma aguda en fases tempranas de la reperusión.

La estabulación durante 17 semanas de las ratas SHR parece ser suficiente para generar un modelo de hipertensión ya que el análisis de su PAS basal revela que, independientemente de la dieta con la que sean alimentadas (Fito-600, Fito-0n o Fito-0r), basta con este tiempo para que alcancen el estado de hipertensión y para que se enfrenten al episodio de isquemia-reperusión con valores de presión arterial media significativamente superiores a los de sus homólogas normotensas, las ratas WKY.

Los resultados obtenidos muestran, que independientemente de la cepa (SHR o WKY), las ratas alimentadas con la dieta rica en soja Fito-600 presentan la misma susceptibilidad frente a un episodio de isquemia-reperusión que las alimentadas con la dieta sin soja Fito-0n, ya que el consumo crónico de isoflavonas de la soja mediante la dieta, ni disminuye de forma significativa el volumen de infarto, ni mejora el estado neurológico de las ratas SHR ni de las ratas WKY. Estos resultados, especialmente los que conciernen a las ratas WKY, no coinciden con los obtenidos previamente en las ratas Wistar (discutidos en el apartado 1.3) ni por otros (Schreihofner y cols., 2005; Lovekamp-Swany cols., 2007), que

demuestran un efecto beneficioso frente al ictus del consumo de dietas ricas en soja en ratas normotensas. La razón más probable para esta discrepancia es el tipo de cepa utilizada. En 1988 Duverger y MacKenzie observaron que la oclusión permanente de la arteria cerebral media mediante electrocoagulación en 5 cepas diferentes de ratas se traducía en volúmenes de infarto diferentes, siendo las ratas WKY las que presentaban los volúmenes de infarto más pequeños (aproximadamente de un 15%) y más variables. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, ya que las ratas WKY, independientemente de la dieta suministrada, mostraron volúmenes de infarto reducidos (15-16%) y muy variables. Quizá esta cuestión metodológica podría influir en la falta de efecto observada para la dieta Fito-600 en la disminución del volumen de infarto, puesto que infartos tan pequeños y variables podrían enmascarar un efecto neuroprotector del consumo de esta dieta.

El análisis de la hemodinámica cerebral y sistémica de las ratas WKY y SHR destinadas al estudio del efecto agudo de la genisteína demuestra la homogeneidad de los grupos antes del tratamiento ya que, dentro de cada cepa, los animales se enfrentan al episodio de isquemia-reperfusión en iguales condiciones hemodinámicas (valor basal) y sus patrones de PC y PAS varían de un modo similar durante la isquemia y la perfusión. Por otro lado, el tratamiento con dosis de 1 mg/kg ó 10 mg/kg de genisteína no demuestra tener eficacia neuroprotectora, ya que no se produce una disminución del volumen de infarto ni una mejora del estado neurológico de los animales. Por tanto, nuestros resultados no nos permiten apoyar la hipótesis de que las isoflavonas de la soja, administradas de forma crónica mediante la dieta, o de que la genisteína, administrada de forma aguda tras la inducción de la isquemia cerebral, tengan un efecto neuroprotector frente al ictus en condiciones de hipertensión.

En la actualidad, muchos trabajos corroboran la relación entre presencia de hipertensión y mayor incidencia de ictus (Temma y cols., 2008; Veglio y cols., 2009). Diferentes estudios han demostrado que el uso de sustancias anti-

hipertensoras como agentes hipolipidémicos (Leys y cols., 2002), nicardipina (Amenta y cols., 2009) o losartan (Dahlöf y cols., 2002), son eficaces en la prevención del ictus. Sin embargo, hasta donde conocemos, no han demostrado ser eficaces en la terapéutica del ictus (Sauter y Rudin, 1996). Algunos autores han postulado cierto efecto anti hipertensor del consumo de dietas ricas en soja (Ver apartado 1.2) que ha sido atribuido a sus efectos hipocolesterolémicos (Setchell y Cassidy, 1999) y antioxidantes (Mizutani y cols., 2000; Park y cols., 2005). Aunque no se ha publicado ningún trabajo al respecto, se postula acerca de si estos efectos podrían convertirlas en buenas candidatas para la prevención del ictus. Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten apoyar esta hipótesis, ya que el consumo crónico de isoflavonas mediante la dieta no ha demostrado tener ni efectos anti-hipertensores, ni tampoco efectos neuroprotectores que nos permitan confirmarlas como buenas candidatas para la profilaxis o incluso para la terapéutica del ictus en presencia de hipertensión.

Por otro lado, la observación del volumen de infarto cerebral muestra que, independientemente de la dieta suministrada o del tratamiento recibido, las ratas SHR presentan volúmenes de infarto superiores (aproximadamente el doble) a los de las ratas WKY. La cepa de ratas SHR empezó a desarrollarse en 1950 cuando Okamoto cruzó un macho WKY con hipertensión moderada (presión arterial sistólica de 145-175 mmHg) con una hembra con elevada presión arterial (presión arterial sistólica 130-140 mmHg). Tras continuas selecciones en 1963 se estableció definitivamente la cepa SHR (Amenta y cols., 2003). Esta es la razón por la que las ratas WKY suelen utilizarse, y han sido utilizadas en el presente trabajo, como controles normotensos de las ratas SHR. Sin embargo, ambas cepas no solamente difieren en los valores de presión arterial sistémica sino que también presentan ciertas diferencias en su metabolismo cerebral (Temma y cols., 2008), en la estructura de sus cerebros (Tajima y cols., 1993), en la organización de su sistema nervioso central (Nelson y Boulant, 1981) y en la estructura de sus arterias



cerebrales (Amenta y cols., 2003). Esta última diferencia podría ser la principal responsable de los mayores volúmenes de infarto descritos para las ratas SHR.

La hipertensión causa principalmente dos tipos de cambios estructurales en las arterias cerebrales: la hipertrofia y el remodelado de la pared del vaso, que resultan en un estrechamiento de la luz del vaso y un incremento de la resistencia vascular, provocando una perfusión inadecuada del tejido cerebral (Amenta y cols., 2003) y una limitación de la capacidad de las arterias cerebrales (particularmente las pequeñas arteriolas) para dilatarse en respuesta a la isquemia (Duverger y MacKenzie, 1988). Todo esto finalmente podría conducir a una inadecuada circulación colateral (Coyle y Jokelainen, 1983) y por tanto explicar los mayores volúmenes de infarto encontrados en nuestros animales. Así pues, la hipertensión no solo incrementaría la incidencia de ictus sino que también exacerbaría el daño que causa.



# CONCLUSIONES



1.- La presencia de altas concentraciones de isoflavonas en la dieta no impide ni atenúa el desarrollo de hipertensión en ratas SHR, ni modifica la presión arterial en ratas normotensas. Por lo tanto, estos resultados no apoyan la eficacia de la intervención nutricional con isoflavonas en el control de la hipertensión.

