



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Expresión diferencial de receptores de estrógenos en
diferentes tejidos de un modelo murino de menopausia
experimental.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Serrano Alandí, Paula

Tutor/a: Bañuls Polo, María José

Cotutor/a externo: MEDINA BESSO, PASCUAL

Director/a Experimental: NOVELLA DEL CAMPO, SUSANA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Expresión diferencial de receptores de estrógenos en diferentes tejidos de un modelo murino de menopausia experimental

Paula Serrano Alandí

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Trabajo Final de Grado en Biotecnología

Curso académico 2021/2022

Tutora académica:

Cotutora:

Cotutor:

Maria José Bañuls Polo

Susana Novella del Campo

Pascual Medina Bessó

Valencia, junio de 2022

Título del TFG: Expresión diferencial de receptores de estrógenos en diferentes tejidos de un modelo murino de menopausia experimental.

Titulación: Grado en Biotecnología

Lugar de realización: Instituto de Investigación Sanitaria (INCLIVA)

Alumna: Dña. Paula Serrano Alandí

Tutora académica: Prof. Dña. Maria José Bañuls Polo

Cotutora: Dra. Susana Novella del Campo

Cotutor: Dr. Pascual Medina Bessó

Valencia, junio de 2022

Palabras clave: Receptores de estrógenos, menopausia, ER α , ER β , GPER.

Resumen: Con la menopausia se inicia el climaterio, periodo fisiológico en el que se produce el cese de la fertilidad debido a que los ovarios de una mujer dejan de liberar óvulos. Durante esta etapa, las mujeres pueden experimentar signos y síntomas que se atribuyen a la disminución de hormonas sexuales, principalmente estrógenos y progesterona. La menopausia es una característica casi exclusiva del ser humano, por lo que para el estudio experimental de posibles alteraciones metabólicas y fisiológicas es necesario contar con un modelo experimental. En este sentido, las ratonas SAM (Senescence Accelerated Mouse) resistentes y propensas a desarrollar senescencia (SAMR1 y SAMP8, respectivamente) sometidas a un procedimiento quirúrgico de extirpación de ovarios (ovariectomía), permiten estudiar el efecto de la ausencia de hormonas sexuales y, además, determinar la contribución del envejecimiento, proceso también asociado a la menopausia.

Dentro del grupo de los estrógenos, es el 17 β -estradiol (estradiol) el que ejerce los efectos estrogénicos más potentes. Las funciones fisiológicas del estradiol están reguladas por los receptores de estrógenos (ER, de sus siglas en inglés), siendo los principales el ER α , el ER β y el receptor de estrógenos asociado a proteína G, GPER. ER α y ER β tienen funciones reguladoras en la transcripción de genes diana, se expresan en gran variedad de células y tejidos, y modulan distintas funciones fisiológicas además de las reproductivas, principalmente a través de acciones a nivel cardiovascular, esquelético y nervioso. El GPER, también tiene un papel importante en eventos rápidos de señalización no genómica debido a la activación de numerosas vías de señalización intracelular como la PI3/AKT o MAPK ERK1/2. Todos los receptores de estrógenos tienen algunas funciones comunes pero su papel es más o menos destacado dependiendo del tejido en el que se expresen.

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar si la ausencia de hormonas ováricas inducida por una menopausia experimental produce una alteración en la expresión de receptores de estrógenos en diferentes tejidos. Para ello, nos hemos centrado en estudiar la expresión por qRT-PCR de los principales receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER en diferentes tejidos procedentes del modelo murino de menopausia experimental SAMR1/SAMP8, concretamente en corazón, bazo, pulmón, hígado y riñón.

Títol del TFG: Expressió diferencial de receptors d'estrògens en diferents teixits d'un model murí de menopausa experimental.

Paraules clau: Receptors d'estrògens, menopausa, ER α , ER β , GPER.

Resumen: Amb la menopausa s'inicia el climateri, període fisiològic en què es produeix el cessament de la fertilitat perquè els ovaris de la dona deixen d'alliberar òvuls. Durant aquesta etapa, les dones poden experimentar signes i símptomes que s'atribueixen a la disminució d'hormones sexuals, principalment estrògens i progesterona. La menopausa és una característica quasi exclusiva de l'ésser humà, per la qual cosa per a l'estudi experimental de possibles alteracions metabòliques i fisiològiques cal tenir un model experimental. En aquest sentit, els ratolins SAM (Senescence Accelerated Mouse) resistents i propensos a desenvolupar senescència (SAMR1 i SAMP8, respectivament) sotmeses a un procediment quirúrgic d'extirpació d'ovaris (ovariectomia), permeten estudiar l'efecte de l'absència d'hormones sexuals i, a més, determinar la contribució de l'envelliment, procés també associat a la menopausa.

Dins del grup dels estrògens, és el 17 β -estradiol (estradiol) el que exerceix els efectes estrogènics més potents. Les funcions fisiològiques de l'estradiol estan regulades pels receptors d'estrògens (ER, de les sigles en anglès), els principals són l'ER α , l'ER β i el receptor d'estrògens associat a proteïna G, GPER. ER α i ER β tenen funcions reguladores a la transcripció de gens diana, s'expressen en gran varietat de cèl·lules i teixits, i modulen diferents funcions fisiològiques a més de les reproductives, principalment a través d'accions a nivell cardiovascular, esquelètic i nerviós. El GPER també té un paper important en esdeveniments ràpids de senyalització no genòmica a causa de l'activació de nombroses vies de senyalització intracel·lular com la PI3/AKT o MAPK ERK1/2. Tots els receptors d'estrògens tenen algunes funcions comunes però el seu paper és més o menys destacat depenent del teixit on s'expressen.

En aquest context, aquest treball té com a objectiu estudiar si l'absència d'hormones ovàriques induïda per una menopausa experimental produeix una alteració en l'expressió de receptors d'estrògens en diferents teixits. Per això, ens hem centrat a estudiar l'expressió per qRT-PCR dels principals receptors d'estrògens ER α , ER β i GPER en diferents teixits procedents del model murí de menopausa experimental SAMR1/SAMP8, concretament en cor, melsa, pulmó, fetge i renyó .

Title: Differential expression of estrogen receptors in different tissues of a murine model of experimental menopause.

Keywords: estrogen receptors, menopause, ER α , ER β , GPER.

Abstract: Menopause is the beginning of the climacteric, a physiological period in which fertility ceases because a woman's ovaries stop releasing eggs. During this stage, women may experience signs and symptoms that are attributed to the decrease in sex hormones, mainly estrogen and progesterone. Menopause is an almost exclusive characteristic of human beings, so for the experimental study of possible metabolic and physiological alterations it is necessary to have an experimental model. In this sense, SAM (Senescence Accelerated Mouse) resistant and senescence-prone mice (SAMR1 and SAMP8, respectively) subjected to a surgical procedure of ovarian removal (ovariectomy), allow us to study the effect of the absence of sex hormones and, in addition, to determine the contribution of aging, a process also associated with menopause.

Within the estrogen group, it is 17 β -estradiol (estradiol) that exerts the most potent estrogenic effects. The physiological functions of estradiol are regulated by estrogen receptors (ER), the main ones being ER α , ER β and the G protein-associated estrogen receptor, GPER. ER α and ER β have regulatory functions in the transcription of target genes, are expressed in a wide variety of cells and tissues, and modulate different physiological functions in addition to reproductive ones, mainly through actions at the cardiovascular, skeletal and nervous levels. GPER also plays an important role in rapid non-genomic signaling events due to the activation of numerous intracellular signaling pathways such as PI3/AKT or MAPK ERK1/2. All estrogen receptors have some common functions but their role is more or less prominent depending on the tissue in which they are expressed.

In this context, the present work aims to study whether the absence of ovarian hormones induced by an experimental menopause produces an alteration in the expression of estrogen receptors in different tissues. To this end, we have focused on studying the expression by qRT-PCR of the main estrogen receptors ER α , ER β and GPER in different tissues from the murine model of experimental menopause SAMR1/SAMP8, specifically in heart, spleen, lung, liver and kidney.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todos los que han estado presentes durante la realización del TFG:

A Susana y Pascual, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y por hacérmelo todo mucho más fácil.

A todos los lincees, por todo el apoyo y la buena compañía, pero en especial a Javier, que es quien más ha tenido que aguantar. Gracias por ayudarme a sacar el TFG adelante y por todas las risas que me has sacado cada día. Ojalá todos tengan la suerte de encontrar un compi de lab como tú.

A mis amigas Carmen, Empar y Andrea, por estar en cada momento, tanto bueno como malo, y siempre darme razones para seguir adelante.

A Mara, por haber estado toda la carrera mano a mano y por haber pasado todo juntas.

A mis padres y a mi hermana, por apoyarme en todo lo que hago. Gracias por todo lo que habéis hecho por mí.

Y por último a Marta, por haber estado toda la carrera a mi lado, desde que recibí el mensaje de admisión hasta la entrega del TFG, siempre apoyándome y dándome fuerza en cada momento, por aguantar lo inaguantable y ponerse más nerviosa que yo en cada examen que hacía. Gracias por acompañarme en cada etapa y seguir a mi lado siempre.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Menopausia y ovariectomía	1
1.2 Estrógenos y sus receptores	2
1.3 Modelo murino de menopausia experimental	6
2. Hipótesis y objetivos	6
3. Materiales y métodos	7
3.1 Muestras y grupo de estudio	8
3.2 Extracción de órganos	8
3.3 Extracción de RNA total	9
3.4 Reacción de amplificación mediante PCR	10
3.5 Análisis estadístico	11
4. Resultados	11
4.1 Comprobación de expresión de RE en diferentes tejidos	11
4.2 Influencia de la senescencia en la expresión de los receptores de estrógenos en los diferentes tejidos	13
4.3 Efecto de la ovariectomía en la expresión de los receptores de estrógenos en los tejidos.	16
5. Discusión	19
6. Conclusiones	22
7. Bibliografía	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descenso de los niveles de estrógenos con la edad

Figura 2. Organización estructural de los receptores de estrógenos

Figura 3. Expresión de ER α (A), ER β (B) y GPER (C) en pulmón, bazo, riñón, hígado y corazón en ratonas Sham SAMR1

Figura 4. Expresión de ER α , ER β y GPER en los pulmones (A), bazo (B), riñones (C), hígado (D) y corazón (E) hígado de ratonas Sham SAMR1

Figura 5. Expresión de ER α en diferentes tejidos en ratonas Sham SAMR1 y SAMP8

Figura 6. Expresión de ER β en diferentes tejidos en ratonas Sham SAMR1 y SAMP8

Figura 7. Expresión de GPER en diferentes tejidos en ratonas Sham SAMR1 y SAMP8

Figura 8. Expresión de ER α , ER β y GPER en los pulmones de ratonas Sham y OVX SAMR1 (A) y SAMP8 (B)

Figura 9. Expresión de ER α , ER β y GPER en el bazo de ratonas Sham y OVX SAMR1 (A) y SAMP8 (B)

Figura 10. Expresión de ER α , ER β y GPER en los riñones de ratonas Sham y OVX SAMR1 (A) y SAMP8 (B)

Figura 11. Expresión de ER α , ER β y GPER en el hígado de ratonas Sham y OVX SAMR1 (A) y SAMP8 (B)

