

TESIS DOCTORAL

2023



**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A LA
GENISTEÍNA DURANTE EL DESARROLLO
EN LA ORGANIZACIÓN DEL HIPOTÁLAMO
EN LA RATA**

JOSÉ MANUEL FERNÁNDEZ GARCÍA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN PSICOLOGÍA DE
LA SALUD**

DIRECTORA: DRA. HELENA PINOS SÁNCHEZ

"¿Por qué quieres escalar el Everest?" A George Mallory se le hizo esta pregunta en 1924 y dio la respuesta más obvia: "Porque está ahí"

Agradecimientos

Esta tesis doctoral abarca mucho más de lo que hay aquí plasmado, es el fruto de un trabajo en equipo en el que han participado muchas personas e instituciones sin cuya aportación hubiera sido imposible su realización. Por ello, quiero dar las gracias de manera muy especial a las Profesoras Paloma Collado Guirao, Beatriz Carrillo Urbano y a mi directora Helena Pinos Sánchez por darme la oportunidad de formar parte de este equipo y guiarme a lo largo de todo el proceso, no solo en el desarrollo de esta tesis sino también en mi formación como investigador.

Resumen

Los fitoestrógenos son una clase de compuestos vegetales con estructura y acciones similares a los estrógenos de los mamíferos que, pese a estar incluidos dentro de la categoría de disruptores endocrinos, son considerados como beneficiosos para la salud. La genisteína, un fitoestrógeno perteneciente a la familia de las isoflavonas, está presente en altas concentraciones en la soja, una planta leguminosa procedente de Asia cuyas semillas son utilizadas habitualmente como sustituto de la leche materna o leche de vaca en forma de bebida. Debido al incremento que se ha producido en los últimos años en el consumo de alimentos derivados de la soja y a la capacidad de la genisteína para actuar como disruptor endocrino, el objetivo de la presente tesis es determinar los efectos a largo plazo que tiene la administración de este fitoestrógeno durante la segunda semana de vida postnatal sobre algunos de los núcleos hipotalámicos que regulan la ingesta de alimentos y el metabolismo energético. Para ello se han utilizado ratas Wistar de ambos sexos a las que se les inyectaron diferentes dosis de genisteína, 10 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de peso corporal o 50 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de peso corporal, desde el día postnatal 6 al 13. Los parámetros fisiológicos, como la ingesta calórica y el peso corporal, fueron registrados semanalmente desde el día postnatal 33 hasta el día postnatal 89. En el momento del sacrificio, en el día postnatal 90, se recogió el plasma con el objetivo de determinar los niveles de estradiol y testosterona. Una vez fijado el cerebro, mediante un proceso inmunohistoquímico se analizó la expresión de proopiomelanocortina y del receptor de membrana de estrógenos acoplado a proteínas G, GPER, en el núcleo arqueado del hipotálamo, mientras que la expresión de orexina se analizó en el hipotálamo dorsomedial, el área perifornical y el hipotálamo lateral. Además, se ha estudiado el efecto del tratamiento con genisteína en la morfología del núcleo arqueado en el volumen y el número de neuronas, utilizando para ello la tinción de Nissl con violeta de cresilo.

En el análisis de las variables fisiológicas, los resultados muestran un retraso en la aparición del dimorfismo sexual normal en el peso corporal en los grupos tratados con la dosis más alta de genisteína. Los niveles de testosterona en plasma no se vieron afectados por la genisteína, pero en cambio, los niveles de estradiol aumentaron tanto en los machos como en las hembras. Respecto a la expresión de los péptidos reguladores de la ingesta estudiados, se ha encontrado una disminución significativa en el número de células inmunorreactivas de proopiomelanocortina en la subdivisión medial del núcleo arqueado en los dos grupos de hembras tratados con genisteína. Por el contrario, no se observó ninguna alteración el número de neuronas

de orexina tanto en machos como en hembras. En el análisis de la expresión del GPER en el núcleo arqueado, se ha encontrado dimorfismo sexual en la subdivisión posterior medial, con un mayor número de neuronas en los machos del grupo control respecto a las hembras del mismo grupo. Los efectos del tratamiento con genisteína en la expresión del GPER se producen exclusivamente en los machos en todas las subdivisiones del núcleo arqueado excepto en la subdivisión medial, mostrando unos patrones dependientes del área estudiada y de la dosis. En el estudio de la morfología del núcleo arqueado, la estimación realizada mediante la tinción de Nissl con violeta de cresilo en el volumen y el número de neuronas ha revelado la existencia de dimorfismo sexual, ya que se ha encontrado un mayor volumen y número de neuronas en los grupos control de los machos respecto al mismo grupo de las hembras en la subdivisión posterior medial del núcleo arqueado. Así mismo, se ha podido comprobar que el tratamiento con la dosis baja de genisteína tiene un efecto en la morfología del núcleo en las hembras, incrementando el número de neuronas en la subdivisión medial.

Los resultados encontrados están en consonancia con los descritos previamente en la literatura sobre los efectos de los fitoestrógenos, resultados en los que la dosis y el sexo son parámetros fundamentales para el estudio de las consecuencias de la inclusión de estos compuestos en la dieta, tanto en épocas tempranas del desarrollo como en adultos. Adicionalmente, en el presente trabajo se destaca la importancia del estudio de las distintas áreas del núcleo arqueado, ya que pudiera ser que los efectos del tratamiento con genisteína encontrados en las subdivisiones del núcleo estén reflejando la diferente implicación de cada subdivisión en los procesos en los que interviene. Muchos factores afectan los mecanismos que subyacen a estos procesos, pero la nutrición parece ser uno de los más relevantes. Un número significativo de trabajos han demostrado que las alteraciones en la edad adulta en el sistema que controla el metabolismo energético tienen su causa principal en la mala alimentación, en cantidad o en calidad, durante los periodos pre y postnatal temprano, y el estudio de los compuestos con propiedades estrogénicas puede ayudar a clarificar los factores a través de los cuales se programan estos circuitos y clarificar el papel que juegan en estos periodos tempranos del desarrollo.

Palabras clave: genisteína, núcleo arqueado, estradiol, proopiomelanocortina, orexina, GPER

Abreviaturas

%: Porcentaje.	ERE: Elementos de respuesta de estrógenos.
°C: Grados centígrados.	FSH: Hormona estimulante del folículo.
α-MSH: Hormona estimulante de melanocitos.	GABA: Ácido gamma-aminobutírico.
μm: Micras.	GHRH: Hormona liberadora de la hormona del crecimiento.
3V: Tercer ventrículo.	GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas.
ACTH: Corticotropina.	GPER: Receptor de membrana de estrógenos acoplado a proteínas G.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.	GPER-KO: Ratones con el GPER inactivado genéticamente.
ARN: Ácido ribonucleico.	HCM: Hormona concentradora de melanina.
ARQ: Núcleo arqueado del hipotálamo.	HL: Hipotálamo lateral.
ArqD: Subdivisión dorsal del núcleo arqueado.	IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1.
ArqL: Subdivisión lateral del núcleo arqueado.	InsR: Receptor insulina.
ArqM: Subdivisión medial del núcleo arqueado.	LC: <i>Locus coeruleus</i> .
ArqPM: Subdivisión posterior medial del núcleo arqueado.	LDT: Núcleo tegmental laterodorsal.
ArqPL: Subdivisión posterior lateral del núcleo arqueado.	LepR: Receptor de leptina.
ANOVA: Análisis de varianza.	MCR4: Receptor 4 de melanocortinas.
APF: Área perifornical.	MCR3: Receptor 3 de melanocortinas.
ATP: Adenosín trifosfato.	ME: Eminencia media.
ATV: Área tegmental ventral.	ml: Mililitros.
BSA: Albumina sérica bovina.	mm: Milímetros.
BNST: Núcleo del lecho de la estría terminal.	mm²: Milímetros cuadrados.
BPA: Bisfenol A.	mm³: Milímetros cúbicos.
CART: Transcrito relacionado con la cocaína y la anfetamina.	mPOA: Área preóptica medial.
CCK: Colecistoquinina.	NAcc: Núcleo <i>Accumbens</i> .
CeA: Núcleo central de la amígdala.	NPY: Neuropeptido Y.
CRH: Hormona liberadora de corticotropina.	NTS: Núcleo del tracto solitario.
DAB: Diaminobenzidina.	OXR1: Receptor de orexina 1.
DMV: Núcleo dorsal motor del vago.	OXR2: Receptor de orexina 2.
DMH: Hipotálamo dorsomedial.	PB: Núcleo parabraquial.
DR: Rafe dorsal.	PBS: Tampón fosfato salino.
DEC: Disruptor endocrino.	PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.	POMC: Proopiomelanocortina.
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.	Pomc: Gen de Proopiomelanocortina.
ER: Receptor de estrógenos.	POMC-ir: Neuronas inmunorreactivas a proopiomelanocortina.
ERα: Receptor de estrógenos α .	PPT: Núcleo pedunculopontino.
ERβ: Receptor de estrógenos β .	PRAG: Proteína relacionada con Agouti.

PKT: Proteína tirosina quinasa.

PKA: Proteína quinasa A.

PKC: Proteína quinasa C.

PVH: Núcleo paraventricular del hipotálamo.

s.c.: inyección subcutánea.

SDN-POA: Núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica.

SFO: Órgano subfornical.

SNC: Sistema nervioso central.

S-N-K: Student–Newman–Keuls.

SON: Núcleo supraóptico.

STAT3: Transductor de señal y activador de transcripción 3.

TRH: Hormona liberadora de tirotrópina.

TSH: Hormona estimulante del tiroides.

vGluT2: Transportador vesicular glutamato 2.

VMH: Núcleo ventromedial del hipotálamo.

Grupos experimentales

MC: Grupo control ratas macho.

MG10: Grupo dosis baja (10µg/gr) de genisteína ratas macho.

MG50: Grupo dosis alta (50µg/gr) de genisteína ratas macho.

HC: Grupo control ratas hembra.

HG10: Grupo dosis baja (10µg/gr) de genisteína ratas hembra.

HG50: Grupo dosis alta (50µg/gr) de genisteína ratas hembra.

Índice

Introducción

1. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y CONDUCTA DE INGESTA.....	1
2. CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA CONDUCTA DE INGESTA	3
2.1. <i>La proopiomelanocortina</i>	5
2.2. <i>La orexina en la regulación de la conducta de ingesta</i>	8
2.3. <i>Circuitos hipotalámicos que regulan la conducta de ingesta</i>	10
3. EL NÚCLEO ARQUEADO DEL HIPOTÁLAMO	13
3.1. <i>Dimorfismo sexual en el núcleo arqueado</i>	16
4. PROGRAMACIÓN DE LOS CIRCUITOS NEURONALES QUE CONTROLAN LA CONDUCTA DE INGESTA.....	17
5. EL ESTRADIOL EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA	19
5.1. <i>Mecanismos del estradiol en el SNC</i>	19
5.2. <i>El papel del estradiol en la regulación de la conducta de ingesta</i>	21
6. FITOESTRÓGENOS	23
6.1. <i>Genisteína</i>	25

Objetivos	29
-----------------	----

Experimento 1

Efectos del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el peso, la ingesta y la expresión de proopiomelanocortina y orexina en el hipotálamo

1. INTRODUCCIÓN.....	33
2. MATERIAL Y MÉTODOS	34
2.1. <i>Animales</i>	34
2.2. <i>Tratamiento</i>	34
2.3. <i>Preparación del tejido</i>	36
2.4. <i>Niveles en plasma de estradiol y testosterona</i>	36
2.5. <i>Procesamiento inmunohistoquímico</i>	37
2.6. <i>Estimación número de neuronas</i>	38
2.6.1. <i>Estimación número de neuronas POMC-ir en el ARQ</i>	39
2.6.2. <i>Estimación número de neuronas orexina-ir en el ARQ</i>	41
2.7. <i>Análisis estadístico</i>	43
3. RESULTADOS	44
3.1. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la evolución del peso corporal</i>	44
3.2. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la ingesta</i>	45
3.3. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en los niveles en plasma de estradiol y testosterona</i>	47
3.3.1. <i>Estradiol</i>	47
3.3.2. <i>Testosterona</i>	49
3.4. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el número de neuronas POMC-ir</i>	49
3.4.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	50
3.5. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el número de neuronas orexina-ir</i>	52
4. DISCUSIÓN	54

Experimento 2

Efectos del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la expresión del GPER en el núcleo arqueado del hipotálamo

1. INTRODUCCIÓN.....	62
2. MATERIALES Y MÉTODO	64
2.1. <i>Animales</i>	64
2.2. <i>Tratamiento</i>	64
2.3. <i>Preparación del tejido</i>	64
2.4. <i>Proceso inmunohistoquímico</i>	64
2.5. <i>Estimación número de neuronas GPER-ir en el ARQ</i>	65
2.6. <i>Análisis estadístico</i>	67
3. RESULTADOS.....	68
3.1. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el número de neuronas GPER-ir</i>	68
3.1.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	70
4. DISCUSIÓN	74

Experimento 3

Efectos del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la morfología del núcleo arqueado del hipotálamo

1. INTRODUCCIÓN.....	80
2. MATERIALES Y MÉTODO	82
2.1. <i>Animales</i>	82
2.2. <i>Tratamiento</i>	82
2.3. <i>Preparación del tejido</i>	82
2.4. <i>Tinción de Nissl</i>	82
2.5. <i>Estimación del volumen</i>	83
2.6. <i>Estimación número de neuronas</i>	85
2.7. <i>Cálculo de la densidad neuronal</i>	87
2.8. <i>Cálculo de la proporción POMC/Nissl</i>	87
2.9. <i>Cálculo de la densidad POMC</i>	87
2.10. <i>Cálculo de la proporción GPER/Nissl</i>	87
2.11. <i>Cálculo de la densidad GPER</i>	87
2.12. <i>Análisis estadístico</i>	88
3. RESULTADOS.....	89
3.1. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el volumen del ARQ</i>	89
3.1.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	90
3.2. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el número de neuronas en el ARQ</i>	91
3.2.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	92
3.3. <i>Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la densidad del ARQ</i>	96
3.3.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	97
3.4. <i>Proporción POMC/Nissl en el ARQ</i>	98
3.4.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	99
3.5. <i>Densidad POMC-ir en el ARQ</i>	100
3.5.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	100
3.6. <i>Proporción GPER/Nissl</i>	101
3.6.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	102
3.7. <i>Densidad GPER</i>	103
3.7.1. <i>Análisis subdivisiones del ARQ</i>	103
4. DISCUSIÓN	105

Discusión final	110
Conclusiones	116
Bibliografía	119
Anexo: Abridged Thesis in English.....	141

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de la anatomía del hipotálamo de la rata en un plano coronal	3
Figura 2. Péptidos implicados en la regulación de la ingesta	5
Figura 3. Esquema del sistema central de melanocortinas	6
Figura 4. Representación esquemática de la localización de neuronas que expresan POMC sensibles a leptina y serotonina en el ARQ	7
Figura 5. Representación de la distribución de OXR1 y OXR2 y las proyecciones desde el HL	9
Figura 6. Micrografía donde se representan los circuitos hipotalámicos involucrados en la regulación de la conducta de ingesta	11
Figura 7. Representación de los circuitos cerebrales implicados en la regulación de la conducta de ingesta	12
Figura 8. Dibujos de cámara lucida de los tipos neuronales identificados en el núcleo arqueado del hipotálamo de rata	13
Figura 9. Micrografías de un proceso con tinción de Nissl en el ARQ de la rata	14
Figura 10. Representación de la localización siguiendo un eje rostro-caudal en planos coronales de algunos de los neuropéptidos que se localizan en el ARQ	15
Figura 11. Representación de un corte sagital donde se muestran las estructuras cerebrales que expresan los subtipos de ERs	21
Figura 12. Diagrama de la familia de los fitoestrógenos	24
Figura 13. Representación de la estructura molecular de la genisteína	27
Figura 14. Representación esquemática del procedimiento utilizado	35
Figura 15. Marcación inmunohistoquímica de POMC y orexina en secciones coronales	38
Figura 16. Microscopio NIKON Eclipse 80i y ordenador utilizados para la realización de las fotografías de las muestras	38
Figura 17. Montaje mediante micrografías con un aumento 4X donde se muestra la marcación en una serie completa de las neuronas POMC-ir en el hipotálamo en secciones coronales	39
Figura 18. Detalle del atlas del encéfalo de la rata marcando las subdivisiones del ARQ según Paxinos y Watson (2015)	40
Figura 19. Rejilla y marcaje de las neuronas positivas en marcación de POMC en el ARQ	41
Figura 20. Montaje mediante micrografías con un aumento 4X donde se muestra la marcación en una serie completa de las neuronas orexina-ir en el hipotálamo en secciones coronales	41
Figura 21. Micrografías con marcaje inmunohistoquímico de las neuronas orexina-ir en dos secciones coronales en el HL y el continuo APF/DMH	42
Figura 22. Micrografía de una sección coronal donde se muestra la rejilla y el marcaje de las neuronas positivas en orexina en el continuo HL y APF/DMH	42
Figura 23. Evolución del peso en todos los grupos	44
Figura 24. Peso a la perfusión (P90) en todos los grupos	45
Figura 25. Evolución de la ingesta en todos los grupos	46
Figura 26. Ingesta total en todos los grupos	47
Figura 27. Concentraciones de estradiol en plasma en todos los grupos	48
Figura 28. Concentraciones de estradiol en plasma en machos	48
Figura 29. Concentraciones de estradiol en plasma en hembras	49
Figura 30. Número de neuronas POMC-ir en la subdivisión ArqM	51
Figura 31. Micrografías de secciones coronales del ArqM en todos los grupos donde se muestra la reducción producida por la genisteína en el ArqM en la expresión de POMC-ir	51
Figura 32. Número de neuronas orexina-ir en el APF/DMH	52
Figura 33. Número de neuronas orexina-ir en el HL	52
Figura 34. Número de neuronas orexina-ir totales	53

Figura 35. Marcación inmunohistoquímica donde se muestran ejemplos positivos para GPER-ir.....	65
Figura 36. Montaje con micrografías en blanco y negro de la expresión del GPER en el hipotálamo en secciones coronales	66
Figura 37. Micrografías donde se muestra la rejilla con cuadrantes con un área de 3300 μm^2 y el marcaje de las células GPER-ir para su análisis cuantitativo	67
Figura 38. Número de neuronas GPER-ir de la división posterior del ARQ en los grupos control	69
Figura 39. Número de neuronas GPER-ir en la división posterior del ARQ en machos.....	69
Figura 40. Número de neuronas GPER-ir en la subdivisión ArqPM en los grupos control.....	70
Figura 41. Micrografías de dos secciones coronales del ARQ. Se muestra el dimorfismo sexual con un patrón macho mayor que hembra en la subdivisión ArqPM en los grupos control	71
Figura 42. Número de neuronas GPER-ir en la subdivisión ArqL en machos y su localización en el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015).....	72
Figura 43. Número de neuronas GPER-ir en la subdivisión ArqPM en machos y su localización en el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015).....	72
Figura 44. Número de neuronas GPER-ir en la subdivisión ArqPL en machos y su localización en el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015).....	73
Figura 45a. Correspondencia de las subdivisiones anteriores del ARQ en una micrografía de una sección coronal con el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015).....	83
Figura 45b. Correspondencia de las subdivisiones posteriores del ARQ en una micrografía de una sección coronal con el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015).....	84
Figura 46. Sección coronal del ARQ con tinción de Nissl con una cuadrícula de puntos con un área de 3300 μm^2	85
Figura 47. Imagen de una sección histológica con tinción de Nissl en el ARQ. Se muestran ejemplos de las células que se han considerado para el recuento	86
Figura 48. (a) Imagen de una sección histológica con tinción de Nissl en el ARQ, y (b) la misma imagen con una rejilla con cuadrantes de área de 1497,69 μm^2	86
Figura 49. Volumen de la división posterior del ARQ en los grupos control.....	90
Figura 50. Volumen de la subdivisión ArqPM en los grupos control.....	91
Figura 51. Número de neuronas en la división posterior del ARQ en los grupos de dosis baja G10	92
Figura 52. Número de neuronas en la subdivisión ArqPM en los grupos control.....	93
Figura 53. Micrografía donde se muestra el menor número de neuronas en la subdivisión ArqPM en las hembras en el grupo control	93
Figura 54. Número de neuronas de la subdivisión ArqL en los grupos de dosis baja G10.....	94
Figura 55. Micrografía donde se muestra el menor número de neuronas en la subdivisión ArqL en los machos en el grupo de dosis baja G10	94
Figura 56. Número de neuronas de la subdivisión ArqPM en los grupos de dosis baja G10	94
Figura 57. Micrografía donde se muestra el menor número de neuronas en la subdivisión ArqPM en las hembras en el grupo de dosis baja G10.....	95
Figura 58. Número de neuronas de la subdivisión ArqD en los grupos de dosis alta G50	95
Figura 59. Micrografía donde se muestra el menor número de neuronas en la subdivisión ArqD en los machos en los grupos de dosis alta G50	95
Figura 60. Número de neuronas en la subdivisión ArqM en hembras y su localización en el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015).....	96
Figura 61. Densidad en la subdivisión ArqPM en los grupos de dosis baja G10	98
Figura 62. Proporción POMC/Nissl en el ARQ en hembras	99
Figura 63. Proporción GPER/Nissl en la subdivisión ArqL en los grupos de dosis baja G10.....	102
Figura 64. Proporción GPER/Nissl en la subdivisión ArqPL en los grupos de dosis baja G10.....	103
Figura 65. Densidad neuronas GPER-ir en la subdivisión ArqL en los grupos de dosis baja G10	104
Figura 66. Densidad neuronas GPER-ir en la subdivisión ArqPL en los grupos de dosis baja G10	104

Índice de tablas

Tabla 1. Divisiones y subdivisiones del ARQ.....	40
Tabla 2. Diferencias estadísticamente significativas en el peso en el factor sexo	44
Tabla 3. Diferencias estadísticamente significativas en la ingesta en el factor sexo	46
Tabla 4. Número de neuronas POMC-ir en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ.....	50
Tabla 5. Número de neuronas GPER-ir en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ.....	68
Tabla 6. Volumen en mm ³ de las subdivisiones, divisiones y total del ARQ	89
Tabla 7. Número de neuronas en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ.....	91
Tabla 8. Densidad de las subdivisiones, divisiones y total del ARQ	96
Tabla 9. Proporción POMC/Nissl en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ	98
Tabla 10. Proporción GPER/Nissl en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ.....	101

Introducción

1. Homeostasis energética y conducta de ingesta

En 1929, Walter Cannon introdujo el concepto de homeostasis para referirse a la propiedad mediante la cual los organismos mantienen las variables fisiológicas internas dentro de unos parámetros adecuados (Cannon, 1929). Relacionado con este concepto, la homeostasis energética se refiere al proceso biológico que regula el balance entre el aporte y el gasto energético por medio de la ingesta de alimentos y el metabolismo. Dicho proceso está modulado por diversos factores, tanto externos como internos al organismo, que integran las señales de hambre, saciedad y adiposidad que van a determinar la conducta de ingesta y la regulación del balance energético. Entre los factores externos se encuentran los factores sociales y ambientales, tales como el horario, el contexto, los ritmos circadianos y los recuerdos hedónicos, que determinan las pautas para regular la frecuencia con la que se come, así como la calidad y la cantidad que se ingiere en cada comida. También dentro de los factores externos son muy importantes los factores sensoriales asociados al consumo de los alimentos, como la palatabilidad, que puede inducir a aumentar la cantidad de comida que se ingiere o a elegir determinados alimentos entre las diferentes opciones disponibles. Un fenómeno bien caracterizado en la literatura asociado a la palatabilidad es la saciedad sensorial específica, que produce una reducción de las cualidades hedónicas asociadas a un alimento cuando se ingiere de forma continuada (Hopkins et al., 2015; Chapelot y Charlot, 2019). En cuanto a los factores internos, existen numerosos compuestos neuroendocrinos involucrados en el control del apetito, cuyo descubrimiento a lo largo de los últimos 100 años ha servido para clarificar e identificar los mecanismos que regulan la conducta de ingesta.

En el año 1953, Jean Mayer, de la Universidad de Harvard, en uno de los primeros intentos de explicación del mantenimiento de la homeostasis energética, propuso la hipótesis glucostática. Según esta hipótesis, los receptores hipotalámicos del cerebro detectan la reducción de la glucosa en sangre durante el periodo de ayuno provocando la activación de la conducta de ingesta, estableciendo al equilibrio dinámico entre los niveles de insulina y glucosa como el principal mecanismo del sistema nervioso para regular el balance energético (Mayer, 1953, 1996). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que esta hipótesis no ofrecía una explicación completa del proceso, porque si bien una reducción drástica de los niveles de glucosa puede desencadenar la conducta de ingesta, en condiciones normales no todas las comidas se inician antes de que los parámetros de

glucosa descieran hasta los valores necesarios para activar esta conducta (Woods, 2013). En el mismo año que Mayer proponía la hipótesis glucostática, Gordon C. Kennedy, de la Universidad de Cambridge, planteó la existencia de otro sistema de señalización diferente, en el que la secreción de hormonas específicas en la sangre se correlacionaba directamente con la grasa almacenada en el organismo (Kennedy, 1953). Esta teoría, que se denominó hipótesis lipostática, presentaba una gran dificultad explicativa en aquella época, ya que todavía no se habían identificado el o los factores o sistemas que serían los responsables de esta regulación. Actualmente ya se conoce que el hipotético sistema de señalización anticipado por Kennedy está regulado por la leptina, una hormona descubierta en 1994 por Jeffrey Friedman en la Universidad de Rockefeller, de la que se hablará más adelante (Zhang et al., 1994).

Paralelamente a estos trabajos sobre la regulación endocrina de la conducta de ingesta, en los años cincuenta del siglo XX se estaban realizando investigaciones para dilucidar el sustrato neural de esta conducta, ya que, aunque las señales de hambre y de saciedad tienen su origen en el aparato digestivo y los depósitos de reserva del organismo, debería existir un sistema neural que regulara todas estas señales. En 1942, A.W. Hetherington y Stephen Ranson, de la universidad de Chicago, en trabajos realizados en ratas, encontraron que la lesión bilateral de la zona tuberal anterior del hipotálamo tenía como resultado un incremento de la obesidad (Hetherington y Ranson, 1942). Casi diez años después, en 1951, los fisiólogos Bal Krishan Anand y John Brobeck, de la universidad de Yale, demostraron que la destrucción bilateral del hipotálamo lateral (HL) suprimía por completo la alimentación espontánea en la rata (Anand y Brobeck, 1951). Estos trabajos iniciales determinaron la implicación en la regulación de la conducta de ingesta de dos núcleos hipotalámicos, el ya mencionado HL, cuya lesión producía el cese de la ingesta en los animales e incluso la muerte a menos que estuvieran bajo alimentación forzada, y el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH del inglés *ventromedial hypothalamus*), cuya lesión incrementaba la ingesta más allá de las necesidades energéticas, produciendo hiperfagia y obesidad severa. Estos descubrimientos propiciaron que durante muchos años se considerara a estos dos núcleos como los principales reguladores de la ingesta, el HL actuaría como el centro del hambre y el VMH como el centro de la saciedad. No obstante, esta explicación no estaba exenta de problemas, como se pudo comprobar posteriormente. Por ejemplo, las técnicas de lesión cerebral empleadas en estos experimentos producían un daño que no se circunscribía al núcleo de interés, puesto que a menudo resultaban seccionadas las proyecciones o fibras

de paso por estos núcleos o incluso el tejido adyacente a la zona de la lesión y, por lo tanto, no se podían atribuir los efectos encontrados sobre la ingesta a estos dos núcleos exclusivamente. Aunque tanto el HL como el VMH tienen un papel importante en la conducta de ingesta, actualmente se considera que el verdadero centro integrador de las señales que regulan dicha conducta es el núcleo arqueado del hipotálamo (ARQ), representado en la figura 1 junto con el resto de los núcleos hipotalámicos mencionados (Gao y Horvath, 2008; Woods, 2013).



Figura 1. Representación esquemática de la anatomía del hipotálamo de la rata en un plano coronal. Se muestran las posiciones relativas del ARQ, VMH, DMH, PVH y HL. ARQ, núcleo arqueado; DMH, núcleo dorsomedial; HL, hipotálamo lateral; ME: Eminencia media; PVH, núcleo paraventricular; VMH, núcleo ventromedial.

A partir de estos primeros experimentos, se identificó al hipotálamo como el principal integrador de las señales que controlan la alimentación. Estas señales están formadas en su mayor parte por péptidos secretados tanto periféricamente como centralmente al sistema nervioso central (SNC) y cuya regulación es fundamental para lograr establecer un metabolismo energético equilibrado capaz de responder a las demandas del organismo.

2. Control neuroendocrino de la conducta de ingesta

El control neuroendocrino de la conducta de ingesta se realiza mediante la activación de diferentes estructuras en el SNC, principalmente en el hipotálamo, que responden a las señales periféricas que llegan desde el sistema gastrointestinal y el tejido adiposo. Estas estructuras ponen en marcha los circuitos encargados de regular el metabolismo energético por medio de la secreción de diversos neuropéptidos, cuya

función es promover el inicio o el cese de la ingesta con el objetivo de lograr una homeostasis energética adecuada.

En relación con las señales periféricas, en el sistema digestivo se secretan numerosos péptidos con un efecto anorexígeno, es decir, que promueven el cese de la ingesta, tales como la colecistoquinina (CCK), el péptido liberador de gastrina, la enterostatina, el péptido similar al glucagón-1 y el péptido YY. En cuanto a los péptidos orexígenos, que inducen el inicio de la ingesta, se ha identificado un único péptido, la grelina, que es producido principalmente en el estómago durante la fase de ayuno y cuya señal es transportada por los nervios aferentes vagales hasta el cerebro. Se piensa que la razón por la que en el sistema digestivo existe una mayor presencia de péptidos anorexígenos que orexígenos pudiera ser debida a que una de las funciones principales de las señales gastrointestinales es restringir el consumo excesivo de calorías para mantener el equilibrio energético (Cone, 1999; Woods et al., 2004; Sobrino et al., 2014; Mitchell y Begg, 2021).

Sin embargo, como ya anticipó Kennedy, los péptidos secretados durante la digestión de los alimentos tienen una vida muy corta, por lo que existen otros péptidos secretados periféricamente capaces de regular el peso del cuerpo a largo plazo. La principal hormona encargada de esta regulación es la leptina (del griego leptos, que significa “delgado”), que tras muchos años de investigación fue descubierta por Jeffrey Friedman en 1994 durante el desarrollo de sus trabajos con ratones transgénicos. Esta hormona es producida principalmente por los adipocitos (células grasas), se codifica en el gen *OB* (localizado en el cromosoma 7 en humanos) y sus efectos se hallan mediados por receptores específicos (LepRs) que se alojan en la membrana celular y están codificados por el gen *DB* (Houseknecht y Portocarrero, 1998; Gao y Horvath, 2007). Cuando la cantidad de grasa almacenada en los adipocitos aumenta, se libera leptina proporcionalmente en el torrente sanguíneo, constituyendo esta liberación una señal de retroalimentación negativa que informa al hipotálamo de que el cuerpo tiene bastantes reservas y que debe inhibir la ingesta mediante la disminución del apetito. Así mismo, el incremento de los niveles de leptina produce un aumento del gasto energético elevando la tasa metabólica basal y la temperatura corporal (Myers et al., 2008).

La integración de todas estas señales periféricas se produce a nivel del SNC en el hipotálamo, especialmente en el ARQ. La activación de este núcleo promueve la liberación de diversos neuropéptidos que, a través de sus efectos orexígenos o anorexígenos, se encargan de la regulación de la ingesta. Entre los neuropéptidos

orexígenos se encuentra la proteína relacionada con agouti (PRAG), el neuropéptido Y (NPY), la hormona concentradora de melanina (HCM) y la orexina. Entre los anorexígenos, el transcripto relacionado con la cocaína y la anfetamina (CART) y la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH), que procede de un precursor de mayor tamaño, la proopiomelanocortina (POMC) (Toda et al., 2017). En la figura 2 se muestra un esquema con los principales péptidos, tanto centrales como periféricos, involucrados en la regulación de la conducta de ingesta que se han comentado hasta este momento. A continuación, se desarrollan con más detalle las principales características del POMC y la orexina, los dos neuropéptidos estudiados en la presente tesis.

Péptidos implicados en la regulación de la ingesta

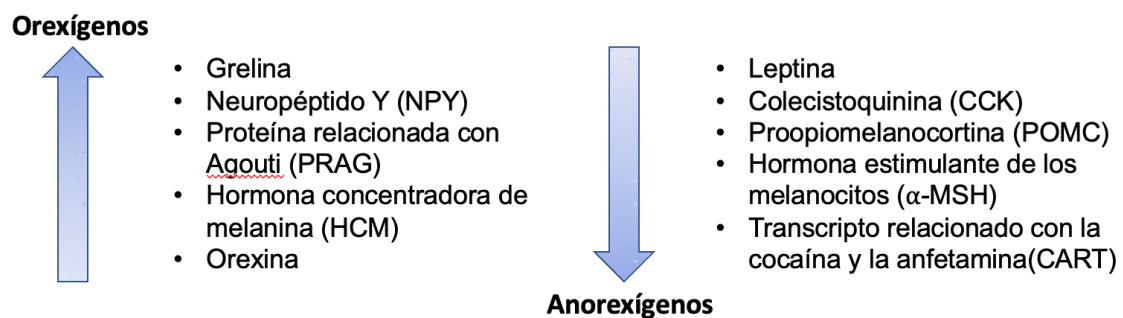


Figura 2. Péptidos implicados en la regulación de la ingesta.

2.1. La proopiomelanocortina

El neuropéptido POMC forma parte del sistema de melanocortinas, una de las vías neurales más estudiada en la regulación de la homeostasis energética debido a su influencia, entre otros procesos, en la ingesta de alimentos, la regulación de la glucosa y la presión arterial. Además de las poblaciones neuronales que expresan POMC en el ARQ, están incluidos en este sistema las neuronas que expresan NPY y PRAG que se originan en el ARQ, las neuronas que expresan POMC en el núcleo del tracto solitario (NTS) y los receptores de melanocortina 3 y 4 (MCR3 y MCR4) (Cone, 2005). Un esquema del sistema de melanocortinas se muestra en la figura 3.

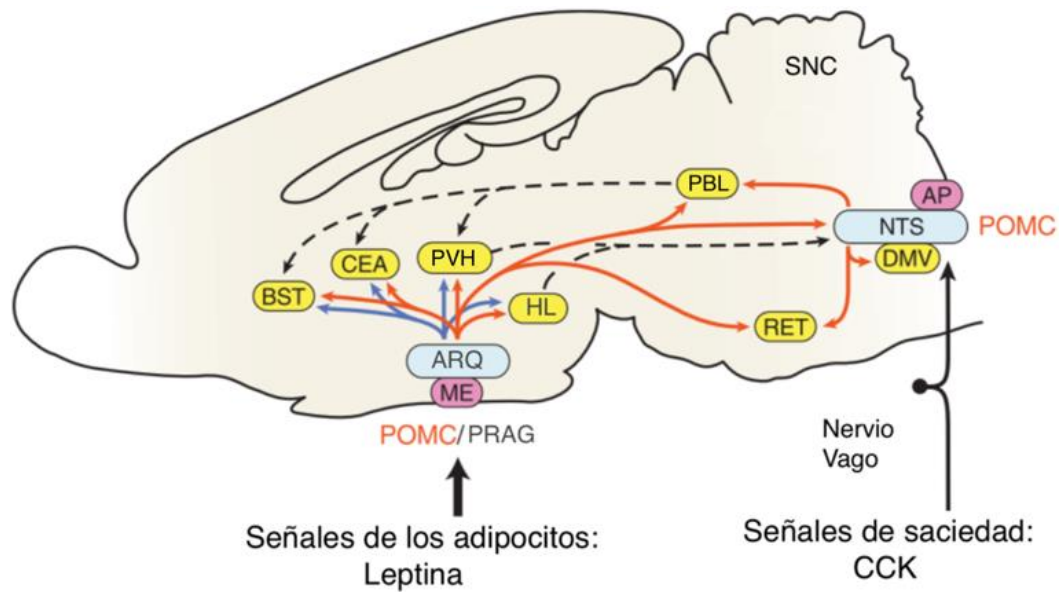


Figura 3. Esquema del sistema central de melanocortinas. En azul, núcleos con neuronas que expresan POMC; amarillo, núcleos que contienen neuronas positivas para MCR4; flechas rojas, proyecciones de las neuronas que expresan POMC; flechas azules, proyecciones de las neuronas que expresan PRAG; flechas punteadas, proyecciones secundarias que unen las neuronas que expresan POMC en el hipotálamo y el tronco encefálico con sitios efectores comunes. AP, área postrema; ARQ, núcleo arqueado; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; CeA, núcleo central de la amígdala; DMV, núcleo motor dorsal del vago; HL, hipotálamo lateral; PBL, núcleo parabraquial lateral; ME, eminencia media; NTS, núcleo del tracto solitario; PVH, núcleo paraventricular del hipotálamo; RET, núcleo reticular. Modificada de Cone (2005).

La proopiomelanocortina es un polipéptido precursor de varias proteínas como la α -MSH, la corticotropina (ACTH) y la β -endorfina y la privilegiada localización de las neuronas que expresan este neuropéptido en el ARQ del hipotálamo y el NTS del tronco cerebral le confiere la capacidad para poder interactuar con numerosas señales hormonales y con otras estructuras cerebrales (Cone, 1999; Hill y Faulkner, 2017). Dentro de este sistema de melanocortinas, las poblaciones neuronales que expresan POMC parecen ser las principales integradoras de las señales homeostáticas que llegan al ARQ, por lo que desempeñan una función fundamental en la regulación del balance energético tanto a corto como a largo plazo. Los ratones con delección del gen *Pomc* o con ablación de neuronas que expresan POMC son obesos y, en contraste, los modelos genéticos de sobreexpresión de POMC han demostrado proteger contra la obesidad (Wardlaw, 2011; Toda et al., 2017). Respecto a la expresión de los receptores de las distintas señales que regulan la homeostasis energética en estas neuronas, son numerosos los trabajos que

indican una distribución anatómica diferencial a lo largo del nivel rostro-caudal y medial-lateral de las neuronas que expresan POMC en el ARQ que responden a los diferentes neuropéptidos. Por ejemplo, en ratones, las neuronas que expresan POMC y responden a la insulina se localizan en el área más rostral del ARQ, mientras que las neuronas que expresan POMC y responden a la serotonina y a la leptina se distribuyen en el resto de la extensión longitudinal del núcleo, con las neuronas sensibles a la serotonina en áreas mediales y las neuronas sensibles a la leptina en áreas más laterales, como se puede ver en la figura 4 (Sohn et al., 2011; Toda et al., 2017).

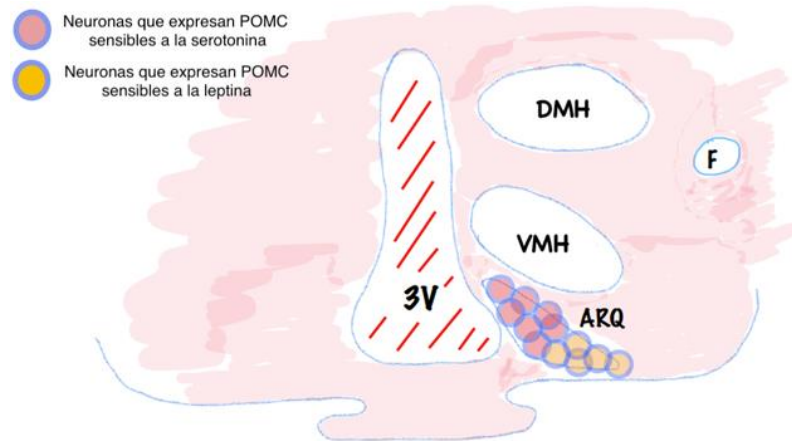


Figura 4. Representación esquemática de la localización de neuronas que expresan POMC sensibles a la leptina y a la serotonina en el ARQ.