2.- La presencia de altas concentraciones de isoflavonas en la dieta no influye en la hemodinámica cerebral y sistémica durante el episodio de isquemia-reperusión en el modelo experimental utilizado en el presente estudio. El perfil evolutivo de todos los parámetros investigados es prácticamente el mismo independientemente de la dieta, del género, de la cepa y de la hipertensión. La implicación es doble: por una parte las isoflavonas no determinan un perfil hemodinámico cerebral durante la isquemia-reperusión que pudiera considerarse más favorable sobre el posterior daño cerebral; y por otra parte la hipertensión no determina un perfil hemodinámico cerebral durante la isquemia-reperusión que pudiera considerarse más desfavorable sobre el posterior daño cerebral.

3.- La presencia de altas concentraciones de isoflavonas en la dieta influye en la gravedad del daño cerebral isquémico en determinados grupos experimentales. Atendiendo al estado neurológico y al volumen de la lesión (infarto), la dieta formulada con altas concentraciones de isoflavonas confiere neuroprotección en ratas Wistar macho y hembra, pero no en ratas WKY o SHR macho. El reducido volumen de infarto de las ratas WKY cuestiona la idoneidad de esta cepa como control normotenso de la cepa SHR en los estudios sobre la influencia de la hipertensión en el ictus. Ahora bien, si se considera la cepa Wistar como control positivo de la cepa SHR, cabe concluir que las isoflavonas confieren neuroprotección primaria en condiciones de normotensión pero no de hipertensión.

4.- La administración de isoflavonas puras, concretamente genisteína, ha demostrado tener efecto neuroprotector en ratas Wistar macho y hembra, y por lo tanto deberían tenerse en cuenta como agentes neuroprotectores capaces de limitar el daño cerebral isquémico cuando se administran en la fase superaguda del ictus. Si bien esta sugerencia se apoya en los resultados obtenidos en condiciones de normotensión, no ocurre lo mismo en condiciones de hipertensión.

# BIBLIOGRAFÍA





Adams JD, Odunze JN (1991) Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 10:161-169.

Adams MR, Goleen DL, Williams JK, Franke AA, Register TC, Kaplan JR (2005) Soy protein containing isoflavones reduces the size of atherosclerotic plaques without affecting coronary artery reactivity in adult male monkeys. *J Nutr* 135:2852-2856.

Adlercreutz H (1990) Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 201:3-23.

Adlercreutz H, Fotsis T, Lampe J, Wähälä K, Mäkelä T, Brunow G, Hase T (1993a) Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 215:5-18.

Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S (1993b) Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet* 342:1209-1210.

Adlercreutz H, Mazur W (1997) Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29:95-120.

Adlercreutz H (2002) Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:113-118.

Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E, Chowen JA, Argente J, Puebla-Jiménez L, Frago LM, Barrios V (2007) 17Beta-estradiol protects depletion of rat temporal cortex somatostatinergic system by beta-amyloid. *Neurobiol Aging* 28:1396-1409.

Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T (2000) Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72:844-852.

Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD (1998) Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke* 29:159-166.

Alkayed NJ, Crain BJ, Traystman RJ, Hurn PD (1999) Estrogen-mediated neuroprotection in reproductively senescent rats. *Stroke* 30:274.

Alkayed NJ, Murphy SJ, Traystman RJ, Hurn PD (2000) Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke* 31:161-168.

Al-Khalili F, Eriksson M, Landgren BM, Schenck-Gustafsson K (1998) Effect of conjugated estrogen on peripheral flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 82:215-218.

Alonso de Leciñana M, Díez-Tejedor E, Carceller F, Roda JM (2001) Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed?. *Cerebrovasc Dis* 11:20-30.

Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG (2009a) Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis* 27:493-501.

Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG (2009b) New approach to stroke subtyping: the A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc Dis* 27:502-508.

Amenta F, Di Tullio MA, Tomassoni D (2003) Arterial hypertension and brain damage--evidence from animal models (review). *Clin Exp Hypertens* 25:359-380.

Amenta F, Lanari A, Mignini F, Silvestrelli G, Traini E, Tomassoni D (2009) Nicardipine use in cerebrovascular disease: a review of controlled clinical studies. *J Neurol Sci* 283:219-223.

Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 333:276-282.

Anderson GL (Women's Health Initiative Steering Committee) (2004) Effects of conjugate equine estrogens in postmenopausal women with hysterectomy: The Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA* 291:1701-1714.

Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL Jr, Morgan TM, Burke GL (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 12:43-50.

Anthony MS, Clarkson TB, Bullock BC, Wagner JD (1997) Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2524-2531.

Arnal JF, Scarabin PY, Trémollières F, Laurell H, Gourdy P (2007) Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today?. *Curr Opin Lipidol* 18:554-560.

Atkinson C, Frankenfeld CL, Lampe JW (2005) Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:155-170.

Axelsson M, Sjövall J, Gustafsson BE, Setchell KD (1984) Soya-a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol* 102:49-56.

Azcoitia I, Moreno A, Carrero P, Palacios S, Garcia-Segura LM (2006) Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in the rat brain. *Gynecol Endocrinol* 22:63-69.

Bandera E, Botteri M, Minelli C, Sutton A, Abrams KR, Latronico N (2006) Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 37:1334-1339.

Bandera EV, Williams MG, Sima C, Bayuga S, Pulick K, Wilcox H, Soslow R, Zauber AG, Olson SH (2009) Phytoestrogen consumption and endometrial cancer risk: a population-based case-control study in New Jersey. *Cancer Causes Control* 20:1117-1127.

Barnes S (1998) Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med* 217:386-392.

Barry DI (1985) Cerebral blood flow in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 7:S94-S98.

Bathena SJ, Velasquez MT (2002) Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 76:1191-1201.

Baumbach GL, Heistad DD (1988) Cerebral circulation in chronic arterial hypertension. *Hypertension* 12:89-95.

Beagelhole R (1990) International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and risk factors. *Epidemiol Rev* 12:1-15.

Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MN, Davis RL, Bartkowski HM (1986) Evaluation of 3,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304-1308.

Belcher SM, Zsarnovszky A (2001) Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *JPET* 299:408-414.

Binko J, Majewski H (1998) 17- $\beta$ -estradiol reduces vasoconstriction in endothelium-denuded rat aortas through inducible NOS. *Am J Physiol* 274:H835-H859.

Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F (1988) The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 19:1083-1092.

Boker LK, Van der Schouw YT, De Kleijn MJ, Jacques PF, Grobbee DE, Peeters PH (2002) Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women. *J Nutr* 132:1319-1328.

Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, Viña J (2005) 17 $\beta$ -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via ERK 1 and ERK2 [MAPK]/NF $\kappa$ B cascade. *Aging Cell* 4:113-118.