Figura 12. Expresión de ER α , ER β y GPER en el corazón de ratonas Sham y OVX SAMR1 (A) y SAMP8 (B)

ABREVIATURAS

cDNA: DNA complementario

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E1: Estrona

E2: 17 β -estradiol

E3: Estriol

ER α : Receptor de estrógenos alfa

ER β : Receptor de estrógenos beta

ERE: Elementos de respuesta al estrógeno

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GPER: Receptor de estrógenos acoplado a la proteína G

GPR30: Receptor 30 acoplado a proteína G

mRNA: RNA mensajero

OMS: Organización Mundial de la Salud

OVX: Ovariectomizado

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RE: Receptor de estrógenos

RNA: Ácido ribonucleico

RT: Transcripción reversa

RT-PCR: PCR con transcriptasa reversa

SAM: Senesce Accelerated Mouse

SAMR1: SAM resistente

SAMP8: SAM propenso

1. Introducción

1.1 Menopausia y ovariectomía

La menopausia marca el inicio del climaterio, proceso fisiológico que tiene lugar aproximadamente en el último tercio de vida de las mujeres, justo tras finalizar sus años reproductivos por el cese de la menstruación y, por tanto, de la fertilidad (Takahashi y Johnson, 2015). Se diagnostica cuando una mujer no ha menstruado durante un año debido a la pérdida de la actividad folicular ovárica y generalmente tiene una duración de varios años. La menopausia está precedida de una etapa denominada perimenopausia, que es una transición menopáusica donde las mujeres experimentan un ciclo menstrual irregular haciendo frente al cese de la producción de ovocitos en los ovarios (Potter *et al.*, 2018). La perimenopausia precede a la menopausia durante varios años y se caracteriza, además de la irregularidad del ciclo menstrual, por los sofocos y sudores nocturnos (Takahashi y Johnson, 2015).

Durante la menopausia destacan principalmente los cambios hormonales que se dan en las mujeres, ya que los ovarios dejan de liberar óvulos, y, en consecuencia, dejan de producir hormonas como progesterona y los estrógenos. Esto se puede observar en la Figura 1, la cual explica mediante una gráfica como van disminuyendo los niveles de estrógenos durante el periodo de los 40-50 años hacia adelante, correspondiéndose con la etapa de la menopausia.

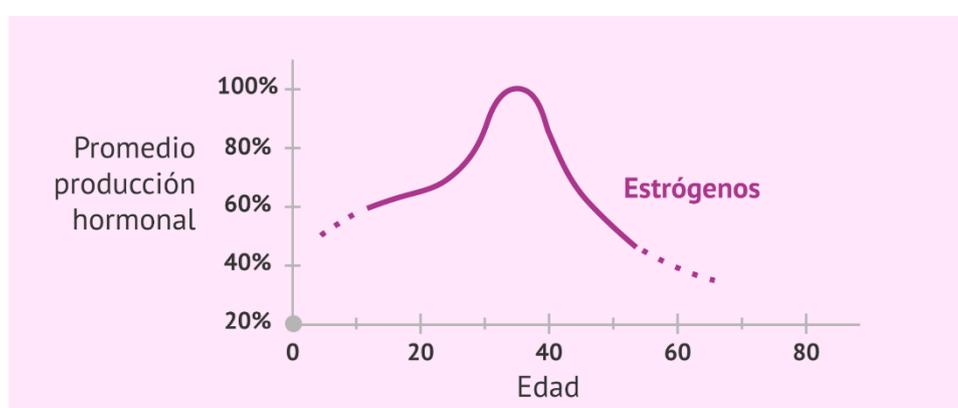


Figura 1. Descenso de los niveles de estrógenos con la edad (Villar *et al.*, 2022).

Estos cambios hormonales provocan una gran cantidad de síntomas que afectan a la mayoría de mujeres durante esta etapa. Los que más destacan son la disfunción vasomotora, los cambios de humor, trastornos del sueño, cambios cognitivos, quejas somáticas, disfunción sexual y reducción de la calidad de vida (Nelson, 2008). Además, hay otros síntomas importantes como los síntomas genitourinarios, que incluyen sequedad vulvovaginal y atrofia, síntomas del tracto urinario inferior, que incluyen polaquiuria, urgencia y nicturia (Takahashi y Johnson, 2015).

Actualmente, un gran número de alteraciones fisiológicas (Vieira *et al.*, 2017), metabólicas e inmunológicas (de Arruda Amaral *et al.*, 2018) que ocurren durante la menopausia son todavía desconocidos o no se conoce completamente el mecanismo, por lo que se recurre a un modelo animal que ayude a estudiar dichos cambios. El problema reside en que los roedores y primates no humanos presentan un patrón de cambio de estrógenos a lo largo de la vida diferente al de los humanos. La senescencia reproductiva natural de los roedores se denomina estropausia, cuyo proceso es el siguiente: al comienzo, los ciclos se vuelven irregulares hasta mediana edad antes de volverse acíclicos (Berkley *et al.*, 2007), sin embargo, en los roedores, la estropausia ocurre debido a una reducción en el aumento de las gonadotropinas (suele ocurrir antes de la ovulación), mientras que en las mujeres la menopausia ocurre por una reducción en los folículos ováricos a lo largo de la vida (Finch, 2014).

Por tanto, para establecer un modelo experimental adecuado, los animales tienen que ser sometidos a un procedimiento denominado ovariectomía, el cual consiste en extirpar quirúrgicamente los ovarios para que los animales experimenten una deficiencia de estrógenos, tal y como ocurre con la menopausia (Souza *et al.*, 2019). Con este modelo experimental, se ha podido estudiar en profundidad la acción de las hormonas ováricas en muchos órganos y sistemas, así como algunos efectos relacionados con la menopausia como la osteoporosis (Sophocleous e Idris, 2014), trastornos cardiometabólicos (Cox-York *et al.*, 2015) o enfermedades inflamatorias (Mendes *et al.*, 2017). No obstante, cabe tener en cuenta que, aunque la ovariectomía permite modelar la pérdida de estrógenos, con el tiempo se va diferenciando de los cambios que ocurren en la menopausia natural (Russell *et al.*, 2019).

1.2 Estrógenos y sus receptores

Los estrógenos son las principales hormonas sexuales femeninas producidas en los ovarios y glándulas suprarrenales. Su síntesis parte del colesterol, a partir del cual se

producen los andrógenos y, estos, por acción de la enzima aromatasa, sintetizan el estrógeno. Hay tres tipos de estrógenos fundamentalmente; el estradiol (E2), cuya síntesis tiene lugar a partir de la testosterona, la estrona (E1), derivada de la progesterona y el estriol (E3), obtenido a partir de la androsterona. Existen otros tipos de estrógenos que se pueden encontrar en anticonceptivos orales: los estrógenos semisintéticos o sintéticos, como el etinilestradiol y mestranol o los estrógenos no esteroides, como estilbenos, isoflavonas y otros fitoestrógenos cuyo origen es vegetal (de Miguel *et al.*, 2019).

En los seres humanos, el 17β -estradiol (E2) es la forma más común de estrógeno circulante y es la principal hormona sexual femenina. Su producción tiene lugar en los ovarios y circula por el plasma transportado por la globulina transportadora de hormonas sexuales, para incorporarse a los tejidos diana por difusión pasiva a través de la membrana plasmática de las células (Palmisano *et al.*, 2017). Otra forma de producción de estrógenos es a partir de los precursores androgénicos, como la testosterona, la cual se aromatiza para producir estradiol. Ocurre en los testículos y sitios no ováricos como el cerebro, glándulas suprarrenales, piel, grasa o médula ósea, donde se expresa la aromatasa (Ryan, 1982).

Desde un punto de vista fisiológico, el E2 es una hormona sexual que tiene efectos directos sobre el desarrollo y funcionamiento del sistema reproductivo femenino (Patel, 2017), ya que estimulan el crecimiento uterino y regulan la síntesis del receptor de progesterona. Además de tener su papel principal en funciones reproductivas, participa en importantes funciones fisiológicas como el mantenimiento de la homeostasis del sistema endocrino, cardiovascular, metabólico y desarrollo óseo (Li y Wang, 2018) ya que sus receptores se expresan en gran cantidad de tejidos y órganos, como el corazón (Karas *et al.*, 1994), cerebro (McEwen *et al.*, 1979), huesos (Laurent *et al.*, 2014), hígado (Shi *et al.*, 2014), tejido adiposo (Kim *et al.*, 2014), colon (Barzi *et al.*, 2013), piel (Stevenson y Thornton, 2007), próstata (Yeh *et al.*, 2014), testículos (Royer *et al.*, 2012), epidídimo (Hess *et al.*, 2011) y glándulas salivales (Imamov *et al.*, 2005).

El E2 desempeña sus efectos reguladores mediante acciones genómicas y no genómicas (Marino *et al.*, 2006). Se une a los receptores de estrógenos (RE) clásicos, el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y el receptor de estrógenos beta ($ER\beta$) en el citosol. Cuando se forma el complejo de los receptores unidos a E2, se dan lugar cambios conformacionales donde se dimerizan, translocan al núcleo y pueden unirse a secuencias de DNA (los elementos de respuesta al estrógeno, ERE) o unirse indirectamente al DNA, en los promotores o a los factores de transcripción, y, de este modo, regular la transcripción de

genes (Fuentes y Silveyra, 2019). Además, pueden activar numerosas vías de señalización al unirse a ER asociados a la membrana (Mendelsohn, 2002).

Por lo tanto, las funciones fisiológicas de los compuestos estrogénicos están moduladas mayoritariamente por ER α y ER β . Como se puede observar en la Figura 2, ambos receptores tienen una estructura similar compuesta por seis dominios. El dominio A/B es el sitio de la activación transcripcional, con el coactivador, AF-1. El dominio C es el sitio de unión al DNA. La bisagra del dominio D contiene una señal de localización nuclear. El dominio E es el dominio de unión al ligando y el lugar de la activación transcripcional, con el coactivador, AF-2. Por último, el dominio F puede desempeñar un complejo papel regulador. Ambos comparten gran homología en la secuencia de aminoácidos a excepción del dominio N-terminal. La homología del 55% entre ER α y ER β en el dominio de unión al ligando da lugar a las afinidades variables. Mientras que ambos muestran una afinidad similar al E2, el ER α tiene una mayor afinidad a la estrona y el ER β tiene una mayor afinidad al estriol (Hsu *et al.*, 2017).

No obstante, ambos se unen a la misma secuencia de DNA, el ERE o elemento de respuesta a estrógenos, e interactúan con los mismos corre reguladores (coactivadores y corre presores que interactúan con ambos receptores influyendo en la capacidad de estos de activar o inhibir la expresión de un gen). A pesar de interactuar con los mismos corre reguladores, ambos tienen diferentes efectos biológicos y una distribución tisular diferencial (Hall *et al.*, 2001).