Además de su importante función en la regulación del metabolismo y la conducta de ingesta, las poblaciones neuronales que expresan POMC también juegan un papel muy importante en el desarrollo de las conexiones de los circuitos hipotalámicos. En ratones, las proyecciones del ARQ hasta otros núcleos hipotalámicos están incompletas al nacer, y en respuesta al aumento de leptina entre el día postnatal 6 (P6) y el P14, se completa el crecimiento axonal. Esta activación es el resultado de las interacciones entre los efectos organizacionales permanentes sobre el desarrollo temprano y los efectos dependientes de los niveles hormonales, ya que un déficit de los niveles de leptina en el desarrollo de estos circuitos desemboca en un aumento del peso y la adiposidad (Bouret, 2010; Toda et al., 2017).

2.2. La orexina en la regulación de la conducta de ingesta

La orexina o hipocretina es un neuropéptido descubierto en 1998 casi simultáneamente por dos grupos de investigación (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998) al que inicialmente se le atribuyó una función en la retroalimentación central que regula la ingesta de alimentos, para posteriormente ampliar su campo de acción al control del ciclo sueño-vigilia, el procesamiento de la recompensa relacionado con conductas apetitivas, la regulación autónoma y el metabolismo de la glucosa (Marcos y Coveñas, 2021).

Su nombre procede de la palabra griega “orexis” que significa apetito, ya que puede estimular el consumo de alimentos cuando se administra de forma centralizada. Se produce exclusivamente en el HL, el hipotálamo dorsomedial (DMH) y el área perifornical (APF), intervando un numeroso grupo de regiones tanto troncoencefálicas como corticales y límbicas. Existen dos formas de este péptido, la orexina A y la orexina B, que actúan en dos receptores acoplados a proteínas G (OXR1 y OXR2), derivados de genes separados y que se expresan de manera diferencial en todo el SNC. Como se puede ver en la figura 5, los OXR1 y OXR2 se expresan en la corteza prefrontal medial, el hipocampo, el núcleo central de la amígdala (CeA), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), el rafe dorsal (RD), el área tegmental ventral (ATV), el núcleo tegmental laterodorsal (LDT)/núcleo pedunculopontino (PPT) y el NTS. El OXR1 se expresan selectivamente en el *locus coeruleus* (LC) y la corteza cingulada, mientras que los OX2R se expresan selectivamente en el núcleo tuberomamilar (TM) y el núcleo *accumbens* (NAcc) (Bäckberg et al., 2002; Han et al., 2020; Li y de Lecea, 2020). En el hipotálamo se ha encontrado el OXR1 en el núcleo supraóptico (SON), en el núcleo paraventricular (PVH) (divisiones magno y parvocelulares), en el núcleo periventricular, el VMH, el DMH, el HL y el TM. En el ARQ, el OXR1 se localiza tanto en las neuronas que expresan NPY/PRAG en el área ventromedial como en neuronas que expresan POMC/CART en el área ventrolateral (Bäckberg et al., 2002).

Las investigaciones sobre la orexina que se han llevado a cabo desde hace más de veinte años han demostrado que las inyecciones intracerebroventriculares de orexina A aumentan la ingesta de alimentos en ratas, especialmente la ingesta de alimentos ricos en grasas. Su localización en el HL, el DMH y el APF confiere a la orexina un papel muy importante en la integración de los aspectos hedónicos de la alimentación, ya que envía

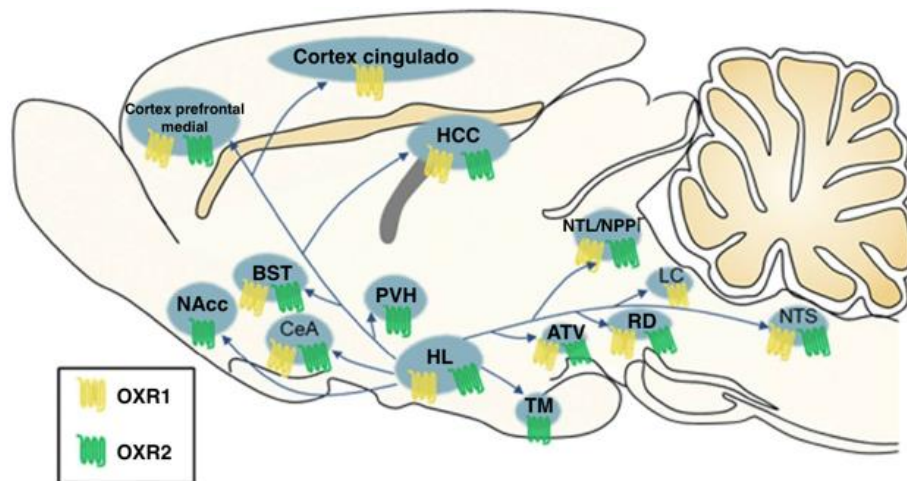


Figura 5. Representación de la distribución de OXR1 y OXR2 y las proyecciones desde el HL. BNST, núcleo del lecho de la estria terminal; CeA, núcleo central de la amígdala; RD, rafe dorsal; HCC, hipocampo; LC, *locus coeruleus*; LDT/PPT, núcleo tegmental laterodorsal/núcleo pedunculopontino; HL, hipotálamo lateral; mPFC, corteza prefrontal medial; NAcc, núcleo accumbens; NTS, núcleo del tracto solitario; OXR1, receptor de orexina tipo 1; OXR2, receptor de orexina tipo 2; PVH, núcleo paraventricular hipotalámico; TMN, núcleo tuberomamilar; ATV, área tegmental ventral. Adaptado de Han et al. (2020).

aferencias a las poblaciones neuronales que expresan tanto NPY como POMC en el ARQ y al ATV de la vía mesolímbica de los circuitos de recompensa (Gao et al., 2017; Marcos y Coveñas, 2021). En ratas, los resultados de diversos estudios revelan que las neuronas que expresan orexina en el HL inervan directamente el ARQ, formando sinapsis con las neuronas que expresan NPY y POMC (Guan et al., 2001). Además, las neuronas que expresan orexina también muestran inmunorreactividad al LepR, lo que podría indicar la existencia de una interacción directa entre la leptina y la orexina, interviniendo en la regulación central de los procesos metabólicos y endocrinos tanto en roedores como en primates (Horvath, Diano y van den Pol., 1999).

La amplia expresión de sus receptores y las proyecciones de las neuronas que expresan orexina en el hipotálamo muestran la gran variedad de funciones fisiológicas reguladas por estas poblaciones neuronales, convirtiendo al sistema orexinérgico en un posible integrador de las diferentes señales homeostáticas a través tanto de las conexiones directas como indirectas entre los diferentes núcleos hipotalámicos y el sistema mesolímbico de la recompensa.

2.3. Circuitos hipotalámicos que regulan la conducta de ingesta

En el ARQ se localizan dos tipos de circuitos que se comunican con otras estructuras hipotalámicas para ejercer sus efectos orexígenos y anorexígenos:

- Los circuitos orexígenos están formados por las poblaciones de neuronas que expresan NPY/PRAG en el ARQ y se proyectan al APF y al HL, donde se localizan la HCM y la orexina, y al PVH, donde las proyecciones de las neuronas NPY/PRAG llegan a las neuronas que expresan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de tirotrina (TRH) y la oxitocina, hormonas para las que se han descrito efectos anorexígenos. La acción antagonista de la PRAG y del NPY sobre los receptores MCR4 y NPY en estas neuronas del PVH produce un efecto orexígeno promoviendo la ingesta de alimentos (Morton et al., 2014; Dearden y Ozanne, 2015).
- Los circuitos anorexígenos están formados por las poblaciones de neuronas POMC/CART que igualmente proyectan hacia el APF, el HL y al PVH, y la secreción por parte de las neuronas que expresan POMC/CART de la α -MSH sobre estos núcleos hipotalámicos produce un efecto agonista sobre los mismos receptores MCR4 sobre los que actúa el PRAG en el PVH con el efecto contrario, provocando el cese de la ingesta y aumentando el gasto energético. Así mismo, dentro de estos circuitos en el ARQ se produce una inhibición recíproca, es decir, existe una inhibición por parte de las neuronas POMC/CART de la actividad de las neuronas NPY/PRAG y viceversa (Gali Ramamoorthy et al., 2015; Shen et al., 2017).

En la figura 6 se muestra una representación mediante un montaje con dos secciones coronales del encéfalo de la rata de los circuitos orexígenos y anorexígenos descritos que regulan la conducta de ingesta en el hipotálamo.

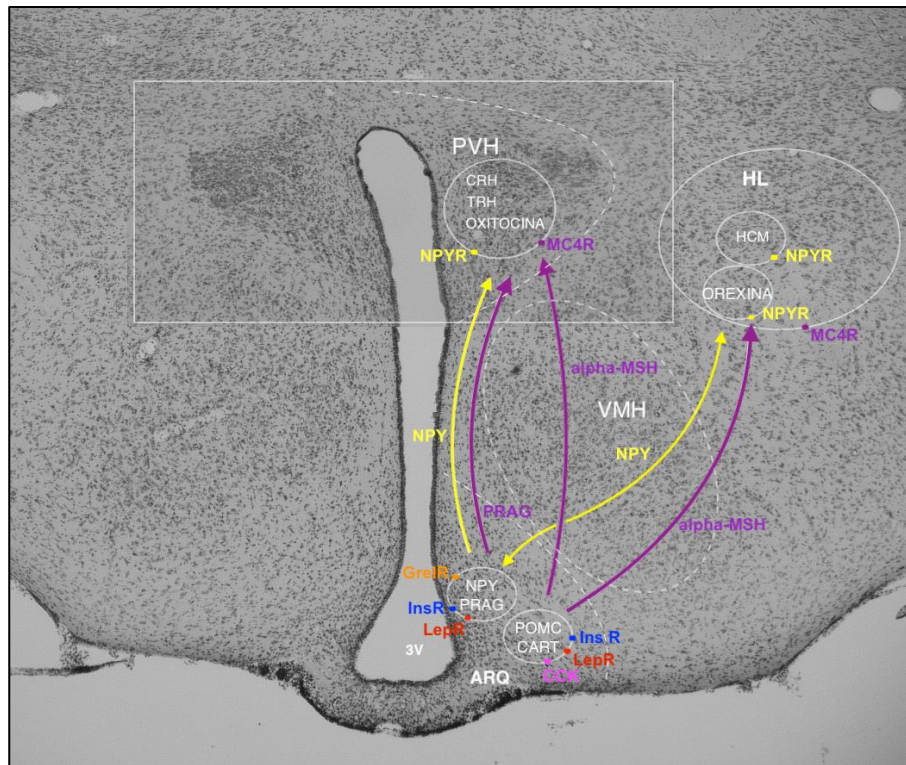


Figura 6. Micrografía donde se representan los circuitos hipotalámicos involucrados en la regulación de la conducta de ingesta. El ARQ realiza proyecciones desde las poblaciones neuronales que expresan NPY (en amarillo) y de las neuronas que expresan POMC (en morado) hacia el PVH y el HL para producir las respuestas tanto orexígenas como anorexígenas que regulan la conducta de ingesta. 3V: tercer ventrículo; α -MSH: hormona estimulante de melanocitos; ARQ, núcleo arqueado; CART, transcripto relacionado con la cocaína y la anfetamina; CCK, colecistoquinina; CRH, hormona liberadora de corticotropina; GreR, receptor de grelina; HL, hipotálamo lateral; HCM, hormona concentradora de melanina; InsR, receptor de insulina; LepR, receptor de leptina; MC4R, receptor de melanocortinas 4; NPY, neuropéptido Y; NPYR, receptor del neuropéptido Y; POMC, proopiomelanocortina; PRAG, proteína relacionada con agouti ; PVH, hipotálamo paraventricular; TRH, hormona liberadora de tirotrina; VMH: núcleo ventromedial.

Además de los núcleos hipotalámicos, otras regiones del tronco del encéfalo participan en la regulación de la ingesta. Por ejemplo, el NTS conecta las señales procedentes del sistema gastrointestinal y el hipotálamo, enviando proyecciones al PVH y al ARQ a través del núcleo parabraquial (PB). Así mismo, la información metabólica canalizada por el ARQ también modula la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico por medio de las proyecciones al NAcc a través del HL y del ATV, actuando en los sistemas de recompensa estriados y corticales para modular el aspecto motivacional de la alimentación en conjunto con los sistemas homeostáticos (Grill y Kaplan, 2001; Gao

y Horvath, 2008; Bake et al., 2020). Un esquema de todos los circuitos implicados en la regulación de la conducta de ingesta se muestra en la figura 7.

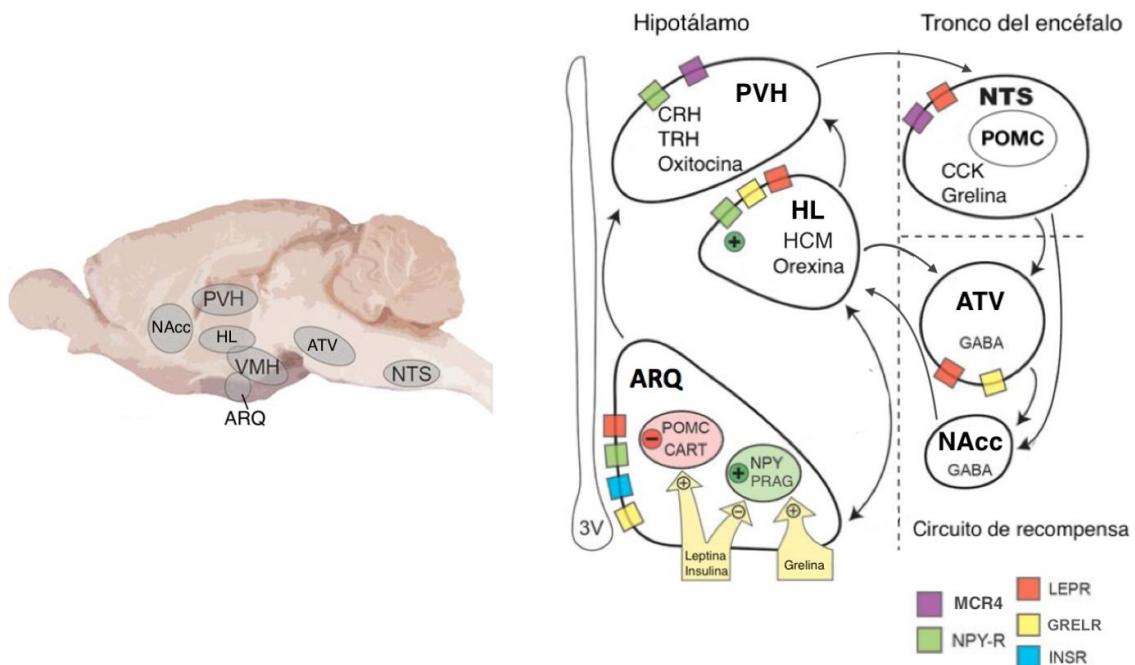


Figura 7. Representación de los circuitos cerebrales implicados en la regulación de la conducta de ingesta. Los circuitos hipotalámicos responsables de la homeostasis se comunican directa o indirectamente con el NTS del tronco del encéfalo donde se localizan subpoblaciones de neuronas que expresan POMC del sistema de melanocortinas que reciben la información del tubo digestivo a través del nervio vago. Así mismo, los núcleos hipotalámicos también realizan conexiones con el circuito de recompensa que modula la respuesta por medio de las vías dopaminérgicas del ATV y el NAcc.

Modificado de Fischer y O'Connell (2017).

De todo lo expuesto hasta este momento se puede destacar el importante papel del ARQ en la integración y regulación de las señales que regulan la conducta de ingesta. Este núcleo ha sido estudiado en profundidad en la presente tesis, por lo que en el siguiente apartado se desarrollan sus principales características neuroanatómicas y funcionales.

3. El núcleo arqueado del hipotálamo

El ARQ se localiza en la zona periventricular del hipotálamo con una longitud rostrocaudal de aproximadamente 2,6 mm en la rata (desde Bregma -1.72 mm hasta Bregma -4.36 mm) rodeando la zona ventral del tercer ventrículo. En su parte más rostral se inicia circundado por el área retroquiasmática, con una población de neuronas ubicadas ventralmente al tercer ventrículo. Una vez que la eminencia media se hace visible, se pueden distinguir las subdivisiones medial y lateral del área anterior del ARQ, que se extienden aproximadamente desde Bregma -1.92mm hasta Bregma -3.36 mm, coincidiendo con la parte más caudal del VMH. A partir de esta localización se inicia el área posterior del ARQ, en la que se pueden distinguir las subdivisiones medial y lateral hasta aproximadamente Bregma -4.36 mm, donde termina el tercer ventrículo (Chronwall, 1985). Utilizando la tinción de Golgi, se han identificado diversos tipos de neuronas en el ARQ (figura 8), entre las que se incluyen neuronas unipolares no ramificadas, ramificadas, bipolares ramificadas, multipolares pequeñas y gran multipolar (González-Burgos et al., 1993). Probablemente, esta heterogeneidad refleja la diversidad de funciones en las que está involucrado el núcleo.

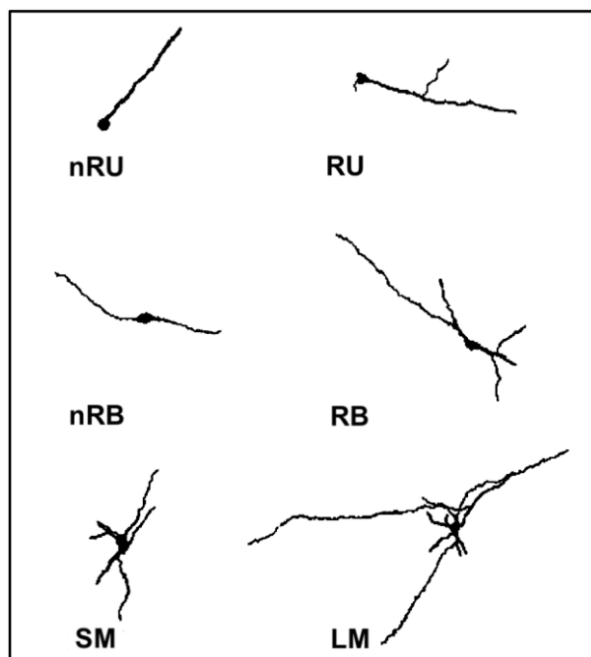


Figura 8. Dibujos de cámara lucida de los tipos neuronales identificados en el núcleo arqueado del hipotálamo de rata. nRU: unipolar no ramificado; RU: unipolar ramificado; nRB: bipolar no ramificado; RB: bipolar ramificado; SM: pequeño multipolar; y LM: gran multipolar. Adaptado de González-Burgos et al. (1993).

Morfológicamente, el tamaño celular varía desde células pequeñas en las áreas mediales periventriculares a células de tamaño medio y grande en las zonas más laterales, como se puede observar en la figura 9.

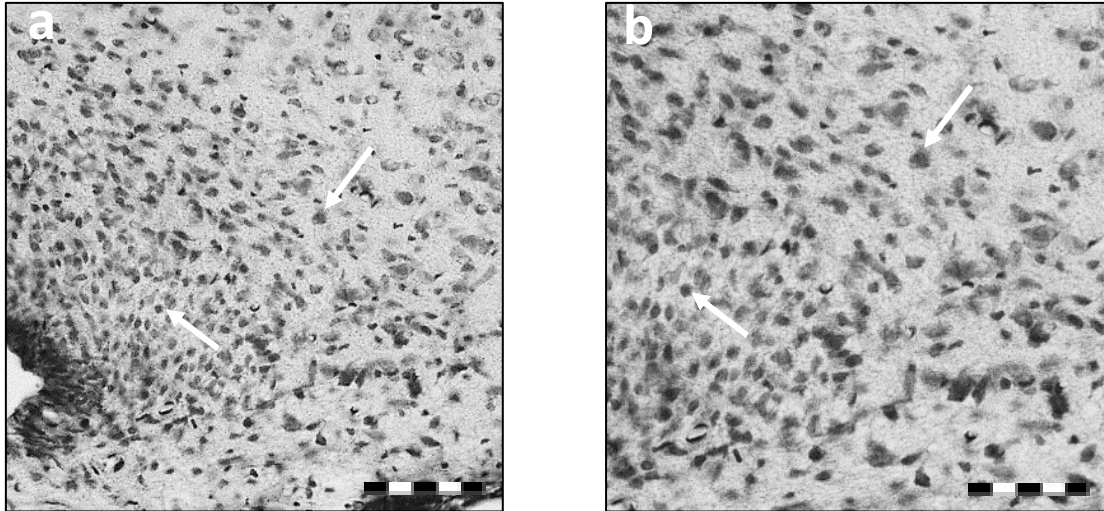


Figura 9. Micrografías de un proceso con tinción de Nissl en el ARQ de la rata. (a) En la micrografía se puede observar el área medial del núcleo y su proximidad al tercer ventrículo y (b) se muestra una ampliación en la que se observa el mayor tamaño de las neuronas situadas en el área lateral. Las flechas indican un ejemplo de las células de diferente tamaño en ambas imágenes. Barra: a: 100 μm , b: 50 μm .

El sistema de melanocortinas configura una de las principales poblaciones neuronales del ARQ. Los somas de las neuronas del sistema de melanocortinas están localizados tanto en las áreas mediales como en las laterales, generalmente siendo más abundantes en una posición ventrolateral y lateral a los bordes convencionales del ARQ. Se pueden encontrar cuerpos celulares positivos para POMC y CART en toda la extensión rostrocaudal del núcleo. Estas neuronas tienen un soma de tamaño grande, de 10-15 μm de diámetro, poligonales y con dendritas relativamente extensas (Chronwall, 1985) y realizan numerosas conexiones con estructuras extrahipotálicas, como la comisura anterior, el BNST y el núcleo septal lateral, así como el putamen y el ya comentado NAcc. Más caudalmente, se localizan fibras que se proyectan hacia la región periventricular del tálamo y hacia la amígdala medial. Dentro del hipotálamo, las fibras más densas se proyectan hacia el núcleo periventricular, el PVH y al APF, aunque se pueden observar algunas fibras en la mayoría de las regiones hipotalámicas (Chronwall, 1985). Las neuronas del ARQ que expresan POMC también envían dos conjuntos descendentes de proyecciones al tronco del encéfalo: uno a través del tegmento gris periacuaductal y

dorsomedial, que inerva el NTS rostral y núcleo reticular lateral, y el otro, mediante el haz descendente del área tegmental ventral, que inerva el NTS rostral, el núcleo ambiguo de la médula ventrolateral y la médula espinal (Cone, 2005). Como ya se ha apuntado, dentro del sistema de melanocortinas también se encuentran las neuronas que expresan el NPY. El ARQ contiene una densidad muy alta tanto en áreas rostrales como caudales de estas poblaciones neuronales, con un soma redondeado y pequeño ubicados en la parte medial del núcleo (Chronwall, 1985).

Otros de los péptidos que se encuentran en el ARQ son la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), la somatostatina, la dopamina y la β -endorfina. Esta última es un producto de la proopiomelanocortina, agonista de los receptores de opioides μ , con potentes efectos analgésicos en todo el organismo y que participa en aspectos como la recompensa, el estrés, la regulación homeostática y la neuroinflamación. Se han encontrado células positivas para β -endorfina en las divisiones lateral, medial y dorsal del ARQ (Douglas et al., 2002; Pilozzi et al., 2020).

En la figura 10 se muestra la localización en el ARQ de algunos de los neuropéptidos comentados.

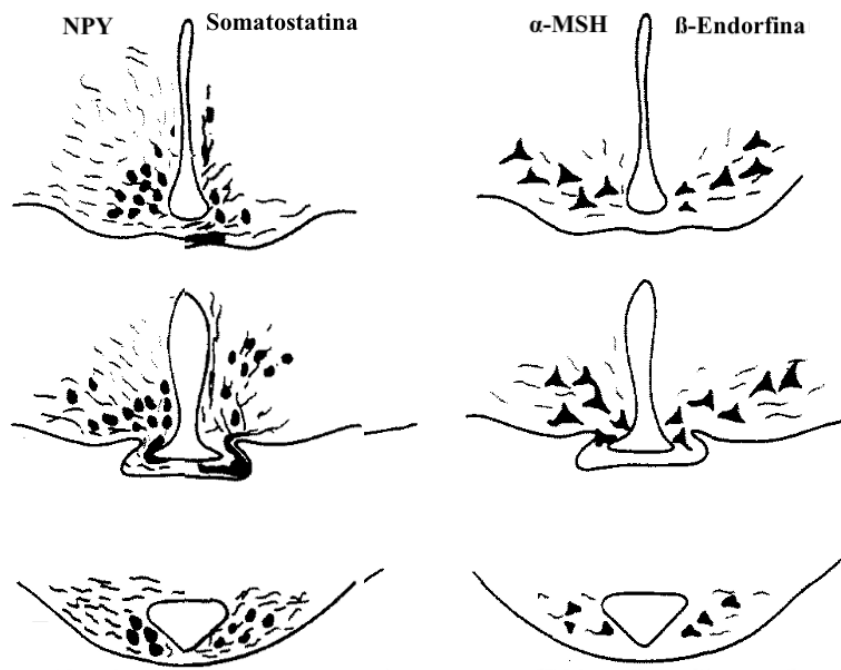


Figura 10. Representación de la localización siguiendo un eje rostro-caudal en vistas coronales de algunos de los neuropéptidos que se localizan en el ARQ. Adaptado de Chronwall (1985).

3.1. Dimorfismo sexual en el núcleo arqueado

El número de neuronas y su abundancia relativa en diferentes partes del cerebro es un determinante de la función neural y, en consecuencia, de las diferentes conductas controladas por cada núcleo. Aunque los individuos y las especies de mayor tamaño generalmente tienen cerebros más grandes que contienen más neuronas, la densidad de estas neuronas es muy inferior (Williams y Herrup, 1988). Igualmente, la proporción de diferentes tipos de neuronas dentro de un solo núcleo y la proporción de neuronas en partes interconectadas del sistema nervioso son determinantes clave del rendimiento neuronal. Las variaciones entre proporciones de poblaciones homólogas de neuronas en diferentes especies se deben a que el organismo y el comportamiento de cada especie está preparado para adaptarse de diferentes maneras al entorno (Wimer et al., 1976). Las diferencias sexuales del SNC se presentan en dos patrones morfológicos. En un patrón, los machos muestran medidas más grandes que las hembras y, en el otro, lo contrario. La diferenciación sexual depende tanto de efectos genéticos como de efectos organizacionales debidos a la presencia y cantidad de hormonas sexuales y sus respectivos receptores, así como de los sustratos y enzimas necesarios para su producción, tanto en las gónadas como dentro del propio cerebro (Asarian y Geary, 2013). Este dimorfismo sexual se ha descrito respecto al volumen y el número de neuronas en estructuras como el LC y la amígdala (Pinos et al., 2001; Carrillo et al., 2007). De la misma manera, en el hipotálamo existen núcleos sexualmente dimorfos, como el VMH, el mPOA, el BNST y el núcleo periventricular anteroventral, con diferentes patrones dependiendo de la estructura analizada (del Abril et al., 1987; Guillamón et al., 1988; Scott et al., 2015). En la literatura, ya se han realizado estimaciones del volumen, número de neuronas y densidad del ARQ en ratas macho y hembra (Hsu y Peng, 1978; Peng y Hsu, 1982; Yang et al., 1993), aunque en solo un trabajo se han analizado las diferencias entre sexos en estos valores morfológicos (Leal et al., 1998). En este estudio, se ha encontrado que, tanto en el volumen como en el número de neuronas en la rata adulta, los machos presentan valores mayores que las hembras. En otros trabajos se ha encontrado que el número de neuronas del ARQ desciende con la edad de una manera sexodimorfa, ya que se produce una pérdida de neuronas en el ARQ en ratas hembra con una edad entre 26 y 27 meses respecto a las ratas de 3.5-5 meses, pero esta pérdida no se produce en ratas macho, sugiriendo un efecto de las hormonas sexuales en la muerte neuronal relacionada con la edad (Hsu y Peng, 1978; Peng y Hsu, 1982; Yang et al., 1993).

4. Programación de los circuitos neuronales que controlan la conducta de ingesta

En el sistema neuroendocrino, los elementos que regulan la homeostasis energética se programan en periodos muy concretos del desarrollo, durante los cuales el sistema nervioso es especialmente vulnerable a la acción de determinados factores del medio interno o externo del organismo (Parker y Bloom, 2012). Durante estos periodos, denominados períodos de máxima susceptibilidad, los desequilibrios alimentarios podrían afectar a la programación neuronal de este sistema. Esto puede tener consecuencias adversas, como un aumento de las probabilidades de sufrir trastornos alimentarios en la edad adulta y el riesgo de padecer enfermedades como la diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia o arterosclerosis (Bouret, 2017).

Se han descrito numerosos factores que modulan o participan en la programación de la conducta de ingesta, como las hormonas, la alimentación, el estrés o la exposición a agentes ambientales (Bouret, 2010), aunque resulta difícil concretar el papel que desempeña cada uno de ellos para que la regulación de este sistema sea óptima (Gali et al., 2015). Entre las dificultades para asignar una función determinada a cada uno de estos factores, se encuentra la alteración producida en la mayoría de las hormonas relacionadas con la homeostasis energética en relación directa con el estado metabólico de la madre. Además, algunas de estas hormonas desempeñan funciones diferentes en épocas tempranas del desarrollo y en la edad adulta (Dearden et al., 2021; Münzberg y Morrison, 2015). El hipotálamo se forma durante el período perinatal y durante el mismo es vulnerable a las condiciones ambientales fetales y neonatales. Diversos estudios muestran que en ratas y ratones el desarrollo hipotalámico no termina en la época embrionaria, ya que mientras la neurogénesis se produce en el periodo prenatal, el desarrollo de los circuitos cerebrales se produce postnatalmente, al menos hasta la tercera semana de vida (Nilsson et al., 2005; Bouret et al., 2004). Por otra parte, entre los factores hormonales que actúan en la determinación de estos circuitos, los niveles adecuados de leptina, grelina e insulina durante las épocas perinatales son esenciales para su correcto desarrollo (Bouret, 2017). La leptina, como se ha expuesto anteriormente, se produce y secreta predominantemente desde el tejido adiposo hacia la circulación sanguínea (Münzberg et al., 2015). Además de su función ya descrita como indicador de las reservas de grasa del organismo y como señal para comunicar el estado de reposición de energía

corporal al SNC (Myers et al., 2008), estudios realizados con ratones muestran que la leptina tiene un papel neurotrófico en el desarrollo de los circuitos hipotalámicos en las primeras semanas de vida. Bouret, et al., en el año 2004, demostraron que la alteración de los niveles de leptina en estos periodos modifica el patrón de desarrollo normal de las proyecciones hipotalámicas desde el ARQ hasta el DMH, el PVH y el HL, proponiendo que durante el periodo perinatal esta hormona desempeña una función trófica en el desarrollo del circuito de la ingesta (Bouret et al., 2004). Así mismo, en otro trabajo de este grupo con ratones (Steculorum y Bouret, 2011), se ha propuesto que también la grelina podría tener un papel modulador durante esta misma época perinatal, ya que, al igual que la leptina, participa en la configuración de la conectividad entre los núcleos hipotalámicos que regulan la ingesta alimentaria. También se ha sugerido que la insulina podría desempeñar una función en la programación de los circuitos cerebrales, debido a que la expresión del receptor de insulina en el encéfalo es mucho mayor durante la fase neonatal que en la edad adulta, tanto en roedores como en humanos (Dearden et al., 2021).

Además de la leptina, la grelina y la insulina, los esteroides gonadales pueden participar en la modulación o en la integración de todas estas señales en el hipotálamo. (Meyer et al., 2011). Se conoce desde hace tiempo que los estrógenos y/o andrógenos son los responsables de la diferenciación sexual del cerebro y el comportamiento, ejerciendo efectos organizacionales permanentes en varios circuitos neuronales como, por ejemplo, en el sistema vomeronasal en la rata y en el conejo (Guillamón y Segovia, 1997; Segovia et al., 2006). Estos efectos se reflejan directamente en los comportamientos y funciones sexualmente diferenciados de los individuos adultos (López y Tena-Sempere, 2015). Tanto la testosterona como los estrógenos influyen en el metabolismo, la homeostasis energética, la ingesta de alimentos y la distribución de la grasa corporal a través de sus receptores en las células diana, actuando como factores de transcripción para regular la expresión de genes y controlando el crecimiento, la diferenciación celular y la homeostasis (Meyer et al., 2011). Por lo tanto, la alteración de todas estas hormonas, especialmente en los periodos de máxima susceptibilidad, podría modificar el funcionamiento y el desarrollo normal de las conexiones neuronales en estos circuitos. Entre los elementos que podrían mediar estas alteraciones se encuentran el estrés, los trastornos alimentarios, como la sobrealimentación y la desnutrición, y diversos factores ambientales, como los disruptores endocrinos, que podrían tener consecuencias fenotípicas a largo plazo, tanto estructurales como funcionales, en el desarrollo del SNC

y los circuitos que regulan la conducta de ingesta y el metabolismo (Dearden y Ozanne, 2015).

5. El estradiol en la homeostasis energética

Además de su importante papel en el control de las conductas reproductoras, las hormonas sexuales son responsables de muchas otras funciones corporales, entre las que se encuentra el control de la homeostasis energética. Los estrógenos, cuyo principal representante es el estradiol, son potentes moduladores de la ingesta, el gasto de energía y el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Brown y Clegg, 2010).

5.1. Mecanismos del estradiol en el SNC

El estradiol es una hormona esteroidea que se sintetiza a partir del colesterol. Después de la escisión de la cadena lateral, el intermediario clave es la androstenediona, que se convierte en testosterona, la cual, a su vez, puede convertirse en estradiol mediante la acción de la enzima aromatasa (Asarian y Geary, 2013). En las hembras, el estradiol, producido por las células granulosas de los ovarios, actúa en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario regulando la comunicación entre las gónadas y el hipotálamo, inhibiendo y estimulando la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y estimulando el comportamiento sexual (Stincic et al., 2018). También está presente en los machos a partir de la síntesis de andrógenos aromatizables, ya que, a través de inhibidores de aromatasa en el cerebro, se ha demostrado que la síntesis local de estradiol en el SNC regula el comportamiento y la cognición en animales machos y hembras (Azcoitia et al., 2018).

El estradiol modula la excitabilidad neuronal hipotalámica en los circuitos implicados en la reproducción, el balance energético, la temperatura, los ritmos circadianos y el estrés, además de regular la formación neuronal sináptica en el hipocampo, el estriado y el cerebelo (Stincic et al., 2018). Debido a su carácter lipídico, el estradiol es capaz de atravesar la membrana celular y actuar en los receptores intracelulares para regular la transcripción genómica dentro del núcleo celular y activar los receptores estrogénicos clásicos α y β (ER α y ER β). Además, también interacciona sobre diferentes tipos de receptores de membrana ionotrópicos y metabotrópicos

acoplados a proteínas G, por lo que pueden interactuar con los sistemas de segundos mensajeros de la célula e intervenir en los procesos de diversas proteínas y enzimas (Sato et al., 2016; Stincic et al., 2018). Los mecanismos celulares y genómicos a través de los cuales los estrógenos ejercen sus efectos son complejos, implicando procesos transcripcionales que afectan a cientos de genes y que modulan la excitabilidad de los receptores de membrana (Kelly et al., 2005).

Los mecanismos genómicos clásicos bien caracterizados de transactivación implican la unión del ligando, la dimerización del receptor nuclear y la unión a los elementos de respuesta del núcleo (EREs). En la membrana, los ER α actúan como receptores acoplados a proteínas G que promueven diversas cascadas de transducción de señal (cadenas de moléculas que transmiten la información dentro de la neurona) y que impactan tanto en las funciones genómicas como en las no genómicas (Pedram et al., 2014). Los resultados a partir de las investigaciones sobre la señalización no genómica demuestran que, si bien algunas de estas cascadas de señalización iniciadas en la membrana se asocian con los efectos rápidos sobre la actividad del canal iónico, otras conducen a la regulación de la transcripción génica. Ejemplos de estas cascadas son el transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3) y la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K). La mayoría de los mecanismos celulares descritos tienen una función crucial en la supervivencia celular, la apoptosis y en la función y el desarrollo neurológico (Clegg et al., 2003; Stincic et al., 2018).

La diversidad de acciones del estradiol es posible porque sus receptores se distribuyen a lo largo de todo el SNC, como se puede observar en la figura 11, aunque dependiendo del tipo de receptor se distribuyen de manera diferente. Por ejemplo, el órgano subfornical (SFO) expresa ER α , pero no ER β , el SON y el PVH, junto con el RD, donde se originan los cuerpos celulares de las neuronas de serotonina que regulan la ingesta de alimentos, expresan ER β , pero no ER α y otras regiones del cerebro, como el NTS, el HL, el ARQ, la región anteroventral del tercer ventrículo y el área preóptica medial (mPOA), expresan ambos subtipos de receptores (Santollo y Daniels, 2015). Los ER α y los ER β también se encuentran en otras regiones del cerebro, como la corteza, el hipocampo, el cerebro medio, el cuerpo estriado, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert (Shughrue et al., 1996). Los estudios de colocalización han identificado ER α en neuronas que contienen ácido gamma-aminobutírico (GABA), neurotensina, somatostatina, galanina, dopamina, norepinefrina, NPY, POMC y kisspeptina. En su mayor parte, los ER β se expresa en diferentes poblaciones de neuronas, como las que

contienen GnRH, vasopresina, oxitocina, así como en las neuronas de serotonina (Stincic et al., 2018). Además, ER α y ER β están localizados en neuronas que expresan CRH y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), así como en subpoblaciones de neuronas hipotalámicas no identificadas (Cardona-Gómez et al., 2001).

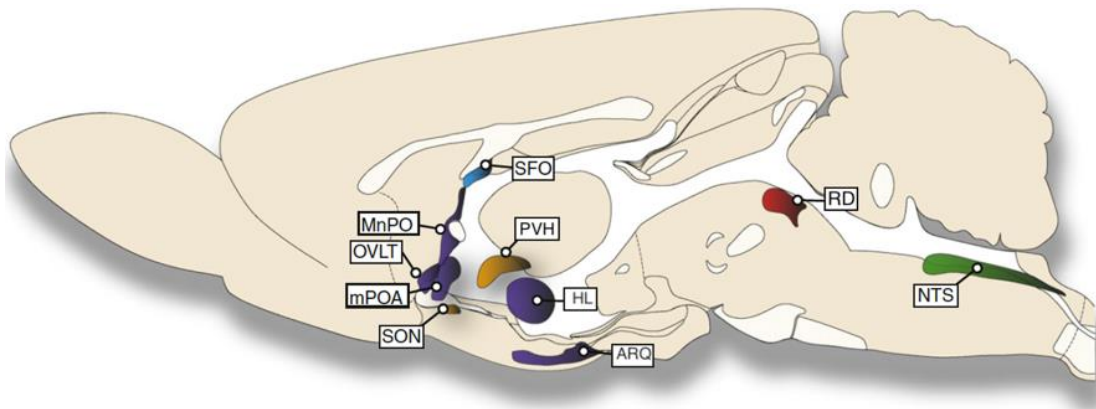


Figura 11. Representación de un corte sagital donde se muestran las estructuras cerebrales que expresan los subtipos de ERs. El SFO solo expresa ER α (azul), mientras que ER β es el único subtipo de ER que se encuentra en el RD (rojo). El MnPO, el OVLT, el mPOA, el HL y el ARQ expresan tanto ER α como ER β (púrpura). ER β y GPER se expresan en PVH y SON (naranja). ER α , ER β y GPER se expresan en el NTS (verde). ARQ, núcleo arqueado; HL, hipotálamo lateral; MnPO, núcleo preóptico mediano; mPOA, área preóptica medial; NTS, núcleo del tracto solitario; OVLT, órgano vascular de la lámina terminal; RD, Rafe dorsal; SFO, órgano subfornical; SON, núcleo supraóptico. Adaptado de Santollo y Daniels (2015).