Boulet MJ, Oddens BJ, Lehert P, Vemer HM, Visser A (1994) Climacteric and menopause in seven South-east Asian countries. *Maturitas* 19:157-176.

Bramlett HM, Dietrich WD (2001) Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *J Neurotrauma* 18:891-900.

Brass LW (2004) Hormone replacement therapy and stroke. Clinical trials review. *Stroke* 35:2644-2647.

Brown NM, Setchell KD (2001) Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest* 81:735-747.

Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Huang FF, Camondola S, Mattson MP (2000) Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* 141:3646-3656.

Bushnell CD (2006) Hormone replacement therapy and stroke: the current state of knowledge and directions for future research. *Semin Neurol* 26:123-130.

Callier S, Morissette M, Grandbois M, Pélaprat D, Di Paolo T (2001) Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse* 41:131-138.

Cassidy A, Bingham S, Setchell K (1995) Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br J Nutr* 74:587-601.

Chan, PH (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 2-14.

Charkoudian N, Stephens DP, Pirkle KC, Kosiba WA, Johnson JM (1999) Influence of female reproductive hormones on local thermal control of skin blood flow. *J Appl Physiol* 87:1719-1723.

Chin-Dusting JP, Boak L, Husband A, Nestel PJ (2004) The isoflavone metabolite dehydroequol produces vasodilatation in human resistance arteries via a nitric oxide-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 176:45-48.

Cho TM, Peng N, Clark JT, Novak L, Roysommuti S, Prasain J, Wyss JM (2007) Genistein attenuates the hypertensive effects of dietary NaCl in hypertensive male rats. *Endocrinology* 148:5396-5402.

Chopp M, Li Y (2008) Treatment of stroke and intracerebral hemorrhage with cellular and pharmacological restorative therapies. *Acta Neurochir* 105:79-83.

Christophe M, Nicolas S (2006) Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des* 12:739-757.

Cimarosti H, Siqueira IR, Zamin LL, Nassif M, Balk R, Frozza R, Dalmaz C, Netto CA, Salbego C (2005) Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Res* 30:583-589.

Coyle P, Jokelainen PT (1983) Differential outcome to middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive stroke-prone rats (SHRSP) and Wistar Kyoto (WKY) rats. *Stroke* 14:605-611.

Cui X, Chen J, Zacharek A, Li Y, Roberts C, Kapke A, Savant-Bhonsale S, Chopp M (2007) Nitric oxide donor upregulation of stromal cell-derived factor-1/chemokine (CXC motif) receptor 4 enhances bone marrow stromal cell migration into ischemic brain after stroke. *Stem Cells* 25:2777-2785.

Dahlöf B (LIFE Study Group) (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359:995-1003.

Danton GH, Dalton-Dietrich W (2004) The search for neuroprotective strategies in stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 25:181-194.

De Keyser J, Sulter G, Luiten PG (1999) Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing?. *Trends Neurosci* 22:535-540.

De Kleijn MJ, Van der Schouw YT, Wilson PW, Grobbee DE, Jacques PF (2002) Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S.women: the Framingham study. *J Nutr* 132:276-282.

Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM (2002) Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol Lett* 128:145-157.

Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM (2000) Impaired endothelial function in transgenic mice expressing both human rennin and human angiotensinogen. *Stroke* 31:760-764.



Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL (2002) PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 40:866-871.

Douglas G, Armitage JA, Taylor PD, Lawson JR, Mann GE, Poston L (2006) Cardiovascular consequences of life-long exposure to dietary isoflavones in the rat. *J Physiol* 571:477-487.

Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55:310-318.

Dubal DB, Wise PM (2001) Neuroprotective effects of estrogen in middle aged female rats. *Endocrinology* 142:43-48.

Duverger D, MacKenzie ET (1988) The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:449-461.

Edvinsson L, Krause DN (2002) Cerebral Blood Flow and Metabolism. Lippincot Williams and Wilkins.

Ferrer I, Planas AM (2003) Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:329-339.

Figtree GA, Griffiths H, Lu YQ, Webb CM, MacLeod K, Collins P (2000) Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism. *J Am Coll Cardiol* 35:1977-1985.

Flynn RW, MacWalter RS, Doney AS (2008) The cost of cerebral ischaemia. *Neuropharmacology* 55:250-256.

Folbergrová J, Minamisawa H, Ekholm A, Siesjö BK (1990) Phosphorilase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *J Neurochem* 55:1690-1696.

Fortuño A, Oliván S, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G (2004) Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens* 22:2169-2175.

Fukuda K, Yao H, Ibayashi S, Nakahara T, Uchimura H, Fujishima M, Hall ED (2000) Ovariectomy exacerbates and estrogen replacement attenuates photothrombotic focal ischemic brain injury in rats. *Stroke* 31:155-160.

Fung TT, Stampfer MJ, Manson JE, Rexrode KM, Willett WC, Hu FB (2004) Prospective study of major dietary patterns and stroke risk in women. *Stroke* 35:2014-2019.

Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F (1999) Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA* 282:2003-2011.

Furlan AJ, Eyding D, Albers GW, Al-Rawi Y, Lees KR, Rowley HA, Sachara C, Soehngen M, Warach S, Hacke W; DEDAS Investigators (2006) Dose escalation of desmoteplase for acute ischemic stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 37:1227-1231.

Gao Q, Li Y, Chopp M (2005) Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult. *Neuroscience* 136:123-134.

Garcia-Ovejero D, Veiga S, Garcia-Segura LM, DonCarlos LL (2002) Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol* 450:256-271.

Garrido A, Pía de la Maza M, Valladares L (2003). Potential health benefits of phytoestrogens. *Rev Med Chile* 131:1321-1328.

Gibson CL, Gray LJ, Murphy SP, Bath PM (2006) Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1103-1113.

Ginsberg MD (2003) Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 34:214-223.

Ginsberg MD (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future *Neuropharmacology* 55:363-389.

Glazier MG, Bowman MA (2001) A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Arch Intern Med* 161:1161-1172.

Glendenning ML, Lovekamp-Swan T, Schreihof DA (2008) Protective effect of estrogen in endothelin-induced middle cerebral artery occlusion in female rats. *Neurosci Lett* 445:188-192.

Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, DeGraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL; American Heart Association; American Stroke Association Stroke Council (2006) Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 113:873-923.

Gollapudi L, Oblinger MM (1999) Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ER $\alpha$ ): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J Neurosci Res* 56:99-108.

Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D (2001) Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr* 131:1202-1206.

Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D (1995) Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 85:304-313.

Green PS, Simpkins JW (2000) Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci* 18:347-358.

Green AR (2008) Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol* 153:S325-S338.

Gridley KE, Green PS, Simpkins JW (1997) Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid (25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Res* 778:158-165.