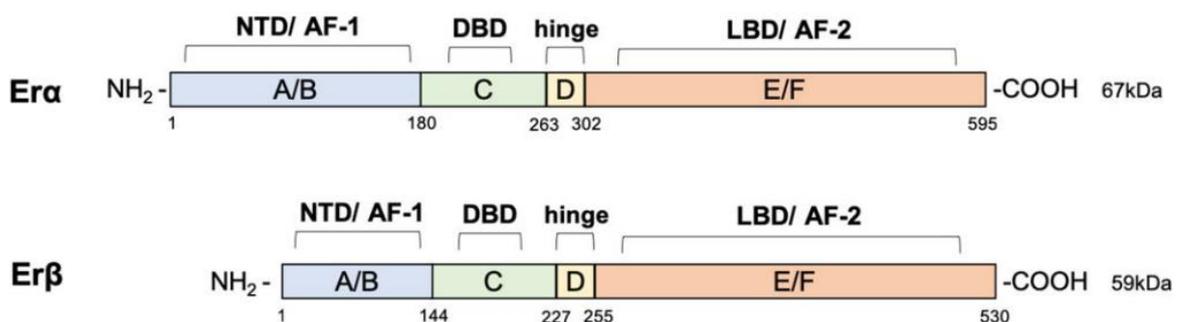


Figura 2. Organización estructural de los receptores de estrógenos. Los dominios estructurales del receptor de estrógeno α (ER α) (595aa) y del ER β (530aa) están marcados de la A a la F. Ambos receptores tienen 6 dominios estructurales y funcionales diferentes: N- terminal (NTD, dominios A/B, AF-1), el dominio de unión al DNA (DBD, dominio C), la bisagra (dominio D), la región C-terminal que contiene el dominio de unión al ligando (LBD, dominio E/F, AF-2) (Fuentes y Silveyra, 2019).

En los seres humanos, ambos receptores se expresan en varios órganos y sistemas, como el reproductivo, esquelético, cardiovascular y sistema nervioso central, así como tejidos específicos como el mamario, subcutáneo o subcompartimentos de próstata y ovario, ejerciendo funciones fisiológicas comunes como el desarrollo y función de los ovarios y la protección del sistema cardiovascular. No obstante, ER α se localiza principalmente en la glándula mamaria, útero, en las células tecales del ovario, hueso, testículo, epidídimo, en el estroma de la próstata, hígado y tejido adiposo. Es por esto por lo que este receptor tiene un papel notable en la glándula mamaria y útero, además de la regulación del metabolismo y la preservación de la homeostasis esquelética. Por otro lado, el ER β se encuentra en el epitelio de la próstata, vejiga, células de la granulosa del ovario, colon, tejido adiposo y sistema inmunitario, por lo que su efecto será más destacado en el sistema nervioso central y el inmunitario. Generalmente, contrarresta la hiperproliferación celular promovida por ER α en tejidos como la mama y útero (Paterni *et al.*, 2014).

Otro de los receptores que ha ganado importancia en la última década es el receptor de estrógeno acoplado a la proteína G (GPER), originalmente llamado receptor 30 acoplado a proteína G (GPR30). Es un receptor de estrógenos implicado en respuestas rápidas no genómicas (Tutzauer *et al.*, 2020). A diferencia de los RE clásicos, GPER es una proteína de siete dominios transmembrana que se expresa en la membrana plasmática, aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Revankar *et al.*, 2005). GPER, además de poseer una estructura diferente a la de ER α y ER β , difiere también en su mecanismo de acción. GPER activa vías de transducción de señales que llevan a cabo la fosforilación de proteínas sustrato, siendo algunas de ellas factores de transcripción. Además, uno de los factores de transcripción que está aguas abajo de GPER es ER α , lo que podría indicar una posible interacción entre los efectos no genómicos y genómicos de los estrógenos (Clark *et al.*, 2014).

Según algunos estudios (Kvingedal y Smeland, 1997), GPER se expresa en varios tejidos, como el músculo esquelético, tejidos linfoides, pulmones, corazón, cerebro, hígado y epidídimo y en células como las de Sertoli y Leydig (Walczak-Jędrzejowska *et al.*, 2022). Además, al tener E2 mayor capacidad de unión a GPER que a otros receptores como el ER α (Hong *et al.*, 2019), posee un papel fundamental en la regulación de las funciones fisiológicas (Ulhaq *et al.*, 2021).

1.3 Modelo murino de menopausia experimental

El envejecimiento y la pérdida de estrógenos provocados por la menopausia se han relacionado en algunos casos con los diferentes niveles de expresión de receptores de estrógenos en los tejidos. En este estudio se ha utilizado un modelo murino de menopausia experimental compuesto por ratonas SAMR1 y SAMP8 ovariectomizadas, previamente caracterizadas por nuestro grupo de investigación a nivel cardiovascular (Novella *et al.*, 2010). Se trata de un modelo desarrollado en ratonas con senescencia acelerada (SAM, *Senescence Accelerated Mouse*) conseguido por selección fenotípica a partir de una colonia de AKR/J descrito por Takeda (Takeda *et al.*, 1981). Este modelo se compone de dos cepas diferentes, SAMR1, con resistencia al desarrollo de la senescencia y por tanto con envejecimiento biológico, y SAMP8, la cepa con predisposición a la senescencia. En este estudio se ha hecho uso de un modelo experimental de menopausia, las SAMR1 y SAMP8 ovariectomizadas.

El modelo murino SAMP8 se caracteriza por presentar el envejecimiento de forma temprana, el cual se manifiesta con lesiones y signos, como las lesiones en la piel, pérdida de pelo, lordocifosis, alteración del comportamiento y una esperanza de vida más corta después de un periodo normal de desarrollo; SAMP demostró tener una esperanza de vida 40% menor al de SAMR (9,7 y 16,3 meses, respectivamente) (Takeda *et al.*, 1981).

En la tesis realizada por Vidal-Gómez en 2018, (Vidal-Gómez, 2018), se estableció la esperanza de vida máxima y media de ratonas SAM mediante curvas de supervivencia. Estas indicaron que existe una diferencia significativa entre ambas colonias, ya que la longevidad media de la cepa SAMP8 era de 12 meses y la máxima de 22, mientras que la de SAMR1 eran 22 meses de media y 38 meses de máxima. Además, se demostró que enfermedades dependientes de la edad en humanos, como osteoporosis, osteoartritis, cataratas y pérdida de audición afectan más a esta cepa. Con todo ello, se considera el modelo SAMP8 como un modelo válido para estudiar procesos fisiológicos relacionados con el envejecimiento (Takeda, 2009).

2. Hipótesis y objetivos

A partir de la menopausia, se observa un descenso en los niveles de estrógenos que conduce a una mayor incidencia de enfermedades, como la osteoporosis, enfermedades metabólicas, psiquiátricas o cardiovasculares. De forma general, la menopausia aparece en edades avanzadas en las que también existe envejecimiento por parte de los tejidos, por lo que el

aumento de la incidencia de estas enfermedades podría atribuirse a la falta de estrógenos debido a la menopausia, al envejecimiento de tejidos o a ambos.

Los receptores de estrógenos son capaces controlar la expresión de genes a nivel genómico, uniéndose a promotores o interactuando con factores de transcripción, y no genómico, a través de vías de transducción de señales. Esto indica que tienen funciones muy importantes y que su regulación y modulación podrían ayudar a comprender el papel que desempeña la falta de estrógenos en el desarrollo de enfermedades.

La hipótesis del presente trabajo es que la expresión de los diferentes receptores de estrógenos varía en diferentes tejidos en función del envejecimiento y de la presencia de hormonas ováricas. El modelo murino de menopausia experimental SAMR1 y SAMP8 permite estudiar tanto los efectos de la ausencia de hormonas ováricas como del envejecimiento.

Para abordar la hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Determinar los niveles de expresión de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER en diferentes órganos: pulmón, hígado, corazón, riñón y bazo.
- Comparar los niveles de expresión de los distintos receptores estrógenos en los órganos estudiados.
- Determinar el efecto del envejecimiento en los niveles de expresión de receptores de estrógenos en los órganos estudiados.
- Determinar el efecto de la ovariectomía en SAMR1 y SAMP8 para estudiar la contribución del envejecimiento y la menopausia en la expresión de receptores de estrógenos.

3. Materiales y métodos

Todos los protocolos experimentales necesarios para la realización del presente estudio fueron aprobados por la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València (número de autorización de la Generalitat Valenciana 2020/VSC/PEA/0128) y los experimentos se realizaron de acuerdo con el Real decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación.

3.1 Muestras y grupo de estudio

Para la realización de este trabajo experimental, se utilizaron hígados, pulmones, bazo, riñones y corazones extraídos de animales de experimentación en abril de 2022 por el grupo del Laboratorio de Investigación de Células Endoteliales (L.In.C.E.), del Departamento de Fisiología de la Universitat de València. Todos los tejidos fueron conservados en RNAlater (Ambion) y a -80°C en las instalaciones de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM) de la Universitat de València. Las muestras biológicas procedían de ratonas con senescencia acelerada (SAM, Senescence Accelerated Mouse), resistentes (SAMR) al desarrollo de senescencia acelerada y propensas (SAMP) a desarrollar senescencia, y en concreto de las cepas SAMR1 y SAMP8 de las que se mantiene una colonia en el animalario de la UCIM.

Para determinar el efecto de la falta de estrógenos y envejecimiento, se han utilizado los órganos procedentes de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a ovariectomía. El procedimiento quirúrgico se realizó en ambas cepas a los 5 meses de edad. Las ratonas se anestesiaron mediante la administración de isoflurano por vía inhalatoria, además de buprenorfina por vía subcutánea. Una vez se comprobó que el animal no presentaba reflejos podales y después de desinfectar la zona a abordar, se realizó una incisión de 0,5 cm en el borde dorsal de la última costilla de cada flanco lateral para proceder a la extirpación de ambos ovarios, el oviducto y la grasa ovárica. Finalizada la intervención, se administró meloxicam en perfusión continua durante 3 días como analgesia postoperatoria. El grupo al que solamente se les realizó la ovariectomía se denominó OVX. El grupo denominado Sham es considerado como grupo control de cirugía, ya que se les realizó la misma intervención quirúrgica, pero sin la extirpación de los órganos reproductores, con la intención de que sufrieran el mismo estrés quirúrgico que los otros grupos experimentales, y los resultados obtenidos no se vieran afectados por los procedimientos quirúrgicos. Estos roedores fueron sacrificados 28 días después de realizarles dicha intervención quirúrgica. A la edad de 6 meses, se utilizaron 12 animales SAMR1 y SAMP8 de los que 6 fueron SHAM y los otros 6 OVX por lo que cada grupo de estudio tiene una n = 6.

3.2 Extracción de órganos

Una vez realizado el sacrificio de las ratonas, se aislaron inmediatamente todos los órganos en una placa Petri con solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) a 4°C. Las muestras fueron

cuidadosamente limpiadas eliminando toda grasa visceral y adherencias con tijeras de microdissección, bajo una lupa estereoscópica (Nikon Instruments Inc) e iluminada con luz fría (EK-1, Euromex). Al finalizar, estas muestras se conservaron en RNAlater (Ambion) a una temperatura de -80°C hasta su posterior uso.

3.3 Extracción de RNA total

Para la obtención de RNA total primero se procedió a la digestión de los órganos con Tissue Lyser LT (Qiagen). Este procedimiento consiste en descongelar el órgano conservado en RNAlater (Ambion) de forma gradual en hielo, cortar un trozo de este sobre una placa Petri e introducirlo en un eppendorf con una bolita metálica. A continuación, tras congelarlo en nitrógeno líquido y añadir 500 µL de TRIzol Reagent (ThermoFisher Scientific), se introduce en el Tissue Lyser y tras 5 o 10 minutos ya se obtiene la muestra digerida. El Tissue Lyser permite la disrupción y homogenización simultáneas de la muestra mediante la agitación a alta velocidad de estas en tubos de microcentrífuga de 2 mL con perlas de acero inoxidable.