5.2. El papel del estradiol en la regulación de la conducta de ingesta

El estradiol y sus receptores desempeñan un papel fundamental en el control de la homeostasis energética y el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Las acciones del estradiol en el músculo esquelético, el hígado, y el tejido adiposo están involucradas en la sensibilidad a la insulina y la distribución de la grasa corporal, mientras que, en los núcleos hipotalámicos, el estradiol actúa regulando la ingesta de alimentos y el gasto de energía. La deficiencia de estradiol promueve la disfunción metabólica, lo que predispone a la obesidad, al síndrome metabólico y a la diabetes tipo 2 (Mauvais-Jarvis, 2015). El efecto anorexígeno del estradiol disminuyendo la ingesta de alimentos y aumentando la actividad metabólica está mediado, en parte, por la inhibición y la potenciación de la señalización de las poblaciones neuronales hipotalámicas, siendo el ARQ el principal

receptor de las señales de esta hormona, donde potencia la señalización de las neuronas que expresan POMC/CART e inhibe las señales de las neuronas que expresan NPY/PRAG (Clegg, 2012; López y Tena-Sempere, 2015; Yang et al., 2016). La inyección de estradiol en el ARQ y en el VMH reduce la ingesta de alimentos tanto en machos como en hembras y se ha demostrado que la señalización de estradiol a través del receptor ER α de las neuronas que expresan POMC es un componente crítico en la regulación de la homeostasis energética, ya que la eliminación de este receptor de las neuronas que expresan POMC en ratones se caracteriza por un incremento significativo del peso corporal en machos y un aumento de la ingesta de alimento y el gasto energético en hembras (Roepke, 2009; Clegg, 2012; Stincic et al., 2018). Además, las mutaciones del ER α en ratones desembocan en un fenotipo obeso y en un aumento de la masa corporal, mientras que la reinstauración de las funciones de los receptores que carecen de función en los EREs es suficiente para reconducir los déficits metabólicos asociados, lo que parece indicar una importante función de la señalización no asociada a los EREs en los mecanismos del estradiol (Stincic et al., 2018). La síntesis de melanocortinas también responde a los esteroides gonadales, ya que el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de POMC fluctúa a lo largo del ciclo estral en la rata, con los cambios más significativos durante el proestro, cuando los picos de estradiol en plasma son más altos (Bohler et al., 1991).

Como ya se ha mencionado, las hormonas gonadales como los estrógenos y los andrógenos se han relacionado durante el desarrollo del SNC con la organización de los circuitos neurales y el establecimiento de las diferencias entre machos y hembras de las funciones neuroendocrinas, conductuales y cognitivas (Guillamón y Segovia, 1997; Meyer et al., 2011). Se ha explicado anteriormente que muchas acciones de la testosterona en el cerebro en desarrollo dependen de su conversión intraneuronal mediante la aromatización al estradiol (Naftolin et al., 1971a, 1971b, 1972). Por ejemplo, la alteración de la expresión o la actividad de la aromatasas muestra como el estradiol actúa como un neuromodulador regulando la plasticidad cerebral en animales machos y hembras (Azcoitia et al., 2018). En anteriores estudios realizados por nuestro grupo en el departamento de Psicobiología de la UNED, ya se comprobaron las respuestas a la administración de estradiol sobre la hipernutrición en ratas macho y hembra en épocas tempranas del desarrollo, encontrándose diferencias dependientes del sexo, con un mayor efecto sobre los parámetros fisiológicos en los machos y sobre el sistema de neuropéptidos hipotalámicos en las hembras (Carrillo et al., 2019). Además, otros

investigadores han comprobado que las fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas de estradiol dependen del ciclo estral en las ratas, resultando en variaciones en la ingesta de alimentos (Asarian y Geary, 2006). Así mismo, en las mujeres durante la menopausia, cuando los niveles de estrógenos disminuyen drásticamente, se suele producir un aumento del peso corporal y de la ingesta, que parece ser dependiente de la caída en los niveles de estas hormonas, ya que el tratamiento con terapias sustitutivas de los estrógenos con estradiol restaura estos parámetros (Cederroth et al., 2007). También muestra dimorfismo sexual el patrón de acumulación de grasa en el organismo (Mauvais-Jarvis, 2015). En humanos, la distribución de la grasa corporal es diferente según el sexo, ya que los hombres tienen menos grasa corporal total, pero una mayor acumulación de grasa visceral en comparación de las mujeres, que tienden a acumular más grasa subcutánea (Asarian y Geary, 2013). Esta distribución también se produce en las ratas, ya que en ratas hembra ovariectomizadas, el tratamiento con estradiol altera la sensibilidad a la leptina en el hipotálamo y cambia la distribución de grasa corporal hacia parámetros normales de ratas no ovariectomizadas, mientras que en los machos, la administración de estradiol también aumenta la sensibilidad hacia la leptina central y aumenta la grasa subcutánea. Por lo tanto, estos resultados muestran una interacción entre los esteroides gonadales y los mecanismos centrales de la leptina en la distribución de la grasa corporal y una diferenciación de estos mecanismos por sexo (Brown y Clegg, 2010).

Mientras que los estrógenos como el estradiol actúan uniéndose a los receptores de estrógenos (ERs), muchos compuestos farmacológicos, ambientales y alimenticios también son capaces de unirse y actuar sobre estos receptores, por lo que dichos compuestos pueden interferir con los procesos promovidos por la actividad de los estrógenos, potenciando su acción o compitiendo de una manera antagonista o agonista débil en estos receptores y disminuyendo los efectos producidos por estas hormonas (Frank et al., 2014). Un buen ejemplo de este tipo de compuestos es la genisteína, un fitoestrógeno muy presente en la soja y objetivo de estudio de este trabajo.

6. Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son compuestos vegetales de origen natural que son estructural y/o funcionalmente similares a los estrógenos de los mamíferos, lo que les confiere la capacidad de actuar sobre los ERs y alterar el funcionamiento de otro tipo de compuestos,

como por ejemplo, las proteínas de unión a hormonas sexuales, la enzima aromatasas y la inhibición de las proteínas kinasas, modulando así diferentes procesos que son los responsables de los efectos, tanto beneficiosos como perjudiciales para la salud, que se han descrito para estos compuestos (Patisaul, 2005).

Los fitoestrógenos incluyen varios grupos de compuestos estrógenicos no esteroideos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, que están presentes en las frutas, los vegetales y los granos integrales. Como se muestra en la figura 12, uno de los subgrupos más importantes en los que se dividen los fitoestrógenos son los flavonoides, compuestos fenólicos que incluyen las isoflavonas, los cumestanos y los fenilflavonoides. Las isoflavonas se encuentran en las leguminosas, principalmente la soja, y los cumestanos están presentes en los brotes de trébol, alfalfa y soja (Cederroth y Nef, 2009).

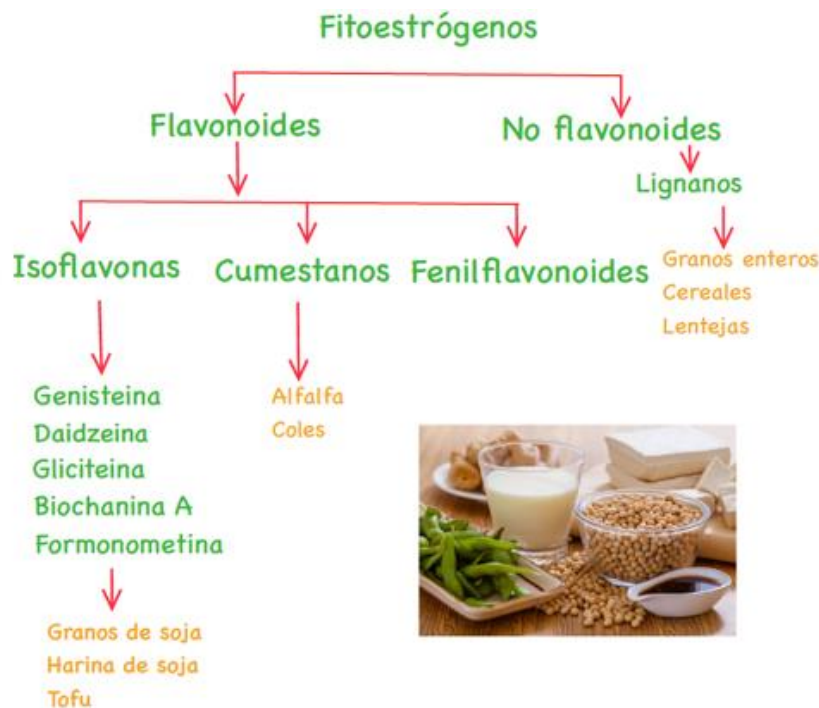


Figura 12. Diagrama de la familia de los fitoestrógenos. Sobre la base de su estructura química y respecto a los patrones de biosíntesis, los fitoestrógenos se pueden dividir en flavonoides (isoflavonas, cumestanos y fenilflavonoides) y no flavonoides. Debe prestarse especial atención a los isoflavonoides, el subgrupo de flavonoides que incluye, entre otros, la genisteína y la daidzeína.

Los fitoestrógenos de la dieta se metabolizan por las bacterias intestinales, se absorben, se conjugan en el hígado, circulan en el plasma y se excretan en la orina (Cassidy, 2003). La actividad estrogénica de los fitoestrógenos vegetales puede mejorarse después de la metabolización por microorganismos intestinales a compuestos más

activos. Por ejemplo, los efectos de la daidzeína varían dependiendo de los individuos y de su capacidad para convertir la daidzeína en equol, un compuesto mucho más activo. Existe un creciente número de estudios sobre como el consumo de fitoestrógenos o sus componentes podrían ser una herramienta altamente eficiente para prevenir y tratar diversas enfermedades y patologías, como el síndrome menopáusico, la osteoporosis, los trastornos cardiovasculares y el cáncer de mama, aunque no todos los resultados de los estudios realizados son congruentes entre sí y actualmente un creciente número de trabajos advierten que los beneficios para la salud que han sido atribuidos con frecuencia a los fitoestrógenos, pueden ser exagerados (Patisaul y Jefferson, 2010; Sirotkin y Harrath, 2014).

Los fitoestrógenos forman parte de los compuestos denominados disruptores endocrinos (DECs), generalmente considerados como compuestos tóxicos para la salud en sus formas sintéticas (Patisaul, 2005). Los DECs son capaces de unirse a los receptores de la membrana celular y promover la formación de nucleótidos cíclicos citoplásmicos y la activación de las proteínas quinasas que controlan la expresión de los genes diana. De esta manera pueden alterar la síntesis, el metabolismo, el transporte y la administración de hormonas, así como la expresión de los receptores y, por lo tanto, las señales posteriores que transmiten. Los DECs son compuestos que pueden promover o restringir una señal hormonal, ya que pueden actuar como agonistas o antagonistas. Por lo tanto, los fitoestrógenos, como DECs, pueden afectar potencialmente todos los procesos regulados por los estrógenos (Roepke, 2009; Périan y Vanacker, 2020).

6.1. Genisteína

La genisteína es un fitoestrógeno que se encuentra en una amplia variedad de alimentos de origen vegetal, especialmente en la soja y los alimentos a base de soja. Su inclusión en la ingesta se ha relacionado con efectos positivos sobre patologías como la osteoporosis, las enfermedades cardiovasculares y la menopausia. La soja es un componente fundamental de la dieta asiática y su ingesta se asocia con las menores tasas de ciertos tipos de cáncer en los países de este continente respecto a las sociedades occidentales, aunque existen diferencias que es necesario tener en cuenta a la hora de evaluar estas comparaciones (Patisaul, 2005; Setchell, 2006; Sirotkin y Harrath, 2014). Mientras que en Asia la genisteína se ingiere como parte de la dieta a través de alimentos ricos en estos compuestos, en occidente es usada como sustituto de la carne o como

aditivo de ciertos alimentos o bebidas debido a sus propiedades beneficiosas, por lo que dependiendo de las enzimas metabólicas que sintetizan sus compuestos activos y la forma en que se ingiere en la dieta, la biodisponibilidad de la genisteína puede variar entre individuos o incluso entre etnias (Patisaul y Jefferson, 2010). En modelos animales ha demostrado ser un inhibidor de las células tumorales a través de la modulación de genes relacionados con el control del ciclo celular y la apoptosis, principalmente a través de su inhibición de las proteínas tirosina quinasas, pero hay que tener en cuenta que la genisteína se comporta de manera diferente cuando se inyecta o se administra por vía oral, debido a que la barrera intestinal modifica y puede limitar la biodisponibilidad y la actividad biológica de este compuesto. La administración de genisteína por vía parental conduce a concentraciones plasmáticas de genisteína libre que son mucho más elevadas que si se administran por vía oral, particularmente a dosis altas. Esto dificulta la extrapolación de sus efectos en las distintas especies, puesto que el efecto de la genisteína puede depender de numerosos factores, como la edad, el estado de salud e incluso la presencia o ausencia de microflora intestinal específica (Setchell, 2006; Patisaul y Jefferson, 2010). Algunos resultados son contradictorios; por ejemplo, se ha encontrado que la administración de genisteína pura tiene efectos promotores de tumores en ratones, aunque estos efectos no han podido ser replicados con estudios *in vitro*, por lo que son necesarios más trabajos sobre la seguridad de consumir genisteína pura (Jungbauer y Medjakovic, 2014).

Así mismo, diversos estudios indican que la genisteína puede alterar la regulación neurohormonal de la conducta de ingesta, incluidas alteraciones en los niveles de leptina e insulina y la disposición del tejido adiposo, existiendo una creciente evidencia sobre el efecto de los fitoestrógenos sobre la regulación del peso corporal en ratas obesas (Lephart, Porter, Hedges et al., 2004; Cederroth y Nef, 2009; Crespillo et al., 2011).

Como se puede observar en la figura 13, la genisteína comparte importantes características estructurales con el estradiol, lo que le confiere la capacidad para competir con éste en la unión a los ERs (con una preferencia por el ER β) y ejercer efectos tanto estrogénicos como antiestrogénicos, estos últimos compitiendo en la unión al receptor con el estradiol como agonista débil (Dixon y Ferreira, 2002). Los ERs, después de la unión con el ligando, son capaces de moverse desde el citoplasma al núcleo, unirse y afectar a las regiones de control de la transcripción de ADN o ARN y, por lo tanto, de expresar genes específicos (Sirotkin y Harrath, 2014). Se han encontrado efectos de la genisteína en áreas del cerebro donde se expresan los ERs, como el PVH, el VMH, el

núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (SDN-POA) y el LC, alterando el comportamiento sexual, la respuesta al estrés, la función tiroidea y la cognición dependiente de la edad (Patisaul, 2005). Al igual que otras isoflavonas, puede exhibir comportamiento estrogénico y antiestrogénico según el nivel de estradiol endógeno y el número y tipo de ERs. Además de su afinidad de unión a los receptores clásicos ER α y ER β , la genisteína también tiene la capacidad de unirse a los receptores de membrana estrogénicos, como el receptor estrogénico de membrana acoplado a proteínas G (GPER), aunque los mecanismos de acción de esta isoflavona a través de estos receptores no se conocen todavía (Xiao et al., 2019). Dentro de la categoría de los disruptores endocrinos, la genisteína fue el competidor más efectivo para el GPER, con una afinidad de unión relativa del 13% respecto a la del estradiol (Thomas y Dong, 2006). Esto indica que la genisteína tiene el potencial de interferir con la señalización estrogénica a través del GPER, actuando bien como agonista o como antagonista. Por lo tanto, y aunque la genisteína tiene una mayor afinidad por el ER β 20 a 30 veces mayor respecto al ER α , la inclusión de su afinidad con el GPER aumenta los mecanismos a través de los cuales esta molécula puede interferir o modular el papel del estradiol, mostrando como las acciones mediadas por el GPER son potencialmente susceptibles de ser alteradas por compuestos ambientales (Zimmerman et al., 2016; Poschner et al., 2017).

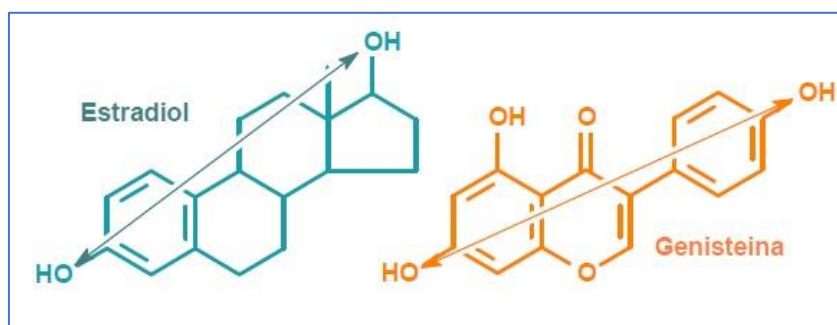


Figura 13. Representación de la estructura molecular de la genisteína. Se pueden observar los dos grupos hidroxilo (OH) en disposición y distancia similar a los del estradiol que le confieren la capacidad a la genisteína de interactuar con los receptores de estrógenos, formando un complejo ligando-receptor funcionalmente similar al formado por el estradiol. Adaptado de Escribano (2010).

Pocos estudios se han centrado en los efectos de la exposición a fitoestrógenos en épocas perinatales y se desconocen los efectos de la inclusión de la genisteína en la dieta durante el desarrollo temprano. Como ya se ha comentado, la genisteína tiene una mayor afinidad por el ER β , aunque no se puede descartar un efecto sobre el ER α , ya sea a través

de los receptores nucleares o de los receptores de membrana, o interviniendo en los mecanismos de transducción de señal dentro de las neuronas. En este sentido, en estudios realizados con ratas, se ha encontrado que la ausencia de fitoestrógenos en la dieta causa una regulación a la baja en los ER α de las neuronas que expresan POMC en el ARQ, afectando a la señal catabólica de la leptina para inhibir la ingesta e incrementar el gasto de energía, por lo que la disminución de la señalización hipotalámica de ER α podría ser un mecanismo por el cual los fitoestrógenos ejercen algunos de los efectos observados (Andreoli et al., 2015). No obstante, la manera a través de la cual la genisteína podría ejercer una regulación a la baja de estos receptores se desconoce.

Numerosos estudios han informado de que la ingesta de soja puede ejercer efectos beneficiosos para la salud al mejorar los parámetros metabólicos y prevenir la obesidad y la diabetes, principalmente en mujeres pre y posmenopáusicas (Gardner et al., 2001; Jayagopal et al., 2002; Greany et al., 2004). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que la exposición a fitoestrógenos al principio del desarrollo tiene efectos adversos sobre la función reproductiva (Jefferson et al., 2012) y altera varios sistemas de neurotransmisores (Losa et al., 2011; Ponti et al., 2017, 2019). Estos datos demuestran que la exposición a la genisteína durante los períodos más sensibles del desarrollo modifica el funcionamiento de los sistemas de neurotransmisores y neuropéptidos involucrados en sistemas neurohormonales reproductivos o alimentarios. Por lo tanto, sería necesario el desarrollo de más investigaciones para desentrañar los efectos de la inclusión de la genisteína en la alimentación y el metabolismo energético.

Objetivos

Partiendo del concepto de que el sistema nervioso durante el desarrollo es vulnerable a los factores ambientales, la idea del presente trabajo surge debido al incremento que en los últimos años se ha producido en la dieta occidental en el uso de los fitoestrógenos como suplementos alimenticios. La exposición a la genisteína durante los períodos más sensibles del desarrollo puede alterar el sistema neuroendocrino involucrado en la regulación de la ingesta, pero todavía existe un debate sobre si el consumo de fitoestrógenos en estos periodos puede ser beneficioso o perjudicial para la salud. Teniendo en cuenta que las bebidas de soja son el principal alimento sustitutivo de la leche en lactantes y que el período de lactancia es un período sensible para la maduración de las estructuras cerebrales que regulan la ingesta y el metabolismo energético, la investigación para comprobar el posible efecto de la genisteína en el desarrollo puede servir para determinar la seguridad del uso de este compuesto en estos periodos. Para ello, en el experimento 1 se estudian los efectos a largo plazo de la exposición a diferentes dosis de genisteína durante la segunda semana de vida sobre el peso corporal, la ingesta y las poblaciones neuronales que expresan los neuropéptidos proopiomelanocortina y orexina en el hipotálamo, tanto en machos como en hembras.

Se conoce desde hace tiempo que la genisteína tiene la capacidad de alterar la señalización del estradiol en el sistema nervioso, aunque los mecanismos de acción de esta isoflavona permanecen todavía desconocidos. Dentro de la categoría de los disruptores endocrinos, la genisteína fue el competidor más efectivo para el GPER. El siguiente objetivo de esta tesis, desarrollado en el experimento 2, es examinar si la población de neuronas que expresan el GPER en el ARQ es alterada por la genisteína durante épocas tempranas del desarrollo, ya que cada vez existe más evidencia de que este receptor de membrana podría ser una vía relevante en la acción de los fitoestrógenos en el cerebro.

En todos los estudios realizados hasta este momento no se han tenido en cuenta las subdivisiones del ARQ y ha sido tratado como un conjunto homogéneo o realizando la diferenciación entre el área anterior y posterior del núcleo. En el experimento 3 se han estudiado las diferencias entre sexos y los efectos del tratamiento con genisteína durante la segunda semana de vida en el volumen, número de neuronas y densidad celular en las divisiones y subdivisiones del ARQ, parámetros que pueden arrojar luz en la caracterización morfológica y funcional de las distintas regiones de esta estructura. Cada vez más trabajos sugieren una especialización de las poblaciones neuronales que se

localizan en las diferentes subdivisiones de este núcleo, por lo que el estudio en detalle del efecto del tratamiento con genisteína en el ARQ puede aportar información relevante para corroborar estos datos.

Experimento 1_____

Efectos del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el peso, la ingesta y la expresión de proopiomelanocortina y orexina en el hipotálamo

1. Introducción

Se ha demostrado recientemente que la genisteína produce alteraciones en varios sistemas de neurotransmisión, como los sistemas vasopresinérgico o dopaminérgico, principalmente cuando se administra durante las etapas tempranas del desarrollo. Además, se ha comprobado que estas alteraciones son sexualmente dimorfas (Ponti et al., 2017, 2019). En este primer experimento, se ha escogido el periodo entre P6 y P13 para el tratamiento con genisteína porque en trabajos anteriores de nuestro grupo en el departamento de Psicobiología de la UNED, se han encontrado acciones programadoras del estradiol durante este periodo en algunos de los péptidos que forman parte del sistema hipotalámico que regula la ingesta en ratas macho y hembra (Carrillo et al., 2020). En este intervalo de tiempo, esta hormona parece participar en la programación de estos circuitos hipotalámicos, ya que el tratamiento con estradiol revirtió las alteraciones neurofisiológicas producidas por la hipernutrición materna en ratas macho y las alteraciones producidas en el ARNm de POMC producidas por la hipernutrición y desnutrición en ratas hembra (Carrillo et al., 2016; Pinos et al., 2018; Carrillo et al., 2019). Esto sugiere que el estradiol durante esta ventana de tiempo específica puede modular diferencialmente algunas de las alteraciones producidas por la malnutrición en ratas de ambos sexos. Considerando estos resultados y los posibles efectos estrogénicos y antiestrogénicos de la genisteína, parece razonable pensar que la exposición a este fitoestrógeno durante el período posnatal temprano podría producir alguna alteración en las poblaciones neuronales que regulan el metabolismo energético y la ingesta de alimentos. El estudio del efecto de la genisteína en la regulación del equilibrio energético durante estas etapas puede ayudar a clarificar el papel de los fitoestrógenos y si su utilización durante el embarazo o la lactancia es segura, además de ayudar a entender sus efectos en algunos de los factores de riesgo que forman parte del síndrome metabólico.

En este primer experimento se ha analizado el efecto del tratamiento con genisteína durante la segunda semana de vida, en ratas de ambos sexos, sobre parámetros fisiológicos como el peso corporal y la ingesta, y sobre parámetros neurohormonales, como la expresión de los neuropéptidos POMC y orexina.

2. Material y métodos

2.1. Animales

Todos los experimentos presentados en esta tesis se diseñaron de acuerdo con las pautas publicadas en la “Guía NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio”, según los principios presentados en las “Pautas para el uso de Animales en la Investigación en Neurociencia” de la Sociedad de Neurociencia de la Unión Europea (Directivas del Consejo 86/609/CEE y 2010/63/UE) y en la Directiva del Gobierno español (R.D. 1201/2005). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de nuestra institución (UNED, Madrid). Se tuvo especial cuidado en minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales utilizados al mínimo necesario. Para este experimento se han utilizado 8 ratas Wistar hembra (Charles River, Lyon, Francia) que fueron alojadas en el animalario de la Facultad de Psicología de la UNED, en un estabulario con control de temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del $55 \pm 10\%$ y con ciclo día/noche de 12h (ciclo de luz de 8:00h a 20:00h y ciclo de oscuridad de 20:00h a 8:00h) con comida y agua *ad libitum*. Para el cruce, un macho fue alojado en una jaula con dos hembras durante 7 días con una comprobación diaria del tapón vaginal. Cuando se detectó la presencia del tapón, las hembras fueron estabuladas individualmente en una caja de plástico con serrín y material para el nido. Tras el parto se realizó el cruce de las camadas y su estandarización en P1, momento en el que las crías fueron pesadas, sexadas y distribuidas entre las diferentes madres lactantes para evitar el “efecto camada”. Todas las camadas se estandarizaron a un número de 10 crías (5 machos y 5 hembras).

2.2. Tratamiento

Se seleccionaron 6 camadas y se asignaron aleatoriamente a tres condiciones experimentales. El grupo control (C), donde las crías fueron expuestas a la sustancia vehículo (90% aceite de maíz + 10% etanol) mediante inyección subcutánea (s.c.), y dos grupos de tratamiento con genistéina administrado de forma s.c., uno con una dosis baja de $10\mu\text{g}/\text{gr}$ (G10) y el otro con una dosis alta de $50\mu\text{g}/\text{gr}$ (G50). En otros trabajos los fitoestrógenos han mostrados efectos dependientes de la dosis (Naaz et al., 2002; Cederroth et al., 2007), por lo que en este estudio se ha realizado un tratamiento con una dosis baja, similar a una ingesta moderada en la dieta, y otro a dosis alta, lo que supondría

un consumo muy alto en la dieta de este compuesto, para así poder evaluar este efecto dependiente de la dosis. En todos grupos las crías, tanto machos como hembras, fueron tratadas con la dosis correspondiente desde P6 a P13, periodo en el que se han mostrado acciones de programación del estradiol en rata macho y hembra (Carrillo et al., 2020). Los grupos resultantes fueron macho control (n=10, MC), hembra control (n=9, HC), macho G10 (n=10, MG10), hembra G10 (n=9, HG10), macho G50 (n=10, MG50) y hembra G50 (n=8, HG50). En el tratamiento se utilizó genisteína sintética (Genistein Synthetic, $\geq 98\%$, Sygma-Aldrich) disuelta según peso y volumen siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se mezcló mediante sonicación y se mantuvo a 4°C de temperatura protegida de la luz hasta su administración subcutánea a temperatura ambiente.

En P21 se realizó el destete, se individualizó a cada animal y se les proporcionó comida (20% caseína, Panlab, Barcelona) y bebida *ad libitum*. Después de un periodo de aclimatación de 12 días, a partir del P33 se midió el peso corporal y la ingesta de los animales cada 7 días hasta P89 para el estudio de estos dos factores a lo largo del desarrollo. Un esquema del procedimiento empleado se puede ver en la figura 14.

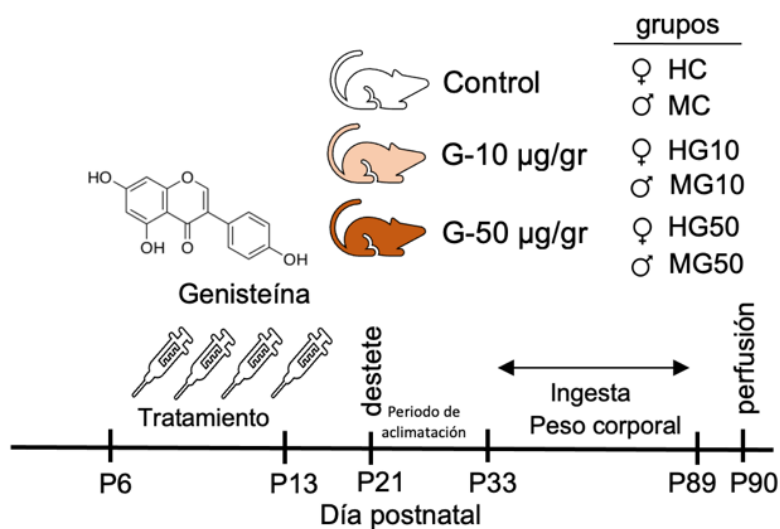


Figura 14. Representación esquemática del procedimiento utilizado. De P6 a P13 se administraron inyecciones diarias de genisteína sintética (10µg/gr o 50µg/gr) o del vehículo, según grupo experimental. Desde el destete en P21 hasta P33 se implementó un período de aclimatación. La ingesta de alimentos y el peso corporal se midieron semanalmente desde P33 hasta P89. Los animales se sacrificaron en P90.

2.3. Preparación del tejido

Un día antes del sacrificio se tomó un frotis vaginal de todas las hembras para determinar la fase del ciclo estral y, 12 horas antes del sacrificio, en P90, se retiró la comida. Todos los animales se sacrificaron entre las 9:00h y las 12:00h a.m. durante tres días consecutivos con todas las hembras en la fase de diestro del ciclo hormonal y con el mismo número de animales de cada grupo. Se pesó y anestesió a cada animal con una inyección intraperitoneal de ketamina (100mg/Kg de peso corporal) y xilazina (10mg/Kg de peso corporal) y se procedió a realizar una perfusión transcardíaca con una solución salina al 0,9% hasta que los vasos sanguíneos estuvieran completamente libres de sangre, seguido por 4% paraformaldehído para fijar el tejido. La sangre se recolectó mediante inyección transcardíaca en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en tubos de vidrio, centrifugados durante 15 minutos a 2000hz a 4°C. Una vez terminado este proceso el plasma fue recolectado y almacenado en alícuotas a -80°C. Seguidamente se extrajeron los cerebros, se mantuvieron en una solución de paraformaldehído durante dos horas a 4°C y se almacenaron en una solución de sacarosa al 30% en PBS al 0,1% (del inglés Phosphate Buffer Saline), a 4°C, hasta el día que se procesaron. Los cerebros se lavaron en ese momento con PBS al 0,1% y se congelaron con Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura). Se cortaron en secciones coronales de 40µm de espesor utilizando un criostato (Microm HM 500-O) siguiendo un eje rostro caudal desde bregma -1.10 mm hasta bregma -2.55 mm según Paxinos y Watson (2015). Las secciones se recopilaron en cuatro series. Tres de las series se colocaron en una placa multipocillo en flotación, se realizaron tres lavados con PBS al 0,1% y se pasaron a crioprotector, mantenidas a -20°C hasta el momento de su procesamiento mediante inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra POMC y orexina (series 1 y 2), que constituyen el experimento 1 y GPER (serie 3) que se utilizó para el experimento 2. La última serie (serie 4) se dispuso en porta gelatinado y se sometió a una tinción histológica de Nissl con violeta de cresilo (experimento 3).

2.4. Niveles en plasma de estradiol y testosterona

Para medir los niveles de estradiol en plasma se utilizó un kit ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (CEA461Ge, Cloud-Clone Corp.), con un rango de detección de 12,35 a 1000 ng/ml. Para medir los niveles de testosterona en plasma se

utilizó un kit ELISA (CSB-E05100r, Cusabio) con un rango de detección de 0,13 a 25,6 ng/ml. Todas las muestras fueron medidas por duplicado siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia en cada pocillo con un lector Tecan Infinite M2000 (Grödig, Austria).

2.5. Procesamiento inmunohistoquímico

En las técnicas inmunohistoquímicas se utilizan anticuerpos para la localización de antígenos en el tejido. Se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas y unirse a ellas. La detección inmunohistoquímica de POMC y orexina se realizó después del lavado del crioprotector con PBS al 0,1% de las series 1 y 2, respectivamente. Las secciones se lavaron posteriormente, durante 30 minutos, con una solución de PBS que contenía 0,2% de albumina sérica bovina (BSA), con el objetivo de reducir las uniones inespecíficas del anticuerpo, y con 0,2% de Triton X-100, para facilitar la permeabilidad del tejido. Seguidamente se trataron para bloquear la actividad de peroxidasa endógena (tampón que contiene metanol 1: 1 y peróxido de hidrógeno al 0,3%; 10 minutos en agitación, a temperatura ambiente). A continuación, se realizaron 3 lavados en PBS durante 5 minutos. Luego la serie 1 se incubó durante 48 horas a 4°C mantenida en agitación con un anticuerpo policlonal de conejo contra POMC (Phoenix Pharmaceuticals Inc, POMC Precursor 27-52 Antibody, diluido 1:2000 en PBS y 0,2% de BSA) y la serie 2 en las mismas condiciones con un anticuerpo policlonal de conejo contra orexina (Sigma-Aldrich Ab3704 Anti-Orexin-A Antibody, diluido 1:1500 en PBS y 0,2% de BSA). Transcurridas las 48 horas se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos y se procedió a tratar con el anticuerpo secundario las dos series (Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Biotin, Thermo Fisher Scientific, 31820, diluido 1:300 en PBS) durante 120 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se repitieron los 3 lavados con PBS y se procedió a añadir el complejo de avidina-biotina peroxidada (ABC) (Thermo 32020, diluido 1:400 en PBS + 3% de leche en polvo) durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos con PBS al 0,1% y se procedió al proceso de revelado con diaminobenzidina (DAB Sigma D5637) y H₂O₂. El procedimiento utilizó DAB al 0,05% y H₂O₂ al 0,025%, en condiciones de poca iluminación y con un tiempo de revelado de 3 minutos y 40 segundos. Las secciones se colocaron sobre portaobjetos gelatinados y protegidos con cubreobjetos de cristal pegados con DPX. En la figura 15 se muestran cuatro micrografías mostrando la marcación

positiva para las células inmunorreactivas de POMC (POMC-ir) y orexina (orexina-ir), así como su localización en el hipotálamo.

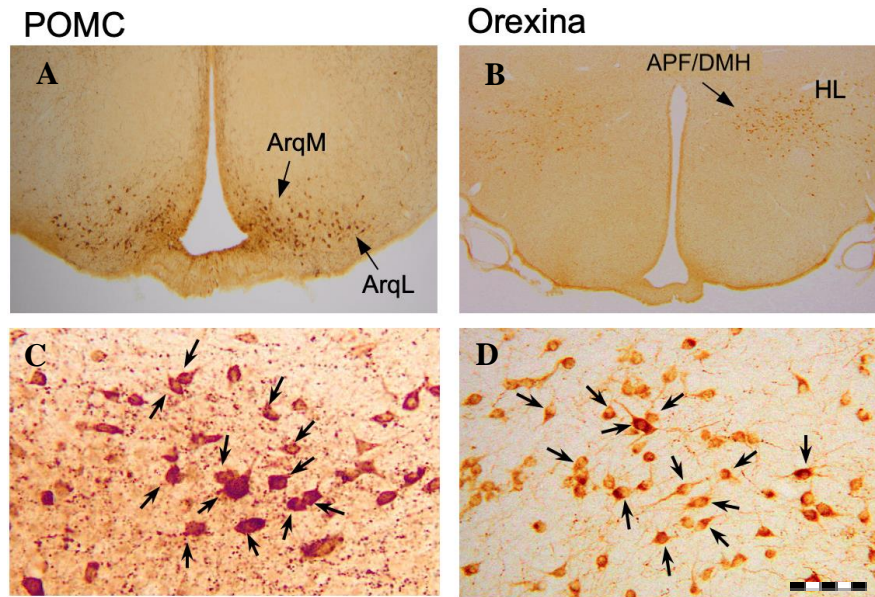


Figura 15. Marcación inmunohistoquímica de POMC (A y C) y orexina (B y D) en secciones coronales. Se muestran ejemplos de marcación positiva para POMC y orexina en el ARQ y el continuo APF/DMH e HL. APF/DMH, área perifornical/núcleo dorsomedial; ArqM, núcleo arqueado medial; ArqL, núcleo arqueado lateral; HL, hipotálamo lateral. Barra A: 300 μ m, B: 350 μ m, C: 50 μ m, D: 45 μ m.

2.6. Estimación número de neuronas

El análisis cuantitativo del número de neuronas se realizó mediante fotografías con una magnificación 4X y 10X realizadas con la cámara NIKON Digital Sight DS-Fi1 conectada al microscopio NIKON Eclipse 80i con el programa Olympus Cella v1.1.6. (figura 16). Estas fotografías fueron analizadas mediante el programa ImageJ versión 2.0.0.0-rc-69/1,52n.



Figura 16. Microscopio NIKON Eclipse 80i y ordenador utilizados para la realización de las fotografías de las muestras.

2.6.1. Estimación número de neuronas POMC-ir en el ARQ

Para realizar el recuento de las neuronas POMC-ir, todas las secciones de los cerebros de rata fueron ordenadas según Paxinos y Watson (2015), mediante fotografías con una magnificación 4X y se seleccionaron todas las secciones con marcación positiva en proopiomelanocortina en el ARQ, como se muestra en la figura 17.

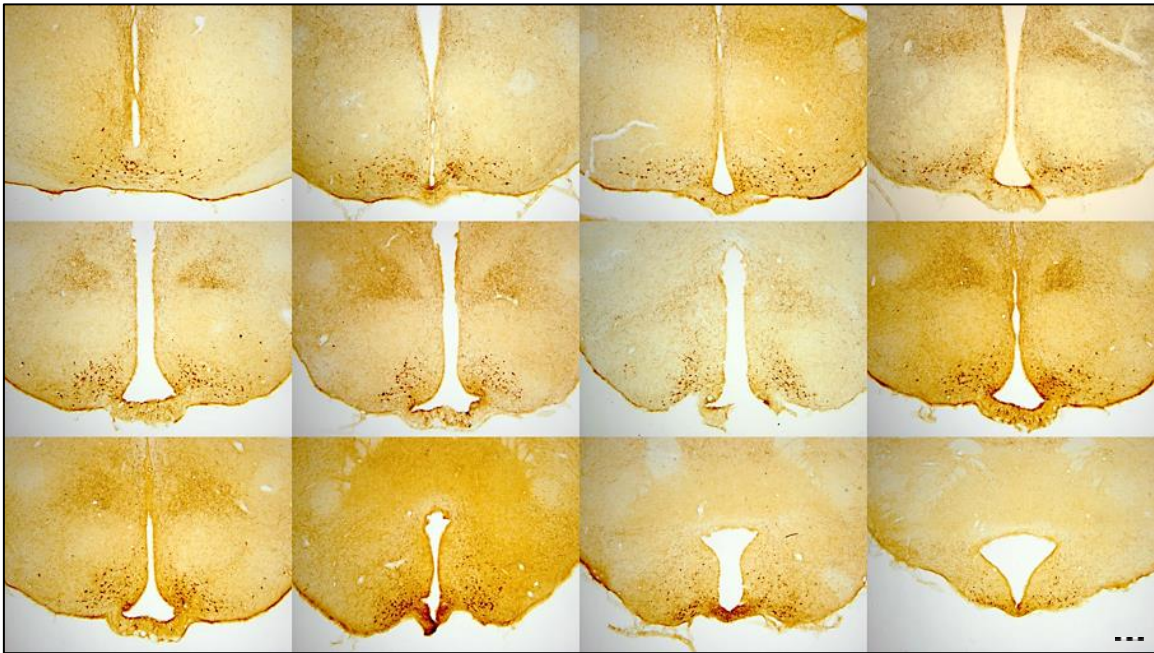


Figura 17. Montaje mediante micrografías con un aumento 4X donde se muestra la marcación en una serie completa de las neuronas POMC-ir en el hipotálamo en secciones coronales. Barra: 300 μm .

Actualmente la mayoría de los estudios realizados en el ARQ no distinguen los efectos de los tratamientos por subdivisiones, siendo la diferenciación anterior-posterior del núcleo la más utilizada. Ya se ha expuesto anteriormente la heterogeneidad de las poblaciones neuronales del ARQ, tanto en expresión de péptidos y neurotransmisores como en la citoarquitectura y distribución de las células, donde se observan distintos patrones de distribución tanto en el eje rostro-caudal como en el eje medial-lateral. Siguiendo para ello el atlas de Paxinos y Watson (2015), en este trabajo se han diferenciado las distintas subdivisiones del ARQ en ambos ejes; esta clasificación por subdivisiones se muestra en la tabla 1 y en la figura 18.

	División	Subdivisión
Núcleo Arqueado (ARQ)	Anterior	Arqueado Dorsal (ArqD)
		Arqueado Medial (ArqM)
		Arqueado lateral (ArqL)
	Posterior	Arqueado Posterior Medial (ArqPM)
		Arqueado Posterior Lateral (ArqPL)

Tabla 1. Divisiones y subdivisiones del ARQ.