Gridley KE, Green PS, Simpkins JW (1998) A novel, synergistic interaction between 17 beta-estradiol and glutathione in the protection of neurons against beta-amyloid 25-35-induced toxicity in vitro. *Mol Pharmacol* 54:874-880.

Grodstein F, Clarkson TB, Manson JE (2003) Understanding the divergent data on postmenopausal hormone therapy. *N Engl J Med* 348:645-650.

Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y, Bogousslavsky J, Davalos A, Eliasziw M, Fischer M, Furlan A, Kaste M, Lees KR, Soehngen M, Warach S; DIAS Study Group (2005) The desmoteplase in acute ischemic stroke trial: A phase II MRI-based 9 hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke* 36:66-73.

Harman SM, Naftolin F, Brinton EA, Judelson DR (2005a) Is the estrogen controversy over? Deconstructing the Women's Health Initiative study: a critical evaluation of the evidence. *Ann N Y Acad Sci* 1052:43-56.

Harman SM, Brinton EA, Cedars M, Lobo R, Manson JE, Merriam GR, Miller VM, Naftolin F, Santoro N (2005b) KEEPS: The Kronos Early Estrogen Prevention Study. *Climacteric* 8:3-12.

Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P (2000) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10751-10756.

Heard DJ, Norby PL, Holloway J, Vissing H (2000) Human ERR $\gamma$ , a third member of the Estrogen Receptor-Related Receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. *Mol Endocrinol* 14:382-392.

Hentschke M, Borgmeyer U (2003) Identification of PNRC2 and TLE1 as activation function-1 cofactors of the orphan nuclear receptor ERR $\gamma$ . *Biochem Biophys Res Commun* 312:975-982.

Hodgson JM, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Burke V, Croft KD, Rogers PB (1999) Effects of isoflavonoids on blood pressure in subjects with high-normal ambulatory blood pressure levels: a randomized controlled trial. *Am J Hypertens* 12:47-53.

Hoffman GE, Merchenthaler I, Zup SL (2006) Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine* 29:217-231.

Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* 60:321-327.

Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim DB, Yun YP, Ryu JH, Lee BM, Kim PY (2000) Neuroprotective effects of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull* 53:743-749.

Hossmann KA (2008) Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 55:257-270.

Huang J, Upadhyay U, Tamargo RJ (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg neurol* 66:232-245.

Huang G, Cao X, Zhang X, Chang H, Yang Y, Du W, Wilson JX (2009) Effects of soybean isoflavone on the notch signal pathway of the brain in rats with cerebral ischemia. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 55:326-331.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (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* 280:605-613.

Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME (1995) Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:378-384.

Immink RV, Van den Born BJ, Van Montfrans GA, Koopmans RP, Karemaker JM, Van Lieshout JJ (2004) Impaired cerebral autoregulation in patients with malignant hypertension. *Circulation* 110:2241-2245.

International Stroke Trial Collaborative Group (1997) The International Stroke Trial (IST): a randomized trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19345 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet* 349:1569-1581.

Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T, Ikegami S (1999) Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 140:1893-1900.

Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130:1695-1659.

Jang JH, Surh YJ (2003) Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 66:1371-1379.

Jensen MN, Ritskes-Hoitinga M (2007) How isoflavone levels in common rodent diets can interfere with the value of animal models and with experimental results. *Lab Anim* 41:1-18.

Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring M, Nelson C (1995) A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54:167-184.

Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM, Zukin RS (2002) Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J Neurosci* 22:2115-2124.

Kader A, Frazzini UI, Solomon RA, Trifiletti RR (1993) Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24:1709-1716.



Kajta M, Domin H, Gryniewicz G, Lason W (2007) Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: an involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3beta intracellular signaling pathway. *Neuroscience* 145:592-604.

Kaplotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H, Gmeiner BM (1997) Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2868-2874.

Karamsetty MR, Klinger JR, Hill NS (2001) Phytoestrogens restore nitric oxide-mediated relaxation in isolated pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 297:968-974.

Kazama K, Wang G, Frys K, Anrather J, Iadecola C (2003) Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1890-H1899.

Keinan-Boker L, Peeters PH, Mulligan AA, Navarro C, Slimani N, Mattisson I, Lundin E, McTaggart A, Allen NE, Overvad K, Tjønneland A, Clavel-Chapelon F, Linseisen J, Haftenberger M, Lagiou P, Kalapothaki V, Evangelista A, Frasca G, Bueno-de-Mesquita HB, van der Schouw YT, Engeset D, Skeie G, Tormo MJ, Ardanaz E, Charrondière UR, Riboli E (2002) Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr* 5:1217-1226.

Kerr S, Brosnan MJ, McOntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA (1999) Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* 33:1353-1358.

Khaja AM, Grotta JC (2007) Established treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet* 369:319-330.

Kim H, Bang OY, Jung MW, Ha SD, Hong HS, Huh K, Kim SU, Mook-Jung I (2001) Neuroprotective effects of estrogen against beta-amyloid toxicity are mediated by estrogen receptors in cultured neuronal cells. *Neurosci Lett* 302:58-62.

Kindy MS (1993) Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents delayed neuronal death following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:372-377.

Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A (2004) Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 109:2357-2362.

Klaiber EL, Vogel W, Rako S (2005) A critique of the Women's Health Initiative hormone therapy study. *Fertil Steril* 84:1589-1601.

Kochanowicz J, Krejza J, Koroza, O, Mariak Z (2005) Influence of estrogens on the impedance of cerebral blood vessels. *Neurol Neurochir Pol* 39:175-180.

Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group (2007) Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort I. *Circulation* 116:2553-2562.

Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, Van der Zee R, Isner JM, Losordo DW. (1997) Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95: 1768-1772.

Krebs EE, Ensrud KE, MacDonald R, Wilt TJ (2004) Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. *Obstet Gynecol* 104:824-836.

Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Bots ML, Grobbee DE, Lampe JW, van der Schouw YT (2005) Randomized controlled trial of the effects of soy protein containing isoflavones on vascular function in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 81:189-195.

Kruk I, Aboul-Enein HY, Michalska T, Lichtszeld K, Kładna A (2005) Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 20:81-89.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 138:863-870.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263.

Lee MY, Man RY (2003) The phytoestrogen genistein enhances endothelium-independent relaxation in the porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol* 481:227-32.

Lee MC, Shoji H, Miyazaki H, Yoshino F, Hori N, Toyoda M, Ikeda Y, Anzai K, Ikota N, Ozawa T (2004) Assessment of oxidative stress in the spontaneously hypertensive rat brain using electron spin resonance (ESR) imaging and in vivo L-Band ESR. *Hypertens Res* 27:485-492.

Lee YB, Lee HJ, Sohn HS (2005) Soy isoflavones and cognitive function. *J Nutr Biochem* 16:641-649.