Posteriormente se procedió a la purificación del RNA. Para ello, sobre el tejido previamente homogenizado, se añadieron 200 µL de cloroformo para ver la separación de fases. Tras invertir el eppendorf unas 10 veces y pasar la muestra por el vortex 30 segundos, se incubó 3 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 15 min a 17000 rpm a 4°C. La centrífuga utilizada en todo el proceso fue la Centrifuge 5415R (Eppendorf). A continuación, se transfiere la fase acuosa transparente cuidadosamente a otro eppendorf, ya que en ésta es donde se encuentra el RNA. Para la precipitación de RNA se añadieron 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (sobre 20°C). Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 17000 rpm y a 4°C. Al acabar la centrifugación, se observa un pellet en el fondo del eppendorf, que corresponde a RNA precipitado. Para realizar el lavado, se procede a eliminar el sobrenadante, se añade 1 mL de etanol al 75% (etanol puro diluido con agua libre de RNA) y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones que anteriormente. Finalmente, se elimina el sobrenadante, se deja secar las muestras durante 5-10 min, se eluye el RNA con RNase-free water y se cuantifica en el Nanodrop (NanoDrop One/One, ThermoFisher Scientific), esperando conseguir un ratio A_{260}/A_{280} de 2.0-2.2. Este ratio es importante para evaluar la pureza de la muestra y comprobar si existe o no contaminación. Si el ratio es mayor a 1.7, la pureza es aceptable, si es menor a 1.7 significa que el RNA está contaminado por compuestos aromáticos y si está entre 2.0-2.2 la pureza de la muestra es óptima.

3.4 Reacción de amplificación mediante PCR

La transcripción reversa o retrotranscripción (RT) es la síntesis de DNA monocatenario (DNA complementario o cDNA) con RNA monocatenario como plantilla gracias a la acción de enzimas transcriptasas reversas para su posterior amplificación por PCR. Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción de mRNA a cDNA, se hizo uso de *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se realizó a partir de 400 ng de RNA total en un volumen de reacción de 15 µL que contenía agua libre de RNA, solución tampón, dNTPs, random primers y la enzima transcriptasa reversa Multiscribe. Una vez preparada, se llevó a cabo la RT en el termociclador MasterCycler 5891T13 (Eppendorf). El programa utilizado consistió en: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C y 5 min a 85°C. Cuando finalizó la RT, las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

La expresión de los receptores de estrógenos seleccionados (ER α , ER β y GPER) se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), con la que se amplifican, detectan y cuantifican secuencias específicas. Para comenzar con esta técnica, se procede a la desnaturalización del DNA de doble cadena, con el fin de que los cebadores puedan unirse. El enzima polimerasa Taq DNA polimerasa incluida en el mix (Thermo Fisher Scientific) se encarga de sintetizar nuevas cadenas de DNA a partir del cDNA y las sondas específicas de secuencia. La PCR se llevó a cabo mediante el iTaq TM Universal SYBR Green super mix (Bio-Rad Laboratories INC., Madrid, Spain). Además, se utilizaron sondas de expresión SYBR Green para cada uno de los receptores de interés. La qRT-PCR se realizó en el servicio de qRT-PCR de la UCIM (termociclador 7900HT). Las condiciones de la qRT-PCR se establecieron en base a las instrucciones del fabricante.

Los primers utilizados en la realización del trabajo fueron los siguientes:

Gen	Forward	Reverse
GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG
ER α	TCTGCCAAGGAGACTCGCTACT	GGTGCATTGGTTTGTAGCTGGAC
ER β	GGTCCTGTGAAGGATGTAAGGC	AACACTTGCGAAGTCGGCAGG
GPER	GCCACATAGTCAACCTTGCAGC	CGTCTTCTGCTCCACATAGAGC

Cuando la PCR finalizó, el software QuantStudio (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) facilitó para cada pocillo, un valor de ciclo umbral (CT, Cycle Threshold). Este valor

indicó el número de ciclo de amplificación de PCR en el que la fluorescencia detectada supera el ruido de fondo de la reacción. La expresión de cada receptor fue normalizada por la expresión del control endógeno GAPDH. Se hizo uso de este gen ya que otros estudios (Lin y Redies, 2012) lo proponen como control endógeno en diferentes tejidos y en nuestros resultados mostraba un coeficiente de variación y expresión adecuadas para ser consideradas como tal. Cada una de las muestras fue analizada por duplicado y la expresión se calculó por el método $2^{-\Delta Ct}$, donde ΔCt es la diferencia entre el Ct del gen problema y el Ct del gen endógeno. Para el análisis de resultados se utilizó el software QuantStudio 1.3 (ThermoFisher Scientific).

3.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Prism 8 (GraphPad Software Inc.). Primero se llevó a cabo una prueba de identificación de valores atípicos, y se realizó un análisis de normalidad de los datos con el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov. Una vez se demostró la normalidad de la muestra, los grupos experimentales se compararon mediante un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA). En aquellos análisis en los que el ANOVA mostró diferencias se realizó un post-test de Bonferroni. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas cuyo valor p fuera menor a 0.05. Las diferencias significativas han sido indicadas como *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001.

4. Resultados:

4.1 Comprobación de expresión de RE en diferentes tejidos

En primer lugar, se determinó si los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER se expresaban en todos los órganos estudiados. Para ello, se realizó un análisis de expresión inicial mediante qRT-PCR en muestras procedentes de 3 ratonas hembras Sham SAMR1, con una n de 4-6.

Se pudo observar que, efectivamente, los receptores de estrógenos se expresan en pulmón, corazón, riñón, hígado y bazo de la cepa SAMR1. Además, se observó una diferencia de expresión de los tres receptores de estrógenos analizados en los diferentes tejidos (Figuras 3 - 5). Los niveles de expresión del ER α fueron superiores a los obtenidos en ER β y GPER en todos los órganos.

Centrándonos en cada tipo de receptor, observamos también una diferente expresión de los receptores de estrógenos en cada órgano. El ER α se expresa mayoritariamente en el hígado y corazón, y en menor medida en pulmón, bazo y riñón (Figura 3A).

En el caso de ER β (Figura 3B), se observó que es en el corazón el órgano donde se producía mayor expresión, a diferencia del pulmón, bazo, riñón e hígado. No obstante, los valores de expresión de todos eran muy bajos en comparación con los demás receptores. Con un patrón de expresión similar a lo que ocurre con ER β , pero con niveles de expresión comparables a los de ER α , GPER se expresó en mayor medida en el corazón de ratonas SAMR1 (Figura 3C).

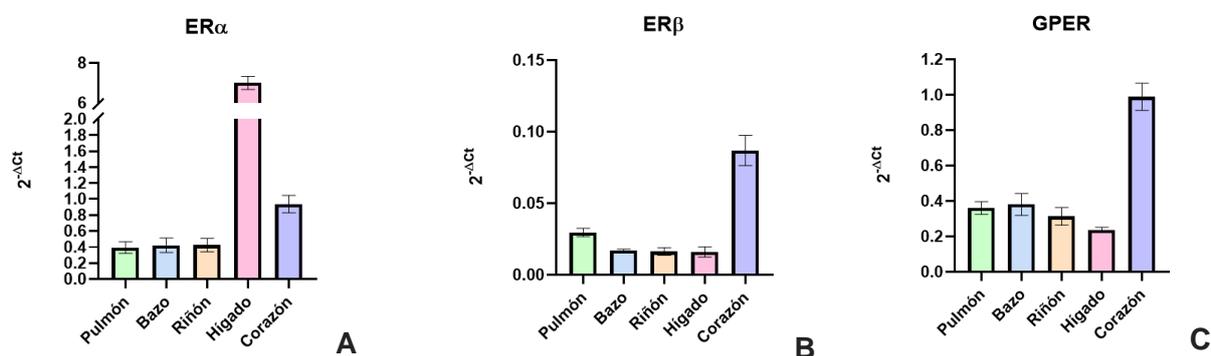


Figura 3. Expresión de ER α (A), ER β (B) y GPER (C) en pulmón, bazo, riñón, hígado y corazón en ratonas Sham SAMR1. Los datos fueron obtenidos mediante método $2^{-\Delta Ct}$ y los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 4 - 6).

Por lo tanto, si nos fijamos en los niveles de expresión, son muy diferentes para los receptores, en especial ER β , que tuvo valores muy bajos. Por otro lado, ER α y GPER presentaron niveles muy similares en pulmón, bazo y riñón.

Una vez comprobada la expresión de los receptores de estrógenos en los órganos estudiados, comparamos los niveles de expresión de los RE en los diferentes órganos (Figura 4A-E). El pulmón, bazo y riñón mostraron un patrón de expresión de receptores similar (Figura 4A, 4B y 4C), con mayor expresión de ER α y GPER que de ER β .

Por otra parte, el hígado y el corazón también comparten un patrón de expresión similar pero las diferencias de expresión son mayores que en los órganos anteriores. En el hígado (Figura 4D), el ER α ($2^{-\Delta Ct} = 7.0 \pm 0.3$) se expresa significativamente más que el ER β y GPER (con

$2^{-\Delta Ct}$ de 0.016 ± 0.004 y 0.24 ± 0.01 , respectivamente). En el corazón (Figura 4E), ER α y GPER también son los receptores que más se expresan y ER β , a pesar de sus bajos niveles de expresión, aumenta su expresión con respecto a la de otros órganos, lo que sugiere su importancia en las funciones cardíacas.