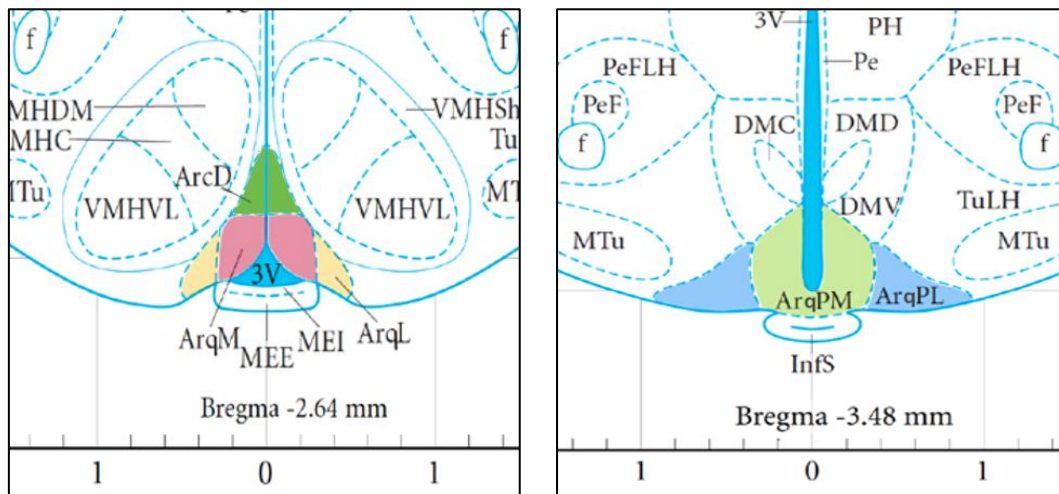


Figura 18. Detalle del atlas del encéfalo de la rata marcando las subdivisiones del ARQ según Paxinos y Watson (2015).

Las células POMC-ir se distinguieron fácilmente porque el cuerpo celular estaba fuertemente marcado. Se detectaron células que expresaban POMC en las subdivisiones medial (ArqM), lateral (ArqL), posterior medial (ArqPM) y posterior lateral (ArqPL) pero no en la subdivisión dorsal (ArqD). Para distinguir las subdivisiones se realizó una fotografía por hemisferio con una magnificación 10X y se utilizó una rejilla para facilitar la delimitación de las áreas. Posteriormente se marcaron con diferentes colores las subdivisiones del ARQ utilizando el software ImageJ, como se muestra en la figura 19.

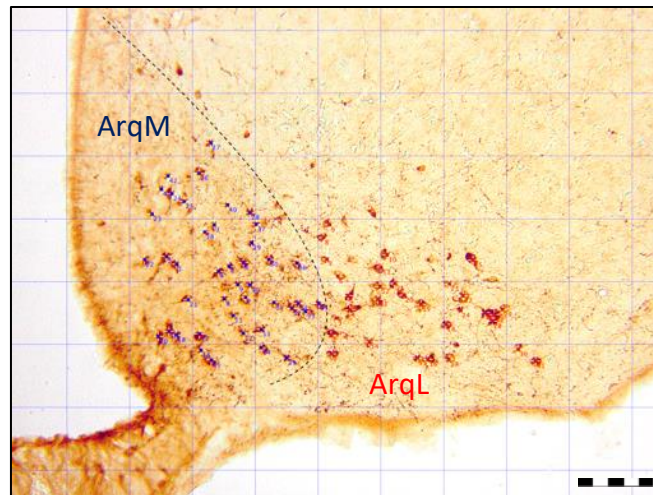


Figura 19. Rejilla y marcaje mediante el programa ImageJ de las neuronas POMC-ir en el ARQ. Subdivisiones arqueado medial (ArqM) en azul y arqueado lateral (ArqL) en rojo. Barra: 165 μ m.

2.6.2. Estimación número de neuronas orexina-ir en el ARQ

Para realizar el recuento de las neuronas orexina-ir todas las secciones de los cerebros fueron ordenadas según Paxinos y Watson (2015), mediante fotografías con una magnificación 4X y se seleccionaron todas las secciones con marcación positiva en orexina, como se muestra en la figura 20.

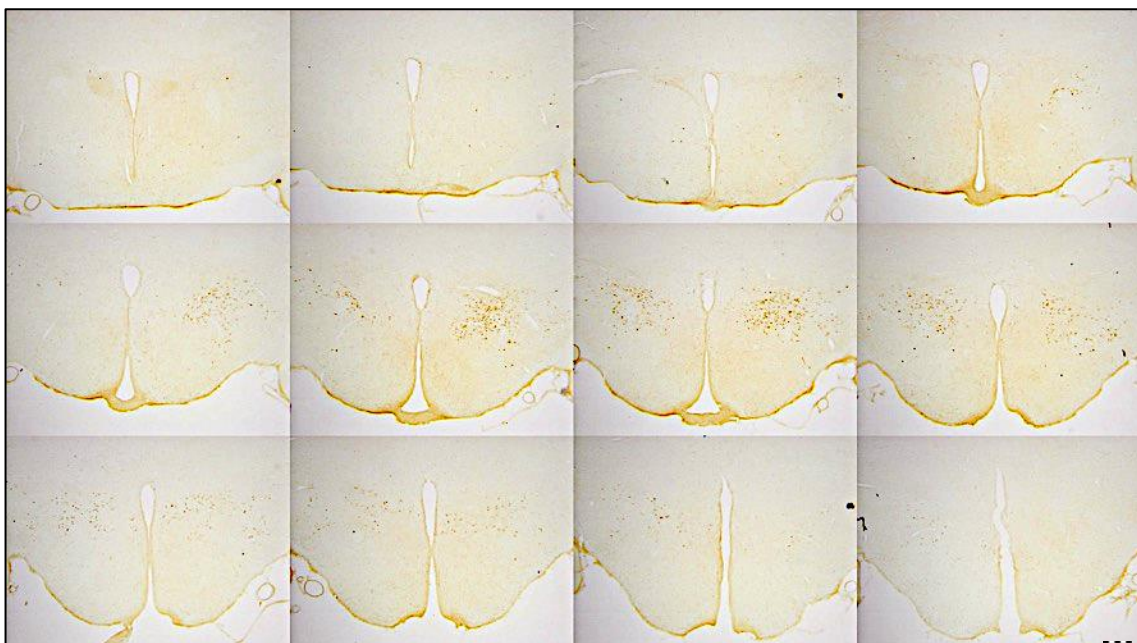


Figura 20. Montaje mediante micrografías con un aumento 4X donde se muestra la marcación en una serie completa de las neuronas orexina-ir en el hipotálamo en secciones coronales. Barra: 300 μ m.

Se detectaron células de orexina-ir en el HL. Asimismo, se detectó una pequeña población de células de orexina-ir en el borde lateral del DMH adyacente a las células de orexina-ir en el APF, razón por la cual los datos se muestran y se analizaron en el continuo APF/DMH. En todos los núcleos estudiados, las células que expresaron orexina fueron fácilmente detectable porque el cuerpo celular estaba fuertemente marcado, como puede verse en la figura 21.

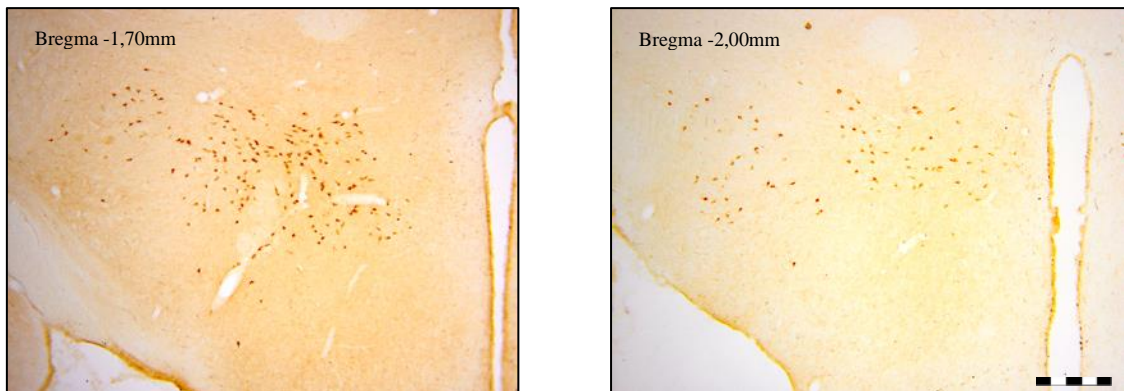


Figura 21. Micrografías con marcaje inmunohistoquímico de las neuronas orexina-ir en dos secciones coronales en el hipotálamo lateral (HL) y el continuo área perifornical/núcleo dorsomedial (APF/DMH).

Barra: 200 μ m.

Para distinguir las subdivisiones se realizó una fotografía por hemisferio con una magnificación 10X y se utilizó una rejilla para facilitar la delimitación de las áreas. Posteriormente se marcaron con diferentes colores las subdivisiones del continuo APF/DMH y HL utilizando el software ImageJ, como se muestra en la figura 22.

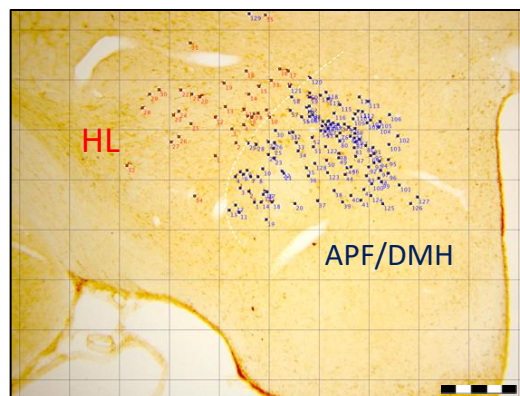


Figura 22. Micrografía de una sección coronal donde se muestra la rejilla y el marcaje de las neuronas positivas en orexina en el continuo HL (rojo) y APF/DMH (azul). Barra: 200 μ m.

2.7. Análisis estadístico

En el análisis estadístico se ha utilizado el Software IBM SPSS Statistics versión 27 y asumiendo como estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$. La evolución del peso corporal y la ingesta calórica durante el procedimiento experimental se analizó mediante un ANOVA de medidas repetidas con el tratamiento como factor intrasujeto y el peso corporal y la ingesta calórica como factor intersujeto. Para determinar las diferencias entre los grupos, se realizó un ANOVA de una vía. Las comparaciones *post hoc* se realizaron mediante pruebas de Student-Newman-Keuls (S-N-K).

Para el análisis del número de neuronas tanto de POMC como de orexina se realizó un ANOVA unifactorial para comprobar la lateralidad del ARQ sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los hemisferios derecho e izquierdo. Descartada la lateralidad se procedió a analizar el número de neuronas del total del ARQ en cada división y subdivisión utilizando para ello un ANOVA de dos factores, sexo y tratamiento y cuando resultó apropiado se realizó el análisis *post hoc* mediante la prueba S-N-K. Además, se realizó un ANOVA unifactorial (factor tratamiento) de manera independiente para cada uno de los sexos. Los análisis *post hoc* para conocer las diferencias entre los grupos se realizaron mediante la prueba S-N-K. Los datos se muestran como medias y error estándar de la media.

3. Resultados

3.1. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la evolución del peso corporal

Los datos obtenidos muestran un efecto principal del factor sexo ($F_{1,50}=253,559$, $p < 0,001$), pero no del factor tratamiento ($F_{2,50}=0,170$, $p=0,844$). Tampoco se encontró interacción entre los dos factores ($F_{2,50}=0,520$, $p=0,598$) (figura 23).

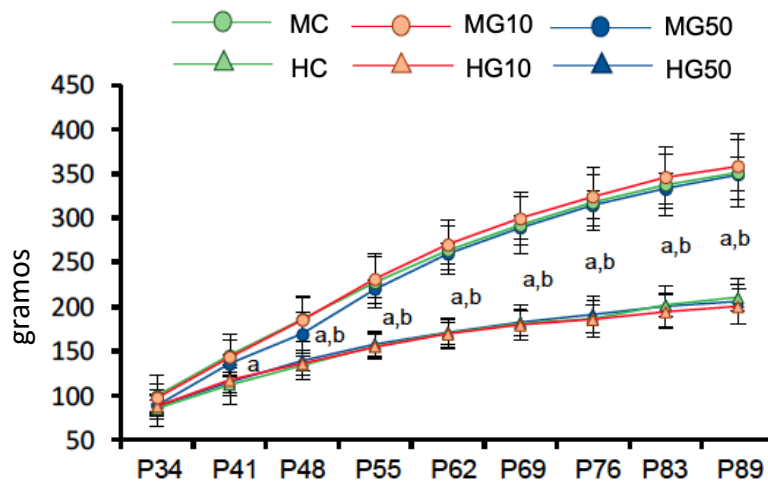


Figura 23. Evolución del peso en todos los grupos. a = Diferencias estadísticamente significativas del factor sexo entre los grupos control y G10; b= Diferencias estadísticamente significativas del factor sexo entre los grupos control y G50. MC, macho control; HC, hembra control; MG10, macho G10; HG10, hembra G10; MG50, macho G50; HG50, hembra G50. $p < 0,05$ en todos los casos. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En el análisis *post hoc* de la evolución semanal del peso de machos y hembras entre los grupos con el mismo tratamiento (MC vs HC, MG10 vs HG10 y MG50 vs HG50) se encontraron diferencias significativas entre los sexos en el peso corporal a partir del día P40 en los grupos control y G10 y desde P47 en el grupo G50 ($p < 0,05$ en todos los casos). Este dimorfismo se mantiene hasta el P89 en todos los grupos (tabla 2).

	P34	P41	P48	P55	P62	P69	P76	P83	P89
MC vs HC		*	*	*	*	*	*	*	*
MG10 vs HG10		*	*	*	*	*	*	*	*
MG50 vs HG50					*	*	*	*	*

Tabla 2. Diferencias estadísticamente significativas en el peso del P33 al P89 en el factor sexo. ($p < 0,05$ en todos los casos).

En el análisis de cada sexo por separado, los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas ni entre los grupos de machos ni entre los grupos de hembras en el factor tratamiento ($F_{2,27}=0,0504$, $p=0,609$; $F_{2,27}=0,083$, $p=0,921$).

En cuanto al peso a la perfusión (P90), se observa un efecto principal del factor sexo ($F_{1,50}=396,802$, $p<0,001$), pero no del factor tratamiento ($F_{2,50}=0,059$, $p=0,943$). Tampoco se ha encontrado interacción entre los dos factores ($F_{2,50}=0,548$, $p=0,582$). El análisis *post hoc* del peso a la perfusión muestra diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos de machos y de hembras, con un mayor peso en los machos que en las hembras (figura 24).

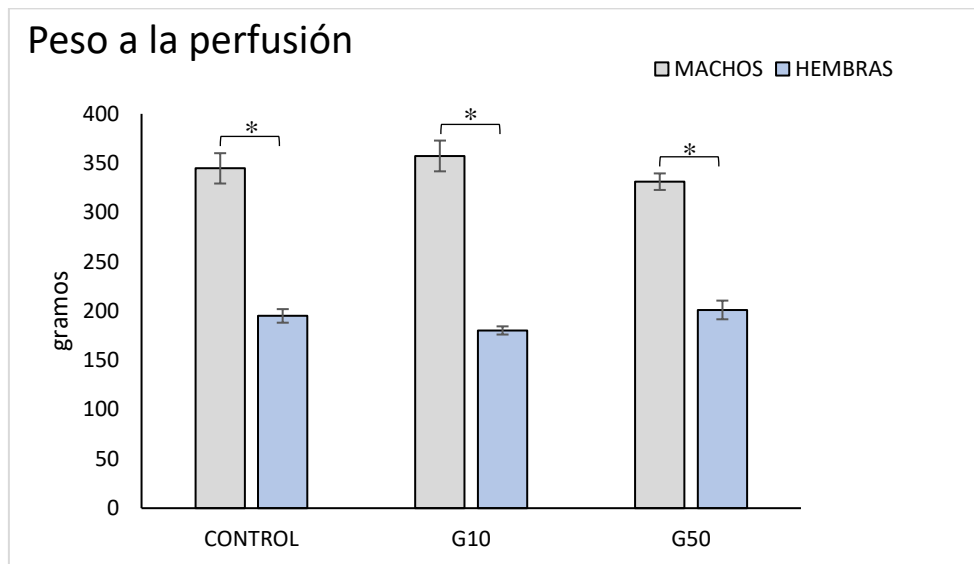


Figura 24. Peso a la perfusión (P90) en todos los grupos. $*=p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

3.2. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la ingesta

El análisis realizado muestra un efecto principal del factor sexo ($F_{1,50}=297,788$, $p <0,001$), pero no del factor tratamiento ($F_{2,50}=0,183$, $p=0,833$) ni de la interacción entre los dos factores ($F_{2,30}=0,696$, $p=0,504$) (figura 25).

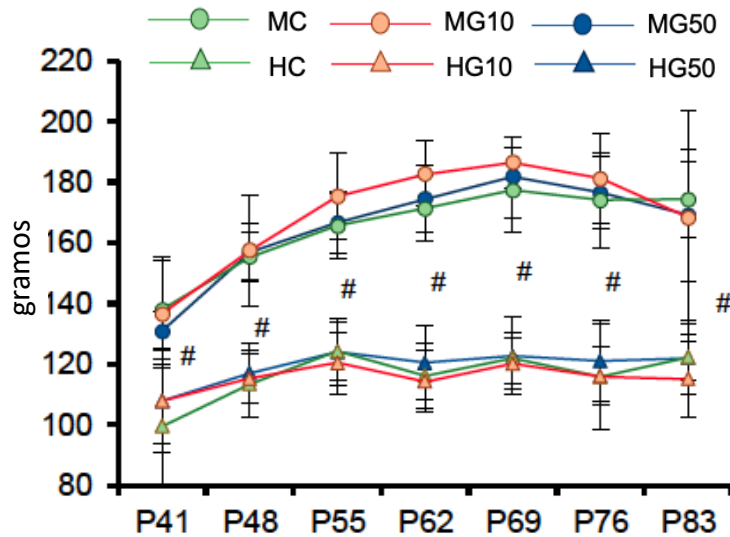


Figura 25. Evolución de la ingesta en todos los grupos. # = Diferencias estadísticamente significativas del factor sexo en todos los grupos. MC, macho control; HC, hembra control; MG10, macho G10; HG10, hembra G10; MG50, macho G50; HG50, hembra G50. $p < 0,05$ en todos los casos. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

El análisis *post hoc* de la evolución semanal de la ingesta de machos y hembras muestra diferencias significativas desde el día P40 hasta el día P89 entre los sexos siendo los machos los que muestran mayores valores que las hembras en todo el periodo (tabla 3). En cuanto al análisis de cada sexo por separado, no se encontraron diferencias significativas en la ingesta ni entre los grupos de machos ni entre los grupos de hembras.

	P34	P41	P48	P55	P62	P69	P76	P83
MC vs HC		*	*	*	*	*	*	*
MG10 vs HG10		*	*	*	*	*	*	*
MG50 vs HG50		*	*	*	*	*	*	*

Tabla 3. Diferencias estadísticamente significativas en la ingesta semanal del P33 al P83 en el factor sexo. ($p < 0,05$ en todos los casos).

En el análisis de la evolución de la ingesta en cada sexo por separado, los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas ni entre los grupos de machos ni entre los grupos de hembras en el factor tratamiento ($F_{2,27}=0,525$, $p=0,598$; $F_{2,27}=0,347$, $p=0,710$).

En cuanto a la ingesta total, se observa un efecto principal del factor sexo ($F_{1,50}=230,129$; $p < 0,001$), pero no del factor tratamiento ($F_{2,50}=0,161$, $p=0,852$).

Tampoco se observa interacción entre los dos factores ($F_{2,50}=0,796$, $p=0,457$). El análisis *post hoc* de la ingesta total muestra diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos de machos y de hembras, con una ingesta total mayor en los machos que en las hembras (figura 26).

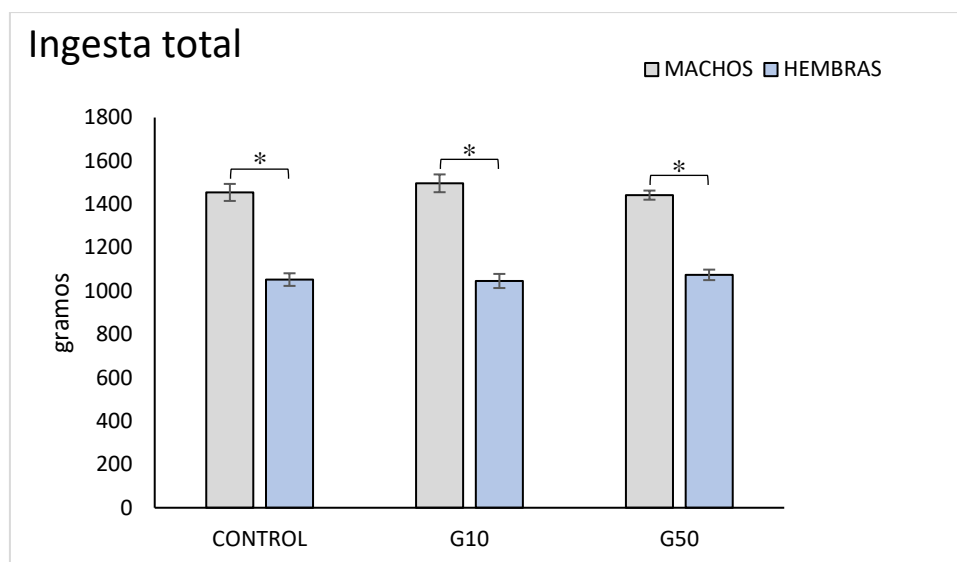


Figura 26. Ingesta total (P89) en todos los grupos. * = $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

Cuando se analizan los sexos por separado, el análisis no muestra diferencias significativas en la ingesta total entre los grupos de machos ni entre los grupos de hembras en el factor tratamiento ($F_{2,27}=0,668$, $p=0,521$; $F_{2,27}=0,247$, $p=0,783$).

3.3. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en los niveles en plasma de estradiol y testosterona

3.3.1. Estradiol

En el estudio de las concentraciones de estradiol en plasma, los resultados muestran un efecto principal del factor sexo ($F_{1,33}=5,777$; $p=0,022$) y del factor tratamiento ($F_{2,33}=15,125$; $p < 0,001$), así como de la interacción entre ambos factores ($F_{2,33}=7,825$; $p=0,002$).

El análisis *post hoc* muestra diferencias entre los grupos MC vs MG50 y MG10 vs MG50, donde el grupo G50 muestra valores más altos respecto al grupo control y al grupo G10, y entre los grupos MG50 vs HG50, presentando los machos valores más elevados que las hembras (figura 27).

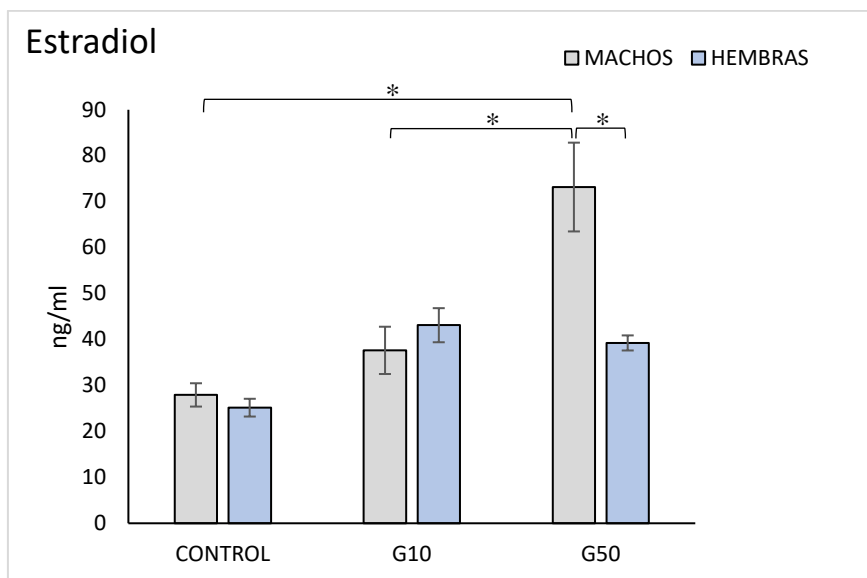


Figura 27. Concentraciones de estradiol en plasma en todos los grupos. *= p<0,05. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

Cuando se analizan los sexos por separado, el análisis *post hoc* muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos MC vs MG50 y MG10 vs MG50 (figura 28) siendo los valores del MG50 los más altos en este parámetro. En el caso de las hembras, las diferencias se encuentran en los dos grupos de tratamiento con respecto al grupo control, siendo el grupo control el que presenta los valores más bajos (figura 29).

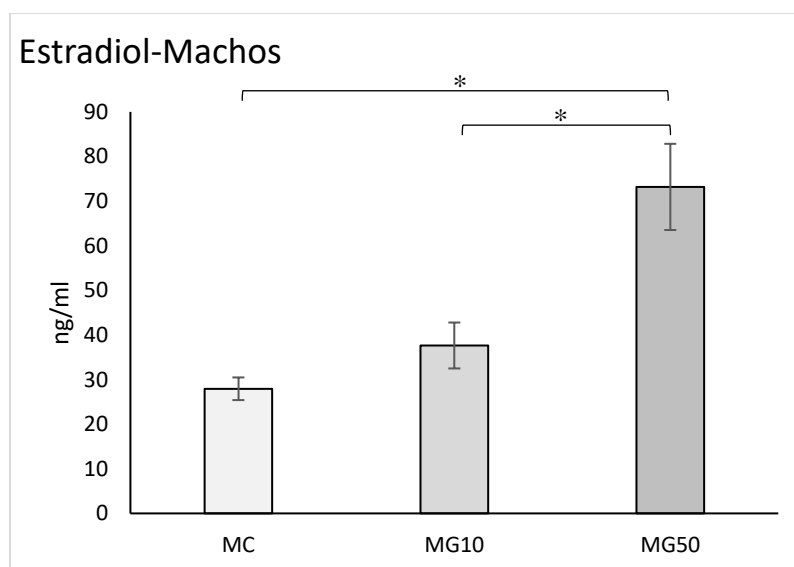


Figura 28. Concentraciones de estradiol en plasma en machos. MC, macho control; MG10, macho G10; MG50, macho G50. *= p<0,05. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

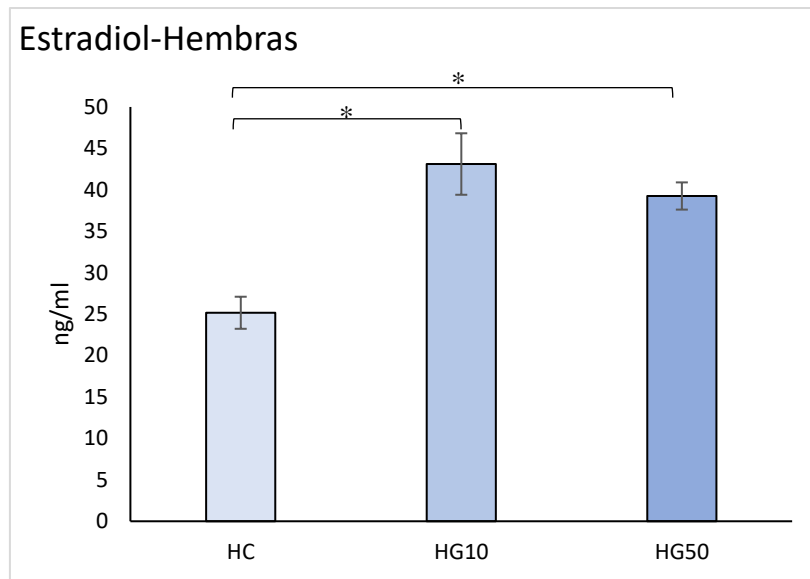


Figura 29. Concentraciones de estradiol en plasma en hembras. HC, hembra control; HG10, hembra G10; HG50, hembra G50. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

3.3.2. Testosterona

En el estudio de las concentraciones de testosterona en plasma, los resultados no muestran ningún efecto principal del factor sexo ($F_{1,36}=3,453$; $p=0,071$), del factor tratamiento ($F_{2,36}=0,660$; $p=0,523$) ni de la interacción entre ambos factores ($F_{2,36}=1,029$; $p=0,367$).

3.4. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el número de neuronas POMC-ir

El cálculo del número total de neuronas de POMC-ir en las divisiones anterior, posterior y total del ARQ se ha realizado sumando las medias de ambos hemisferios de las diferentes subdivisiones. Para el cálculo de la división anterior se han sumado las subdivisiones ArqM y ArqL, no habiendo encontrado neuronas POMC-ir en la subdivisión ArqD. Para la división posterior se han sumado las subdivisiones ArqPM y ArqPL. Para el cálculo del total se han sumado la división anterior y la división posterior. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 4.

NÚMERO DE NEURONAS POMC-ir	MC		HC		MG10		HG10		MG50		HG50	
Medial	867 ±	58	953 ±	95	884 ±	122	827 ±	84	851 ±	155	859 ±	51
Lateral	565 ±	163	572 ±	85	610 ±	106	477 ±	67	624 ±	164	475 ±	40
Medial posterior	431 ±	123	449 ±	73	455 ±	112	401 ±	99	417 ±	137	393 ±	88
Lateral posterior	288 ±	53	311 ±	55	316 ±	28	264 ±	91	303 ±	33	259 ±	78
Anterior	1432 ±	206	1525 ±	155	1494 ±	216	1304 ±	85	1475 ±	311	1334 ±	70
Posterior	719 ±	172	760 ±	117	771 ±	124	665 ±	165	720 ±	142	652 ±	144
ARQ	2151 ±	246	2285 ±	226	2265 ±	295	1968 ±	179	2195 ±	450	1986 ±	115

Tabla 4. Número de neuronas POMC-ir en todas las subdivisiones, divisiones y total del ARQ. Los valores se expresan en medias ± SEM.

El análisis de las divisiones anterior y posterior y número total de POMC-ir en el ARQ no muestra ningún efecto en los factores sexo ($F_{1,36}=1,549$; $p<0,223$; $F_{1,36}=0,841$; $p<0,366$; $F_{1,36}=2,837$; $p<0,102$), tratamiento ($F_{2,36}=0,642$; $p<0,534$; $F_{2,36}=0,408$; $p<0,668$; $F_{2,36}=0,548$; $p<0,584$) ni en la interacción entre ambos ($F_{2,36}=1,859$; $p<0,173$; $F_{2,36}=0,838$; $p<0,442$; $F_{2,36}=2,185$; $p<0,130$).

3.4.1. Análisis subdivisiones del ARQ

En el análisis por subdivisiones, en la subdivisión ArqL se ha encontrado un efecto principal del sexo ($F_{1,36}=5,347$; $p<0,027$), pero ningún efecto del tratamiento ($F_{2,36}=0,196$; $p=0,823$) o la interacción ($F_{2,36}=1,051$; $p=0,164$). No se han encontrado efectos en las subdivisiones ArqM y ArqPM de los factores sexo ($F_{1,36}=0,001$; $p=0,973$; $F_{1,36}=0,795$; $p=0,379$), tratamiento ($F_{2,36}=1,514$; $p=0,234$; $F_{2,36}=0,724$; $p=0,492$) o la interacción ($F_{2,36}=1,905$; $p=0,164$; $F_{2,36}=0,467$; $p=0,631$). El análisis *post hoc* por grupos no muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones.

Cuando se analiza cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto del tratamiento en los machos en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{2,18}=0,149$; $p=0,862$; $F_{2,18}=0,121$; $p=0,887$; $F_{2,18}=0,035$; $p=0,965$; $F_{2,18}=0,225$; $p=0,801$). En las hembras se han encontrado diferencias estadísticamente significativas del tratamiento en la subdivisión ArqM ($F_{2,18}=4,211$; $p=0,032$) pero ningún efecto en el resto de las subdivisiones ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{2,18}=2,905$; $p=0,081$; $F_{2,18}=1,569$; $p=0,236$; $F_{2,18}=1,301$; $p=0,297$).

El análisis *post hoc* muestra diferencias estadísticamente significativas en la subdivisión ArqM entre los grupos de hembras G10 y G50 respecto al grupo control, con un menor número de neuronas POMC-ir en los primeros, no encontrándose diferencias en las subdivisiones posteriores o laterales ni entre los grupos de machos (figura 30). En

la figura 31 se puede observar un ejemplo de la disminución producida en las neuronas POMC-ir por el tratamiento con genisteína en las hembras.

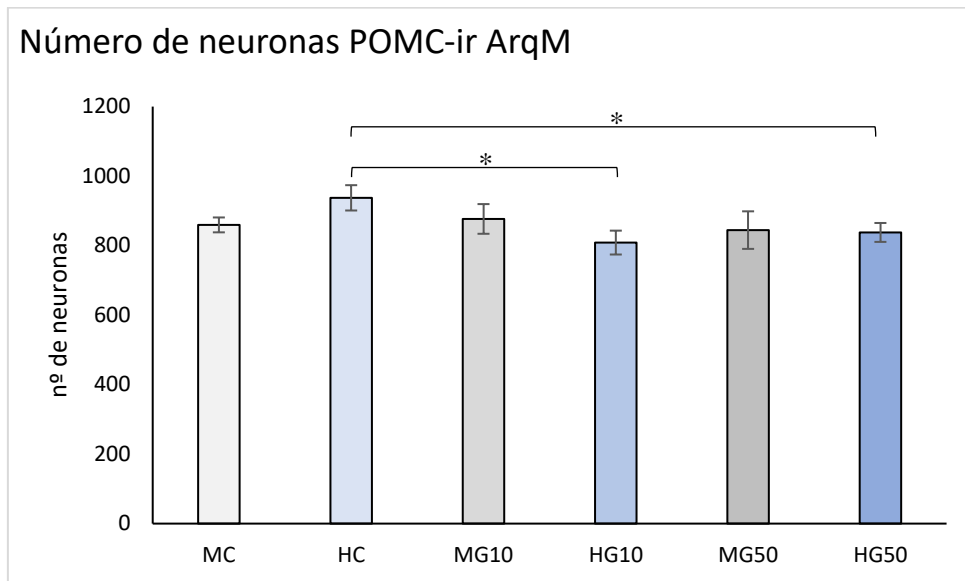


Figura 30. Número de neuronas POMC-ir en la subdivisión ArqM. MC, macho control; HC, hembra control; MG10, macho G10; HG10, hembra G10; MG50, macho G50; HG50, hembra G50. *= $p < 0,05$.

Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

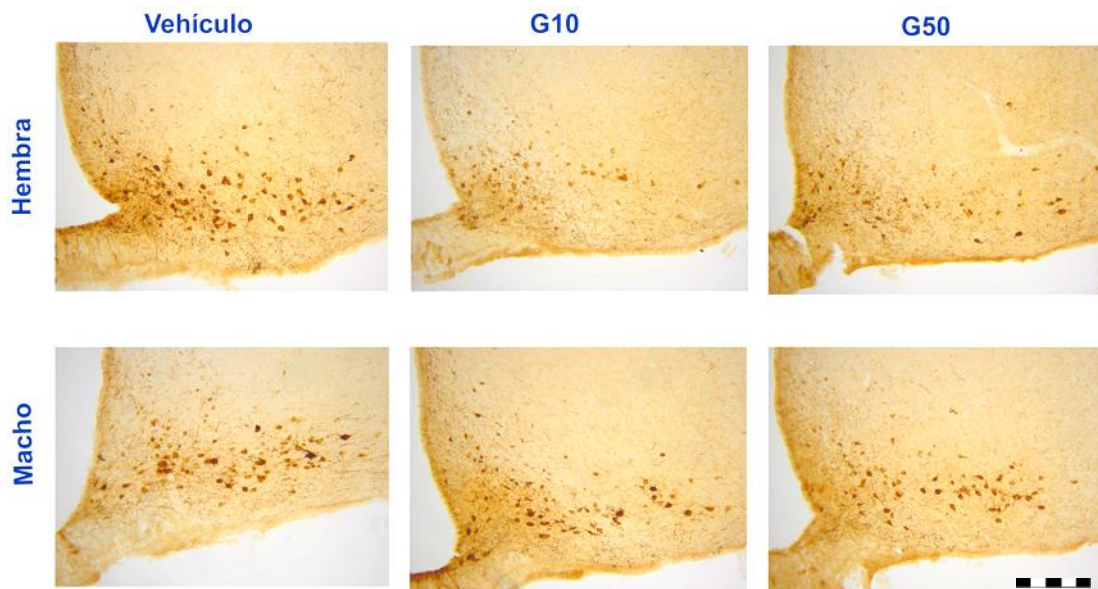


Figura 31. Micrografías de secciones coronales del ArqM en todos los grupos donde se muestra la reducción producida por la genisteína en el ArqM en la expresión de POMC-ir. Barra: 200 μ m.

3.5. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el número de neuronas orexina-ir

El análisis de los resultados del número de neuronas que expresan orexina en el continuo APF/DMH, no muestra ningún efecto del factor sexo ($F_{1,30}=0,598$; $p=0,445$), del factor tratamiento ($F_{2,30}=1,614$; $p=0,216$) o de la interacción entre los factores ($F_{2,30}=0,079$; $p=0,924$). Tampoco se observa ningún efecto significativo en el HL con respecto al efecto del sexo ($F_{1,30}=0,002$; $p=0,964$), tratamiento ($F_{2,30}=0,218$; $p=0,805$) o interacción entre los factores ($F_{2,30}=0,234$; $p=0,793$) (figuras 32, 33 y 34).

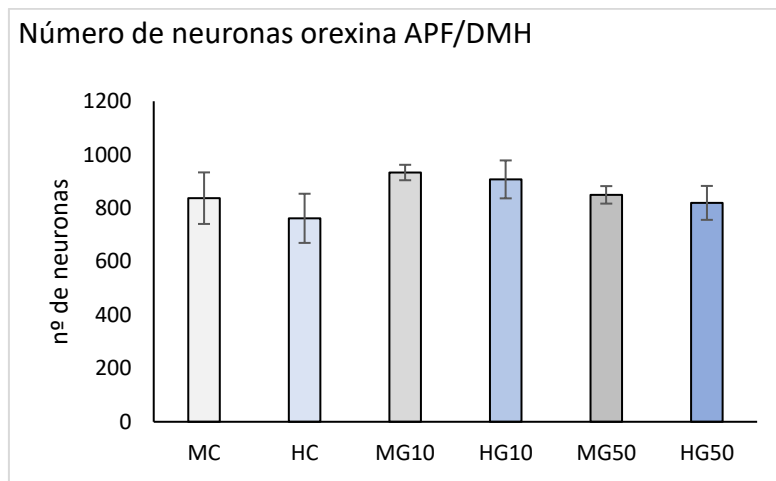


Figura 32. Número de neuronas orexina-ir en el APF/DMH. MC, macho control; HC, hembra control; MG10, macho G10; HG10, hembra G10; MG50, macho G50; HG50, hembra G50. *= $p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

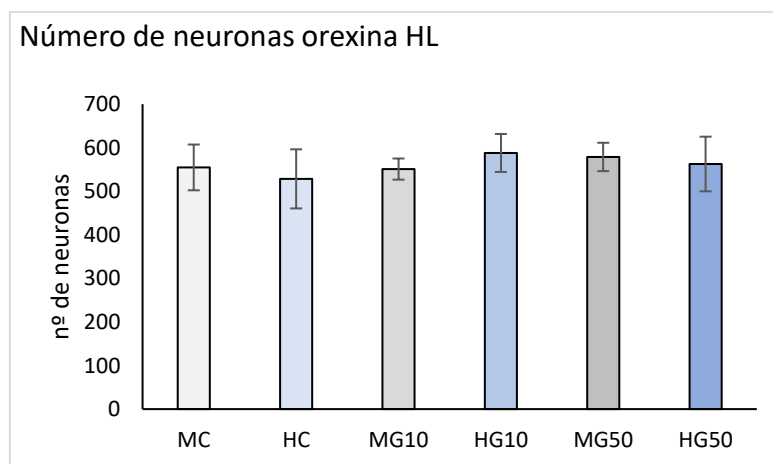


Figura 33. Número de neuronas orexina-ir en el hipotálamo lateral. MC, macho control; HC, hembra control; MG10, macho G10; HG10, hembra G10; MG50, macho G50; HG50, hembra G50. *= $p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

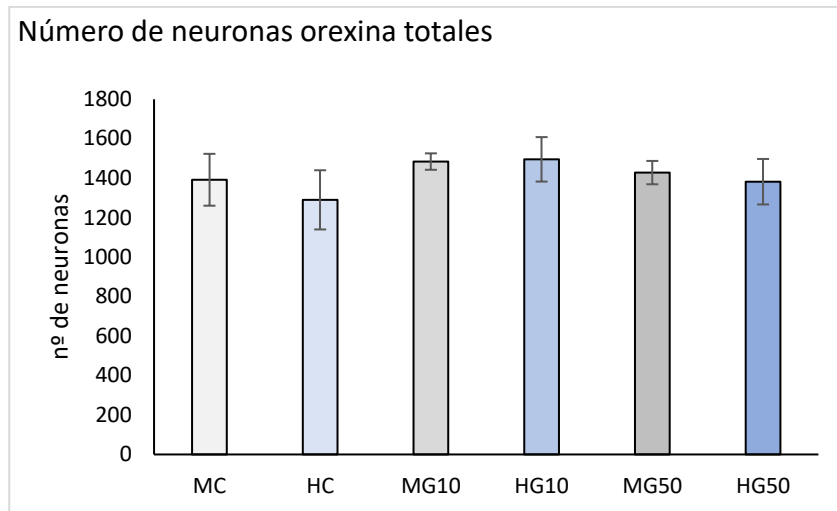


Figura 34. Número de neuronas orexina-ir totales. MC, macho control; HC, hembra control; MG10, macho G10; HG10, hembra G10; MG50, macho G50; HG50, hembra G50. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

4. Discusión

Los resultados del primer experimento han demostrado que la exposición a la genisteína en las primeras etapas del desarrollo modifica la expresión a largo plazo de las neuronas que expresan POMC en el ARQ en ratas Wistar hembras, pero no en machos. Además, el tratamiento con la dosis alta de genisteína produjo un retraso en la aparición de diferencias sexuales en el peso corporal y una alteración de las concentraciones de estradiol en plasma en ambos sexos. Por el contrario, la ingesta calórica o la expresión de orexina no se vieron alteradas en ninguno de los sexos.