Lee YB, Lee KH, Sohn HS, Lee SJ, Cho KH, Kang IJ, Kim DW, Shin YK, Pai T, Hwang IK, Won MH (2009a) Effects of soy phytoestrogens on reference memory and neuronal cholinergic enzymes in ovariectomized rats. *J Med Food* 12:64-70.

Lee SA, Shu XO, Li H, Yang G, Cai H, Wen W, Ji BT, Gao J, Gao YT, Zheng W (2009b) Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 89:1920-1926.

Lephart ED, West TW, Weber KS, Rhees RW, Setchell KD, Adlercreutz H, Lund TD (2002) Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicol Teratol* 24:5-16.

Lephart ED, Rhees RW, Setchell KD, Bu LH, Lund TD (2003) Estrogens and phytoestrogens: brain plasticity of sexually dimorphic brain volumes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:299-309.

Leys D, Deplanque D, Lucas C, Bordet R (2002) Hypolipemic agents for stroke prevention. *Clin Exp Hypertens* 24:573-594.

Li L, Haynes MP, Bender JR (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor  $\alpha$  variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4807-4812.

Liang HW, Qiu SF, Shen J, Sun LN, Wang JY, Bruce IC, Xia Q (2008) Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 438:116-120.

Liang W, Lee AH, Binns CW, Huang R, Hu D, Shao H (2009) Soy consumption reduces risk of ischemic stroke: a case-control study in southern china. *Neuroepidemiology* 33:111-116.

Linford NJ, Dorsa DM (2002) 17beta-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids* 67:1029-1040.

Locatelli F, Bersano A, Ballabio E, Lanfranconi S, Papadimitriou D, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP, Corti S (2009) Stem cell therapy in stroke. *Cell Mol Life Sci* 66:757-72.

Lock M (1994) Menopause in cultural context. *Exp Gerontol* 29:307-317.

Lovekamp-Swan T, Glendenning M, Schreihof DA (2007a) A high soy diet reduces programmed cell death and enhances bcl-xL expression in experimental stroke. *Neuroscience* 148:644-652.

Lovekamp-Swan T, Glendenning ML, Schreihof DA (2007b) A high soy diet enhances neurotrophin receptor and Bcl-XL gene expression in the brains of ovariectomized female rats. *Brain Res* 1159:54-66.

Low Dog T (2005) Menopause: a review of botanical dietary supplements. *Am J Med* 118:98-108.

Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, Kohen F, Nagamani M (2000) Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention. *Cancer Res* 60:4112-4121.

Lund TD, Lephart ED (2001) Dietary soy phytoestrogens produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze. *Brain Res* 913:180-184.

Lund TD, Rhees RW, Setchell KD, Lephart ED (2001a) Altered sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) volume in adult Long-Evans rats by dietary soy phytoestrogens. *Brain Res* 914:92-99.

Lund TD, West TW, Tian LY, Bu LH, Simmons DL, Setchell KD, Adlercreutz H, Lephart ED (2001b) Visual spatial memory is enhanced in female rats (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens. *BMC Neurosci* 2:20.

Lund CO, Mortensen A, Nilas L, Breinholt VM, Larsen JJ, Ottesen B (2007) Estrogen and phytoestrogens: Effect on eNOS expression and in vitro vasodilation in cerebral arteries in ovariectomized Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 130:84-92.

Maggi A, Ciana P, Belcredito S, Vegeto E (2004) Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu Rev Physiol* 66:291-313.

Mahady GB (2005) Do soy isoflavones cause endometrial hyperplasia? *Nutr Rev* 63:392-397.

Mahn K, Borrás C, Knock GA, Taylor P, Khan IY, Sugden D, Poston L, Ward JP, Sharpe RM, Viña J, Aaronson PI, Mann GE (2005) Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. *FASEB J* 19:1755-1757.

Mäkelä S, Savolainen H, Aavik E, Myllärniemi M, Strauss L, Taskinen E, Gustafsson JA, Häyry P (1999) Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7077-7082.

Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Choop M (1993) Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:355-358.

Mallis LM, Sarkahian AB, Harris HA, Zhang MY, McConnell OJ (2003) Determination of rat oral bioavailability of soy-derived phytoestrogens using an automated on-column extraction procedure and electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 796:71-86.

Manson JE (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators) (2003) Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 349:523-534.

Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23:134-147.

Martin DS, Breitkopf NP, Eyster KM, Williams JL (2001) Dietary soy exerts an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive female rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281:R553-R560.

Martin DS, Williams JL, Breitkopf NP, Eyster KM (2002) Pressor responsiveness to angiotensin in soy-fed spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 80:1180-1186.

Martinez-Vila E, Irimia P (2005) Challenges of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 20:148-158.

Mattar CN, Harharah L, Su LL, Agarwal AA, Wong PC, Choolani M (2008) Menopause, hormone therapy and cardiovascular and cerebrovascular disease. *Ann Acad Med Singapore* 37:54-62.

Mayo JL (1998) The remarkable health benefits of soy isoflavones. *Clinical Nutrition Insights* 6:1-4.

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

Mendelowitsch A, Ritz MF, Ros J, Langemann H, Gratzl O (2001) 17beta-Estradiol reduces cortical lesion size in the glutamate excitotoxicity model by enhancing extracellular lactate: a new neuroprotective pathway. *Brain Res* 901:230-236.

Meng QH, Lewis P, Wähälä K, Adlercreutz H, Tikkanen MJ (1999) Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1438:369-376.

Mense SM, Hei TK, Ganju RK, Bhat HK (2008) Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. *Environ Health Perspect* 116:426-433.

Michelfelder AJ (2009) Soy: a complete source of protein. *Am Fam Physician* 79:43-47.



Mikkola TS, Clarkson TB (2002) Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res* 53:605-619.

Miller NR, Jover T, Cohen HW, Zukin RS, Etgen AM (2005) Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology* 146:3070–3079.

Mishra SK, Abbot SE, Choudhury Z, Cheng M, Khatab N, Maycock NJ, Zavery A, Aaronson PI (2000) Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc Res* 46:539-546.

Mizutani K, Ikeda K, Nishikata T, Yamori Y (2000) Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 18:1833-1840.

Mohandas B, Mehta JL (2007) Lessons from hormone replacement therapy trials of primary prevention of cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 22:434-442.

Moon YJ, Sagawa K, Frederick K, Zhang S, Morris ME (2006) Pharmacokinetics and bioavailability of the isoflavone biochanin A in rats. *AAPS J* 8:E433-E442.

Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW (1995) Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 91:755-763.

Murkies AL, Wilcox G, Davis SR (1998) Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metabol* 83:297-303.

Nagata C, Takatsuka N, Inaba S, Kawakami N, Shimizu H (1998) Effect of soymilk consumption on serum estrogen concentrations in premenopausal Japanese women. *J Natl Cancer Inst* 90:1830-1835.

Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K (2003) Association of blood pressure with intake of soy products and other food groups in Japanese men and women. *Prev Med* 36:692-697.

Nandur R, Kumar K, Villablanca AC (2004). Cardiovascular actions of selective estrogen receptors modulators and phytoestrogens. *Prev Cardiol* 7:73-79.

Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G (1999) Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo: possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circ Res* 85:377-385.

Neal B, MacHahon S, Chapman N (2000) Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs. *Lancet* 356:1955-1964.

Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y (2004) Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 134:38-42.

Nelson DO, Boulant JA (1981) Altered CNS neuroanatomical organization of spontaneously hypertensive (SHR) rats. *Brain Res* 226:119-130.

Nelson HD, Vesco KK, Haney E, Fu R, Nedrow A, Miller J, Nicolaidis C, Walker M, Humphrey L (2006) Nonhormonal therapies for menopausal hot flashes: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 295:2057-2071.

Nevala R, Korpela R, Vapaatalo H (1998) Plant derived estrogens relax rat mesenteric artery in vitro. *Life Sci* 63:PL95-PL100.

Nevala R, Vaskonen T, Vehniainen J, Korpela R, Vapaatalo H (2000) Soy based diet attenuates the development of hypertension when compared to casein based diet in spontaneously hypertensive rat. *Life Sci* 66:1821-1828.

Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH (2006) A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46:161-183.

Nilsen J, Mor G, Naftolin F (2000) Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *J Neurobiol* 43:64-78.

Nilsen J, Brinton RD (2002) Impact of progestins on estradiol potentiation of the glutamate calcium response. *Neuroreport* 13:825-830.

Nilsen J, Chen S, Brinton RD (2002) Dual action of estrogen on glutamate induced calcium signaling: mechanisms requiring interaction between estrogen receptors and src/mitogen activated protein kinase pathway. *Brain Res* 930:216-234.

Nilsen J, Brinton RD (2003) Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection : regulation of mitochondrial calcium and bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2842-2847.

Ørgaard A, Jensen L (2008) The effects of soy isoflavones on obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:1066-1080.

Ososki AL, Kennelly EJ (2003) Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* 17:845-869.

Palacios S (2002) Fitoestrógenos. Harcourt S.A.

Park E, Shin J-I, Park O-J, Kang M-H (2005) Soy isoflavone supplementation alleviates oxidative stress and improves systolic blood pressure in male spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 51:254-259.

Park Em, Cho S, Frys KA, Glickstein SB, Zhou P, Anrather J, Ross ME, Iadecola C (2006) Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:392-401.

Paschen W (1996) Disturbances of calcium homeostasis within the endoplasmic reticulum may contribute to the development of ischemic-cell damage. *Med Hypotheses* 47:283-288.

Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK (2007) Differential disruption of nuclear volume and neuronal phenotype in the preoptic area by neonatal exposure to genistein and bisphenol-A. *Neurotoxicology* 28:1-12.

Patisaul HB, Polston EK (2008) Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. *Brain Res Rev* 57:352-362.

Pawlak J, Brito V, Kuppens E, Beyer C (2005) Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res* 138:1-7.

Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:196-205.

Phillis JW, Song D, O'Regan MH (1996) Inhibition of tyrosine phosphorylation attenuates amino acid neurotransmitter release from the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 207:151-154.

Pike CJ (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:1552-1563.

Planas AM, Gorina R, Chamorro A (2006) Signal pathways mediating inflammatory responses in brain ischemia. *Biochem Soc Trans* 34:1267-1270.

Polizio AH, Gorzalczany SB, Tomaro ML (2009) Lowering arterial pressure delays the oxidative stress generation in a renal experimental model of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 54:348-354.

Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr (1998) Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68:1375S-1379S.

Prokai L, Simpkins JW (2007) Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. *Pharmacol Ther* 114:1-12.

Qu R, Li Y, Gao Q, Shen L, Zhang J, Liu Z, Chen X, Chopp M (2007) Neurotrophic and growth factor gene expression profiling of mouse bone marrow stromal cells induced by ischemic brain extracts. *Neuropathology* 27:355-363.

Raines EW, Ross R (1995) Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr* 125:624S-630S.

Rau SW, Dubal DB, Böttner M, Wise PM (2003a) Estradiol differentially regulates c-Fos after focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 23:10487-10494.

Rau SW, Dubal DB, Böttner M, Gerhold LM, Wise PM (2003b) Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. *J Neurosci* 23:10420-10426.

Report a WHO Study Group (1994) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *Geneva: WHO Technical Report Series* 843:11-13.

Rice S, Whitehead SA (2008) Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:186-195.

Rimbach G, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, Hall WL, Weinberg PD (2008) Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease--a molecular perspective. *Food Chem Toxicol* 46:1308-1319.

Rivas M, Garay RP, Escanero JF, Cia P Jr, Alda JO (2002) Soy milk lowers blood pressure in men and women with mild to moderate essential hypertension. *J Nutr* 132:1900-1902.

Rosenfeld CR, Cox BE, Roy T, Magness RR (1996) Nitric oxide contributes to estrogen-vasodilation of the ovine uterine circulation. *J Clin Invest* 98:2158-2166.

Rosenfeld CR, Roy T, Cox BE (2002) Mechanisms modulating estrogen-induced uterine vasodilation. *Vascul Pharmacol* 38:115-125.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.

Rossouw JE (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators) (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 288:321-333.

Rusa R, Alkayed NJ, Crain BJ, Traystman RJ, Kimes AS, London ED, Klaus JA, Hurn PD (1999) 17 $\beta$ -Estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient animals. *Stroke* 30:1665-1670.

Sacco RL, Chong JY, Prabhakaran S, Elkind MS (2007) Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet* 369:331-341.

Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Torregrosa G, Alborch E (2001) Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:422-429.

Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Castelló-Ruiz M, Torregrosa G, Alborch E (2006) Relaxant effect of sildenafil in the rabbit basilar artery. *Vascul Pharmacol* 44:10-16.

Salom JB, Castelló-Ruiz M, Pérez-Asensio FJ, Burguete MC, Torregrosa G, Alborch E (2007) Acute effects of three isoflavone class phytoestrogens and a mycoestrogen on cerebral microcirculation. *Phytomedicine* 14:556-562.

Sampei K, Goto S, Alkayed NJ, Crain BJ, Korach KS, Traystman RJ, Demas GE, Nelson RJ, Hurn PD (2000) Stroke in estrogen receptor-alpha-deficient mice. *Stroke* 31:738-743.

Samson FE, Nelson SR (2000) The aging brain, metals and oxygen free radicals. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:699-707.

Sasaki Y, Noguchi T, Yamamoto E, Giddings JC, Ikeda K, Yamori Y, Yamamoto J (2002) Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on cerebral thrombosis and blood pressure in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:963-967.

Sauter A, Rudin M (1996) Failure of isradipine in cerebral ischemia models. *Stroke* 27:775-776.