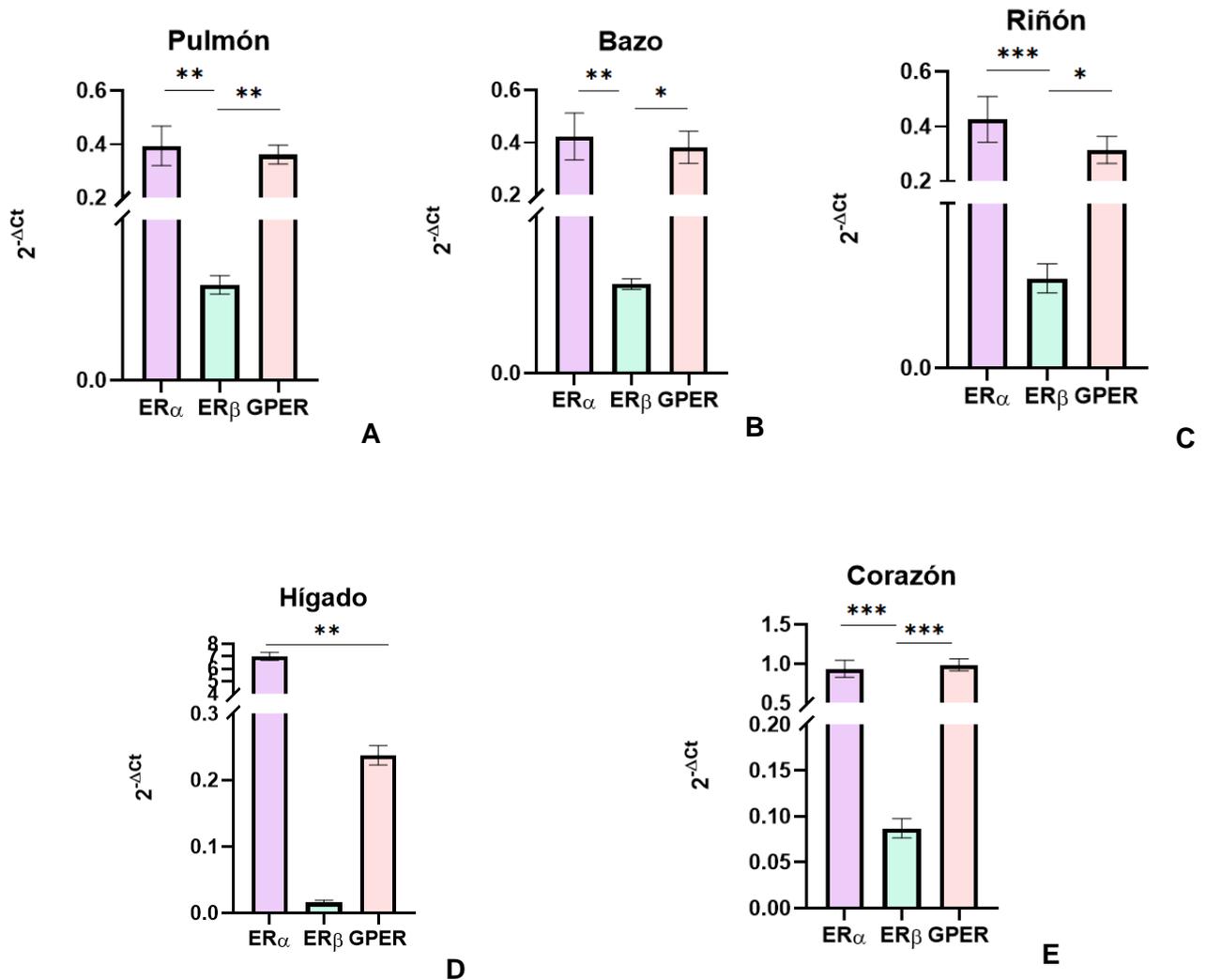


Figura 4. Expresión de ER α , ER β y GPER en los pulmones (A), bazo (B), riñones (C), hígado (D) y corazón (E) hígado de ratonas Sham SAMR1. Los datos fueron obtenidos mediante método $2^{-\Delta Ct}$ y los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 4 - 6, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

4.2 Influencia de la senescencia en la expresión de los receptores de estrógenos en los diferentes tejidos

Para poder evaluar el efecto del envejecimiento en la expresión de los receptores de estrógenos en los diferentes tejidos se realizó una qRT-PCR en muestras procedentes de hembras Sham de las cepas SAMR1 y SAMP8 (n = 4 – 6).

En la Figura 5 se representa la expresión de ER α en SAMR1 y SAMP8 en los diferentes tejidos. En pulmón, bazo y corazón, no se apreciaron diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, se observó un aumento de expresión en el riñón e hígado, ambos órganos metabólicos, en el grupo de ratonas con senescencia SAMP8, si bien sólo se obtuvo diferencia estadística en el caso del hígado.

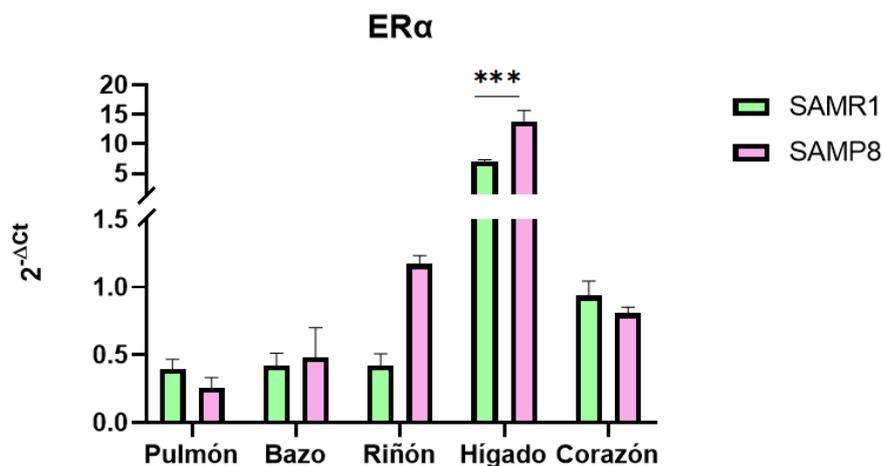


Figura 5. Expresión de ER α en diferentes tejidos en ratonas Sham SAMR1 y SAMP8. Los datos fueron obtenidos mediante método $2^{-\Delta Ct}$ y los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 4 - 6 en cada grupo, ***p < 0.01).

Por otro lado, el ER β cuyos niveles de expresión eran tan bajos en las ratonas control SAMR1, aumentaba significativamente en todos los órganos de las ratonas del grupo SAMP8 (Figura 6), excepto en el bazo donde se observó una fuerte tendencia (p = 0.06). Estos resultados sugieren un papel relevante de los ER β durante el envejecimiento.

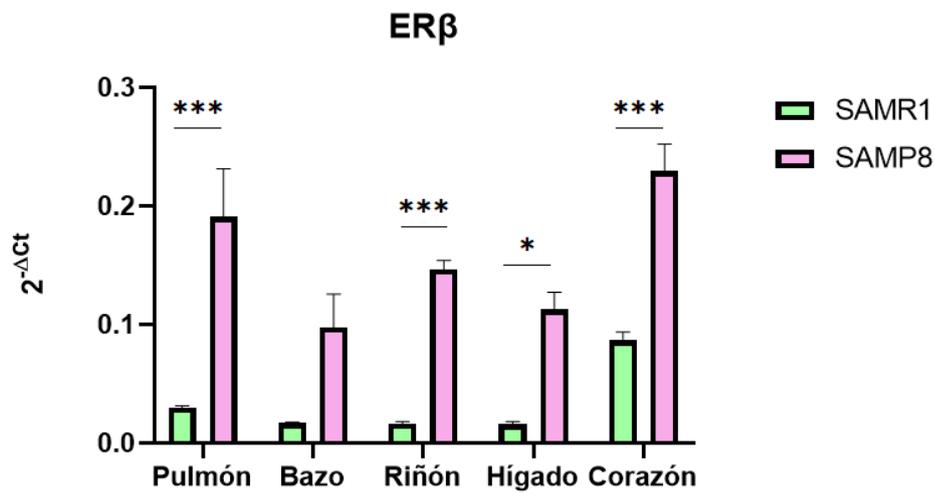


Figura 6. Expresión de ERβ en diferentes tejidos en ratonas Sham SAMR1 y SAMP8. Los datos fueron obtenidos mediante método 2^{-ΔCt} y los resultados se expresan como media ± SEM (n = 4 - 6 en cada grupo, ***p < 0.01, *p < 0.05).

La expresión de GPER (Figura 7) fue similar en todos los órganos de ambas cepas excepto el corazón, donde la expresión de este receptor disminuyó significativamente en el grupo de ratonas senescentes.

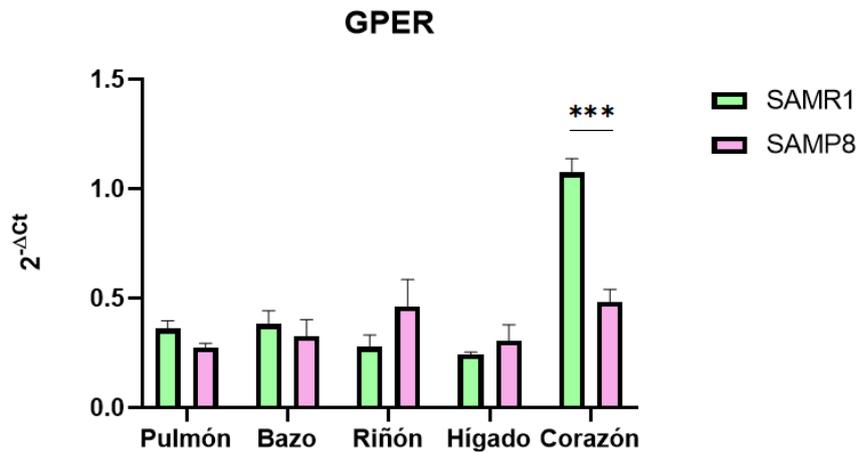


Figura 7. Expresión de GPER en diferentes tejidos en ratonas Sham SAMR1 y SAMP8. Los datos fueron obtenidos mediante método 2^{-ΔCt} y los resultados se expresan como media ± SEM (n = 4 - 6 en cada grupo, ***p < 0.01).

En resumen, el envejecimiento, característico de las ratonas senescentes SAMP8, afecta de manera generalizada a la expresión de ERβ en todos los órganos estudiados. En el caso del

receptor ER α , aumenta significativamente la expresión en el hígado y con fuerte tendencia en el riñón, y GPER disminuye su expresión en el corazón.

4.3 Efecto de la ovariectomía en la expresión de los receptores de estrógenos en los tejidos

Finalmente, para poder evaluar el efecto de la falta de hormonas ováricas en la expresión de los receptores de estrógenos en los diferentes tejidos se realizaron qRT-PCR en muestras de hembras Sham y OVX de las cepas SAMR1 y SAMP8 (n = 4 - 6). De esta manera, pudimos comparar por un lado el efecto de la falta de hormonas ováricas y por otro el del envejecimiento sobre la expresión de RE.

Estudiando la expresión de los RE en el pulmón (Figura 8A y 8B) se observó que la ovariectomía no afectaba a la expresión de ER α y ER β en ratonas control SAMR1 y envejecidas SAMP8. Sólo en el caso de GPER, se observó un aumento significativo en las ratonas ovariectomizadas de las ratonas envejecidas, sugiriendo una contribución conjunta de envejecimiento y menopausia afecta a la expresión de este receptor en el pulmón.

En el caso del bazo la ovariectomía afectó de manera similar a las ratonas SAMR1 y SAMP8 e indujo un aumento en la expresión de ER α , mientras que la expresión de los receptores ER β como GPER no se modificaron (Figuras 9A y 9B).

En el riñón se observa, de manera general, una mayor expresión de receptores de estrógenos en ratonas ovariectomizadas control SAMR1 y envejecidas SAMP8 (Figura 10A y 10B, respectivamente), sugiriendo la importancia de las hormonas ováricas en este tejido. De manera similar a lo que ocurría en el bazo, la elevada expresión de ER α en ratonas ovariectomizadas resultó ser significativa. Se observa también un aumento significativo de GPER en ratonas envejecidas y ovariectomizadas (Figura 10B).

En el hígado, los niveles de expresión de los receptores también se mantienen en ratonas ovariectomizadas. La expresión de los receptores fue muy similar en ratonas control y envejecidas (Figuras 11A y 11B), observándose una única diferencia significativa en la expresión de ER α de las ratonas SAMR1, donde la ovariectomía aumentó su expresión ($p < 0.05$)

Por último, en el corazón la ovariectomía no indujo diferencias en la expresión de receptores en ninguno de los grupos (Figuras 12A y 12B). La única diferencia permanece en el hecho de

que los niveles de expresión de GPER disminuyen con el envejecimiento, si bien la ausencia de hormonas ováricas debidas a la menopausia experimental no produce ningún efecto.