Respecto al peso corporal, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el tratamiento con genisteína de P6 a P13 produjo un retraso de una semana en la aparición de diferencias sexuales en los grupos de genisteína tratados con la dosis más alta. Las diferencias de sexo en los grupos control y G10 se observaron a partir de P40, pero en P47 en el grupo G50. En todos los casos, el patrón típico en el que el macho muestra mayor peso corporal que la hembra se mantuvo una vez que aparecieron la diferencias entre los sexos. Se han comunicado resultados similares en la aparición de diferencias sexuales respecto a los grupos de control en un estudio previo de nuestro grupo (Carrillo et al., 2019). Además, en este estudio, el tratamiento con estradiol entre los días P6 y P13 restauró el peso corporal de los machos alimentados con una dieta alta en grasas a los niveles del grupo control, que estaban alimentados con una dieta estándar.

Respecto a la ingesta calórica, las diferencias de sexo aparecieron en P40 y continuaron hasta P82, tanto en los grupos control como en los animales tratados con genisteína. En todos los grupos, la ingesta de los machos fue más elevada que la de las hembras.

La ingesta y el peso corporal son dos variables fisiológicas en las que se han encontrado importantes efectos de las hormonas gonadales, con diferencias en la regulación de estas variables entre los sexos, ya que, por ejemplo, los hombres y las mujeres difieren en la distribución de la grasa corporal y en el control hormonal por el cual se regula esta distribución (Shi y Clegg, 2009; Butera, 2010). Una muestra de estas diferencias en el control del metabolismo es el cambio que ocurre en mujeres premenopáusicas en la acumulación de grasa corporal cuando la secreción de estradiol se ve reducida, provocando un aumento de los depósitos de grasa intraabdominal, siguiendo un patrón de acumulación de grasa típicamente masculino (Brown y Clegg, 2010). Así mismo, la ingesta aumenta significativamente con la reducción o retirada de los

estrógenos en diversas especies, incluidos los humanos, elevando el riesgo del desarrollo de obesidad (Santollo y Daniels, 2015). Debido a su similitud con el estradiol, como ya se comentó anteriormente, se podría esperar un efecto similar de la genisteína en lo que se refiere a la reducción tanto del peso corporal como de la ingesta de alimentos. Sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios; mientras que en algunos trabajos se ha informado de efectos de la genisteína similares a los del estradiol (Luo et al., 2018; Kim et al., 2009), reduciendo tanto la ingesta de alimentos como el peso corporal, en otros se ha encontrado que el efecto de la genisteína se produce en la distribución de la grasa corporal, pero sin que el peso y la ingesta muestren alteraciones con respecto a los sujetos control, mostrando así la variabilidad de los efectos de los fitoestrógenos (Cave et al., 2007). En el presente trabajo, la genisteína no afectó al peso corporal, por lo que el retraso en la aparición de las diferencias sexuales en el peso en los grupos G50 podría explicarse, en parte, debido al efecto de la genisteína sobre los receptores de estrógenos en el tejido adiposo, puesto que la localización de los receptores de estradiol en los depósitos de grasa subcutáneo difiere entre los sexos (Cooke y Naaz, 2004). No obstante, no existen muchos estudios en los cuales se haya puesto el foco de atención sobre los efectos de los fitoestrógenos en el peso o la ingesta, siendo más habitual estudiar sus alteraciones sobre el sistema reproductor o las conductas sexuales. Dado el importante papel de los estrógenos, especialmente del estradiol, en la regulación de estas variables fisiológicas, resulta interesante profundizar en el efecto de estos compuestos en la regulación de la ingesta y el metabolismo energético (Cederreoth y Nef, 2009).

En el presente trabajo, el tratamiento con genisteína entre los días P6 y P13 ha causado una alteración en los niveles de estradiol en plasma tanto en machos como en hembras, con un efecto muy marcado de elevación de los niveles en el grupo tratado con la dosis alta de genisteína en machos, mientras que en las hembras el efecto se produce de forma más moderada tanto en el grupo tratado con dosis altas como el grupo tratado con dosis bajas. Por el contrario, los niveles de testosterona no se ven alterados en ninguno de los grupos. Estos resultados son similares a los encontrados en trabajos anteriores de nuestro grupo, en los que se han estudiado las alteraciones fisiológicas y cerebrales producidas por una dieta rica en grasas en ratas macho y hembra durante las etapas tempranas del desarrollo (Carrillo et al., 2019). En el grupo de ratas macho alimentadas con una dieta alta en grasa, los niveles de estradiol en plasma son más elevados respecto al mismo grupo en hembras y a los grupos control alimentados con una dieta estándar. Estos resultados, junto con los del presente trabajo, sugieren una especial influencia de

las alteraciones en la ingesta producidas en estas etapas tempranas en los niveles de estradiol en plasma en ratas, especialmente en los machos. El estradiol juega un papel muy importante en la regulación hormonal en los hombres, ya que algunas de las acciones biológicas tradicionalmente atribuidas a la testosterona se deben a la acción a través de su aromatización a estradiol por la enzima aromatasa citocromo P450, que cataliza la biosíntesis de estrógeno a partir de los andrógenos (Lephart, 1996). Por ejemplo, en los hombres, los niveles de estradiol son mayores que en las mujeres posmenopáusicas, y los receptores de estrógeno se expresan en muchos tejidos reproductivos y somáticos (Russell y Grossmann, 2019). La actividad de la enzima aromatasa está presente en las células adiposas, en el hígado, la piel y otros tejidos. En varones, el 80% de la conversión de testosterona a estradiol se debe a la aromatización periférica de la testosterona, y en mujeres, el 50% del estradiol producido en el transcurso de la gestación proviene de la aromatización de andrógenos. Así mismo, la conversión de androstenediona en estrona es la principal fuente de estrógenos en mujeres posmenopáusicas, en las que la producción de estradiol por los ovarios se reduce drásticamente (Murray et al., 2013).

El hecho de que las concentraciones séricas de estradiol no reflejen necesariamente las concentraciones en el cerebro (Barker y Galea, 2009) y que incluso dentro de las estructuras cerebrales estas concentraciones sean diferentes, dificulta la explicación de los mecanismos a través de los cuales la genisteína pueda mediar en estas concentraciones. El papel de la genisteína en la regulación de la aromatasa se ha reportado en diversos trabajos, principalmente por su efecto inhibitorio de esta enzima en el desarrollo del cáncer de mama, mientras que en otros trabajos se ha reportado un efecto contrario, aumentando la acción enzimática (Brooks y Thompson, 2005; Edmunds et al., 2005; Kim et al., 2009; Khan et al., 2011; Nielsen y McNulty, 2019; Chu et al., 2020). En concordancia con otros trabajos, donde la dosis elevada de genisteína puede actuar como un potencial disruptor endocrino en roedores (Santti et al., 1998; Kim et al., 2009), los resultados de la presente tesis muestran un marcado aumento en plasma de las concentraciones de estradiol producida por el tratamiento con altas dosis de genisteína en el grupo de machos. Por lo tanto, podemos concluir que, en la rata, los niveles de estradiol parecen ser sensibles a la exposición de los fitoestrógenos durante el desarrollo, con un mayor efecto de la dosis alta en los machos, y que este efecto dependiente de la dosis podría tener efectos tanto estrogénicos como antiestrogénicos, dependiendo de la edad, del sexo y de las estructuras y sistemas implicados.

Respecto a las neuronas que expresan POMC en el ARQ, los resultados obtenidos en la presente tesis han demostrado que la exposición a la genisteína en las primeras etapas del desarrollo modifica la expresión a largo plazo de estas neuronas en ratas Wistar hembra pero no en machos. Específicamente, el número de células que expresan POMC disminuyó en la subdivisión ArqM de ratas hembra cuando se administraron dosis bajas o altas de genisteína desde P6 a P13; sin embargo, no se detectó ningún efecto de la genisteína sobre la expresión de POMC en este mismo núcleo en los machos ni en la expresión de orexina en el HL o en el área APF/DMH, ni en machos ni en hembras.

En anteriores trabajos se han encontrado resultados similares (Carrillo et al., 2019), ya que la administración de estradiol moduló los niveles de ARNm de POMC hipotalámico en hembras con una dieta baja en proteínas o alta en grasas, pero no se detectó ningún efecto en las ratas macho o en cualquier otro péptido relacionado con la alimentación. Además, cuando la actividad de los receptores $ER\alpha$, $ER\beta$ y GPER se bloqueó de P5 a P13, hubo una disminución de los niveles de ARNm de POMC en ratas hembra, pero nuevamente, este efecto no se detectó en machos y no se mostraron alteraciones en otros péptidos estudiados ni en machos ni en hembra (Carrillo et al., 2020). Así mismo, el estudio con ratones de Qiu et al. (2020), muestra como el estradiol protegió a las hembras del desarrollo de la resistencia a la insulina en el SNC característico de un fenotipo obeso, sin causar ningún efecto en los machos. Todos estos datos sugieren de nuevo unos mecanismos diferentes para esta hormona en machos y hembras, y muestran como la genisteína a través de una actividad agonista o antagonista sobre los receptores estrogénicos, altera la expresión a largo plazo de POMC durante el desarrollo en ratas hembra pero no en machos. Se han encontrado resultados similares con estudios realizados con el bisfenol A (BPA), otro disruptor endocrino con actividad estrogénica. En este caso los ratones macho expuestos a BPA exhibieron proyecciones inmunopositivas de POMC reducidas en el PVH y en las hembras se detectó una expresión del gen *Pomc* más débil en el ARQ (MacKay et al., 2017). Estos efectos podrían producirse, indirectamente, a través del aumento de la activación por parte de la genisteína de las neuronas que expresan NPY/PRAG y la subsecuente acción inhibitoria de estas poblaciones neuronales sobre las neuronas que expresan POMC, posiblemente a través de GABA, o directamente, sobre los procesos de los neuropéptidos que actúan en estas neuronas (Roseberry et al., 2004; Tong et al., 2008; Andreoli et al., 2015). La leptina podría ser el candidato idóneo para ejercer estas acciones, ya que la suplementación con

leptina en ratas recién nacidas durante el período de lactancia protege contra el sobrepeso en la edad adulta y mejora el control de la ingesta de alimentos. Este efecto se ha asociado con cambios en la expresión de los genes de proopiomelanocortina, del LepR y del supresor de la señalización de citoquinas (Palou et al., 2011). En la edad adulta, parte de la regulación de la leptina en la homeostasis energética y la reproducción se produce a través de los LepR que se encuentran en las neuronas que expresan POMC en el ARQ, y en algunos trabajos se ha vinculado con la acción de los estrógenos gonadales (Frank et al., 2014). Mediante un efecto directo sobre las neuronas que expresan POMC en el ARQ, tanto la leptina como el estradiol activan la vía de transducción de señal STAT3 (Toda et al., 2017), sugiriendo un efecto sinérgico de estas dos hormonas en la regulación de la homeostasis energética por medio de la activación de esta vía (Pinos et al., 2018). Así mismo, se ha encontrado dimorfismo sexual en la señalización de la leptina en las neuronas que expresan POMC en el hipotálamo (Shi et al., 2010, Frank et al., 2014), como muestra la mayor activación de los marcadores de c-Fos y STAT3 producida por la administración intraventricular de leptina en ratas hembra respecto a los machos (Clegg et al., 2006). Por el contrario, otros trabajos han mostrado como los ER α y LepR no se coexpresan en las mismas poblaciones neuronales en el ARQ, por lo que se sugiere que las dos hormonas actúan de forma independiente para reducir el peso corporal y/o que el estradiol aumenta indirectamente la sensibilidad a la leptina, efectos que serían necesario estudiar en las épocas postnatales tempranas donde estas hormonas no tienen los mismos efectos que en la edad adulta (Kim et al., 2016).

Otra vía a través de la cual se podría producir el efecto de la genisteína podría ser el receptor de membrana estrogénico GPER. Se conoce la afinidad de la genisteína por el GPER (Thomas y Dong, 2006), y al igual que el BPA, podría alterar la programación del circuito de melanocortinas, disminuyendo las proyecciones de las poblaciones que expresan POMC en ARQ con el PVH, proyecciones que dependen para su desarrollo del pico de leptina que se produce entre los días P8 y P13 (Bouret et al., 2004; MacKay et al., 2017). Por lo tanto, la interferencia de la genisteína en estas épocas postnatales tempranas con los procesos a través de los cuales la leptina ejerce su función neurotrófica podría resultar en un desarrollo alterado de estos circuitos hipotalámicos. La reducción de las neuronas POMC-ir en las hembras en los grupos tratados con genisteína podría indicar una interferencia de ésta con el estradiol y la leptina, o la interacción entre ellos, en épocas críticas del desarrollo para estas neuronas, es decir, la genisteína podría tener un efecto

antiestrogénico en estos periodos, al contrario de lo que ocurre en adultos donde se han encontrado efectos potenciadores de los efectos del estradiol.

Por lo tanto, se necesita más investigación para determinar la acción específica de la genisteína durante el período de programación sobre los ERs y si la genisteína actúa directa o indirectamente sobre las neuronas POMC. En el siguiente experimento realizado en esta tesis se estudian los efectos de la genisteína sobre la expresión de GPER en el ARQ con el objetivo de profundizar en el conocimiento de estos procesos.

Respecto a los resultados encontrados en la expresión de orexina en el HL y en el continuo APF/DMH, en un trabajo anterior realizado con ratones se ha informado de un efecto de la genisteína alterando la expresión de esta hormona en ambos sexos (Marraudino, Ponti et al., 2021), encontrando un número mayor de neuronas que expresan orexina en el HL en los machos control que en las hembras control en la edad adulta. En este mismo estudio, se muestra como este dimorfismo fue totalmente revertido en ratones tratados con genisteína, provocando un aumento del número de neuronas inmunorreactivos en las hembras y una reducción en los machos tratados con genisteína. Estos circuitos son sensibles a la programación por parte de la leptina y a la alteración producida por la dieta alta en grasas (Kelley et al., 2020), aunque el efecto directo del estradiol no parece plausible de forma directa debido a la baja expresión de receptores de estrógenos en el HL y en el continuo APF/DMH (Muschamp et al., 2007). En los resultados de este trabajo no se han encontrado efectos de la genisteína en ninguno de los dos sexos ni en las diferentes dosis, mostrando un patrón isomorfo macho-hembra en la expresión de este neuropéptido, lo que sugiere la ausencia de un efecto directo o indirecto de la genisteína en la programación postnatal en la expresión de estas poblaciones en ratas. Estos datos están en consonancia con los resultados encontrados en la ingesta de alimentos en esta tesis, en los que tampoco se ha encontrado un efecto del tratamiento con genisteína, y en la que el sistema de orexina parece tener un papel relevante.

En relación con su interacción con los estrógenos, el papel que desempeña la orexina en la conducta de cópula del macho es controvertido, ya que parece estar más determinado por la reducción de la ansiedad a través del efecto de la orexina en el sistema dopaminérgico que en la regulación de la conducta sexual en sí misma por los receptores estrogénicos (Di Sebastiano et al., 2010). Pocas neuronas orexinérgicas expresan ER α , lo que podría indicar que la regulación hormonal de la expresión de orexina se realiza a través de aferencias de las neuronas que contienen esos receptores o mediante la

colocalización con receptores de otros neuropéptidos (Muschamp et al., 2007). El receptor para la leptina está presente en la mayoría de las neuronas que expresan orexina al igual que la vía de transcripción de señal STAT3 (Håkansson et al., 2001), sugiriendo una regulación por parte de la leptina de estas poblaciones neuronales y confiriendo al mismo tiempo a la orexina un papel en la regulación de la glucosa, en la resistencia a la obesidad inducida por la dieta y la sensibilidad a la insulina (Tsuneki et al., 2010). Como se ha comentado anteriormente, la leptina tiene un rol fundamental en el desarrollo de los circuitos de ingesta, y el STAT3, a través de la convergencia de la señalización de la leptina, la insulina y el estradiol, se postula como uno de los mecanismos principales en los que se integra el desarrollo de los circuitos cerebrales postnatales (Carrillo et al., 2016). Un ejemplo de esta regulación es como la dieta alta en grasas en ratas aumenta las proyecciones hipotalámicas al HL, aumentando la activación basal de las neuronas OXR1 y la respuesta directa de las neuronas del HL a la leptina (Kelley et al., 2020). Por lo tanto, y dadas las amplias conexiones que realizan las neuronas que expresan orexina en el HL, una alteración en las poblaciones neuronales involucradas en la conducta de ingesta reguladas por la leptina, la insulina y el estradiol y su confluencia en la vía STAT3, podría afectar a la función de las neuronas orexinérgicas y a su papel en la regulación de la ingesta de alimentos y el metabolismo, especialmente en la programación temprana de los circuitos de recompensa mesocorticolímbicos, fuertemente inervados por el HL, aunque no se observen cambios morfológicos en su expresión en el HL, el APF y el DMH.

Experimento 2

Efectos del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la expresión del GPER en el núcleo arqueado del hipotálamo

1. Introducción

En la actualidad, existe amplia evidencia de como las hormonas esteroides pueden ejercer acciones rápidas, no genómicas, no relacionadas con la activación mediada por los receptores nucleares (Thomas y Dong, 2006). Estas acciones se llevan a cabo a través de receptores de membrana, entre los que se encuentra el receptor estrogénico de membrana GPER, anteriormente denominado GPR30, que fue descubierto en las células de cáncer de mama humano hace dos décadas (Zimmerman et al., 2016). Este receptor de siete dominios transmembrana se expresa de manera omnipresente en todo el organismo, incluido el sistema nervioso, el corazón, el páncreas, el músculo esquelético, los riñones, los órganos reproductores y las células inmunitarias, con un patrón de expresión dependiente de la edad, la especie, el género y el tejido (Olde y Leeb-Lundberg, 2009; Luo y Liu, 2020). En el SNC de la rata y el hámster, se ha detectado una alta densidad de GPER en el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, el cerebelo y la amígdala. La expresión de este receptor en estas estructuras es sexualmente dimorfa, con un patrón hembra>macho en el hipotálamo y el cerebelo, y un patrón macho>hembra en el tálamo, el hipocampo y la amígdala, con una fluctuación de la expresión del receptor dependiente del ciclo estral en las hembras (Canonaco et al., 2008; Llorente et al., 2020; Luo y Liu, 2020; Marraudino, Carrillo et al., 2021). Estas características establecen las bases para investigar los efectos fisiológicos del GPER en los numerosos procesos en los que está implicado, como el desarrollo del cáncer, la hipertensión, la regulación inmunológica, reproductiva y cardiovascular, así como en sus funciones metabólicas (Zimmerman et al., 2016).

Trabajos anteriores han mostrado como el estradiol aumenta la actividad de las neuronas que expresan POMC en el hipotálamo mediante la unión a receptores de membrana, produciendo un efecto anorexígeno a través de la activación de diversas proteínas kinasas, como PKA, PKC y PI3K (Malyala et al., 2005; Qiu et al., 2003, 2006; Kelly y Rønnekleiv, 2008; Stincic et al., 2018). Aunque se desconocen los mecanismos exactos por medio de los cuales los estrógenos ejercen sus efectos en los receptores de membrana en el hipotálamo, parte de estos efectos podrían estar mediados por el GPER. Por ejemplo, el $Er\alpha$ y el LepR no se expresan en las mismas poblaciones neuronales en el ARQ, pero, sin embargo, el estradiol y la leptina activan las mismas vías de transmisión

de señal (Kim et al., 2016). Este hecho sugiere la implicación de otro tipo de receptores estrogénicos en las neuronas que expresan LepR, entre los cuales podrían encontrarse el GPER, mediando los efectos a través de la activación de estas vías comunes de transducción de señal entre el estradiol y la leptina.

La integración de todas las señales en el ARQ y los mecanismos de acción de los diferentes procesos son complejos, dependientes del sexo y sujetos a una plasticidad necesaria para adaptar la conducta al ambiente. Así mismo, es necesario poner especial atención a las épocas tempranas del desarrollo, momento en el que el papel de los diversos neurotransmisores y hormonas puede ser muy diferente al de la edad adulta (Périan y Vanacker, 2020). En la actualidad, la creciente evidencia sugiere que el GPER desempeña un papel en la regulación del peso corporal y el metabolismo, aunque todavía es necesario la realización de más estudios (Qiu et al., 2006). De especial relevancia es la inclusión de diferentes especies animales de ambos sexos y el momento del desarrollo para corroborar los datos obtenidos hasta este momento en los mecanismos y funciones en los que está involucrado este receptor (Luo y Liu, 2020).

Muchos de los compuestos ambientales con propiedades estrogénicas, además de tener la capacidad de unirse a los receptores nucleares clásicos, también pueden actuar a través de los receptores de membrana de estrógenos como el GPER (Périan y Vanacker, 2020). Como se ha apuntado anteriormente, se pensaba que los efectos estrogénicos de la genisteína se producían principalmente a través de los receptores $Er\beta$ (Kuiper et al., 1998; Casanova et al., 1999; Patisaul et al., 2002), pero en los últimos años también se han demostrado acciones de la genisteína a través del GPER, ya que algunos autores han informado de una afinidad de unión al GPER del 13% respecto a la del estradiol (Thomas y Dong, 2006). Específicamente, la activación del GPER producida por la genisteína resulta en efectos antiinflamatorios en las células microgliales (Du et al., 2018) y en un aumento en la migración de las células gliales (Ariyani et al., 2020). Dado que el GPER es el receptor descubierto más recientemente, se conocen menos datos que vinculen a este receptor con los efectos de la genisteína en la regulación de la ingesta y el metabolismo. Por lo tanto, a medida que se caracterizan las funciones del GPER, se añaden también nuevos mecanismos a través de los cuales la genisteína y otros compuestos, tanto naturales como artificiales, pueden ejercer sus efectos en el organismo.

2. Materiales y método

2.1. Animales

Para la realización del experimento 2 se han utilizado los mismos animales que en el experimento 1.

2.2. Tratamiento

En el experimento 2 se han utilizado las muestras obtenidas con el mismo tratamiento ya explicado en el experimento 1.

2.3. Preparación del tejido

Para la realización del experimento 2 se ha seguido el mismo procedimiento que en el experimento 1, con la diferencia de que se ha utilizado la serie 3.

2.4. Proceso inmunohistoquímico

Para la detección inmunohistoquímica de GPER se utilizó la serie 3 en flotación. Primeramente, se lavó el crioprotector con PBS al 0,1%, seguidamente se procedió a realizar una incubación de las secciones con una solución de PBS que contenía 0,2% de BSA y 0,2% de Triton X-100 durante 30 minutos y posteriormente se trataron para bloquear la actividad de peroxidasa endógena (tampón que contiene metanol 1: 1 y peróxido de hidrógeno al 0,3%) durante 10 minutos en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados en PBS durante 5 minutos. Luego se incubaron en agitación a 4°C durante 48h con un anticuerpo policlonal de conejo contra GPER (Abcam Anti-G-protein coupled receptor 30 antibody ab39742, diluido 1:250 en PBS y 0,2% de BSA). Transcurridas las 48 horas se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos y se procedió a tratar con el anticuerpo secundario (Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Biotin, Thermo Scientific, 31820, diluido 1:300 en PBS) durante 120 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se repitieron los 3 lavados con PBS y se procedió a añadir el complejo ABC (Thermo Fisher 32020, diluido 1:400 en PBS + 3% de leche en polvo)

durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos con PBS al 0,1% y se procedió al proceso de revelado con DAB (Sigma D5637) y H₂O₂. El procedimiento utilizó DAB al 0,05% y H₂O₂ al 0,025%, en condiciones de poca iluminación y con un tiempo de revelado de 3 minutos y 40 segundos. Las secciones se colocaron sobre portaobjetos gelatinados y protegidos con cubreobjetos de cristal pegados con DPX.

2.5. Estimación número de neuronas GPER-ir en el ARQ

La marcación inmunohistoquímica del GPER se ha caracterizado por ser predominantemente citoplasmática, con una distribución amplia en todo el ARQ y una delimitación dentro del núcleo similar a la encontrada en la tinción de Nissl. Se han considerado todas las células en las que se pudiera distinguir la morfología del soma neuronal, excluyendo aquellas que mostraban un soma pequeño característico de las células gliales (Llorente et al., 2020). En la figura 35 se puede observar una micrografía de la marcación positiva para GPER.

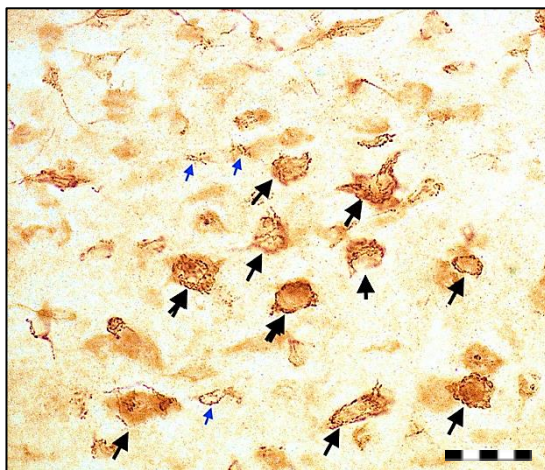


Figura 35. Marcación inmunohistoquímica donde se muestran ejemplos positivos para GPER-ir. Flechas negras, células inmunorreactivas con morfología neuronal. Flechas azules, células inmunorreactivas con morfología glial. Barra: 30 μ m.

El recuento de las neuronas GPER-ir en el ARQ se realizó mediante fotografías en blanco y negro con una magnificación 4X y 20X realizadas con la cámara NIKON Digital Sight DS-Fi1 conectada al microscopio NIKON Eclipse 80i con el programa

Olympus Cella v1.1.6. Estas fotografías fueron analizadas mediante el programa ImageJ versión 2.0.0.0-rc-69/1,52n. Todas las secciones de los cerebros fueron ordenados según Paxinos y Watson (2015) mediante fotografías con una magnificación 4X y se seleccionaron todas las secciones con marcación positiva en GPER en el ARQ, como se muestra en la figura 36.

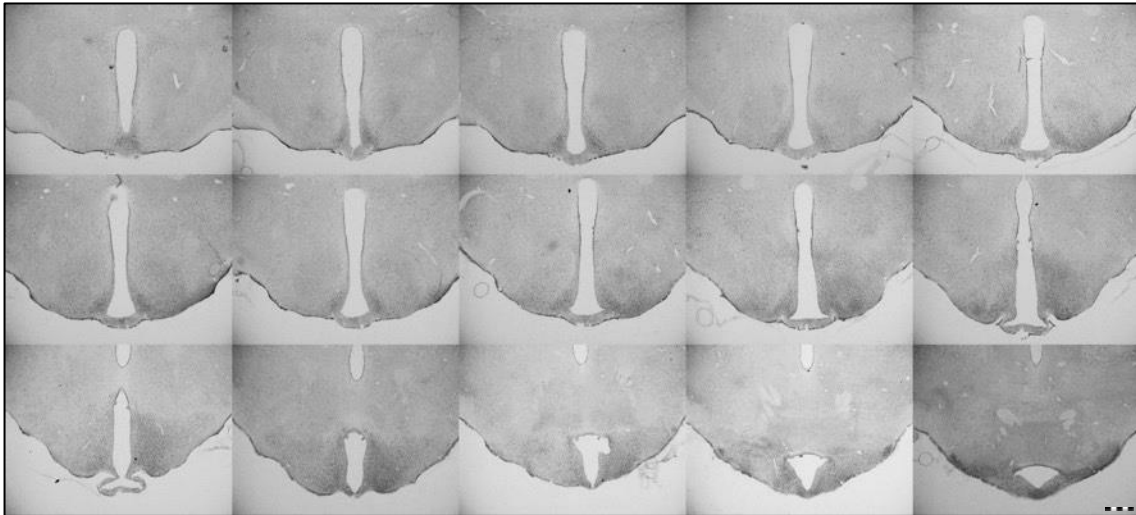


Figura 36. Montaje con micrografías en blanco y negro de la expresión del GPER en el hipotálamo en secciones coronales. Aproximadamente desde bregma -1,20 mm hasta -2,50 mm. Barra: 300 μm .

Los hemisferios derecho e izquierdo fueron contados independientemente mediante una fotografía con una magnificación 20X. Para ello, se colocó aleatoriamente una rejilla con cuadrantes con un área de $3300 \mu\text{m}^2$ en cada sección. Seguidamente se establecieron las delimitaciones de todas las subdivisiones del ARQ y se procedió a realizar el recuento, como se muestra en la figura 37. El método empleado ha consistido en una estimación del número de neuronas inmunorreactivas mediante la selección aleatoria de un número proporcional de cuadrantes de la rejilla en cada subdivisión. Se han utilizado diferentes medidas de selección de cuadrantes debido al distinto tamaño de las subdivisiones del ARQ. Para las partes mediales se seleccionó aleatoriamente uno de cada diez cuadrantes y para las partes laterales se seleccionó aleatoriamente uno de cada cinco cuadrantes cuya área total estaba incluida dentro de los límites de las subdivisiones del núcleo. En ambos casos se comenzó a realizar el recuento aleatorio en el primer cuadrante situado más próximo al área dorsomedial cuya superficie estuviera incluida en

la delimitación de la subdivisión en su totalidad. Se contaron todas las células dentro del cuadrante excluyendo aquellas en los que las líneas de la rejilla se superponían con los somas neuronales.

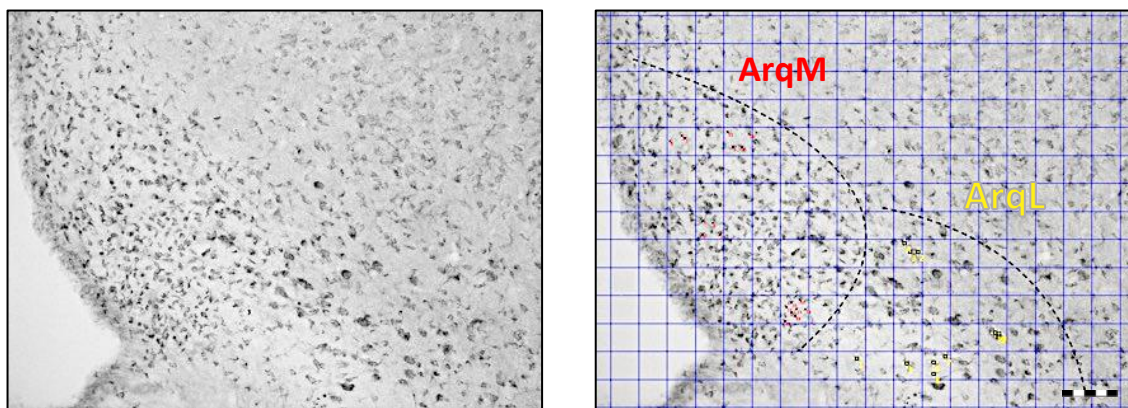


Figura 37. Micrografías donde se muestra la rejilla con cuadrantes con un área de $3300 \mu\text{m}^2$ y el marcaje de las células GPER-ir para su análisis cuantitativo. Se puede observar la marcación utilizada para realizar la estimación del número de neuronas en la subdivisión arquead medial (ArqM) en rojo y en la subdivisión arqueado lateral (ArqL) en amarillo. Barra: $100 \mu\text{m}$.

2.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se ha utilizado el Software IBM SPSS Statistics versión 27 asumiendo como estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

El análisis del número de neuronas se ha realizado mediante un ANOVA unifactorial para comprobar la lateralidad sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los hemisferios derecho e izquierdo. Descartada la lateralidad se ha procedido a analizar el dimorfismo en el número de neuronas en cada división y subdivisión utilizando para ello un ANOVA unifactorial comparando los grupos de cada sexo con el mismo tratamiento. Seguidamente, se realizó un ANOVA unifactorial (factor tratamiento) de manera independiente para cada uno de los sexos. Los análisis *post hoc* para conocer las diferencias entre los grupos se realizaron mediante la prueba S-N-K. Los datos se muestran como medias y error estándar de la media.

3. Resultados

3.1. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el número de neuronas GPER-ir

En la tabla 5 se muestra primeramente la estimación del número de neuronas GPER-ir de cada una de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqD, ArqPM y ArqPL, seguidamente de las divisiones anterior y posterior y por último del total del ARQ. No se ha detectado diferenciación entre las subdivisiones ArqM y ArqD, por lo que se ha considerado el continuo de estas dos subdivisiones (ArqM-D) para la realización del recuento. En el cálculo del área anterior se han sumado las subdivisiones ArqM-D y ArqL, y para el área posterior se han sumado las subdivisiones ArqPM y ArqPL. Para el cálculo del total se han sumado el área anterior y el área posterior.

NÚMERO DE NEURONAS GPER	MC	HC	MG10	HG10	MG50	HG50
ArqM-D	11493 ± 1810	11887 ± 458	11527 ± 1226	11807 ± 2135	11816 ± 2150	13247 ± 813
ArqL	3030 ± 210	3127 ± 233	3503 ± 268	2977 ± 750	3444 ± 373	3570 ± 685
ArqPM	7793 ± 1016	5893 ± 712	6880 ± 1240	6113 ± 494	5600 ± 1056	5833 ± 578
ArqPL	2197 ± 270	1897 ± 497	2520 ± 218	2150 ± 461	1864 ± 249	2010 ± 520
ARQ Anterior	14523 ± 1635	15013 ± 592	15030 ± 1129	14783 ± 2795	15260 ± 2061	16817 ± 1420
ARQ Posterior	9990 ± 961	7790 ± 841	9400 ± 1240	8263 ± 899	7464 ± 1103	7843 ± 922
ARQ	24513 ± 2206	22803 ± 784	24430 ± 1025	23047 ± 3147	22724 ± 2538	24660 ± 1958

Tabla 5. Número de neuronas GPER-ir en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ. Todos los valores se expresan como medias ±SEM.

El análisis de los grupos control muestra diferencias estadísticamente significativas en la división posterior ($F_{1,10}=17,802$, $p=0,002$), con un mayor número de neuronas GPER-ir en los machos (figura 38), mientras que en las divisiones anterior y en el total del ARQ no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($F_{1,10}=0,476$, $p=0,506$; $F_{1,10}=3,201$, $p=0,104$). El análisis de los grupos de dosis baja G10 no muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y en el total del ARQ ($F_{1,10}=2,197$, $p=0,172$; $F_{1,10}=0,388$, $p=0,549$; $F_{1,10}=2,047$, $p=0,186$); de igual manera, en el análisis de los grupos de dosis alta G50 tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ ($F_{1,10}=0,40$, $p=0,845$; $F_{1,10}=3,306$, $p=0,99$; $F_{1,10}=1,048$, $p=0,330$).

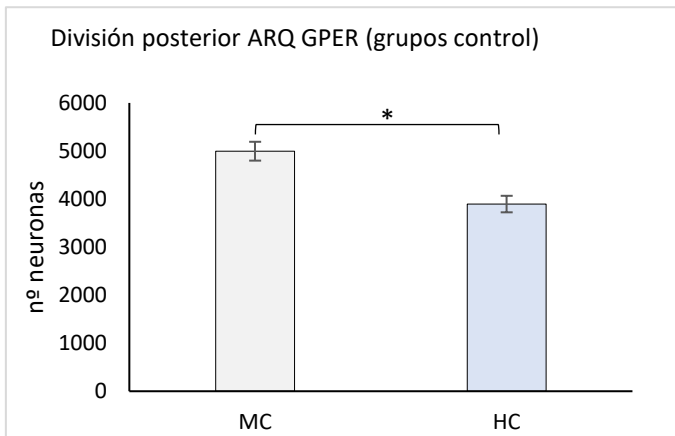


Figura 38. Número de neuronas GPER-ir de la división posterior del ARQ en los grupos control. MC, macho control; HC, hembra control. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En cuanto al análisis de cada sexo por separado, en las hembras no se ha encontrado ningún efecto del tratamiento en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ ($F_{2,15}=1,277$; $p=0,307$; $F_{2,15}=2,192$; $p=0,146$; $F_{2,15}=0,511$; $p=0,610$). En cambio, en los machos, los resultados muestran un efecto del tratamiento en la división posterior ($F_{2,15}=7,590$; $p=0,006$) pero no en la división anterior ni en el total ($F_{2,15}=1,366$; $p=0,287$; $F_{2,15}=0,304$; $p=0,743$). El análisis *post hoc* muestra diferencias estadísticamente significativas en los machos en la división posterior entre el grupo de dosis altas G50 y los grupos control y de dosis bajas G10, con un menor número de neuronas GPER-ir dependiente de la dosis (figura 39).

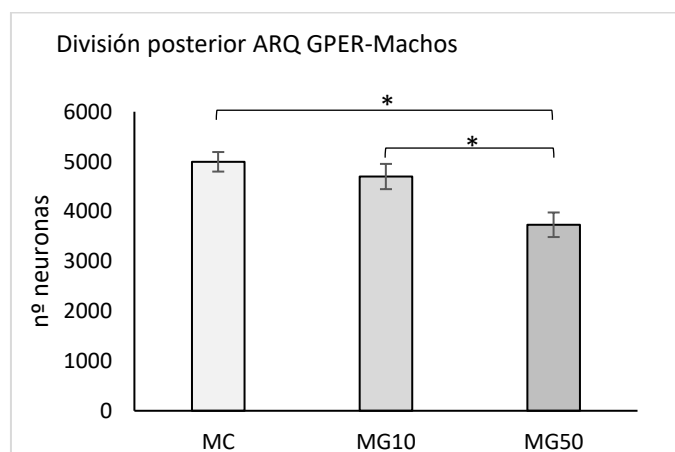


Figura 39. Número de neuronas GPER-ir en la división posterior del ARQ en machos. MC, macho control; MG10, macho G10; MG50, macho G50. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

3.1.1. Análisis subdivisiones del ARQ

En el análisis en las subdivisiones del ARQ, los grupos control de cada sexo en el número de neuronas que expresan GPER muestran diferencias estadísticamente significativas en la subdivisión medial posterior ($F_{1,10}=14,072$, $p=0,004$), con un mayor número de neuronas GPER-ir en los machos (figura 40 y 41). En el resto de las subdivisiones medial, lateral y posterior lateral no se han encontrado diferencias ($F_{1,10}=0,266$, $p=0,617$; $F_{1,10}=0,571$, $p=0,467$; $F_{1,10}=1,687$, $p=0,223$). En el análisis de los grupos de dosis bajas G10, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones medial, lateral, posterior medial y posterior lateral ($F_{1,10}=2,305$, $p=0,163$; $F_{1,10}=0,134$, $p=0,723$; $F_{1,10}=0,218$, $p=0,652$; $F_{1,10}=0,327$, $p=0,581$); de igual manera, en el análisis de los grupos de dosis altas G50, tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones medial, lateral, posterior medial y posterior lateral ($F_{1,10}=2,305$, $p=0,163$; $F_{1,10}=0,134$, $p=0,723$; $F_{1,10}=0,218$, $p=0,652$; $F_{1,10}=0,327$, $p=0,581$).