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S (2000) Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *Faseb J* 14:1202-1214.

Sawada H, Shimohama S (2000) Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Biobehav Rev* 24:143-147.

Scarabin PY, Oger E, Plu-Bureau G (2003) Estrogen and ThromboEmbolism Risk Study Group. Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. *Lancet* 362:428-432.

Schreihofe DA, Do KD, Schreihofe AM (2005) High-soy diet decreases infarct size after permanent middle cerebral artery occlusion in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R103-R108.



Schreihofe DA, Redmond L (2009) Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury in vitro. *Neuroscience* 158:602-609.

Schwarz JM, McCarthy MM (2008a) Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:300-306.

Schwarz JM, McCarthy MM (2008b) Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *J Neurochem* 105:1561-1572.

Scoville SA, Bufton SM, Liuzzi FJ (1997) Estrogen regulates neurofilament gene expression in adult female rat dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol* 146:596-599.

Setchell KD (1998) Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68:1333S-1346S.

Setchell KD, Cassidy A (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129:758S-767S.

Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 131:1362S-1375S.

Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 76:447-453.

Shah RD, Anderson KL, Rapoport M, Ferreira A (2003) Estrogen induced changes in the microtubular system correlate with a decreased susceptibility of aging neurons to beta amyloid neurotoxicity. *Mol Cell Neurosci* 24:503-516.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525.

Shughrue PJ, Merchenthaler I (2003) Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. *Neuroscience* 116:851-861.

Si H, Liu D (2008) Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 138:297-304.

Simon JA, Hsia J, Cauley JA, Richards C, Harris F, Fong J, Barrett-Connor E, Hulley SB (2001) Postmenopausal Hormone Therapy and risk of stroke: The Heart and Estrogen-progestin Replacement Study (HERS). *Circulation* 103:638-642.

Simpkins JW, Rajakumar G, Zhang YQ, Simpkins CE, Greenwald D, Yu CJ, Bodor N, Day AL (1997) Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg* 87:724-730.

Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 19:2455-2463.

Singh M, Dykens JA, Simpkins JW (2006) Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp Biol Med* 231:514-521.

Siow RC, Li FY, Rowlands DJ, de Winter P, Mann GE (2007) Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radic Biol Med* 42:909-925.

Slopien R, Junik R, Meczekalski B, Halerz-Nowakowska B, Maciejewska M, Warenik-Szymankiewicz A, Sowinski J (2003) Influence of hormonal replacement therapy on the regional cerebral blood flow in postmenopausal women. *Maturitas* 46:255-262.

Sobey CG, Weiler JM, Boujaoude M, Woodman OL (2004) Effect of short-term phytoestrogen treatment in male rats on nitric oxide-mediated responses of carotid and cerebral arteries: comparison with 17beta-estradiol. *J Pharmacol Exp Ther* 310:135-140.

Sonee M, Sum T, Wang C, Mukherjee SK (2004) The soy isoflavone, genistein, protects human cortical neuronal cells from oxidative stress. *Neurotoxicology* 25:885-891.

Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, Deodato B, Ferlito M, Campo GM, Bova A, Caputi AP (2000) Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovasc Res* 45:454-462.

Sribnick EA, Ray SK, Nowak MW, Li L, Banik NL (2004) 17-beta-estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons. *J Neurosci Res* 76:688-696.

Stafiakos J, Coward L, Kirk M, Barnes S (1997) Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr* 127:1260-1268.

Stara A, Madar Z (2002) Phytoestrogens: a review of recent findings. *J Pediatr Endocr Met* 15:561-572.

Stoltzner SE, Berchtold NC, Cotman CW, Pike CJ (2001) Estrogen regulates bcl-x expression in rat hippocampus. *Neuroreport* 12:2797-2800.

Sudhir K, Chou TM, Mullen WL, Hausmann D, Collins P, Yock PG, Chatterjee K (1995) Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries. *J Am Coll Cardiol* 26:807-814.

Sugimoto E, Yamaguchi M (2000) Stimulatory effect of Daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol* 59:471-475.

Suzuki M, Tabuchi M, Ikeda M, Umegaki K, Tomita T (2004) Protective effects of green tea catechins on cerebral ischemic damage. *Med Sci Monit* 10:166-174.

Suzuki S, Brown CM, Wise PM (2006) Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29:209-215.

Symon L, Pasztor E, Branston NM (1974) The distribution and density of reduced cerebral blood flow following acute middle cerebral artery occlusion: an experimental study by the technique of hydrogen clearance in baboons. *Stroke* 5:255-264.

Tagawa H, Shimokawa H, Tagawa T, Kuroiwa-Matsumoto M, Hirooka Y, Takeshita A (1997) Short-term estrogen augments both nitric oxide-mediated and non-nitric oxide-mediated endothelium-dependent forearm vasodilation in postmenopausal women. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:481-488.

Tai MH, Wang LL, Wu KL, Chan JY (2005) Increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 38:450-462.

Tajima A, Hans FJ, Livingstone D, Wei L, Finnegan W, DeMaro J, Fenstermacher J (1993) Smaller local brain volumes and cerebral atrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 21:105-111.

Tamura M (2006) Effects of intestinal flora on the metabolism and absorption of isoflavones. *JARQ* 40:45-50.

Tanahashi N, Fukuuchi Y (2002) Treatment of acute ischemic stroke: Recent progress. *Intern Med* 41:337-344.

Tang GW (1994) The climacteric of Chinese factory workers. *Maturitas* 19:177-182.

Taniyama Y, Griendling KK (2003) Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42:1075-1081.

Taylor CK, Levy RM, Elliott JC, Burnett BP (2009) The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. *Nutr Rev* 67:398-415.

Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Davis SR, Liang YL, McGrath BP (2001) Soy protein dietary supplementation containing phytoestrogens improves lipid profiles and blood pressure: a double blind, randomized, placebo controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3053-3060.

Teede HJ, Giannopoulos D, Dalais FS, Hodgson J, McGrath BP (2006) Randomised, controlled, cross-over trial of soy protein with isoflavones on blood pressure and arterial function in hypertensive subjects. *J Am Coll Nutr* 25:533-540.

Temma T, Kuge Y, Sano K, Kamihashi J, Obokata N, Kawashima H, Magata Y, Saji H (2008) PET O-15 cerebral blood flow and metabolism after acute stroke in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1212:18-24.

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* 273:199-208.

Tominaga T, Sato S, Ohnishi T, Onishi ST (1993) Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral ischemia in the rat: in vivo detection of the nitric oxide radical by electron paramagnetic resonance spin trapping. *Brain Res* 614:342-346.

Toran-Allerand CD (2004) Minireview: A plétora of estrogen receptors in the brain: Where will it end?. *Endocrinology* 145:1069-1074.