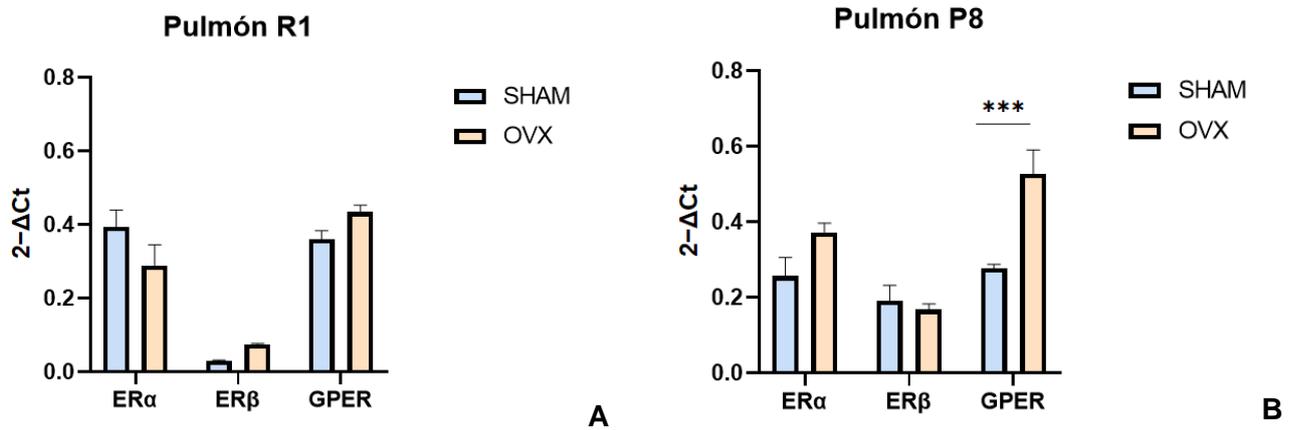


Figura 8. Expresión de ER α , ER β y GPER en los pulmones de ratonas Sham y OVX SAMR1 (A) y SAMP8 (B). Los datos fueron obtenidos mediante método $2^{-\Delta Ct}$ y los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 4 - 6 en cada grupo, ***p < 0.001).

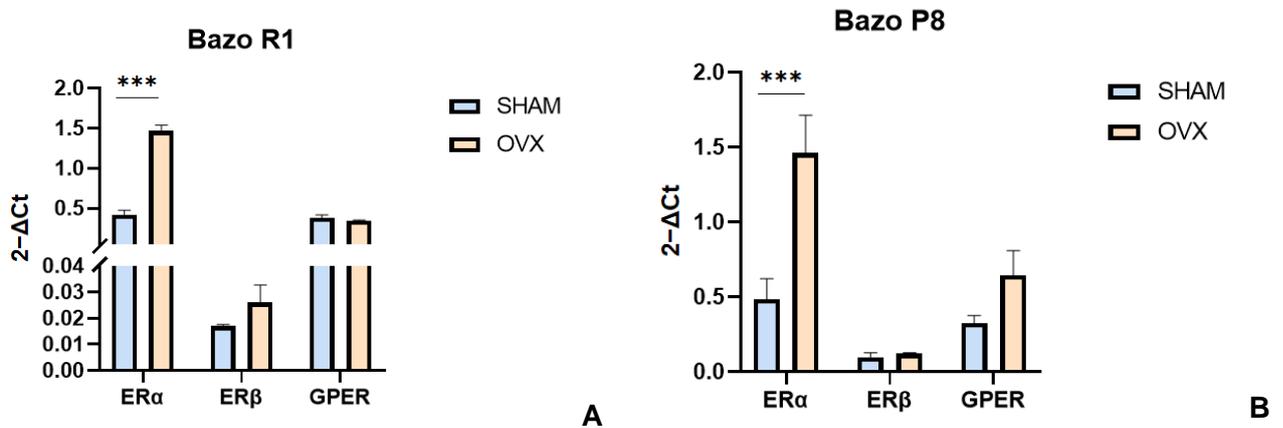


Figura 9. Expresión de ER α , ER β y GPER en el bazo de ratonas Sham y OVX del grupo SAMR1 (A) y SAMP8 (B). Los datos fueron obtenidos mediante método $2^{-\Delta Ct}$ y los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 4 - 6 en cada grupo, ***p < 0.001).

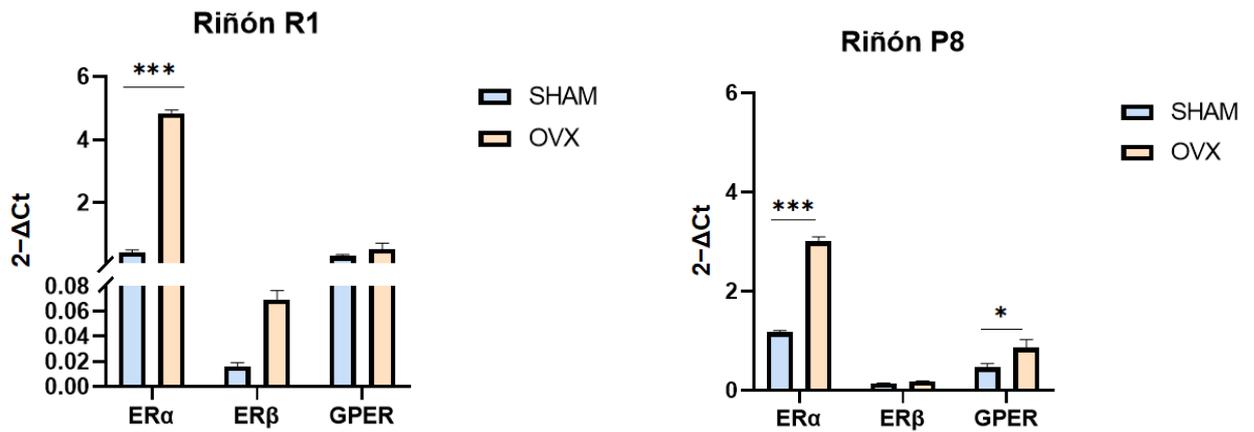


Figura 10. Expresión de ERα, ERβ y GPER en los riñones de ratonas Sham y OVX del grupo SAMR1 (A) y SAMP8 (B). Los datos fueron obtenidos mediante método $2^{-\Delta Ct}$ y los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 4 - 6 en cada grupo, *p < 0.05, ***p < 0.01).

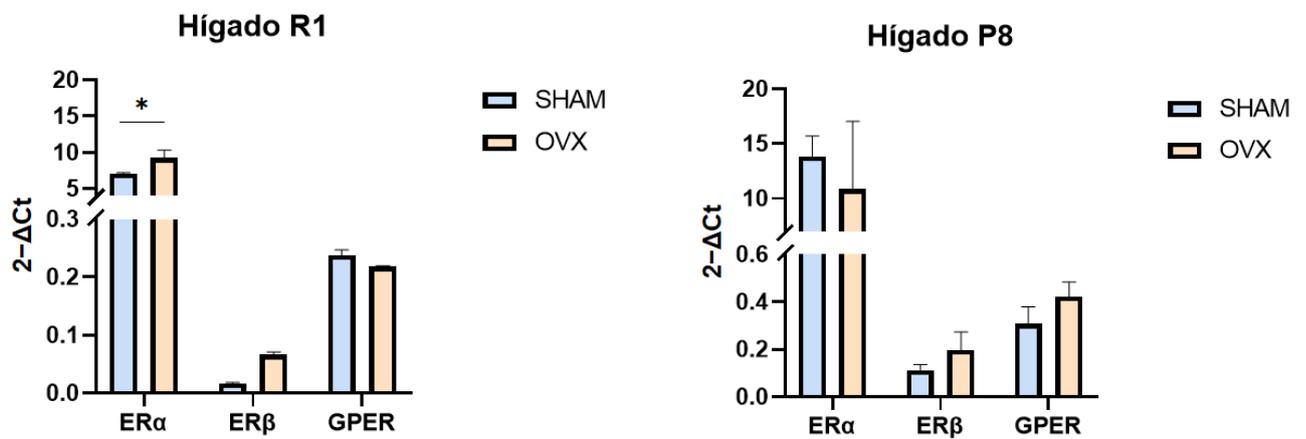


Figura 11. Expresión de ERα, ERβ y GPER en el hígado de ratonas Sham y OVX del grupo SAMR1 (A) y SAMP8 (B). Los datos fueron obtenidos mediante método $2^{-\Delta Ct}$ y los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 4 - 6 en cada grupo, *p < 0.05).

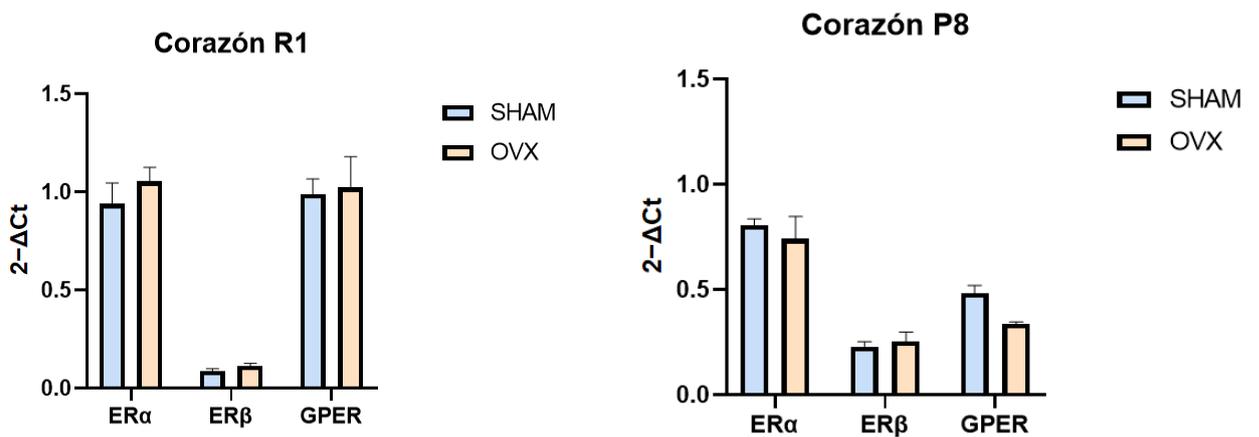


Figura 12. Expresión de ER α , ER β y GPER en el corazón de ratonas Sham y OVX del grupo SAMR1 (A) y SAMP8 (B). Los datos fueron obtenidos mediante método 2^{- Δ Ct} y los resultados se expresan como media \pm SEM (n = 4 - 6 en cada grupo).

5. Discusión

En el presente estudio se han identificado las diferencias de expresión de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER en los diferentes órganos. La comprobación experimental de la expresión de RE se ha realizado en pulmón, bazo, riñón, hígado y corazón de ratonas SAMR1 del grupo control (Sham), donde se observa que ER α en el hígado es donde más se expresa, seguido del corazón y del resto de órganos. Por otro lado, en el caso del ER β y GPER es el corazón el órgano donde más se expresan estos receptores. A parte de estudiar los receptores por separado, se ha determinado qué receptor se expresa más en cada órgano por separado, viéndose como ER α y GPER son los predominantes en todos los casos a excepción del hígado, donde ER α se expresa significativamente más respecto a los otros dos receptores.