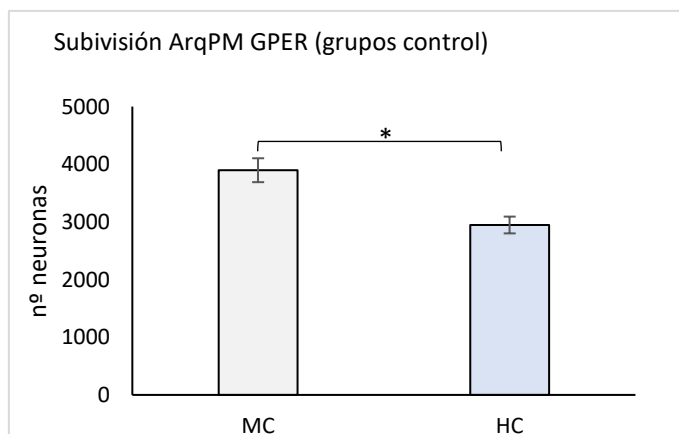


Figura 40. Número de neuronas GPER-ir en la subdivisión ArqPM del ARQ en los grupos control. MC, macho control; HC, hembra control. $*=p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En el análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado efecto del tratamiento en las hembras en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{2,15}=2,171$, $p=0,149$; $F_{2,15}=1,578$, $p=0,239$; $F_{2,15}=0,361$, $p=0,703$; $F_{2,15}=0,397$, $p=0,679$). En cambio, en los machos, se han encontrado un efecto del tratamiento en las subdivisiones ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{2,15}=4,830$, $p=0,025$; $F_{2,15}=5,319$, $p=0,019$; $F_{2,15}=9,692$, $p=0,002$) pero no en la subdivisión ArqM ($F_{2,15}=0,55$, $p=0,947$).

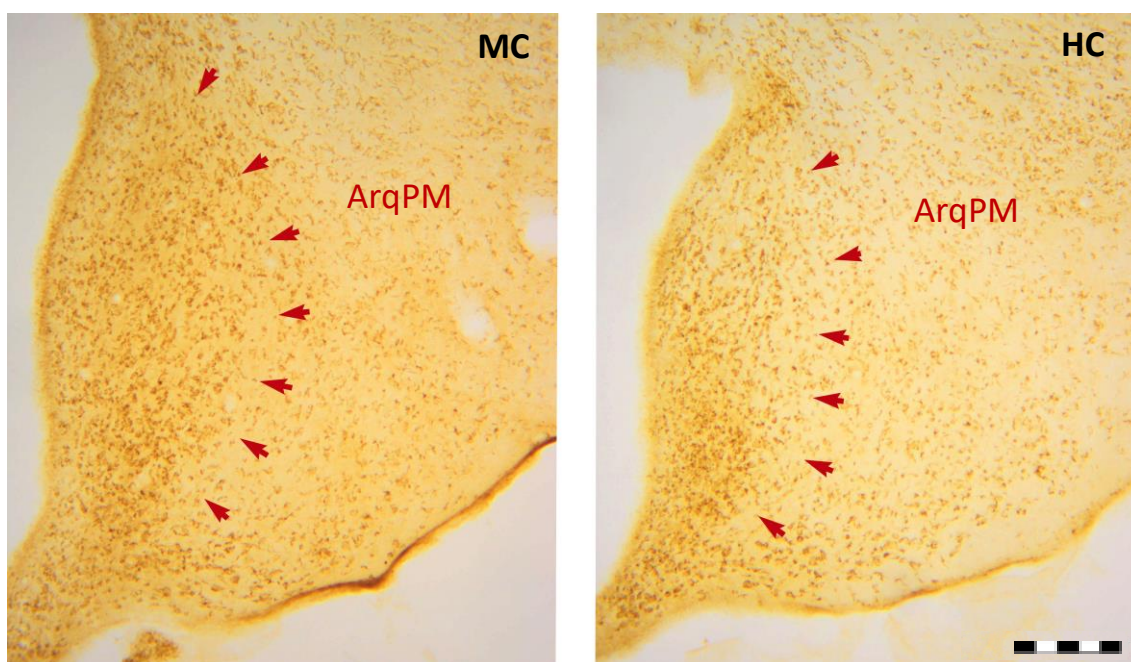


Figura 41. Micrografías de dos secciones coronales del ARQ. Se muestra el dimorfismo sexual con un patrón macho mayor que hembra en la subdivisión arqueado posterior medial (ArqPM) en los grupos control. Barra: 150 μ m.

Una vez detectado el efecto del tratamiento en las subdivisiones ArqL, ArqPM y ArqPL en los machos, se ha procedido a realizar el análisis *post hoc* por grupos. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas en los machos en la subdivisión ArqL entre el grupo control y el grupo G10 y el grupo G50, con una mayor expresión en los grupos tratados con genisteína; en la subdivisión ArqPM entre el grupo control y el grupo G50, con una menor expresión en el grupo de dosis alta de genisteína; en la subdivisión ArqPL entre todos los grupos, con una menor expresión en el grupo G50 respecto al grupo G10 y respecto al grupo control. A su vez el grupo G10 presenta diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control y el grupo G50 con una mayor expresión del receptor (figuras 42, 43 y 44).

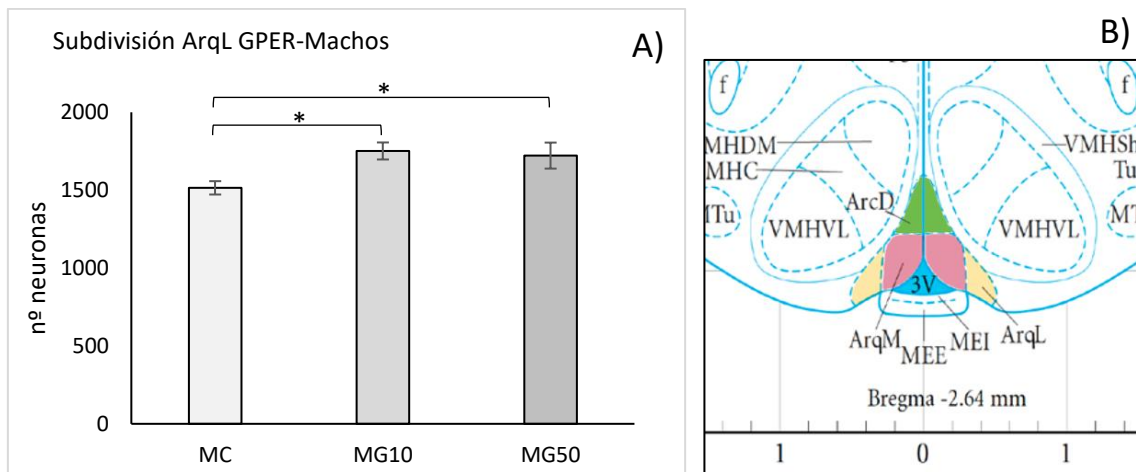


Figura 42. A) Número de neuronas GPER-ir en la subdivisión arqueado lateral (ArqL) en machos y B) localización en el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015). MC, macho control; MG10, macho G10; MG50, macho G50. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

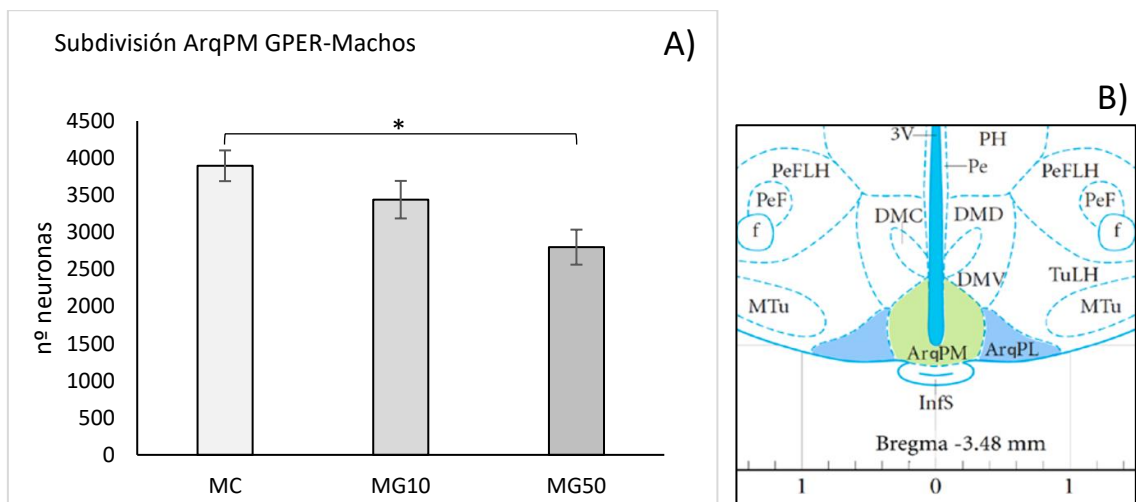


Figura 43. A) Número de neuronas GPER-ir en la subdivisión arqueado posterior medial (ArqPM) en machos y B) localización en el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015). MC, macho control; MG10, macho G10; MG50, macho G50. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

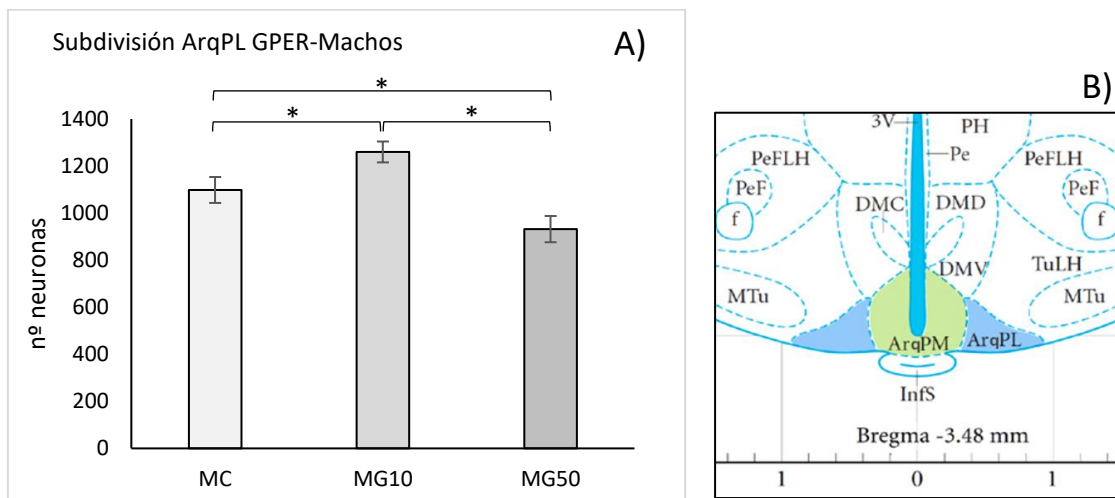


Figura 44. A) Número de neuronas GPER-ir en la subdivisión arqueado posterior lateral (ArqPL) en machos y B) localización en el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015). MC, macho control; MG10, macho G10; MG50, macho G50. *= p<0,05. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

4. Discusión

Se ha demostrado que los DEC's ejercen acciones estrogénicas a través de la unión a los receptores nucleares de estrógenos y la subsiguiente transcripción de genes sensibles a estas hormonas. Además, varios de estos compuestos también tienen la capacidad de unirse al GPER y activar de este modo vías alternativas de señalización (Périan y Vanacker, 2020). Este receptor de membrana se localiza ampliamente en el hipotálamo (Canonaco et al., 2008), y podría ser una de las vías a través de las cuales la genisteína ejerce sus efectos en este núcleo. En el análisis realizado en este trabajo de las poblaciones de neuronas que expresan GPER en el ARQ se ha encontrado que, en el ArqPM, los machos tienen un mayor número de neuronas GPER-ir positivas que las hembras. El tratamiento con genisteína solamente ha tenido efecto en los machos, y este efecto ha sido específico de cada subdivisión y de la dosis. Dada la heterogeneidad de las neuronas que componen el ARQ y la diversidad de funciones en las que participan (Sohn et al., 2011; Campbell et al., 2017; van den Pol et al., 2019), el estudio de las subdivisiones del ARQ aportan un valor añadido y podría explicar las diferencias en la fisiología de los comportamientos que regula este núcleo, como la alimentación y los comportamientos reproductivos (Asarian y Geary, 2013; Schafer et al., 2018; Wang y Moenter, 2020).

El dimorfismo en la expresión de GPER en el hipotálamo ya se ha demostrado anteriormente en dos trabajos realizados en el hámster y en la rata (Canonaco et al., 2008; Marraudino, Carrillo et al., 2021). Respecto a la distribución del GPER en el ARQ, el trabajo de Canonaco con hámsteres en 2008, utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción (RT-PCR), demostró una expresión del GPER mayor en áreas rostrales del ARQ en las hembras. En el trabajo de Marraudino, Carrillo et al. (2021) realizado con ratas, se estimó la población neural GPER-ir reactiva considerando toda la población neural, incluyendo las células gliales. En este estudio se encontró una expresión dimorfa tanto en áreas rostrales como caudales del núcleo (anterior, medial y posterior) con un mayor número de células GPER-ir en las hembras que en los machos, dependiente del ciclo estral en las hembras en todas las áreas y con una mayor expresión en la fase de estro.

En los últimos años se está profundizando en el estudio de las funciones del GPER en la regulación de la conducta de ingesta (Mårtersson et al., 2009; Davis et al., 2014;

Prossnitz y Hathaway, 2015; Sharma y Prossnitz, 2017). Los trabajos con animales, tanto *in vitro* como *in vivo*, han puesto de manifiesto que el GPER está involucrado en la regulación del peso corporal, el comportamiento alimentario, la inflamación y la homeostasis de los niveles de glucosa y de los lípidos (Sharma y Prossnitz, 2017). Debido a la alta expresión del GPER en el organismo, la acción a través de este receptor de membrana se puede realizar tanto desde el SNC (hipotálamo) como desde los órganos periféricos (páncreas, tejido adiposo, músculo e hígado). La comprensión de los efectos del GPER en todas estas estructuras resulta compleja, mostrando una alta variabilidad en los resultados de los trabajos realizados hasta este momento. Por ejemplo, en el trabajo de Mårtersson et al. (2009), el aumento de peso producido por la hiperglucemia y la alteración de la tolerancia a la glucosa producida por la delección de GPER en ratones hembra (pero no en machos), se relaciona con una disminución de la expresión y liberación de insulina en el páncreas. Por otra parte, en el trabajo de Sharma et al. (2013), la inactivación del GPER genéticamente (GPER-KO) en ratones produce un aumento de peso debido a la resistencia a la insulina y a la dislipidemia en los machos, pero no en hembras. En el trabajo de Wang et al. (2016), los ratones hembra GPER-KO estaban protegidos de la obesidad inducida por la dieta alta en grasas, la intolerancia a la glucosa en sangre y la resistencia a la insulina, sin que se encontrara ningún efecto en ratones macho. Sin embargo, en el trabajo de Davis et al. (2014), muestra como los ratones macho GPER-KO aumentaron el peso corporal y la adiposidad y disminuyeron el gasto de energía, mientras que los pesos corporales de las hembras no divergían hasta una edad más avanzada. Así mismo, en este mismo estudio, los ratones hembra GPER-KO tenían una menor sensibilidad a la leptina, a la CCK, y a los efectos de los estrógenos sobre el peso corporal y la homeostasis de los niveles de glucosa en sangre, mientras que los ratones macho GPER-KO eran indistinguibles de sus compañeros de camada WT (ratones silvestres). Para averiguar si estas discrepancias, tanto en la expresión como en la función del GPER, son resultado de factores genéticos, ambientales o de muestreo sería necesario profundizar en el estudio de los mecanismos a través de los cuales ejercen sus efectos en la regulación de la homeostasis energética y las diferencias en estos procesos entre machos y hembras.

Hasta la inclusión del GPER en los mecanismos de acción de los DEC's, se consideraba que el ER β debía ser la vía principal por la cual la genisteína mediaba sus efectos en el organismo. En el trabajo de Shughrue y Merchenthaler (2001), se encontró

que, en el ARQ de la rata hembra, el número de células ER β -ir era bajo, con una marcación más débil en las áreas rostrales en comparación con las áreas caudales. Respecto a los análisis de las divisiones del ARQ, las subdivisiones ArqM, ArqL y ArqPM parecen contener núcleos de células ER β -ir dispersos, mostrando la subdivisión ArqM el menor número de células inmunorreactivas. En el estudio de Pérez et al. (2003) en ratas de ambos sexos utilizando técnicas inmunohistoquímicas, los resultados no muestran expresión del ER β en el ARQ en absoluto, pero sí una alta expresión del ER α . Así mismo no se encontraron diferencias entre sexos en la expresión del ER α ni efecto de la edad en P3, P7 y P14 (Pérez et al., 2003). La baja expresión del ER β en el ARQ, receptor a través del cual se pensaba que la genisteína ejercía principalmente sus efectos, sugiere mecanismos de acción alternativos de este fitoestrógeno. El descubrimiento de los receptores estrogénicos de membrana y la capacidad de unión de los disruptores endocrinos a estos receptores amplía el campo de acción de los compuestos con propiedades estrogénicas, al no poderse descartar efectos independientes de su afinidad por los receptores estrogénicos clásicos. Como ya se ha apuntado, dentro de los fitoestrógenos, la genisteína es la que ha demostrado tener una mayor afinidad por el GPER (13,421% respecto de la afinidad del estradiol) (Thomas y Dong, 2006). Por lo tanto, y dada la alta expresión del GPER en el ARQ, este receptor podría ser el candidato ideal para mediar las acciones de la genisteína en el núcleo ARQ e incluso para mediar la interacción con los efectos ya conocidos del ER α en la regulación de la ingesta (Roepke, 2009; Meyer et al., 2011; Mauvais-Jarvis et al., 2013; Frank et al., 2014; Santollo y Daniels, 2015). En nuestro estudio, un aspecto a destacar es como el efecto de la genisteína en los machos en la expresión de GPER en el ARQ se produce principalmente en las áreas más caudales, coincidiendo con la mayor expresión del ER β en estas áreas. En un trabajo anterior realizado por otros autores, se ha encontrado una presencia de neuronas excitatorias de glutamato más alta en las áreas caudales del ARQ respecto a las áreas más rostrales (van den Pol et al., 2019). La activación de la neurotransmisión glutamatérgica en el ARQ produce un efecto anorexígeno regulado en parte a través de la vía de transducción de señal STAT3, vía en la que ya se han descrito anteriormente efectos del estradiol y la leptina (Toda et al., 2017). Tomados en conjunto, estos datos, sugieren un papel importante de las áreas posteriores del ARQ en la regulación de la homeostasis energética, áreas a la que tradicionalmente no se le ha prestado tanta atención en comparación con las áreas más rostrales.

Los resultados del presente trabajo sobre el efecto del tratamiento con genisteína en el ARQ muestran una alteración de las células GPER-ir en los machos diferente dependiendo de la subdivisión del núcleo analizada. Tanto el ER α como el ER β pueden estimular la transcripción del gen de una manera dependiente de la dosis (Merchenthaler et al., 2004), interacción cuyos mecanismos se desconocen y que podría implicar una relación diferencial de los subtipos ER α y ER β con ciertos tipos de proteínas coactivadoras transcripcionales específicas (Kuiper et al., 1998). Esto sugiere que la expresión de ambos receptores en la misma célula podría llevar a distintos procesos de transcripción o a diferentes efectos. Por lo tanto, dada la alta expresión del ER α en el ARQ y aunque la expresión del ER β en este mismo núcleo es mucho menor, no se puede descartar un efecto de la interacción de ambos receptores y un papel de la genisteína en esta interacción, pese a la mayor afinidad de la genisteína por el ER β . Por lo tanto, una mejor caracterización de la interacción entre los receptores clásicos y los receptores de membrana podría clarificar los mecanismos a través de los cuales se regulan estos procesos.

En los últimos años, diversos trabajos han puesto el foco de atención en el papel del estradiol en la programación hipotalámica, como demuestran los estudios en los que se ha encontrado un papel modulador de esta hormona sobre los efectos de la dieta alta en grasas y la desnutrición en épocas tempranas del desarrollo en ratas hembra (Carrillo et al., 2016; Pinos et al., 2018). Aunque inicialmente se pensaba que estos efectos se producían a través del ER α , Roepke et al. (2017) demostraron que la pérdida de ER α revierte parcialmente los efectos de la dieta materna alta en grasas sobre la homeostasis energética en ratones hembra, sugiriendo que la interrupción causada por la pérdida de ER α produce un efecto "techo" y reduce la influencia de la dieta alta en grasas materna. Dicho efecto también podría estar relacionado con los resultados dosis dependiente de diversos disruptores endocrinos y ser un punto importante dentro de la interacción de los receptores estrogénicos, tanto nucleares como de membrana.

Los datos de todos los trabajos expuestos hasta este momento, incluidos los de la presente tesis, sugieren un efecto del estradiol y los compuestos con propiedades estrogénicas a través de múltiples mecanismos, muchos de los cuales siguen siendo desconocidos. Los resultados de nuestro segundo experimento indican que, además de las acciones del estradiol sobre ER α , ER β , la actividad del GPER durante una ventana de

tiempo específica durante el desarrollo, de P6 a P13, puede ser relevante para el control metabólico a largo plazo y enfatizan la importancia de estudiar ambos sexos. Es fundamental desentrañar los mecanismos que subyacen las acciones del estradiol y de los compuestos estrogénicos sobre la ingesta de alimentos, tanto durante el desarrollo como en la edad adulta, y como estos mecanismos tienen lugar diferencialmente en machos y hembras. Tal conocimiento ayudaría a producir herramientas que pudieran facilitar la prevención, así como el tratamiento, de trastornos metabólicos en un sexo de manera específica.

Experimento 3_____

Efectos del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la morfología del núcleo arqueado del hipotálamo

1. Introducción

El volumen, la densidad y el número de neuronas son parámetros morfológicos utilizados habitualmente en la caracterización de las distintas estructuras del sistema nervioso. Dichos parámetros varían durante el desarrollo y a lo largo de la vida, variación que también se produce en las poblaciones homólogas de neuronas en diferentes especies, debido probablemente a que el organismo y el comportamiento de cada especie está preparado para adaptarse de diferentes maneras al entorno (Williams y Herrup, 1988). Además, se ha comprobado que estos parámetros morfológicos son diferentes entre los sexos en algunas estructuras cerebrales (Gorski et al., 1978; Diamond et al., 1979; Diamond et al., 1981; Guillamón y Segovia, 1997; Pinos et al., 2001; Carrillo et al., 2007) y son susceptibles de ser modificados por enfermedades, tratamientos farmacológicos y alteraciones hormonales y genéticas (Mauvais-Jarvis et al., 2020).

En el ARQ se ha encontrado dimorfismo sexual en el número de neuronas, el volumen, la organización sináptica, las conexiones y la expresión de neuropéptidos (Matsumoto y Arai, 1980; Garcia-Segura et al., 1985; Leal et al., 1998; Lenz y McCarthy, 2010; Asarian y Geary, 2013). En el presente trabajo, los resultados muestran también un patrón sexodimorfo, ya que se ha demostrado que la administración de genisteína en épocas tempranas del desarrollo puede alterar la expresión de las neuronas que expresan POMC y GPER en el ARQ de manera diferente en machos y hembras (Fernandez-Garcia et al., 2021). En la revisión de la literatura realizada para la elaboración de la presente tesis, se ha comprobado que, en los estudios realizados hasta este momento, el núcleo ARQ se ha estudiado mayoritariamente de manera global o subdividido entre las divisiones anterior y posterior del núcleo. Sin embargo, algunos trabajos (Chowen et al., 1993; Chowen et al., 2019) ya han demostrado que no todas las poblaciones neuronales del ARQ responde de igual manera a las alteraciones producidas en el entorno hormonal y que estas respuestas son diferentes en machos y hembras. Por ejemplo, la regulación del metabolismo energético a través de los receptores LepR, 5HTC_{2c}R, vGluT2 y GABAB en las neuronas que expresan POMC parece ser sexualmente dimorfa (Chowen et al., 2019) y se han descrito diferencias sexuales en la neurotransmisión de la dopamina, la serotonina y la kisspeptina en el ARQ (Kauffman et al., 2007; Sawai et al., 2012; Marraudino et al., 2017). La variedad en la expresión de neuropéptidos y receptores en el ARQ parece estar en consonancia con las distintas conductas en las que está implicado, como la ingesta de alimentos y el metabolismo, la reproducción y el inicio de la pubertad

(Korf y Møller, 2021). Un punto importante a tener en cuenta es que los distintos neuropéptidos y receptores que se expresan en las neuronas del ARQ se localizan en áreas neuroanatómicas diferentes del núcleo, como por ejemplo sucede en las poblaciones de neuronas que expresan POMC, donde la distribución de los receptores de insulina, serotonina y leptina en estas neuronas es específica de cada receptor a lo largo del eje rostro-caudal y medial-lateral del núcleo (Chronwall, 1985; Sohn et al., 2011; Toda et al., 2017).

Pocos estudios se han centrado en el efecto diferencial de la genisteína en machos y hembras y menos aún en su influencia durante el desarrollo. Trabajos anteriores han mostrado que en épocas perinatales la genisteína produce una disminución del tamaño de las neuronas de oxitocina en el SON en los machos, pero no en las hembras (Yoshimura et al., 2011). Cuando se analizaron los efectos de la exposición a la genisteína durante el desarrollo en la edad adulta, los resultados mostraron que la genisteína abolió el dimorfismo sexual en la transmisión dopaminérgica en el hipotálamo y que la cantidad de células que producen NOS disminuyó en la amígdala en los machos, pero no en las hembras (Ponti et al., 2017; 2019). Específicamente en el ARQ, se ha encontrado que la exposición a la genisteína en los primeros tres días de vida disminuyó la densidad de las fibras de kisspeptina en el día 21 posnatal (Losa et al., 2011).

En el presente trabajo se han estudiado las diferencias entre sexos y los efectos del tratamiento con distintas dosis de genisteína durante la segunda semana de vida en el volumen, la densidad y en el número de neuronas en cada una de las divisiones y subdivisiones del ARQ. De esta manera, se consigue caracterizar de forma más específica las áreas que componen este núcleo, lo que proporciona una información muy valiosa en la investigación sobre los procesos fisiológicos en los que participa y las funciones en las que están implicadas, así como las posibles interrelaciones entre los diferentes sistemas de neurotransmisión que se localizan en este núcleo y las señales hormonales que le llegan desde el sistema gastrointestinal.

2. Materiales y método

2.1. Animales

Para la realización del experimento 3 se han utilizado los mismos animales que en el experimento 1.

2.2. Tratamiento

En el experimento 3 se ha llevado a cabo el mismo tratamiento ya explicado en el experimento 1.

2.3. Preparación del tejido

Para la realización del experimento 3 se ha seguido el mismo procedimiento que en el experimento 1 con la diferencia de que se ha utilizado la serie 4.

2.4. Tinción de Nissl

En la presente tesis se han analizado los patrones morfológicos del ARQ utilizando la técnica de tinción de Nissl, que permite un etiquetado y una estimación del volumen y la población neuronal. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2, en los que los datos muestran como la distribución y el número de neuronas que expresan POMC y GPER difieren entre los sexos en las subdivisiones del ARQ en la rata, el análisis detallado de la morfología de este núcleo a lo largo de sus subdivisiones podría clarificar los mecanismos y funcionalidades de estas poblaciones neuronales y sus circuitos.

La solución de violeta de cresilo se utiliza para teñir la sustancia de Nissl de las neuronas en las secciones encefálicas fijadas con paraformaldehído. Esta tinción utiliza un colorante de anilina básico para teñir el ARN y de este modo resalta las características estructurales de las neuronas. Los cuerpos de Nissl, que son conglomerados del retículo endoplásmico rugoso, aparecen de color azul oscuro debido a la tinción del ARN ribosómico, lo que le da al citoplasma una apariencia moteada. Los gránulos individuales de ARN extranuclear se denominan gránulos de Nissl y el ADN presente en el núcleo se

tiñe de un color similar, produciendo de esta manera una tinción muy clara del núcleo neuronal (Kádár et al., 2009). La cuarta serie de secciones cerebrales fue teñida con violeta de cresilo al 1% (FLUKA Rf^a 61123) según el protocolo que se muestra a continuación por pasos:

1. Agua destilada acondicionada con ácido acético: 90 minutos.
2. Violeta de cresilo al 0,1 %: 6 minutos.
3. Lavado con agua destilada con ácido acético: 7 segundos.
4. Deshidratación en alcohol al 70%: 30 segundos.
5. Deshidratación en alcohol al 80%: 30 segundos.
6. Alcohol de 96% + ácido acético: 10 segundos.
7. Dos inmersiones rápidas por alcohol absoluto al 100%.
8. Hidratación con xilol. Las preparaciones se protegieron con cubreobjetos de cristal adheridos con DPX (Surgipath Europe Ltd., Peterborough, PE3 8YD, United Kingdom).

2.5. Estimación del volumen

Una vez realizada la tinción de Nissl, se fotografiaron todas las secciones de la serie 4 con una magnificación 10X utilizando una cámara NIKON Digital Sight DS-Fi1 conectada a un microscopio NIKON Eclipse 80i con el programa Olympus Cella v1.1.6. y se procedió a realizar la diferenciación de las subdivisiones del ARQ siguiendo el atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (2015), como puede observarse en las figuras 45a y 45b.

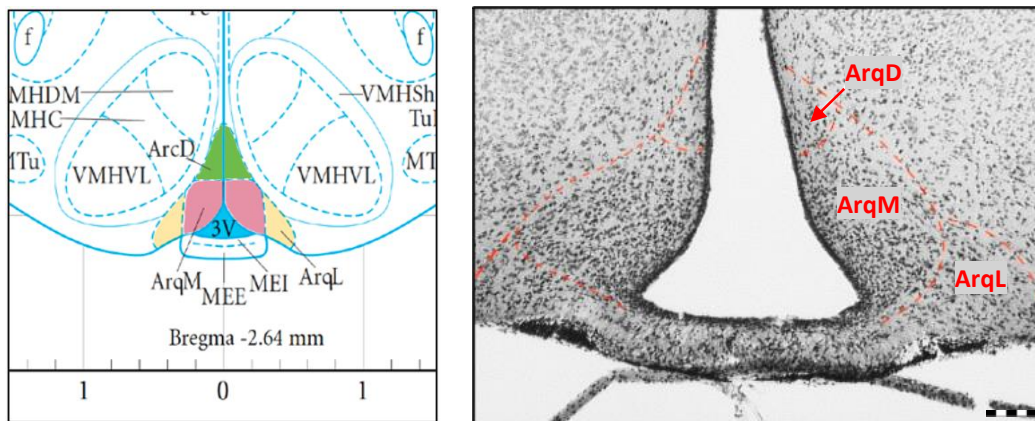


Figura 45a. Correspondencia de las subdivisiones anteriores del ARQ en una micrografía de una sección coronal con el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015). Barra: 100 μ m.

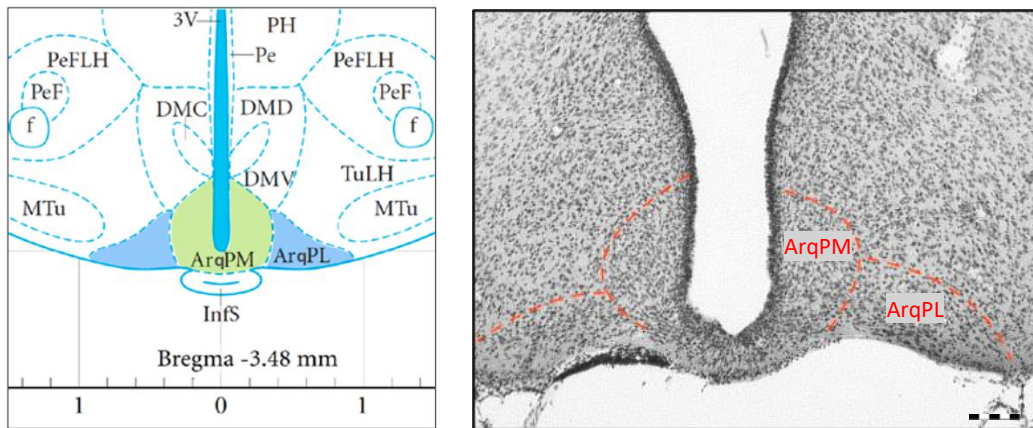


Figura 45b. Correspondencia de las subdivisiones posteriores del ARQ en una micrografía de una sección coronal con el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015). Barra: 100 μm.

Se ha estimado el volumen de la ARQ aplicando el principio de Cavalieri (1966). El principio de Cavalieri es una técnica estereológica bien establecida que utiliza la interpolación entre muestras para estimar el volumen de objetos tridimensionales. Cavalieri teorizó que dos sólidos tendrán el mismo volumen cuando tengan la misma altura y cuando sus secciones transversales se tomen de manera paralela respecto a sus bases a la misma distancia respectiva (West, 2012). Por lo tanto, es posible calcular el volumen total de una sección delineada observando una fracción de sus cortes que se encuentran en el mismo intervalo siguiendo la siguiente fórmula:

$$V (\text{mm}^3) = f \cdot (\Sigma P \cdot a(p) \cdot t)$$

Donde f es la fracción utilizada, P es el número de puntos contados en cada una de las secciones, $a(p)$ es el área asociada a cada punto y t es el espesor de las secciones utilizadas.

En este trabajo, los hemisferios derecho e izquierdo fueron contados independientemente. Se estimó el área de cada sección coronal del ARQ de la serie teñida con violeta de cresilo, superponiendo aleatoriamente una rejilla de cruces con un área por punto de $3300 \mu\text{m}^2$ (figura 46), utilizando para ello el programa ImageJ versión 2.0.0.0-rc-69/1,52n. Se incluyeron en el recuento todas las cruces de la rejilla situadas en su totalidad dentro de las delimitaciones del ARQ realizadas anteriormente.

Para el cálculo del volumen de la división anterior, posterior y el volumen total del ARQ se ha seguido el siguiente procedimiento: para el cálculo de la división anterior

se han sumado las subdivisiones ArqM, ArqL y ArqD y para la división posterior se han sumado las subdivisiones ArqPM y ArqPL. Para el cálculo del volumen total del ARQ se han sumado la división anterior y la división posterior. En todos los casos se han sumado las medias de ambos hemisferios correspondientes a la subdivisión/división estudiada.

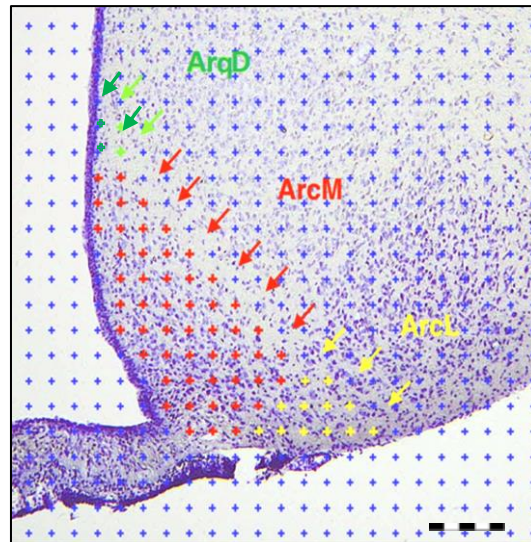


Figura 46. Sección coronal del ARQ con tinción de Nissl con una cuadrícula de puntos con un área de $3300 \mu\text{m}^2$. Se contabilizan los puntos que están dentro de las subdivisiones arqueado dorsal (ArqD) en verde, arqueado medial (ArqM) en rojo y arqueado lateral (ArqL) en amarillo. Barra: $150 \mu\text{m}$.

2.6. Estimación número de neuronas

La estimación del número de neuronas en el ARQ se realizó mediante un muestreo aleatorizado sobre fotografías con una magnificación 10X del núcleo realizadas tal y como se indicó en el apartado anterior. Se han considerado neuronas positivas todas aquellas en las que se distinguía el núcleo neuronal marcado por la tinción de Nissl. Unos ejemplos de estas neuronas se pueden observar en la figura 47. Para la estimación del número de neuronas, se superpuso aleatoriamente en la fotografía una rejilla con cuadrantes con un área de $1497,69 \mu\text{m}^2$, en la que quedaba incluido la totalidad del núcleo (figura 48). Para el análisis del número de neuronas se consideraron todos los cuadrantes que se superponían al área de la subdivisión estudiada. De ellos se realizó un recuento sistemático de una selección de cuadrantes en función del tamaño de las subdivisiones. Al igual que en el experimento anterior, en las partes mediales se seleccionó aleatoriamente uno de cada diez cuadrantes y en las partes laterales se seleccionó

aleatoriamente uno de cada cinco cuadrantes cuya área total estaba incluida dentro de los límites de las subdivisiones del núcleo. En ambos casos se comenzó a realizar el recuento aleatorio en el primer cuadrante situado más más próximo al área dorsomedial de la sección cuya superficie estuviera incluida en la delimitación de la subdivisión en su totalidad. Se han incluido en el recuento las neuronas en las que se distinguían los núcleos neuronales dentro del cuadrante, excluyendo aquellas en los que las líneas de la rejilla se superponían con la morfología neuronal. Al igual que en el caso del volumen, se ha realizado una estimación del número de neuronas en cada subdivisión del ARQ y posteriormente se han calculado los totales del área anterior, posterior y la estimación del total del núcleo.

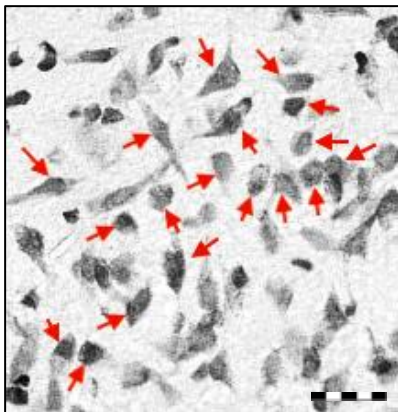


Figura 47. Imagen de una sección histológica con tinción de Nissl en el ARQ. Se muestran ejemplos de las células que se han considerado para el recuento (flechas rojas). Barra: 10 μm .

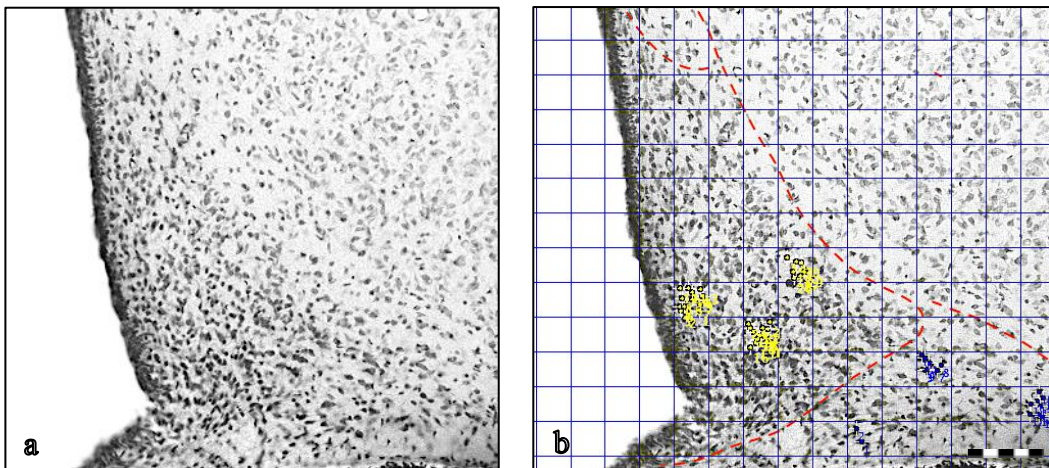


Figura 48. (a) Imagen de una sección histológica con tinción de Nissl en el ARQ, y (b) la misma imagen con una rejilla con cuadrantes con un área de 1497,69 μm^2 . Se puede observar la marcación utilizada para realizar la estimación del número de neuronas en la subdivisión arqueado medial (ArqM) en amarillo y en la subdivisión arqueado lateral (ArqL) en azul. Barra: 100 μm .