Torregrosa G, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Salom JB, Gil JV, Alborch E (2003) Pharmacological profile of phytoestrogens in cerebral vessels: in vitro study with rabbit basilar artery. *Eur J Pharmacol* 482:227-234.

Torregrosa G, Salom JB, Jover-Mengual T, Alborch E (2007) Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. En: *Fisiopatología de la Isquemia Cerebral*, J Montaner (Ed.), Marge Media Books, Barcelona pp. 13-31.

Toung TJK, Traystman RJ, Hurn PD (1998) Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in males. *Stroke* 29:1666–1670.

Touyz RM (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248-252.

Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Mol Endocrinol* 11:353-365.

Trieu VN, Uckun FM (1999) Genistein is neuroprotective in murine models of familial amyotrophic lateral sclerosis and stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 258:685-658.

Tsubokawa H, Oguro K, Masuzawa T, Kawai N (1994)  $Ca^{+2}$ - dependent non-NMDA receptor-mediated synaptic currents in ischemic CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 71:1190-1196.

Tsubokawa H, Oguro K, Robinson HP, Masuzawa T, Kawai N (1996) Intracellular inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate enhances the calcium current in hippocampal CA1 neurones of the gerbil after ischemia. *J Physiol (Lond)* 497:67-78.

Usui T (2006) Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J* 53:7-20.

Valtueña S, Cashman K, Robins SP, Cassidy A, Kardinaal A, Branca F (2003) Investigating the role of natural phyto-oestrogens on bone health in postmenopausal women. *Br J Nutr* 89:S87-99.

Van Duijn CM (1999) Hormone replacement therapy and Alzheimer's disease. *Maturitas* 31:201-205.

van Erp-Baart MA, Brants HA, Kiely M, Mulligan A, Turrini A, Sermoneta C, Kilkkinen A, Valsta LM (2003) Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br J Nutr* 89:S25-S30.

Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Vlappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A (2001) Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 21:1809-1818.

Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Ciana P, Chambon P, Maggi A (2003) Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9614-9619.

Vegeto E, Ghisletti S, Meda C, Etteri S, Belcredito S, Maggi A (2004) Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17beta-estradiol in macrophage cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 91:59-66.

Veglio F, Paglieri C, Rabbia F, Bisbocci D, Bergui M, Cerrato P (2009) Hypertension and cerebrovascular damage. *Atherosclerosis* 205:331-341.

Vincent A, Fitzpatrick LA (2000) Soy isoflavones: are they useful in menopause? *Mayo Clin Proc* 75:1174-1184.



Wahlgreen NG, Ahmed N (2004) Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies – the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 17:153-166.

Walker HA, Dean TS, Sanders TA, Jackson G, Ritter JM, Chowienczyk PJ (2001) The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human forearm vasculature with similar potency to 17beta-estradiol. *Circulation* 103:258-262.

Wang YT, Salter MW (1994) Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* 369:233-235.

Wang J, Green PS, Simpkins JW (2001) Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrana potential decline and generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 77:804-811.

Wang X, Simpkins JW, Dykens JA, Cammarata PR (2003) Oxidative damage to human lens epithelial cells in culture: estrogen protection of mitochondrial potential, ATP and cell viability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2067-2075.

Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184:53-68.

Wangen KE, Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Marcus R, Phipps WR, Kurzer MS (2000) Effects of soy isoflavones on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3043-3048.

Ward NC, Hodgson JM, Puddey IB, Mori TA, Beilin LJ, Croft KD (2004) Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. *Free Radic Biol Med* 36:226-232.

Washburn S, Burke GL, Morgan T, Anthony M (1999) Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause* 6:7-13.

Weber KS, Setchell KD, Stocco DM, Lephart ED (2001a) Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol* 170:591-599.

Weber KS, Setchell KD, Lephart ED (2001b) Maternal and perinatal brain aromatase: effects of dietary soy phytoestrogens. *Brain Res Dev Brain Res* 126:217-221.

Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y (1995) Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:124-130.

Weinberger JM (2006) Evolving therapeutic approaches to treating acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 249:101-109.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994) Induction of Calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5212-5216.

Welty FK, Lee KS, Lew NS, Zhou JR (2007) Effect of soy nuts on blood pressure and lipid levels in hypertensive, prehypertensive, and normotensive postmenopausal women. *Arch Int Med* 167:1060-1067.

White RE (2002) Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol* 38:73-80.

Wilcox JN, Blumenthal BF (1995) Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. *J Nutr* 125:631S-638S.

Wilson ME, Dubal DB, Wise PM (2000) Estradiol protects against injury-induced cell death in cortical explant cultures: a role for estrogen receptors. *Brain Res* 873:235-242.

Wise PM, Dubal DB, Rau SW, Brown CM, Suzuki S (2005) Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? Reevaluation after the Women's health initiative. *Endocr Rev* 26:308-312.

Wolf PA, D'Agostino RB, O'Neal MA, Sytkowski P, Kase CS, Belanger AJ, Kannel WB (1992) Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. *Stroke* 23:1551-1555.

Yamakoshi J, Piskula MK, Izumi T, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Obata A, Kikuchi M (2000) Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *J Nutr* 130:1887-1893.

Yanagihara N, Toyohira Y, Shinohara Y (2008) Insights into the pharmacological potential of estrogens and phytoestrogens on catecholamine signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1129:96-104.

Yang ST, Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD (1991) Endothelium-dependent responses of cerebral blood vessels during chronic hypertension. *Hypertension* 17:612-618.

Yang G, Shu XO, Jin F, Zhang X, Li HL, Li Q, Gao YT, Zheng W (2005) Longitudinal study of soy food intake and blood pressure among middle-aged and elderly Chinese women. *Am J Clin Nutr* 81:1012-1017.

Yen GC, Lai HH (2003) Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. *J Agric Food Chem* 51:7892-7900.

Zacharek A, Chen J, Cui X, Li A, Li Y, Roberts C, Feng Y, Gao Q, Chopp M (2007) Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27:1684-1691.

Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J (2001) Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38:1395-1399.

Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummings R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20 :84-91.

Zeng H, Chen Q, Zhao B (2004) Genistein ameliorates beta-amyloid peptide (25-35)-induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* 36:180-188.

Zhang DL, Zhang YT, Yin JJ, Zhao BL (2004) Oral administration of Crataegus flavonoids protects against ischemia/reperfusion brain damage in gerbils. *J Neurochem* 90:211-219.

Zhang L, Zhang Z, Zhang RL, Cui Y, LaPointe MC, Silver B, Chopp M (2006) Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. *Brain Res* 1118:192-198.

Zhao L, Chen Q, Diaz Brinton R (2002) Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp Biol Med (Maywood)* 227:509-519.

Zheng W, Dai Q, Custer LJ, Shu XO, Wen WQ, Jin F, Franke AA (1999) Urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:35-40.

Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME (2002) Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295:505-508.