Además, se ha estudiado el efecto del envejecimiento en la expresión de los receptores en ratonas senescentes de la cepa SAMP8, viéndose como la expresión de ER β aumenta en ratonas SAMP8 en todos los órganos. La expresión de ER α y GPER, dependiendo del órgano aumenta, disminuye o se mantiene prácticamente igual.

Finalmente, se ha estudiado el efecto de la ovariectomía en la expresión de RE tanto en ratonas jóvenes como envejecidas. En este caso, las ratonas SAMR1 aumentan la expresión de los RE después de una ovariectomía, especialmente del ER α en bazo, riñón e hígado. Por otro lado, en las ratonas envejecidas SAMP8 y ovariectomizadas la expresión de GPER aumenta en pulmón y riñón, y ER α en bazo y riñón.

Las expresiones de los receptores en cada tejido en condiciones normales (Sham SAMR1) ya se han descrito en otros estudios. Por ejemplo, en el hígado se ha detectado expresión de ER α y GPER principalmente en ratones LERKO de 2 a 3 meses con un tratamiento para extirpar condicionalmente el ER α (Qiu *et al.*, 2017), siendo la expresión de ER α mucho más abundante que la de GPER (Prossnitz y Bartol, 2014). En nuestro estudio, se puede observar que efectivamente ER α es el receptor predominante en el hígado expresándose significativamente más que GPER y ER β .

En el caso del riñón, se ha descrito previamente que los niveles de ER α son elevados en rata, sin embargo, los de ER β , son apenas detectables (Pelletier, 2000). Además, otros estudios sugieren que GPER en ratones macho y hembra también se expresa en varias partes del riñón (Cheng *et al.*, 2014). Atendiendo a nuestro estudio, los resultados que se obtienen son similares, pues los niveles de ER α son significativamente mayores a los de ER β , los cuales tienen un nivel de expresión muy bajo. También se puede observar que GPER se expresa en menores niveles que ER α , pero en mayores niveles que ER β .

En el corazón, se sabe que E2 ejerce sus efectos cardioprotectores al unirse a los receptores nucleares ER α y ER β en ratonas (Aryan *et al.*, 2020), pero también algunos estudios demuestran que GPER se expresa en cardiomiocitos en ratones knockout para ER α y ER β machos y hembras (Deschamps y Murphy, 2009). Además, otros estudios indicaron que ER α y GPER son los principales receptores que median los efectos de los estrógenos en el sistema cardiovascular en ratones macho y hembra, mientras que ER β es indetectable (Gurralla *et al.*, 2021). Comparando estos resultados con nuestro estudio, se puede observar que existe expresión de los tres receptores de estrógenos, aunque la expresión de GPER y ER α es mayor que ER β .

En el caso del pulmón, en algunos estudios se han determinado niveles más altos de ER β que de ER α en ratones de ambos sexos de 3 a 8 meses de edad (Couse *et al.*, 1997). Estos resultados no concuerdan con los que se han obtenido en el presente trabajo, sugiriendo que tal vez estas diferencias se deban a que los ratones no eran de la misma cepa.

Por último, algunos estudios han detectado la presencia de ER α en células esplénicas de ratonas (Sakazaki *et al.*, 2002). En este trabajo se puede observar la expresión de ER α y GPER como los receptores mayoritariamente expresados en el bazo.

Por otro lado, se han estudiado las diferencias de expresión entre los distintos grupos de la cepa SAM (SAMR1 y SAMP8) en condiciones normales (Sham) para ver si el envejecimiento afecta a la expresión. El envejecimiento, según la organización mundial de la salud (OMS) (2022) es el resultado de la acumulación de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo que conduce a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales de un individuo, una mayor probabilidad de sufrir enfermedades y, en última instancia, la muerte. Es un proceso caracterizado por cambios progresivos en todos los órganos y tejidos (Srivastava *et al.*, 2020) y una de sus consecuencias es la disminución en la producción de hormonas ováricas (Brann y Mahesh, 2005).

Para determinar la posible relación de los niveles de estrógenos con el envejecimiento, estudiamos primero las diferencias de expresión de RE en diferentes órganos en las cepas SAMR1 y SAMP8, y después si el envejecimiento afectaba de alguna manera a los cambios en la expresión de receptores de estrógenos observados en OVX.

Desafortunadamente no hay muchos estudios con los que poder comparar los resultados obtenidos. No obstante, nuestro estudio determina que la expresión del receptor ER β aumenta significativamente en ratonas senescentes en todos los órganos. Por otra parte, en ER α solo aumenta significativamente su expresión en el hígado y riñón de ratonas SAMP8, con resultados parecidos en el resto de los órganos. En lo que respecta a GPER, únicamente se observa un aumento de la expresión en el corazón de ratonas SAMR1.

Otro de los objetivos del presente estudio es determinar la influencia de las hormonas ováricas en la expresión de los receptores de estrógenos en ratonas SAMR1 y SAMP8.

Algunos estudios afirman que tanto ER α como ER β aumentan con la pérdida aguda de hormonas ováricas (Jayachandran y Miller, 2002). A pesar de ser un estudio realizado en cerdos, los resultados obtenidos en nuestro estudio son los mismos, pues la expresión de ambos receptores aumenta en ratonas ovariectomizadas. Por otro lado, en algunos estudios se indica que el receptor de membrana GPER a nivel vascular no es sensible al estado hormonal, ya que las ratonas ovariectomizadas mantienen la función y la expresión de este receptor (Zimmerman *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con estos estudios ya que indican que GPER se mantiene prácticamente igual en todos los tejidos y no se observan cambios significativos en ratonas SAMR1.

Dependiendo del órgano estudiado, el aumento en la expresión de RE puede ser o no significativo. Por ejemplo, un estudio sobre el efecto de la ovariectomía en la expresión de los receptores de estrógenos, en concreto ER α , (Mohamed y Abdel-Rahman, 2000) indica que hay un aumento significativo de ER α en las ratonas ovariectomizadas en riñón pero que en el hígado y corazón no hay un aumento significativo. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares, pues la expresión de ER α en el riñón aumenta significativamente a diferencia del corazón. No obstante, en nuestro estudio la expresión de este receptor en ratonas ovariectomizadas sí es significativa en el hígado.

Por otro lado, estudiando el envejecimiento en ratonas Sham y OVX, se obtienen resultados similares a los de SAMR1, con diferencia de que GPER aumenta su expresión en ratonas OVX en el pulmón y riñón. Esto puede deberse a que la expresión de estos

receptores no sea dependiente del envejecimiento ni de los niveles de estrógenos en los órganos estudiados, excepto el receptor GPER que en el pulmón y el riñón aumenta su expresión de forma importante cuando no hay estrógenos. Este puede ser un mecanismo compensador que aparece únicamente cuando los niveles de estrógenos disminuyen de manera considerable, por la eliminación de los ovarios.

Los resultados comentados anteriormente muestran que la regulación de la expresión de los receptores de estrógenos en ratonas ovariectomizadas es específica de tejido.

Concretamente, la ausencia de estrógenos aumenta la expresión de ER β en todos los órganos. Una posible explicación del aumento de expresión de los RE en el grupo OVX es que, al disminuir los niveles de estrógenos, se produce una retroalimentación negativa que aumenta la expresión de los receptores de estrógenos para hacer más efectiva la unión de la hormona al receptor.

6. Conclusiones

De los resultados presentados en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER se expresan en pulmón hígado, corazón, riñón y bazo de ratonas de la cepa SAM.
2. Existe una expresión diferencial de los receptores de estrógenos en los diferentes tejidos analizados. Destaca la elevada expresión de ER α en hígado y corazón de ratonas SAMR1 mientras que la expresión de ER β y GPER es mayor en corazón que en el resto de órganos.
3. El envejecimiento aumenta la expresión de ER β en todos los órganos estudiados, y de ER α en hígado. Los niveles de expresión de GPER no varían en ratonas SAMP8 a excepción del corazón, donde los niveles de SAMR1 son mayores.
4. La ausencia de hormonas ováricas inducida por una ovariectomía afecta de manera diferencial a la expresión de receptores de ratonas control SAMR1 y envejecidas SAMP8. Destaca el aumento en la expresión de ER α en riñón y bazo de ratonas con menopausia jóvenes y envejecidas, y la contribución conjunta del envejecimiento y la menopausia en el aumento de expresión de GPER en pulmón y riñón.

7. Bibliografía

- ARYAN, L., YOUNESSI, D., ZARGARI, M., BANERJEE, S., AGOPIAN, J., RAHMAN, S., BORNA, R., RUFFENACH, G., UMAR, S., & EGHBALI, M. (2020). The Role of Estrogen Receptors in Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4314. <https://doi.org/10.3390/ijms21124314>
- BARZI, A., LENZ, A. M., LABONTE, M. J., & LENZ, H. J. (2013). Molecular pathways: Estrogen pathway in colorectal cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(21), 5842–5848. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0325>
- BERKLEY, K. J., McALLISTER, S. L., ACCIUS, B. E., & WINNARD, K. P. (2007). Endometriosis-induced vaginal hyperalgesia in the rat: effect of estropause, ovariectomy, and estradiol replacement. *Pain*, 132 Suppl 1(Suppl 1), S150–S159. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.09.022>
- BRANN, D. W., & MAHESH, V. B. (2005). The aging reproductive neuroendocrine axis. *Steroids*, 70(4), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2004.12.008>
- CHENG, S. B., DONG, J., PANG, Y., LAROCCA, J., HIXON, M., THOMAS, P., & FILARDO, E. J. (2014). Anatomical location and redistribution of G protein-coupled estrogen receptor-1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogens but not aldosterone. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(2), 950–959. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.11.005>
- CLARK, S., RAINVILLE, J., ZHAO, X., KATZENELLENBOGEN, B. S., PFAFF, D., & VASUDEVAN, N. (2014). Estrogen receptor-mediated transcription involves the activation of multiple kinase pathways in neuroblastoma cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 139, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.010>
- COUSE, J. F., LINDZEY, J., GRANDIEN, K., GUSTAFSSON, J. A., & KORACH, K. S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*, 138(11), 4613–4621. <https://doi.org/10.1210/endo.138.11.5496>