2.7. Cálculo de la densidad neuronal

Para el cálculo de la densidad neuronal en el ARQ se ha dividido la estimación del número de neuronas en violeta de cresilo por el volumen obtenido mediante el principio de Cavalieri en cada una de las subdivisiones y divisiones del ARQ, así como en la totalidad del núcleo.

2.8. Cálculo de la proporción POMC/Nissl

Para la estimación de la proporción de neuronas de POMC-ir en el número total de neuronas en el ARQ se ha dividido el número de neuronas POMC-ir por el número de neuronas teñidas con violeta de cresilo en cada una de las subdivisiones y divisiones del ARQ, así como en la totalidad del núcleo.

2.9. Cálculo de la densidad POMC

Para el cálculo de la densidad en el ARQ se ha dividido la estimación del número de neuronas POMC-ir por el volumen obtenido siguiendo el principio de Cavalieri en cada una de las subdivisiones y divisiones del ARQ, así como en la totalidad del núcleo.

2.10. Cálculo de la proporción GPER/Nissl

Para el cálculo de la proporción de neuronas de GPER-ir en el número total de neuronas en el ARQ se ha dividido la estimación del número de neuronas GPER-ir por la estimación del número de neuronas realizada con la tinción de Nissl en cada una de las subdivisiones y divisiones del ARQ, así como en la totalidad del núcleo.

2.11. Cálculo de la densidad GPER

Para la estimación de la densidad en el ARQ se ha dividido la estimación del número de neuronas GPER-ir por el volumen obtenido siguiendo el principio de Cavalieri en cada una de las subdivisiones y divisiones del ARQ, así como en la totalidad del núcleo.

2.12. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se ha utilizado el Software IBM SPSS Statistics versión 27, asumiendo como estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

En el análisis del volumen, número de neuronas y densidad del ARQ, se ha realizado un ANOVA unifactorial para comprobar la lateralidad sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los hemisferios derecho e izquierdo. Descartada la lateralidad, se ha procedido a analizar el volumen, el número de neuronas y la densidad de neuronas en cada división y subdivisión utilizando para ello un ANOVA unifactorial comparando los grupos de cada sexo con el mismo tratamiento. Seguidamente, se realizó un ANOVA unifactorial (factor tratamiento) de manera independiente para cada uno de los sexos. Los análisis *post hoc* para conocer las diferencias entre los grupos se realizaron mediante la prueba S-N-K, y se estableció $p < 0,05$ como el nivel de significación.

3. Resultados

3.1. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el volumen del ARQ

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 6. Primeramente, se muestra el volumen de cada una de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqD, ArqPM y ArqPL, seguidamente el volumen de las divisiones anterior y posterior y por último el volumen total del ARQ.

VOLUMEN (mm ³)	MC	HC	MG10	HG10	MG50	HG50
ArqM	0,132 ± 0,016	0,131 ± 0,024	0,136 ± 0,022	0,132 ± 0,020	0,129 ± 0,027	0,136 ± 0,026
ArqL	0,045 ± 0,006	0,049 ± 0,003	0,046 ± 0,006	0,045 ± 0,007	0,044 ± 0,008	0,044 ± 0,009
ArqD	0,012 ± 0,001	0,013 ± 0,002	0,013 ± 0,002	0,012 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,012 ± 0,002
ArqPM	0,040 ± 0,006	0,030 ± 0,004	0,034 ± 0,008	0,030 ± 0,005	0,034 ± 0,008	0,035 ± 0,007
ArqPL	0,020 ± 0,004	0,018 ± 0,003	0,020 ± 0,003	0,019 ± 0,002	0,020 ± 0,003	0,020 ± 0,003
ARQ Anterior	0,189 ± 0,018	0,192 ± 0,025	0,195 ± 0,025	0,189 ± 0,026	0,185 ± 0,025	0,192 ± 0,036
ARQ Posterior	0,060 ± 0,009	0,048 ± 0,006	0,054 ± 0,010	0,049 ± 0,006	0,054 ± 0,011	0,055 ± 0,009
ARQ	0,250 ± 0,026	0,240 ± 0,029	0,249 ± 0,022	0,237 ± 0,031	0,238 ± 0,034	0,247 ± 0,042

Tabla 6. Volumen en mm³ en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ. Todos los valores se expresan como medias ±SEM.

El análisis de los grupos control muestra diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras en la división posterior ($F_{1,10}=7,864$, $p=0,019$) (figura 49) mostrando un mayor volumen los machos que las hembras. En la división anterior y en el total del ARQ no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($F_{1,10}=0,050$, $p=0,827$; $F_{1,10}=0,408$, $p=0,537$). Este dimorfismo no está presente en los grupos de genisteína, ya que el análisis de los grupos de dosis baja G10 no muestra diferencias estadísticamente significativas en las divisiones anterior, posterior y total del ARQ ($F_{1,10}=0,162$, $p=0,697$; $F_{1,10}=1,472$, $p=0,256$; $F_{1,10}=0,540$, $p=0,481$). De igual manera, en el análisis de los grupos de dosis alta G50, tampoco se han encontrado diferencias en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ ($F_{1,10}=0,149$, $p=0,709$; $F_{1,10}=0,057$, $p=0,817$; $F_{1,10}=0,141$, $p=0,716$).

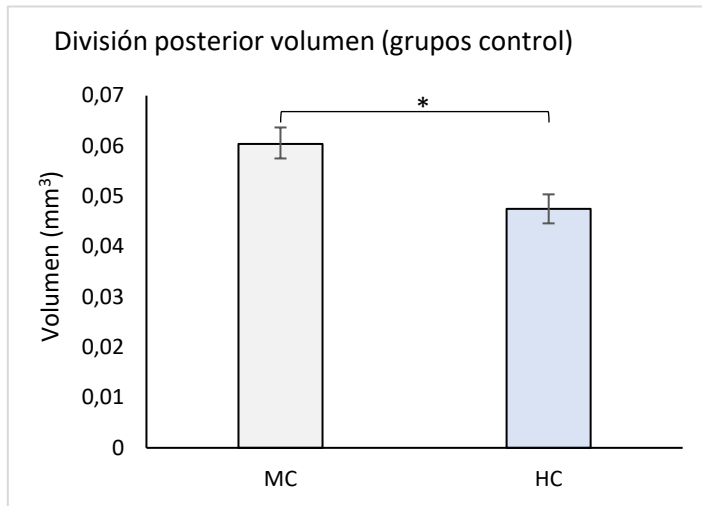


Figura 49. Volumen de la división posterior del ARQ en los grupos control. MC, macho control; HC, hembra control. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En cuanto al análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto del tratamiento en ninguna de las divisiones total, anterior y posterior tanto en machos ($F_{2,15}=0,283$, $p=0,757$; $F_{2,15}=0,891$, $p=0,431$; $F_{2,15}=0,314$, $p=0,735$) como en hembras ($F_{2,13}=0,23$, $p=0,977$; $F_{2,13}=1,738$, $p=0,214$; $F_{2,13}=0,121$, $p=0,887$).

3.1.1. Análisis subdivisiones del ARQ

Cuando se analiza cada una de las subdivisiones del ARQ en los grupos control de cada sexo, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la subdivisión ArqPM ($F_{1,10}=12,632$, $p=0,005$) (figura 50), pero no en el resto de las subdivisiones ArqM, ArqD, ArqL y ArqPL ($F_{1,10}=0,009$, $p=0,925$; $F_{1,10}=0,98$, $p=0,760$; $F_{1,10}=1,616$, $p=0,232$; $F_{1,10}=1,230$, $p=0,293$). El patrón encontrado es similar al del análisis anterior, en el que los machos muestran un mayor número de neuronas en la división posterior, delimitando estas diferencias a la subdivisión medial posterior. El análisis de los grupos de dosis baja G10 no muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqD, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,10}=0,167$, $p=0,693$; $F_{1,10}=0,353$, $p=0,567$; $F_{1,10}=0,000$, $p=0,999$; $F_{1,10}=0,66$, $p=0,802$; $F_{1,10}=0,029$, $p=0,869$); de igual manera, en el análisis de los grupos de dosis alta G50, tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqD, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,10}=0,80$, $p=0,784$; $F_{1,10}=1,607$, $p=0,237$; $F_{1,10}=0,105$, $p=0,754$; $F_{1,10}=1,118$, $p=0,318$; $F_{1,10}=0,774$, $p=0,402$).

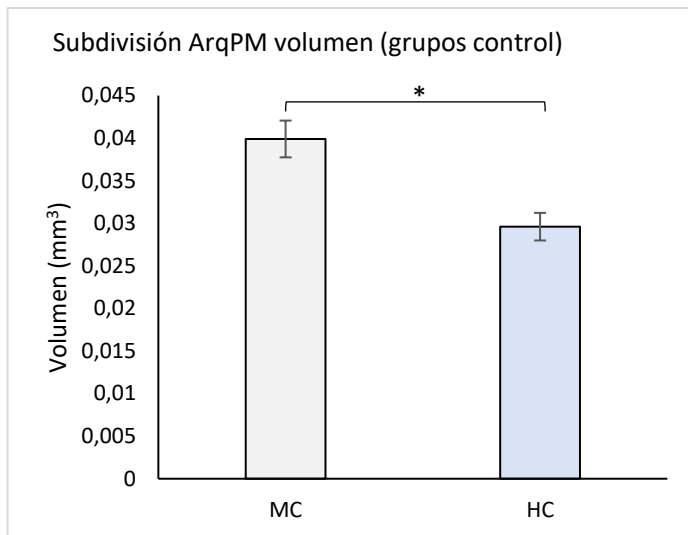


Figura 50. Volumen de la subdivisión arqueado posterior medial (ArqPM) en los grupos control. MC, macho control; HC, hembra control. $*=p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En cuanto al análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto del tratamiento en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqD, ArqL, ArqPM y ArqPL tanto en machos ($F_{2,15}=0,127$, $p=0,881$; $F_{2,15}=0,987$, $p=0,396$; $F_{2,15}=0,181$, $p=0,836$; $F_{2,15}=1,322$, $p=0,296$; $F_{2,15}=0,102$, $p=0,903$) como en hembras ($F_{2,13}=0,054$, $p=0,948$; $F_{2,13}=0,345$, $p=0,714$; $F_{2,13}=0,685$, $p=0,521$; $F_{2,13}=2,058$, $p=0,167$; $F_{2,13}=0,596$; $p=0,565$).

3.2. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en el número de neuronas en el ARQ

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 7. Primeramente, se muestra el número neuronas de cada una de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqD, ArqPM y ArqPL, seguidamente el número neuronas de las divisiones anterior y posterior y por último el número neuronas total del ARQ.

NÚMERO DE NEURONAS	MC	HC	MG10	HG10	MG50	HG50
ArqM	19491 \pm 2707	18032 \pm 1496	21344 \pm 2279	20840 \pm 2170	18853 \pm 1887	18720 \pm 1065
ArqL	4517 \pm 541	5092 \pm 687	4216 \pm 392	5200 \pm 720	4210 \pm 824	5132 \pm 759
ArqD	752 \pm 260	968 \pm 198	936 \pm 101	1072 \pm 231	928 \pm 189	1238 \pm 223
ArqPM	10600 \pm 1348	8528 \pm 853	10784 \pm 1077	8533 \pm 1096	9853 \pm 1275	8744 \pm 765
ArqPL	3886 \pm 536	4060 \pm 498	3632 \pm 545	4033 \pm 344	3650 \pm 604	4144 \pm 283
ARQ Anterior	24761 \pm 3089	24092 \pm 2190	26496 \pm 2337	27112 \pm 2713	23991 \pm 1612	25090 \pm 1569
ARQ Posterior	14486 \pm 1802	12588 \pm 1175	14416 \pm 1379	12567 \pm 1138	13503 \pm 879	12888 \pm 851
ARQ	39246 \pm 3922	36680 \pm 3263	40912 \pm 2392	39679 \pm 2668	37495 \pm 1833	37978 \pm 1592

Tabla 7. Número de neuronas en las subdivisiones, divisiones y total ARQ. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En el estudio sobre el dimorfismo en los grupos control, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ ($F_{1,10}=0,171$, $p=0,688$; $F_{1,10}=4,200$, $p=0,068$; $F_{1,10}=1,424$, $p=0,260$). El análisis de los grupos de dosis baja G10 muestra diferencias estadísticamente significativas en la división posterior ($F_{1,10}=5,962$, $p=0,037$) (figura 51), pero no en la división anterior ni en total del ARQ ($F_{1,10}=0,159$, $p=0,700$; $F_{1,10}=0,638$, $p=0,445$). De igual manera, en el análisis de los grupos de dosis alta G50 no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ ($F_{1,10}=1,299$, $p=0,284$; $F_{1,10}=1,375$, $p=0,271$; $F_{1,10}=0,213$, $p=0,655$).

En cuanto al análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto del tratamiento en ninguna de las divisiones total, anterior y posterior tanto en machos ($F_{2,15}=1,441$, $p=0,268$; $F_{2,15}=0,884$, $p=0,433$; $F_{2,15}=1,820$, $p=0,196$) como en hembras ($F_{2,13}=2,599$, $p=0,112$; $F_{2,13}=0,146$, $p=0,865$; $F_{2,13}=1,833$, $p=0,199$).

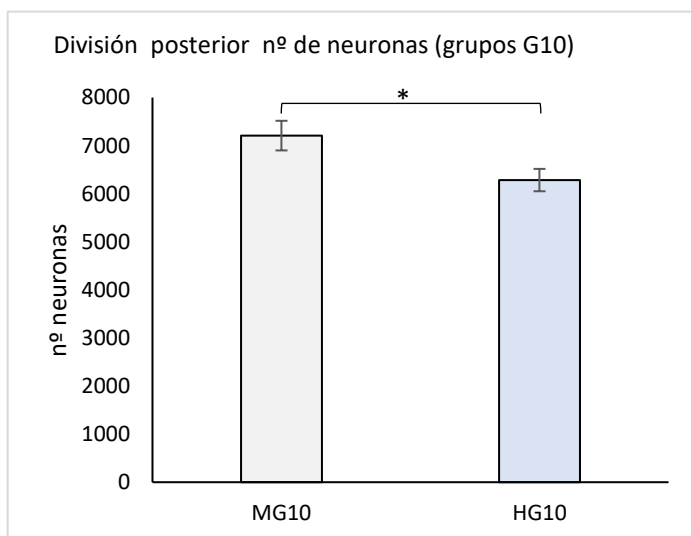


Figura 51. Número de neuronas de la división posterior del ARQ en los grupos de dosis baja G10. MG10, macho G10; HG10, hembra G10. $*=p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

3.2.1. Análisis subdivisiones del ARQ

El análisis por subdivisiones del ARQ del número de neuronas entre cada grupo de tratamiento de machos y hembras, ha mostrado diferencias estadísticamente significativas en la subdivisión ArqPM entre los grupos control ($F_{1,10}=9,061$, $p=0,013$) (figuras 52 y 53), con un mayor número de neuronas en los machos que en las hembras.

En el resto de las subdivisiones ArqM, ArqD, ArqL y ArqPL el análisis no muestra diferencias estadísticamente significativas ($F_{1,10}=1,174$, $p=0,304$; $F_{1,10}=2,416$, $p=0,151$; $F_{1,10}=2,642$, $p=0,135$; $F_{1,10}=0,326$, $p=0,580$). En el análisis de los grupos de dosis baja G10, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqL y ArqPM ($F_{1,10}=7,406$, $p=0,024$; $F_{1,10}=11,678$, $p=0,008$), con un patrón macho < hembra en la subdivisión ArqL (figuras 54 y 55) y un patrón contrario en la subdivisión ArqPM (figuras 56 y 57). En el resto de las subdivisiones ArqM, ArqD y ArqPL no se ha encontrado ningún efecto ($F_{1,10}=0,141$, $p=0,716$; $F_{1,10}=1,475$, $p=0,255$; $F_{1,10}=2,223$, $p=0,170$). En el análisis de los grupos de dosis alta G50, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la subdivisión ArqD ($F_{1,10}=6,260$, $p=0,034$), con un mayor número de neuronas en las hembras (figuras 58 y 59), pero no en las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,10}=0,20$, $p=0,892$; $F_{1,10}=3,659$, $p=0,088$; $F_{1,10}=2,885$, $p=0,124$; $F_{1,10}=2,790$, $p=0,129$).

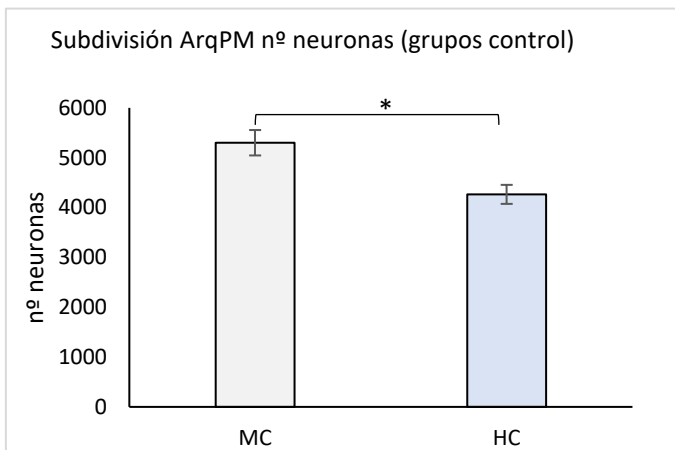


Figura 52. Número de neuronas de la subdivisión arqueado posterior medial (ArqPM) en los grupos control. MC, macho control; HC, hembra control. *= $p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

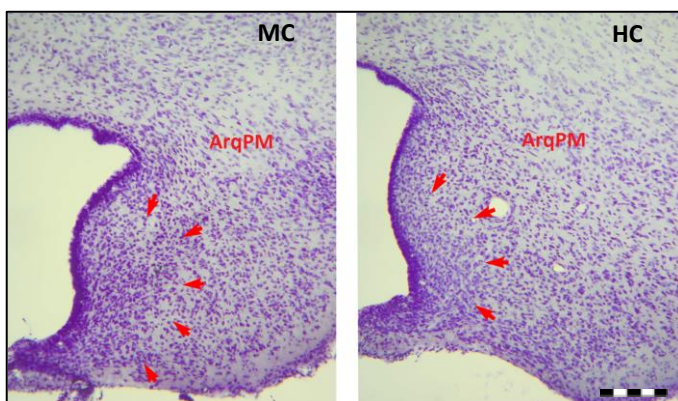


Figura 53. Micrografía donde se muestra el menor número de neuronas en la subdivisión arqueado posterior medial (ArqPM) en las hembras en el grupo control. Barra: 150 μ m.

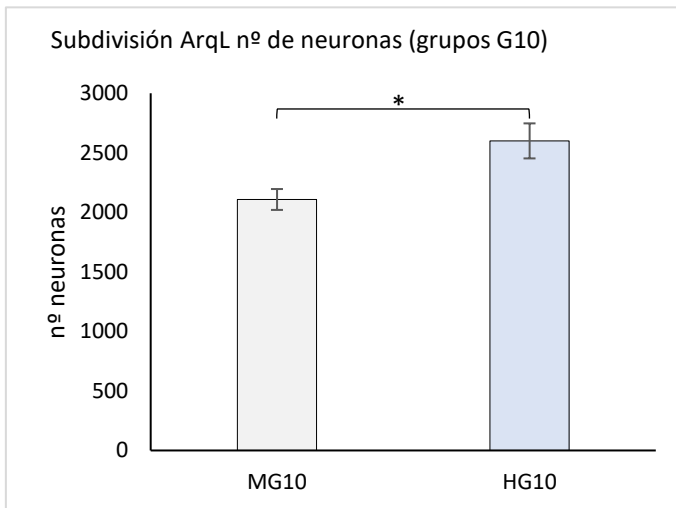


Figura 54. Número de neuronas de la subdivisión arqueado lateral (ArqL) en los grupos de dosis baja G10. MG10, macho G10; HG10, hembra G10. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

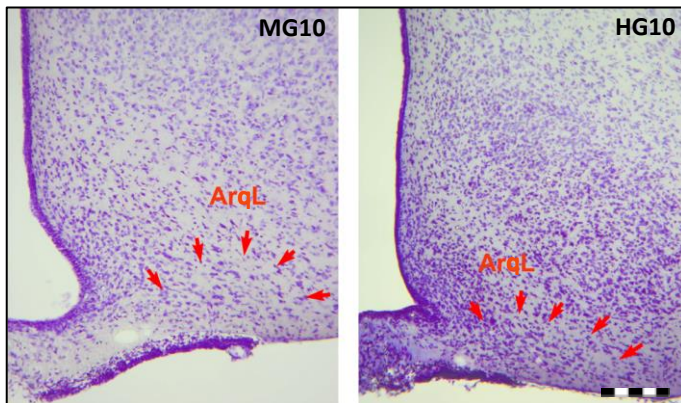


Figura 55. Micrografía donde se muestra el menor número de neuronas en la subdivisión arqueado lateral (ArqL) en los machos en el grupo de dosis baja G10. Barra: 150 μ m.

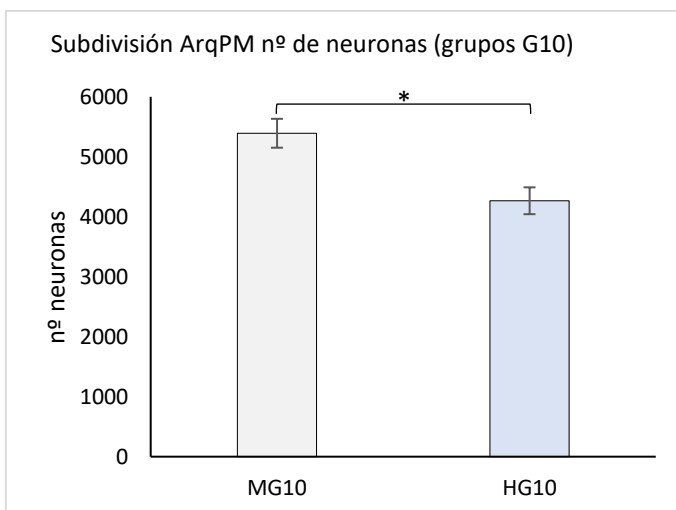


Figura 56. Número de neuronas de la subdivisión arqueado posterior medial (ArqPM) en los grupos de dosis baja G10. MG10, macho G10; HG10, hembra G10. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

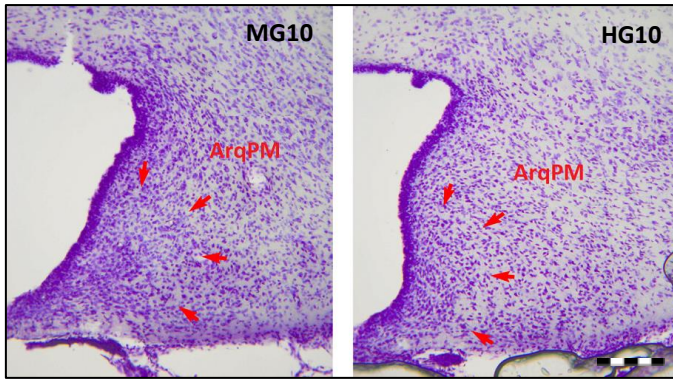


Figura 57. Micrografía donde se muestra el menor número de neuronas en la subdivisión arqueado posterior medial (ArqPM) en las hembras en el grupo de dosis baja G10. Barra: 150 μ m.

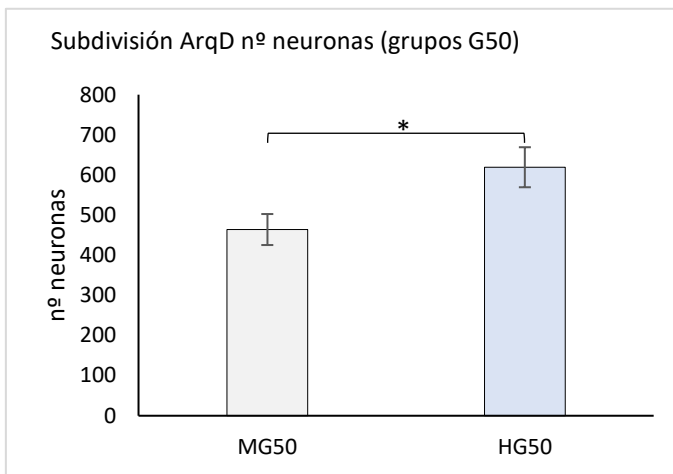


Figura 58. Número de neuronas de la subdivisión arqueado dorsal (ArqD) en los grupos de dosis alta G50. MG50, macho G50; HG50, hembra G50. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

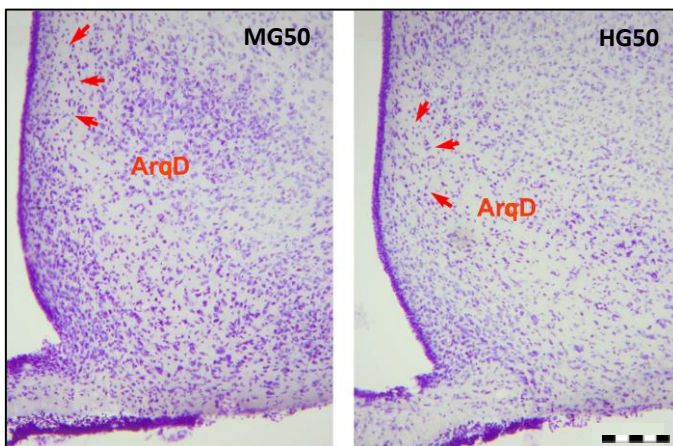


Figura 59. Micrografía donde se muestra el menor número de neuronas en la subdivisión arqueado dorsal (ArqD) en los machos en los grupos de dosis alta G50. Barra: 150 μ m.

En el análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto del tratamiento en los machos en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqD, ArqPM y ArqPL ($F_{2,15}=1,632$, $p=0,228$; $F_{2,15}=0,515$, $p=0,608$; $F_{2,15}=1,654$, $p=0,224$; $F_{2,15}=0,890$, $p=0,431$; $F_{2,15}=0,404$, $p=0,675$). En las hembras, se ha encontrado un

efecto del tratamiento en la subdivisión ArqM ($F_{2,13}=4,203$, $p=0,039$), pero no en el resto de las subdivisiones ArqL, ArqD, ArqPM y ArqPL ($F_{2,13}=0,32$; $p=0,969$; $F_{2,13}=1,948$, $p=0,182$; $F_{3,13}=0,90$, $p=0,914$; $F_{2,13}=0,121$, $p=0,887$).

El análisis *post hoc* muestra un efecto del tratamiento en la subdivisión ArqM entre el grupo HG10 y el grupo HC, con un mayor número de neuronas en el grupo tratado con la dosis baja de genisteína (figura 60).

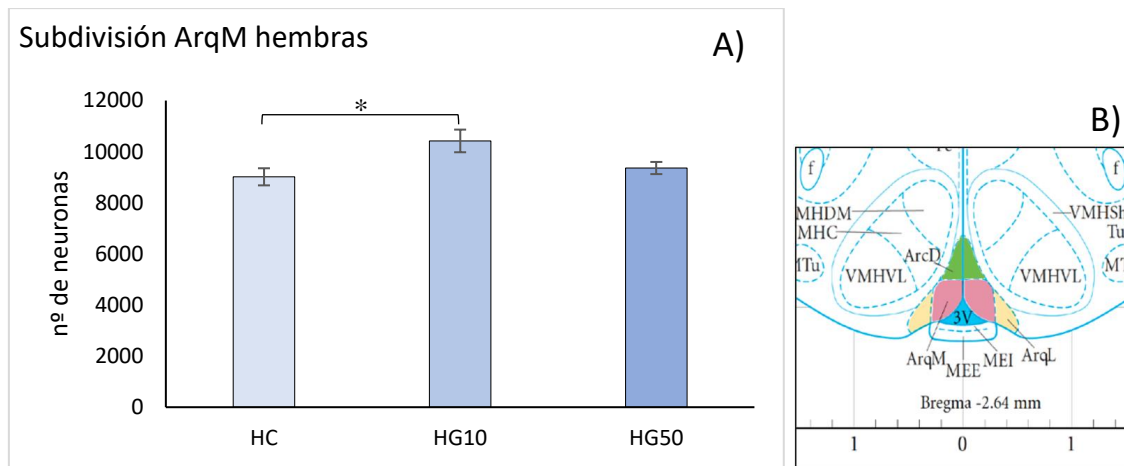


Figura 60. A) Número de neuronas en la subdivisión arqueado medial (ArqM) en hembras y B) localización en el atlas del encéfalo de la rata de Paxinos y Watson (2015). HC, hembra control; HG10, hembra G10; HG50, hembra G50. $*=p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

3.3. Efecto del tratamiento con genisteína en épocas tempranas del desarrollo en la densidad del ARQ

Los valores obtenidos en la estimación de la densidad se muestran en la tabla 8. Primeramente, se muestra la densidad de cada una de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqD, ArqPM y ArqPL, seguidamente la densidad de las divisiones anterior y posterior y por último la densidad total del ARQ.

DENSIDAD ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	MC	HC	MG10	HG10	MG50	HG50
ArqM	149,263 \pm 28,196	140,597 \pm 22,828	158,725 \pm 13,572	159,2405 \pm 15,936	148,9143 \pm 16,899	141,2098 \pm 20,453
ArqL	101,590 \pm 17,055	104,701 \pm 12,414	91,508 \pm 5,682	116,237 \pm 13,471	95,956 \pm 6,933	119,058 \pm 19,346
ArqD	61,491 \pm 19,770	77,761 \pm 9,652	72,764 \pm 12,789	93,540 \pm 17,956	79,712 \pm 18,771	101,322 \pm 17,455
ArqPM	268,192 \pm 36,360	290,216 \pm 29,218	326,199 \pm 51,042	292,608 \pm 53,548	298,517 \pm 58,042	254,884 \pm 58,217
ArqPL	194,600 \pm 32,667	228,057 \pm 20,269	180,190 \pm 21,866	215,401 \pm 15,716	194,850 \pm 67,246	211,705 \pm 31,844
ARQ Anterior	131,676 \pm 20,164	126,578 \pm 15,145	136,672 \pm 9,945	144,734 \pm 12,925	130,979 \pm 10,446	133,447 \pm 17,872
ARQ Posterior	241,974 \pm 30,018	266,430 \pm 17,362	269,267 \pm 31,728	261,675 \pm 36,502	260,609 \pm 57,430	238,721 \pm 46,454
ARQ	158,311 \pm 20,713	154,007 \pm 14,153	164,782 \pm 12,203	168,444 \pm 11,465	158,948 \pm 15,254	156,765 \pm 22,804

Tabla 8. Densidad (n° neuronas Nissl/ mm^3) en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En el análisis por divisiones del ARQ en la densidad de neuronas entre cada grupo de tratamiento de machos y hembras, en los grupos control, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ ($F_{1,10}=0,226$, $p=0,645$; $F_{1,10}=2,638$, $p=0,135$; $F_{1,10}=0,160$, $p=0,160$). El análisis de los grupos de dosis baja G10 tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior ni en el total del ARQ ($F_{1,10}=1,296$, $p=0,284$; $F_{1,10}=0,132$, $p=0,724$; $F_{1,10}=0,263$, $p=0,621$); de igual manera, en el análisis de los grupos de dosis alta G50 no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ ($F_{1,10}=0,082$, $p=0,781$; $F_{1,10}=0,468$, $p=0,511$; $F_{1,10}=0,036$, $p=0,854$).

En cuanto al análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto del tratamiento en ninguna de las divisiones total, anterior y posterior tanto en machos ($F_{2,15}=0,230$, $p=0,797$; $F_{2,15}=0,690$, $p=0,517$; $F_{2,15}=0,241$, $p=0,789$) como en hembras ($F_{2,13}=1,996$, $p=0,175$; $F_{2,13}=0,879$, $p=0,439$; $F_{2,13}=1,209$, $p=0,330$).

3.3.1. Análisis subdivisiones del ARQ

El análisis por subdivisiones del ARQ de la densidad de neuronas entre cada grupo de tratamiento de machos y hembras, en los grupos control no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqD, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,10}=0,320$, $p=0,584$; $F_{1,10}=2,841$, $p=0,123$; $F_{1,10}=0,119$, $p=0,737$; $F_{1,10}=1,247$, $p=0,290$; $F_{1,10}=4,058$, $p=0,072$). Entre los grupos de dosis baja G10 se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la división ArqL ($F_{1,10}=14,482$, $p=0,004$), con una densidad más alta en las hembras (figura 61). En el resto de las subdivisiones ArqM, ArqD, ArqPM y ArqPL ($F_{1,10}=0,003$, $p=0,956$; $F_{1,10}=4,675$, $p=0,059$; $F_{1,10}=1,119$, $p=0,318$; $F_{1,10}=9,669$, $p=0,013$) no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, al igual que en el grupo de dosis alta G50, donde tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqD, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,10}=0,470$, $p=0,510$; $F_{1,10}=3,846$, $p=0,081$; $F_{1,10}=7,540$, $p=0,023$; $F_{1,10}=1,537$, $p=0,246$; $F_{1,10}=0,262$, $p=0,621$).

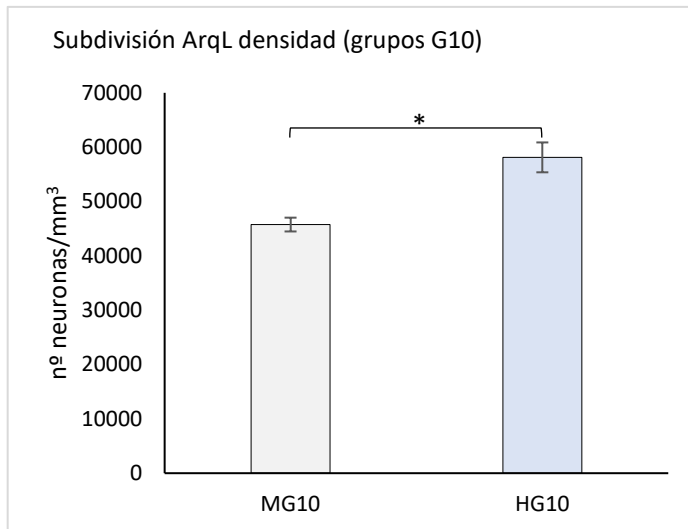


Figura 61. Densidad en la subdivisión arqueado posterior medial (ArqPM) en los grupos de dosis baja G10. MG10, macho G10; HG10, hembra G10. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En el análisis de cada sexo por separado, no se han encontrado diferencias en los machos en ninguna de las subdivisiones ($F_{2,15}=0,362$; $p=0,702$; $F_{2,15}=1,081$; $p=0,364$; $F_{2,15}=1,736$; $p=0,210$; $F_{2,15}=2,123$; $p=0,154$; $F_{2,15}=0,185$; $p=0,833$) ni tampoco en las hembras ($F_{2,15}=1,631$; $p=0,233$; $F_{2,15}=1,262$; $p=0,316$; $F_{2,15}=2,938$; $p=0,089$; $F_{2,15}=0,961$; $p=0,408$; $F_{2,15}=0,697$; $p=0,516$).

3.4. Proporción POMC/Nissl en el ARQ

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 10. Primeramente, se muestra la proporción POMC/Nissl de cada una de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqD, ArqPM y ArqPL, seguidamente la proporción POMC/Nissl de las divisiones anterior y posterior y por último la proporción POMC/Nissl del total del ARQ.

PROPORCIÓN POMC/NISSL	MC	HC	MG10	HG10	MG50	HG50
ArqM	0,045 \pm 0,007	0,049 \pm 0,006	0,044 \pm 0,012	0,043 \pm 0,005	0,044 \pm 0,006	0,044 \pm 0,004
ArqL	0,118 \pm 0,045	0,108 \pm 0,002	0,136 \pm 0,032	0,091 \pm 0,028	0,165 \pm 0,053	0,090 \pm 0,026
ArqPM	0,118 \pm 0,004	0,108 \pm 0,006	0,136 \pm 0,007	0,091 \pm 0,006	0,165 \pm 0,008	0,090 \pm 0,002
ArqPL	0,088 \pm 0,016	0,072 \pm 0,005	0,074 \pm 0,010	0,064 \pm 0,015	0,089 \pm 0,019	0,066 \pm 0,030
ARQ Anterior	0,058 \pm 0,011	0,061 \pm 0,005	0,061 \pm 0,018	0,052 \pm 0,008	0,064 \pm 0,012	0,053 \pm 0,005
ARQ Posterior	0,120 \pm 0,013	0,114 \pm 0,020	0,106 \pm 0,026	0,111 \pm 0,026	0,109 \pm 0,027	0,104 \pm 0,024
ARQ	0,061 \pm 0,005	0,061 \pm 0,001	0,062 \pm 0,019	0,054 \pm 0,004	0,063 \pm 0,012	0,054 \pm 0,002

Tabla 9. Proporción POMC/Nissl en las subdivisiones, divisiones y total del ARQ. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

En los grupos control, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ ($F_{1,7}=0,160$, $p=0,705$; $F_{1,7}=0,015$, $p=0,906$; $F_{1,7}=0,004$, $p=0,953$). El análisis de los

grupos de dosis baja G10, tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ ($F_{1,7}=1,047$, $p=0,346$; $F_{1,7}=0,446$, $p=0,529$; $F_{1,7}=0,833$, $p=0,413$); así mismo, en el análisis de los grupos de dosis alta G50, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ ($F_{1,7}=2,020$, $p=0,205$; $F_{1,7}=0,50$, $p=0,830$; $F_{1,7}=1,599$, $p=0,253$).

El análisis de cada sexo por separado muestra diferencias estadísticamente significativas en las hembras en el total del ARQ ($F_{2,6}=5,418$, $p=0,045$), mientras no se han encontrado diferencias en las divisiones anterior y posterior ($F_{2,6}=1,259$, $p=0,350$; $F_{2,6}=0,109$, $p=0,898$) ni en los machos en ninguna de las divisiones anterior, posterior y número total de POMC-ir en el ARQ ($F_{2,8}=0,219$, $p=0,808$; $F_{2,8}=0,361$, $p=0,708$; $F_{2,8}=0,042$, $p=0,959$).

El análisis *post hoc* muestra diferencias estadísticamente significativas en el total del ARQ de los grupos HG10 y HG50 respecto al grupo HC, con una disminución de la proporción POMC/Nissl en los grupos tratados con genisteína (figura 62).

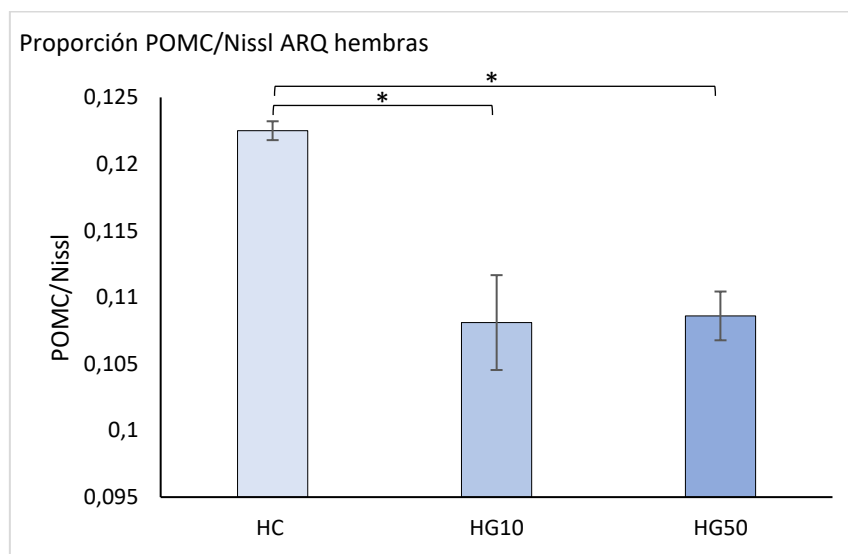


Figura 62. Proporción POMC/Nissl en el ARQ en hembras. HC, hembra control; HG10, hembra G10; HG50, hembra G50. * = $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

3.4.1. Análisis subdivisiones del ARQ

En los grupos control no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,6}=0,975$, $p=0,369$;

F1,6=0,235, p=0,648; F1,6=0,111, p=0,752; F1,6=0,497, p=0,512). Tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los grupos de dosis baja G10 en las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL (F1,6=0,205, p=0,666; F1,6=3,100, p=0,129; F1,6=1,359, p=0,288; F1,6=0,696, p=0,436) ni en los grupos de dosis alta G50 (F1,7=0,000, p=0,985; F1,7=5,055, p=0,066; F1,7=0,110, p=0,752; F1,7=1,816, p=0,226).