- COX-YORK, K. A., SHEFLIN, A. M., FOSTER, M. T., GENTILE, C. L., KAHL, A., KOCH, L. G., BRITTON, S. L., & WEIR, T. L. (2015). Ovariectomy results in differential shifts in gut microbiota in low versus high aerobic capacity rats. *Physiological reports*, 3(8), e12488. <https://doi.org/10.14814/phy2.12488>
- de ARRUDA AMARAL, I. C. G., BACCARO, L. F., LUI-FILHO, J. F., OSIS, M. J. D., PEDRO, A. O., & COSTA-PAIVA, L. (2018). Factors associated with knowledge about menopause and hormone therapy in middle-aged Brazilian women: a population-based household survey. *Menopause (New York, N.Y.)*, 25(7), 803–810. <https://doi.org/10.1097/gme.0000000000001087>
- de MIGUEL, D. L. G., CAYETANO, S. R., & SALVADOR, Z. (2019, diciembre 3). ¿Qué son los estrógenos? - Tipos, funciones y fármacos. Reproducción Asistida ORG. <https://www.reproduccionasistida.org/estrogenos/>
- DESCHAMPS, AM y MURPHY, E. (2009). La activación de un nuevo receptor de estrógeno, GPER, es cardioprotectora en ratas macho y hembra. *Revista americana de fisiología. Fisiología cardíaca y circulatoria*, 297 (5), H1806–H1813. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00283.2009>
- Envejecimiento y salud*. (s/f). Who.int. Recuperado el 16 de mayo de 2022, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
- FINCH C. E. (2014). The menopause and aging, a comparative perspective. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 142, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.010>
- FUENTES, N., & SILVEYRA, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 116, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- GÓMEZ, X. V. (2018). *Efecto de las ciclooxigenasas en la biodisponibilidad del óxido nítrico en la respuesta vascular al tromboxano a2 en un modelo murino de envejecimiento y menopausia*. Universitat de València.
- GURRALA, R., KILANOWSKI-DOROH, IM, HUTSON, DD, OGOLA, BO, ZIMMERMAN, MA, KATAKAM, P., SATOU, R., MOSTANY, R. y LINDSEY, SH (2021). Alteraciones en el perfil de receptores de estrógenos de los tejidos cardiovasculares durante el envejecimiento. *GeroScience*, 43 (1), 433–442. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00331-3>

- HALL, J. M., COUSE, J. F., & KORACH, K. S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*, 276(40), 36869–36872. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100029200>
- HESS, R. A., FERNANDES, S. A., GOMES, G. R., OLIVEIRA, C. A., LAZARI, M. F., & PORTO, C. S. (2011). Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *Journal of andrology*, 32(6), 600–613. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012872>
- HONG, D. G., PARK, J. Y., CHONG, G. O., LEE, Y. H., LEE, H. J., SHINN, J. U., LEE, Y. S., & SEONG, W. J. (2019). Transmembrane G protein-coupled receptor 30 gene polymorphisms and uterine adenomyosis in Korean women. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 35(6), 498–501. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1540572>
- HSU, L. H., CHU, N. M., & KAO, S. H. (2017). Estrogen, Estrogen Receptor and Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1713. <https://doi.org/10.3390/ijms18081713>
- IMAMOV, O., SHIM, G. J., WARNER, M., & GUSTAFSSON, J. A. (2005). Estrogen receptor beta in health and disease. *Biology of reproduction*, 73(5), 866–871. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043497>
- JAYACHANDRAN, M., & MILLER, V. M. (2002). Ovariectomy upregulates expression of estrogen receptors, NOS, and HSPs in porcine platelets. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 283(1), H220-6. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00950.2001>
- KARAS, R. H., PATTERSON, B. L., & MENDELSON, M. E. (1994). Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation*, 89(5), 1943–1950. <https://doi.org/10.1161/01.cir.89.5.1943>
- KIM, J. H., CHO, H. T., & KIM, Y. J. (2014). The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocrine journal*, 61(11), 1055–1067. <https://doi.org/10.1507/endocrj.ej14-0262>

- KVINGEDAL, A. M., & SMELAND, E. B. (1997). A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS letters*, 407(1), 59–62. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00278-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00278-0)
- LAURENT, M., ANTONIO, L., SINNESAE, M., DUBOIS, V., GIELEN, E., CLASSENS, F., & VANDERSCHUEREN, D. (2014). Androgens and estrogens in skeletal sexual dimorphism. *Asian journal of andrology*, 16(2), 213–222. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122356>
- LI, L., & WANG, Z. (2018). Ovarian Aging and Osteoporosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 1086, 199–215. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1117-8_13
- LIN, J., & REDIES, C. (2012). Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development genes and evolution*, 222(6), 369–376. <https://doi.org/10.1007/s00427-012-0420-x>
- MARINO, M., GALLUZZO, P., & ASCENZI, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current genomics*, 7(8), 497–508. <https://doi.org/10.2174/138920206779315737>
- McEWEN, B. S., DAVIS, P. G., PARSONS, B., & PFAFF, D. W. (1979). The brain as a target for steroid hormone action. *Annual review of neuroscience*, 2, 65–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.02.030179.000433>
- MENDELSON M. E. (2002). Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *The American journal of cardiology*, 90(1A), 3F–6F. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(02\)02418-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(02)02418-9)
- MENDES, E., ACETTURI, B. G., THOMAS, A. M., MARTINS, F. D. S., CRISMA, A. R., MURATA, G., BRAGA, T. T., CAMÂRA, N. O. S., FRANCO, A. L. D. S., SETUBAL, J. C., RIBEIRO, W. R., VALDUGA, C. J., CURI, R., DIAS-NETO, E., TAVARES-de-LIMA, W., & FERREIRA, C. M. (2017). Prophylactic supplementation of *Bifidobacterium longum* 51A protects mice from ovariectomy-induced exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1732. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01732>

- MOHAMED, M. K., & ABDEL-RAHMAN, A. A. (2000). Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *European journal of endocrinology*, 142(3), 307–314. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1420307>
- NELSON H. D. (2008). Menopause. *Lancet (London, England)*, 371(9614), 760–770. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60346-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60346-3)
- NOVELLA, S., DANTAS, A. P., SEGARRA, G., NOVENSÀ, L., BUENO, C., HERAS, M., HERMENEGILDO, C., & MEDINA, P. (2010). Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Experimental gerontology*, 45(11), 868–874. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.07.007>
- PALMISANO, B. T., ZHU, L., & STAFFORD, J. M. (2017). Role of Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism. *Advances in experimental medicine and biology*, 1043, 227–256. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_12
- PATEL S. (2017). Disruption of aromatase homeostasis as the cause of a multiplicity of ailments: A comprehensive review. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 168, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.009>
- PATERNI, I., GRANCHI, C., KATZENELLENBOGEN, J. A., & MINUTOLO, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, 90, 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.06.012>
- PELLETIER, G. (2000). Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histology and Histopathology*, 15(4), 1261–1270. <https://doi.org/10.14670/HH-15.1261>
- POTTER, B., SCHRAGER, S., DALBY, J., TORELL, E., & HAMPTON, A. (2018). Menopause. *Primary care*, 45(4), 625–641. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.08.001>
- PROSSNITZ, E. R., & BARTON, M. (2014). Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and cellular endocrinology*, 389(1-2), 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.02.002>
- QIU, S., VAZQUEZ, J. T., BOULGER, E., LIU, H., XUE, P., HUSSAIN, M. A., & WOLFE, A. (2017). Hepatic estrogen receptor α is critical for regulation of gluconeogenesis and

lipid metabolism in males. *Scientific Reports*, 7(1), 1661.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01937-4>

REVANKAR, C. M., CIMINO, D. F., SKLAR, L. A., ARTEBURN, J. B., & PROSSNITZ, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>

ROYER, C., LUCAS, T. F., LAZARI, M. F., & PORTO, C. S. (2012). 17Beta-estradiol signaling and regulation of proliferation and apoptosis of rat Sertoli cells. *Biology of reproduction*, 86(4), 108. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096891>

RYAN K. J. (1982). Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer research*, 42(8 Suppl), 3342s–3344s.

RUSSELL, J. K., JONES, C. K., & NEWHOUSE, P. A. (2019). The Role of Estrogen in Brain and Cognitive Aging. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 16(3), 649–665. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00766-9>

SAKAZAKI, H., UENO, H., & NAKAMURO, K. (2002). Estrogen receptor alpha in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. *Toxicology letters*, 133(2-3), 221–229. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00203-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00203-5)

SHI, L., FENG, Y., LIN, H., MA, R., & CAI, X. (2014). Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key?. *Journal of translational medicine*, 12, 93. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-93>

SOPHOCLEOUS, A., & IDRIS, A. I. (2014). Rodent models of osteoporosis. *BoneKEy reports*, 3, 614. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.109>

SOUZA, V. R., MENDES, E., CASAROO, M., ANTIORIO, A., OLIVEIRA, F. A., & FERREIRA, C. M. (2019). Description of Ovariectomy Protocol in Mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 303–309. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_29

SRIVASTAVA, A., BARTH, E., ERMOLAEVA, MA, GUENTHER, M., FRAHM, C., MARZ, M. y WITTE, OW (2020). Los cambios de expresión génica específicos de tejido están asociados

- con el envejecimiento en ratones. *Genómica, proteómica y bioinformática* , 18 (4), 430–442. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.12.001>
- STEVENSON, S., & THORNTON, J. (2007). Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. *Clinical interventions in aging*, 2(3), 283–297. <https://doi.org/10.2147/cia.s798>
- TAKAHASHI, T. A., & JOHNSON, K. M. (2015). Menopause. *The Medical clinics of North America*, 99(3), 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.01.006>
- TAKEDA T. (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical research*, 34(4), 639–659. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9922-y>
- TAKEDA, T., HOSOKAWA, M., TAKESHITA, S., IRINO, M., HIGUCHI, K., MATSUSHITA, T., TOMITA, Y., YASUHIRA, K., HAMAMOTO, H., SHIMIZU, K., ISHII, M., & YAMAMURO, T. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of ageing and development*, 17(2), 183–194. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(81\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0047-6374(81)90084-1)
- TUTZAUER, J., SJÖSTRÖM, M., BENDAHL, P. O., RYDÉN, L., FERNÖ, M., LEEB-LUNDBERG, L., & ALKNER, S. (2020). Plasma membrane expression of G protein-coupled estrogen receptor (GPER)/G protein-coupled receptor 30 (GPR30) is associated with worse outcome in metachronous contralateral breast cancer. *PloS one*, 15(4), e0231786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231786>
- ULHAQ, Z. S., SORAYA, G. V., MILLIANA, A., & TSE, W. (2021). Association between *GPER* gene polymorphisms and GPER expression levels with cancer predisposition and progression. *Heliyon*, 7(3), e06428. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06428>
- VIEIRA, A. T., CASTELO, P. M., RIBEIRO, D. A., & FERREIRA, C. M. (2017). Influence of Oral and Gut Microbiota in the Health of Menopausal Women. *Frontiers in microbiology*, 8, 1884. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01884>
- VILLAR, L. P., ZERMIANI, D. M., MORENO, Ó. O., REUS, R., & CAYETANO, S. R. (s/f). Descenso de los niveles de estrógeno con la edad. Reproducción Asistida ORG. Recuperado el 16 de mayo de 2022, de <https://www.reproduccionasistida.org/moco-cuello-uterino/grafica-hormonas-estrogenos/>
- WALCZAK-JĘDRZEJOWSKA, R., FORMA, E., OSZUKOWSKA, E., BRYŚ, M., MARCHLEWSKA, K., KULA, K., & SLOWIKOWSKA-HILCZER, J. (2022). Expression of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) in whole testicular tissue and laser-

capture microdissected testicular compartments of men with normal and aberrant spermatogenesis. *Biology*, 11(3), 373. <https://doi.org/10.3390/biology11030373>

YEH, C. R., DA, J., SONG, W., FAZILI, A., & YEH, S. (2014). Estrogen receptors in prostate development and cancer. *American journal of clinical and experimental urology*, 2(2), 161–168.

ZIMMERMAN, M. A., BUDISH, R. A., KASHYAP, S., & LINDSEY, S. H. (2016). GPER-novel membrane oestrogen receptor. *Clinical science (London, England : 1979)*, 130(12), 1005–1016. <https://doi.org/10.1042/CS20160114>