En el análisis de cada sexo por separado, no se han encontrado diferencias en ninguna de las subdivisiones en machos (F2,9=0,32, p=0,968; F2,9=1,309, p=0,317; F2,9=0,434, p=0,661; F2,9=0,331, p=0,727) ni en hembras (F2,8=2,441; p=0,149; F2,8=0,355; p=0,712; F2,8=0,414; p=0,674; F2,8=0,355; p=0,712).

3.5. Densidad POMC-ir en el ARQ

En los grupos control no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ (F1,6=0,555, p=0,490; F1,6=1,546, p=0,269; F1,6=0,688, p=0,453). El análisis de los grupos de dosis baja G10 tampoco muestra ningún efecto en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ (F1,6=0,175, p=0,690; F1,6=0,153, p=0,709; F1,6=0,188, p=0,687). De igual manera, en el análisis de los grupos de dosis alta G50, no se ha encontrado ningún efecto en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ (F1,6=1,863, p=0,221; F1,6=1,521, p=0,264; F1,6=4,218, p=0,086).

En el análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto en los machos en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ (F2,8=0,116; p=0,892; F2,8=0,267; p=0,772; F2,8=0,074; p=0,929), ni tampoco en las hembras (F2,6=0,753; p=0,511; F2,6=1,344; p=0,329; F2,6=1,636; p=0,271).

3.5.1. Análisis subdivisiones del ARQ

En los grupos control no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL (F1,6=0,452, p=0,527; F1,6=2,292, p=0,181; F1,6=0,328, p=0,588; F1,6=1,156, p=0,324). El análisis de los grupos de dosis baja G10 tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL (F1,6=0,650, p=0,457; F1,6=0,200, p=0,673; F1,6=2,893, p=0,150; F1,6=0,031,

p=0,866); así mismo, en el análisis de los grupos de dosis alta G50 no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL (F1,6=0,452, p=0,527; F1,6=2,292, p=0,181; F1,6=0,328, p=0,588; F1,6=1,156, p=0,324).

En el análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL tanto en los machos (F2,8=0,106, p=0,901; F2,8=0,867, p=0,456; F2,8=1,706, p=0,241; F2,8=0,434, p=0,662) como en las hembras (F2,6=1,592; p=0,279; F2,6=0,040; p=0,961; F2,6=1,021; p=0,415; F2,6=0,790; p=0,496).

3.6. Proporción GPER/Nissl

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 10. Primeramente, se muestra la proporción GPER/Nissl de cada una de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqD, ArqPM y ArqPL, seguidamente la proporción GPER/Nissl de las divisiones anterior y posterior y por último la proporción GPER/Nissl del total del ARQ.

PROPORCIÓN GPER/NISSL	MC	HC	MG10	HG10	MG50	HG50
ArqM	0,552 ± 0,142	0,679 ± 0,098	0,537 ± 0,103	0,561 ± 0,076	0,616 ± 0,012	0,676 ± 0,025
ArqL	0,721 ± 0,095	0,629 ± 0,010	0,841 ± 0,097	0,570 ± 0,068	0,711 ± 0,006	0,703 ± 0,154
ArqPM	0,653 ± 0,055	0,694 ± 0,027	0,633 ± 0,141	0,741 ± 0,145	0,642 ± 0,244	0,642 ± 0,084
ArqPL	0,591 ± 0,186	0,383 ± 0,005	0,733 ± 0,091	0,497 ± 0,080	0,487 ± 0,049	0,492 ± 0,096
ARQ Anterior	0,580 ± 0,117	0,667 ± 0,074	0,589 ± 0,099	0,563 ± 0,074	0,634 ± 0,014	0,679 ± 0,039
ARQ Posterior	0,636 ± 0,085	0,594 ± 0,015	0,656 ± 0,122	0,653 ± 0,072	0,584 ± 0,143	0,592 ± 0,060
ARQ	0,595 ± 0,059	0,642 ± 0,054	0,607 ± 0,041	0,589 ± 0,032	0,618 ± 0,057	0,649 ± 0,043

Tabla 10. Proporción GPER/Nissl en las subdivisiones, divisiones y en el total del ARQ. Todos los valores se expresan como medias ±SEM.

En los grupos control, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ (F1,5=0,890, p=0,399; F1,5=0,433, p=0,547; F1,5=0,892, p=0,398). El análisis de los grupos de dosis baja G10 tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ (F1,7=0,173, p=0,692; F1,7=0,002, p=0,965; F1,7=0,527, p=0,495), al igual que en los grupos de dosis alta G50, donde el análisis de no muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ (F1,4=2,332, p=0,224; F1,4=0,008, p=0,933; F1,4=0,511, p=0,526).

En el análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ tanto en los machos ($F_{2,7}=0,206$; $p=0,819$; $F_{2,7}=0,281$; $p=0,763$; $F_{2,7}=0,140$; $p=0,871$) como en las hembras ($F_{2,6}=3,377$; $p=0,104$; $F_{2,6}=1,057$; $p=0,404$; $F_{2,6}=2,324$; $p=0,179$).

3.6.1. Análisis subdivisiones del ARQ

En los grupos control, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,5}=1,216$, $p=0,332$; $F_{1,5}=1,656$, $p=0,268$; $F_{1,5}=0,939$, $p=0,387$; $F_{1,5}=2,227$, $p=0,210$). El análisis de los grupos de dosis baja G10 muestra diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqL y ArqPL ($F_{1,7}=20,703$, $p=0,004$; $F_{1,7}=15,173$, $p=0,008$), con una proporción menor en las hembras en ambas subdivisiones (figuras 63 y 64). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqM y ArqPM ($F_{1,7}=0,139$, $p=0,722$; $F_{1,7}=1,136$, $p=0,327$); en el análisis de los grupos de dosis alta G50 no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,4}=9,495$, $p=0,054$; $F_{1,4}=0,005$, $p=0,946$; $F_{1,4}=0,000$, $p=0,998$; $F_{1,4}=0,004$, $p=0,952$).

En el análisis de cada sexo por separado, no se han encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones en machos ($F_{2,7}=0,319$; $p=0,737$; $F_{2,7}=2,286$; $p=0,172$; $F_{2,7}=0,023$; $p=0,978$; $F_{2,7}=2,381$, $p=0,163$) ni en hembras ($F_{2,6}=3,215$; $p=0,112$; $F_{2,6}=1,477$; $p=0,301$; $F_{2,6}=0,639$; $p=0,560$; $F_{2,6}=1,538$; $p=0,289$).

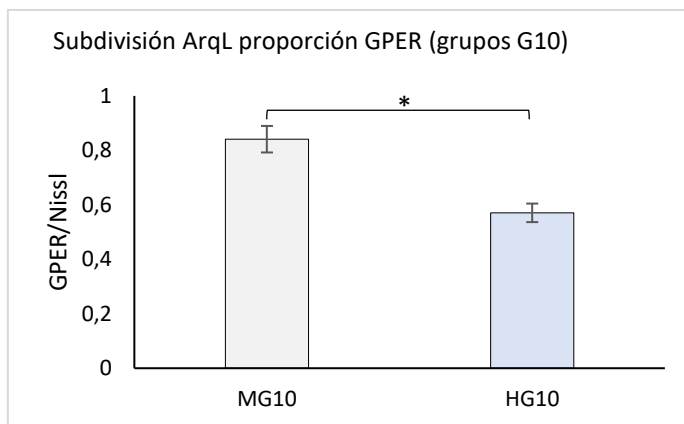


Figura 63. Proporción GPER/Nissl en la subdivisión arqueado lateral (ArqL) en los grupos de dosis baja G10. MG10, macho G10; HG10, hembra G10. $*=p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

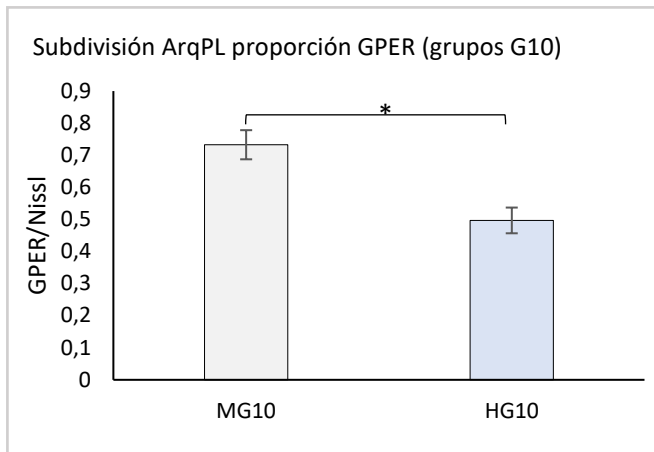


Figura 64. Proporción GPER/Nissl en la subdivisión arqueado posterior lateral (ArqPL) en los grupos de dosis baja G10. MG10, macho G10; HG10, hembra G10. *= $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

3.7. Densidad GPER

En los grupos control, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ ($F_{1,5}=0,290$, $p=0,671$; $F_{1,5}=0,015$, $p=0,909$; $F_{1,5}=0,000$, $p=0,997$). El análisis de los grupos de dosis baja G10 tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ ($F_{1,7}=0,024$, $p=0,882$; $F_{1,7}=0,848$, $p=0,393$; $F_{1,7}=0,822$, $p=0,399$). En el análisis de los grupos de dosis alta G50 no se ha encontrado ningún efecto en ninguna de las divisiones anterior, posterior y total del ARQ ($F_{1,4}=0,129$, $p=0,743$; $F_{1,4}=0,303$, $p=0,620$; $F_{1,4}=0,147$, $p=0,727$).

En el análisis de cada sexo por separado, no se ha encontrado ningún efecto en ninguna de las divisiones anterior y posterior ni en el total del ARQ en los machos ($F_{2,7}=0,135$; $p=0,876$; $F_{2,7}=0,155$; $p=0,859$; $F_{2,7}=0,006$; $p=0,994$) ni tampoco en las hembras ($F_{2,6}=0,180$; $p=0,839$; $F_{2,6}=0,820$; $p=0,485$; $F_{2,6}=0,124$; $p=0,886$).

3.7.1. Análisis subdivisiones del ARQ

En los grupos control, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,5}=0,404$, $p=0,560$; $F_{1,5}=0,364$, $p=0,579$; $F_{1,5}=4,230$, $p=0,109$; $F_{1,5}=1,003$, $p=0,373$). El análisis de los grupos de dosis baja G10 muestra diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqL y ArqPL ($F_{1,7}=6,039$, $p=0,049$; $F_{1,7}=9,329$,

$p=0,022$), con una menor densidad en las hembras (figuras 65 y 66). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las subdivisiones ArqM y ArqPM ($F_{1,7}=0,29$, $p=0,869$; $F_{1,7}=0,146$, $p=0,715$); en el análisis de los grupos de dosis altas G50 no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las subdivisiones ArqM, ArqL, ArqPM y ArqPL ($F_{1,4}=0,512$, $p=0,526$; $F_{1,4}=0,15$, $p=0,911$; $F_{1,4}=0,464$, $p=0,545$; $F_{1,4}=0,023$, $p=0,890$).

En el análisis de cada sexo por separado, no se han encontrado diferencias en ninguna de las subdivisiones en machos ($F_{2,7}=0,264$; $p=0,775$; $F_{2,7}=0,263$; $p=0,776$; $F_{2,7}=0,282$; $p=0,762$; $F_{2,7}=0,280$, $p=0,764$) ni en hembras ($F_{2,6}=0,173$; $p=0,846$; $F_{2,6}=0,811$; $p=0,488$; $F_{2,6}=1,635$; $p=0,271$; $F_{2,6}=0,317$; $p=0,740$).

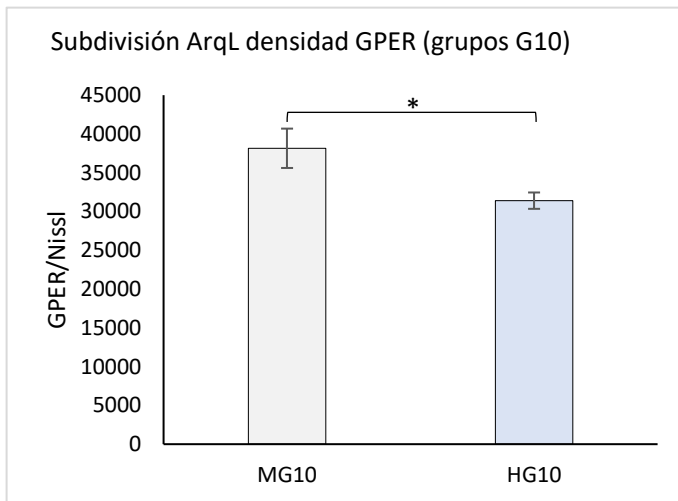


Figura 65. Densidad neuronas GPER-ir en la subdivisión arqueado lateral (ArqL) en los grupos de dosis baja G10. MG10, macho G10; HG10, hembra G10. $*=p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

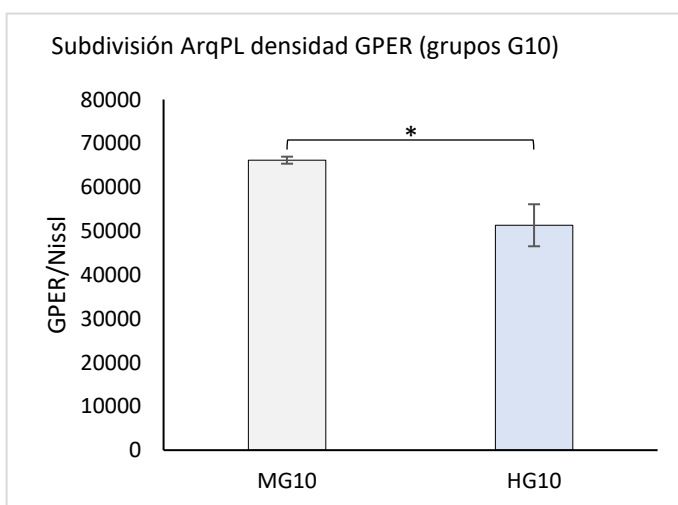


Figura 66. Densidad neuronas GPER-ir en la subdivisión posterior lateral (ArqPL) en los grupos de dosis baja G10. MG10, macho G10; HG10, hembra G10. $*=p<0,05$. Todos los valores se expresan como medias \pm SEM.

4. Discusión

Respecto a los parámetros morfológicos, es ampliamente conocido que el volumen, el número total de células y la morfología dendrítica son las características principales para la organización de la citoarquitectura de las diferentes estructuras encefálicas (Attili et al., 2019). Tradicionalmente se han utilizado dos de estos parámetros, el volumen y el número de neuronas, para definir los dos patrones de dimorfismo sexual que se producen en el cerebro (Guillamón y Segovia, 1997). Los resultados encontrados en este trabajo, donde el patrón macho>hembra en el número de neuronas y el volumen se localiza en la subdivisión ArqPM en los grupos control, está en consonancia con los resultados expuestos en trabajos anteriores, donde se muestra dimorfismo en diferentes características morfológicas de este núcleo (Matsumoto y Arai, 1980; Garcia-Segura et al., 1985; Leal et al., 1998; Mong et al., 1999; Lenz y McCarthy, 2010). El tratamiento con genisteína de P6 a P13 alteró el patrón del dimorfismo sexual del ARQ según la subdivisión analizada. La genisteína eliminó el dimorfismo sexual observado en el volumen del ArqPM, pero solo desapareció el encontrado en el número de neuronas teñidas con violeta de cresilo en el grupo de dosis alta G50. Por lo tanto, parece existir un efecto de la genisteína en la expresión del dimorfismo sexual morfológico en el ARQ dependiente de la dosis. Por ejemplo, en los grupos de dosis baja G10 se ha encontrado dimorfismo en el número de neuronas y en la densidad en la subdivisión ArqL con un patrón hembra>macho, mientras que en los grupos de dosis alta G50 el dimorfismo aparece en el número de neuronas en la subdivisión ArqD con un patrón hembra>macho. Este aumento también es evidente cuando se analiza la parte posterior del ARQ como un todo, es decir, incluyendo las subdivisiones ArqPM y ArqLP. Estos datos muestran que el dimorfismo sexual en la población neuronal teñida con violeta de cresilo en la región posterior es bastante estable y no se ve alterada por la presencia de genisteína durante el desarrollo. Sin embargo, en la parte anterior, esta misma población parece ser más vulnerable a la acción de la genisteína en función de la dosis.

Como se ha explicado anteriormente, ya se ha descrito dimorfismo sexual en el ARQ (Matsumoto y Arai, 1980; Kauffman et al., 2007; Sawai et al., 2012). En el estudio sobre el dimorfismo sexual en regiones hipotalámicas se ha encontrado que, en los diferentes núcleos, la diferenciación puede deberse a la misma hormona esteroide, pero el patrón sexual que se desarrolla a menudo es específico de una región o tipo de célula

(Lenz y McCarthy, 2010). Además, incluso dentro de una misma estructura, pueden encontrarse diferentes patrones dependiendo de las poblaciones neuronales que se localicen en cada área, como por ejemplo en el BNST (del Abril et al., 1987).

En el año 1980, Matsumoto y Arai estudiaron el dimorfismo sexual en el tipo y número de conexiones sinápticas en el ARQ y su modificación por el ambiente hormonal neonatal en la rata. Uno de los resultados más interesantes de este estudio es el referido al proceso de formación de estas sinapsis. Estos autores demostraron que dicho proceso no está finalizado al nacimiento y además está modulado por las hormonas esteroideas, ya que el tratamiento con propionato de testosterona en las hembras y la castración en los machos revertía los patrones sexuales (Matsumoto y Arai, 1980). Cinco años más tarde, Garcia-Segura et al. encontraron diferencias sexuales y cambios dependientes de la administración de estrógenos en la maduración de la organización de la membrana plasmática neuronal del ARQ, con un mayor número de proteínas intermembrana en las hembras respecto a los machos. Además, demostraron que estas diferencias no eran las mismas en épocas tempranas que en la edad adulta (Garcia-Segura et al., 1985). Respecto al volumen y número de neuronas en el ARQ, los estudios realizados son escasos y en su mayoría centrados en el efecto de la edad en la morfología del ARQ. Como se ha apuntado anteriormente, en 1998 Leal et al. encontraron un patrón macho>hembra en el número total de neuronas en el ARQ de la rata. En el presente trabajo, el análisis de las subdivisiones nos ha permitido detectar diferencias en una subdivisión específica del ARQ, sin embargo, aunque el dimorfismo encontrado en estas subdivisiones sigue, en general, el mismo patrón que el encontrado por Leal et al., no se han encontrado diferencias de sexo en el volumen o número de neuronas total como hicieron estos autores. Esta discrepancia puede deberse a la diferente edad a la que se estudiaron los animales, ya que en nuestro estudio los animales se sacrificaron a los 90 días y en el estudio de Leal a los 180 días. Es interesante notar que estos autores encontraron mayores diferencias en el volumen en animales jóvenes (6 meses) que en los mayores (24 meses), lo que sugeriría que esta diferencia varía según la edad (Leal et al., 1998). En trabajos anteriores se han descrito diferencias en la pérdida de neuronas dependientes del sexo en el hipotálamo en ratas seniles (Hsu y Peng, 1978; Peng y Hsu, 1982). Específicamente, se encontró una pérdida selectiva de neuronas en la región mPOA, el área hipotalámica anterior y el ARQ de ratas hembra de edad avanzada (Hsu et al., 1980). Así mismo, la exposición a largo plazo al estradiol en las ratas macho induce esta pérdida de neuronas relacionada con la edad característica de las ratas hembra en el área hipotalámica anterior

y el ARQ. Sin embargo, la pérdida de neuronas relacionada con la edad en estas áreas en las ratas hembra no se puede prevenir por ovariectomía (Yang et al., 1993). La diferenciación de estas estructuras en los patrones morfológicos comentados está determinada por la acción de las hormonas esteroideas, particularmente por el estradiol, como se ha comentado anteriormente, aunque la dirección de una diferencia sexual a menudo depende del área y del tipo de neurona (Lenz y McCarthy, 2010). Uno de los procesos a través de los cuales el estradiol podría producir esta regulación es por medio de la aromatización intracelular de la testosterona, ya que la castración neonatal de los machos feminiza características tales como el volumen, el número de células, la conectividad, la morfología, el fenotipo de neurotransmisores y la señalización molecular, mientras que el tratamiento con testosterona en las hembras en épocas tempranas las masculiniza (Matsumoto y Arai, 1980; Lenz y McCarthy, 2010).

Un dato interesante encontrado en la presente tesis es como la administración de diferentes dosis genisteína en las primeras etapas de desarrollo afecta de manera específica a las poblaciones de neuronas del ARQ en ratas hembra. El número de neuronas en la subdivisión ArqM de ratas hembra tratadas con la dosis baja de genisteína se vio incrementado con el tratamiento, sin embargo, no se detectó ningún efecto de la genisteína en el número de neuronas en el grupo de dosis alta. Además, no se encontraron efectos en el tratamiento con genisteína con ninguna dosis en los machos. Estos resultados ponen de manifiesto dos aspectos relevantes. Primero, el efecto diferencial de estos compuestos entre machos y hembras, puesto que el efecto es exclusivo en las hembras, y segundo, el efecto dosis dependiente de la genisteína, ya que solamente se vieron afectados los grupos G10. Estos resultados son similares a los encontrados en los efectos del consumo de soja en las hormonas tiroideas en humanos. Se conoce que el consumo de soja altera los niveles de la hormona estimulante del tiroides (TSH) a dosis bajas, aumentando las concentraciones de T4, quizás al desplazar la T4 de sus proteínas de unión, pero disminuye las concentraciones de T4 en dosis más altas al estimular la secreción de TSH (Patisaul, 2005). Así mismo, en el SDN-POA, se produce una alteración de su volumen dependiendo de la dosis, del periodo de exposición y del sexo en las ratas, subsecuentemente a la administración de genisteína (Patisaul, 2005). En otros modelos experimentales, los efectos tienden a ser específicos del fenotipo de ciertas células, más que del tamaño y/o volumen de una región como un todo. Por ejemplo, en el tratamiento en crías de rata con bisfenol A y con genisteína durante los dos primeros días de vida, no se vio afectado el volumen total del SDN-POA, pero se incrementó el número de las

células inmunorreactivas en ratas macho para la proteína fijadora de calcio, la calbindina, en esta región (Lephart et al., 1998). Por lo tanto, se puede concluir que los datos de este trabajo apoyan los resultados de otros trabajos en los cuales se muestra como la exposición a DEC's durante épocas tempranas puede tener consecuencias estructurales en el desarrollo del ARQ. Así mismo estos resultados podrían indicar una interferencia de la genisteína en el papel modulador del estradiol en estas primeras etapas de desarrollo. Además, se pone de manifiesto que parece producirse una especificidad de las subdivisiones del ARQ a los efectos de la genisteína. La heterogeneidad de las poblaciones del ARQ y su disposición neuroanatómica en los ejes rostro-caudal y medial-lateral podría explicar por qué estas diferencias son específicas de las subdivisiones de este núcleo (Chronwall, 1985; Sohn et al., 2011; Toda et al., 2017).

En la presente tesis también se han estudiado la proporción y la densidad de la expresión de los neuropéptidos POMC y GPER respecto al número total de neuronas y el volumen estimado mediante la tinción de Nissl. Los resultados muestran una proporción menor de neuronas POMC-ir en los grupos de hembras tratados con genisteína, en consonancia con los resultados encontrados en el experimento 1, donde el tratamiento con genisteína produjo un descenso en la expresión en las poblaciones neuronales que expresan POMC en estos grupos en la subdivisión ArqM. Respecto a la proporción de neuronas que expresan GPER, un dato interesante para futuros trabajos es la alta expresión de este receptor de membrana en el ARQ, superando el 50% del total de neuronas respecto a la estimación realizada mediante la tinción de Nissl. El efecto de la genisteína tanto en la proporción como en la densidad de las neuronas GPER-ir se produce en el grupo de dosis baja G10 en las subdivisiones ArqL y ArqPL, con valores mayores en el grupo de machos tratado con la dosis baja respecto al grupo de hembras tratado con la misma dosis, poniendo de relevancia, nuevamente, el efecto dependiente de la dosis de estos compuestos con propiedades estrogénicas y su especificidad según la subdivisión estudiada.

Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento con genisteína de P6 a P13 altera el desarrollo normal del ARQ solamente en una subdivisión específica en las hembras y modifica el dimorfismo sexual según la subdivisión analizada. La parte anterior del núcleo parece ser más vulnerable a la acción de la genisteína en función de la dosis. Hasta donde sabemos, estos resultados muestran por primera vez un dimorfismo sexual en el número de neuronas teñidas con Nissl en la región posterior del ARQ que es dependiente

de la dosis, puesto que este dimorfismo es eliminado por el tratamiento con genisteína en altas dosis.

Discusión final _____

Se conoce desde hace tiempo el importante papel de las poblaciones neuronales del ARQ en la regulación de la conducta de ingesta. El ARQ es vulnerable a los efectos de los DEC's, como el BPA, el Aroclor 1221, los retardantes de llama organofosforados, el dietilestilbestrol y el tributilestaño, la mayoría de ellos produciendo alteraciones en los sistemas reproductivo, endocrino, neurológico e inmune en la edad adulta y durante el desarrollo (Walker et al., 2013; Walker et al., 2014; Roepke et al., 2016; Vail y Roepke, 2020; Marraudino, Ponti et al., 2021). Todos estos DEC's tienen efectos estrogénicos y son considerados nocivos para la salud (Casals-Casas y Desvergne, 2011), como demuestran las regulaciones legislativas que se han producido para el uso de estos compuestos en los últimos 30 años. Los fitoestrógenos también se consideran DEC's, pero a diferencia de los mencionados anteriormente, se ha demostrado que sus efectos pueden ser beneficiosos para prevenir enfermedades cardiovasculares (Fusi et al., 2020), mejorar los síntomas de la menopausia (Chen et al., 2019; Thangavel et al., 2019) o prevenir accidentes cerebrovasculares isquémicos (Castelló-Ruiz et al., 2011). Sin embargo, los resultados de otros trabajos realizados en los últimos años no han mostrado estos posibles efectos positivos en los estudios clínicos (Lephart, Porter, Lund et al., 2004; Crain et al., 2008; Patisaul y Jefferson, 2010) e incluso otros han mostrado efectos negativos, como la citotoxicidad en las neuronas corticales primarias aumentando la muerte celular (Linford et al., 2001), la interrupción del desarrollo ovárico (Losa et al., 2011) o el aumento de la arborización neurítica en neuronas hipotalámicas primarias (Marraudino et al., 2019).

Hay que tener en cuenta que en este trabajo la exposición a la genisteína se produce durante un período específico de la etapa posnatal temprana y que los efectos se detectan cuando los animales son adultos. Durante esta etapa específica de desarrollo, los circuitos hipotalámicos se están programando (Rice y Barone, 2000; Bouret et al., 2004; Ishii y Bouret, 2012) y se podría esperar que la administración de genisteína durante este período alterara esta programación, ya que se ha demostrado que dichos circuitos son sensibles a los efectos del estradiol durante las épocas tempranas del desarrollo (Carrillo et al., 2016, 2019; Pinos et al., 2018). Se ha propuesto al ARQ como el principal mediador de la regulación estrogénica en la conducta de ingesta y el metabolismo, tanto a través de los receptores clásicos ER α y ER β , como de los receptores de membrana estrogénicos descubiertos más recientemente. Los receptores de los estrógenos son las vías de acción de los efectos contrastados del estradiol en la homeostasis energética, como la reducción del peso corporal y de la ingesta de alimentos (Chambers et al., 2007). El estradiol modula

la actividad de estas poblaciones neuronales hipotalámicas a través de la regulación génica y la excitabilidad neuronal (Roepke, 2009), con un papel predominante del ER α como el principal responsable de estos efectos, dada su alta expresión en el hipotálamo y el hecho de que la inactivación o delección de este receptor produce un aumento de peso y de la tasa metabólica. La inclusión de los nuevos receptores de membrana, tanto los relacionados con los ER α y ER β como el GPER, el primer receptor de membrana de estrógenos estructuralmente no relacionado con los ER nucleares (Thomas y Dong, 2006), amplía el campo de acción a través de los cuales el estradiol puede ejercer sus efectos en el hipotálamo. La caracterización de todos estos receptores en el ARQ no está todavía completa, como por ejemplo la colocalización de los receptores ER α en las neuronas del ARQ con otros neuropéptidos esenciales para la regulación y programación de estos circuitos, como la leptina, la grelina y la insulina, así como los sistemas de transducción intracelulares a través de los cuales convergen todas estas señales. Otro aspecto importante es como la función del estradiol puede diferir según la época del desarrollo, especialmente en las épocas perinatales, momento el que se le atribuye un importante papel en la modulación de estos circuitos, adaptándolos a las condiciones ambientales a las que se ven expuestos, y de esta forma determinar el fenotipo que se manifestará en épocas adultas.

El mecanismo directo mejor caracterizado a través del cual el estradiol regula el metabolismo energético en el ARQ es a través de las neuronas que expresan POMC (Gao et al., 2007). Los resultados del experimento 1 muestran que, en ratas hembra, estas neuronas son sensibles durante el desarrollo al tratamiento con genisteína, al menos de P6 a P13, ya que se ha encontrado una reducción en la expresión de este neuropéptido en la edad adulta. En trabajos anteriores ya se ha mostrado una regulación producida por la inclusión de fitoestrógenos en la dieta en el periodo perinatal, ya que la eliminación de fitoestrógenos del pienso para ratones produce un fenotipo obeso en las hembras compatible con el síndrome metabólico, con una elevación significativa en el estradiol sérico endógeno que se asoció después del nacimiento con resultados reproductivos adversos denominados “síndrome de estrogenización fetal” (Ruhlen et al., 2008). Este punto podría ser muy importante en la evaluación de todos los trabajos en los que se utilizan modelos animales con roedores, puesto que los niveles de isoflavonas en las dietas comunes podrían interferir con el valor de estos modelos animales y con los resultados experimentales (Jensen y Ritskes-Hoitinga, 2007). En un trabajo previo de

nuestro grupo (Carrillo et al., 2020) el bloqueo de ER α , ER β y GPER de P5 a P13 indujo alteraciones a largo plazo en el metabolismo energético, específicamente en el peso corporal y los niveles del ARNm de POMC hipotalámico, con un efecto sexualmente dimorfo. El peso corporal disminuyó en los machos, pero no en las hembras, mientras que los niveles hipotalámicos de ARNm de POMC disminuyeron en las hembras, pero no en los machos. Estos resultados están en consonancia con los encontrados en el presente trabajo, donde el tratamiento con genisteína produjo un retraso en la aparición de las diferencias entre machos y hembras en el peso corporal y una reducción en las neuronas POMC-ir solo en las hembras en la edad adulta. Así mismo, también son similares a los efectos a largo plazo de la exposición sobre otros sistemas neuroendocrinos, como los que controlan función reproductiva y comportamental (Hines y Goy, 1985; Horan et al., 2017).

Un punto importante para comprender los efectos de los fitoestrógenos se encuentra en los mecanismos a través de los cuales estos producen sus efectos. En los trabajos realizados con ratones *knockout* hembra, en los que se ha inactivado la señalización genómica del ER α pero se mantiene la señalización no genómica mediada por los receptores de membrana, la ausencia de fitoestrógenos en el pienso durante la gestación y la lactancia dio como resultado obesidad e intolerancia a la glucosa. El cambio a una dieta alta en fitoestrógenos al destete no restaura este fenotipo, aunque sí se restablece por completo en los descendientes alimentados con una dieta alta en fitoestrógenos de por vida y nacidos de padres reintroducidos a la dieta alta en fitoestrógenos antes de la pubertad, y parcialmente restaurado si los padres comenzaron a alimentarse con dieta alta en fitoestrógenos como adultos (Flowers et al., 2014). Estos datos sugieren una acción independiente, no genómica, del ER α sobre el metabolismo energético, dependiente de la exposición materna a los fitoestrógenos en la dieta. Así mismo, este efecto protector de los fitoestrógenos en la programación de los circuitos hipotalámicos contra el aumento de peso, la adiposidad y la ingesta de la dieta alta en grasas, solamente se mantiene si se sigue produciendo el consumo de fitoestrógenos en épocas adultas (Andreoli et al., 2015), presumiblemente mediante la activación de los sistemas cuyo desarrollo y programación se realizó en épocas perinatales.

En relación con estos mecanismos mediados por los receptores de membrana estrogénicos de la ingesta de fitoestrógenos, los resultados encontrados en el experimento 2 de la presente tesis en la expresión de GPER-ir en el hipotálamo muestran un efecto

solo en los machos, con una reducción en la expresión del número de neuronas en la subdivisión ArqL y un aumento en las subdivisiones posteriores. La alta expresión de este receptor en el ARQ, donde la proporción estimada respecto a las neuronas marcadas mediante la tinción de Nissl asciende aproximadamente al 60% en los machos y 64% en las hembras, sugiere que la señalización a través de este receptor de membrana puede tener un importante papel en todos los mecanismos neuroendocrinos regulados por el ARQ. Aunque en los últimos años las funciones de GPER en la homeostasis metabólica están comenzando a dilucidarse, todavía se desconocen muchas de sus funciones. Una de las características de la señalización producida a través del GPER se manifiesta en que, al igual que el ER α y el ER β , sus mecanismos pueden producirse de manera independiente o interactuando con el resto de los receptores estrogénicos dependiendo del tipo de célula considerado (Périan y Vanacker, 2020). La función del GPER se ha relacionado con la regulación del peso corporal, el comportamiento alimentario, la inflamación y la homeostasis de la glucosa y los lípidos (Sharma y Prossnitz, 2017). Se ha informado de la expresión del GPER en el tejido adiposo de ratones macho y hembra, con un aumento de peso corporal y obesidad abdominal en los animales con delección de este receptor (Haas et al., 2009), resultados confirmados en otros trabajos donde se sugiere que el GPER puede regular vías clave involucradas en la homeostasis de lípidos, la regulación del peso corporal y el metabolismo energético tanto en machos como en hembras (Davis et al., 2014; Sharma et al., 2020;). Se ha sugerido que las alteraciones en la expresión de GPER se deben a los niveles circulantes de hormonas sexuales, ya que el estradiol activa este receptor. Por ejemplo, en un trabajo realizado con ratas, se ha demostrado que el estradiol modifica la expresión del GPER y el contenido de glucógeno en los astrocitos de las hembras, pero no en los de los machos (Ibrahim et al., 2020). Por lo tanto, parece que la población de neuronas que expresan GPER responde de manera diferencial dependiendo de los niveles de estradiol.

Entre los DEC's, la genisteína ha demostrado tener una de las mayores afinidades de unión al GPER, pudiendo ser una vía clave para que este fitoestrógeno ejerza sus efectos en la regulación metabólica tanto en el desarrollo como en la edad adulta (Thomas y Dong, 2006). La alteración de la expresión del GPER en el ARQ en machos confirma la existencia de una señalización de la genisteína a través del GPER, con unos procesos diferentes dependiendo de la subdivisión estudiada. Aunque se desconocen los mecanismos y efectos de la genisteína mediados por estos receptores de membrana, se

podría hipotetizar que esta señalización involucra a distintos sistemas de regulación neurohormonal dentro del ARQ. El hecho de que determinados sistemas de neurotransmisores, como el glutamatérgico, se localice principalmente en la región posterior del ARQ, en la que la población neuronal GPER parece ser sensible a la acción de la genisteína durante el desarrollo en machos, abre la puerta a futuras investigaciones que desentrañen el posible papel de la población que expresa GPER en las funciones que el ARQ controla. Nuestros datos revelan que los fitoestrógenos no solo alteran estas poblaciones neuronales, sino que también pueden modular algunas acciones del estradiol durante el desarrollo diferencialmente en ratas hembra y macho.

El análisis de los resultados del experimento 3 muestra como el ARQ de la rata macho contiene más neuronas que el de la rata hembra y, específicamente, se han encontrado estas diferencias relacionadas con el sexo en la subdivisión posterior medial del núcleo. Los efectos organizativos de los esteroides gonadales influyen en la citoarquitectura neuroanatómica y dado que el hipotálamo es el objetivo de estas hormonas, podrían esperarse diferentes efectos organizativos entre el hipotálamo masculino y el femenino. Estos resultados corroboran cómo las poblaciones neuronales en el ARQ se distribuyen de manera diferente en machos y hembras, sugiriendo distintos mecanismos entre sexos en respuesta a la genisteína, posiblemente a través de la modulación de los receptores nucleares clásicos $ER\alpha$ y $ER\beta$ y los receptores de membrana como el GPER. Así mismo, también podrían indicar una interferencia de la genisteína en el papel modulador del estradiol en estas primeras etapas de desarrollo y una especificidad de las subdivisiones del ARQ en su respuesta a esta hormona. Además, y de acuerdo con otros estudios, estos datos muestran como el efecto de la genisteína en etapas tempranas del desarrollo se manifiesta de forma significativa con dosis bajas de este disruptor endocrino.

Teniendo en cuenta todos estos datos, habría que prestar especial atención al uso de las bebidas a base de semillas de soja como el principal alimento sustitutivo de la leche en lactantes, ya que el período de lactancia es un período sensible para el óptimo desarrollo de los circuitos cerebrales. Así mismo, sería necesario la realización de más investigaciones para desentrañar los mecanismos a través de los cuales la genisteína puede alterar el desarrollo de los circuitos hipotalámicos involucrados en la regulación de la conducta de ingesta para detectar efectos adversos sobre el metabolismo energético y la alimentación.

Conclusiones ---

- Los experimentos realizados en la presente tesis demuestran que la administración de genisteína en el periodo postnatal temprano puede inducir alteraciones a largo plazo en los núcleos hipotalámicos implicados en el control de la homeostasis energética.
- Los resultados del experimento 1 han mostrado un retraso en la aparición de las diferencias de sexo en el peso corporal en los grupos tratados con la dosis más alta de genisteína. Respecto a la expresión de POMC en el ARQ del hipotálamo, se ha encontrado una disminución significativa en el número de neuronas en los dos grupos de hembras tratados con genisteína en la subdivisión medial del núcleo. Por el contrario, no se han observado alteración en el resto de las subdivisiones ni en la expresión de orexina en ninguno de los sexos. Por lo tanto, se puede concluir que la genisteína puede modular las acciones de programación del estradiol en los circuitos de alimentación hipotalámicos diferencialmente en ratas macho y hembra durante el desarrollo. Además, las alteraciones producidas por la genisteína dependen de la subdivisión del ARQ analizada.
- En el experimento 2, las diferentes dosis de genisteína han modificado la expresión del receptor estrogénico de membrana GPER en el núcleo arqueado, en ratas macho pero no en hembras. Las subdivisiones posteriores del ARQ que expresan GPER parecen ser especialmente sensibles a la acción de la genisteína en machos, ratificando la capacidad de este fitoestrógeno para actuar a través del GPER y la importancia de estas regiones del ARQ, a las que tradicionalmente no se les ha prestado tanta atención en comparación con otras áreas. Así mismo, los resultados de este experimento han mostrado una expresión del GPER sexualmente dimorfa en la subdivisión ArqPM.
- El estudio de la morfología del núcleo arqueado hipotalámico en el experimento 3 muestra como el volumen y el número de neuronas presentan dimorfismo sexual solo en determinadas subdivisiones. Además, este dimorfismo presenta una vulnerabilidad diferencial al tratamiento con genisteína en cada subdivisión,

reflejando la heterogeneidad de las poblaciones neuronales del ARQ y las posibles funciones diferenciales en las que está implicado este núcleo en cada sexo.

- Debido a la utilización de la soja como alimento sustitutivo de la leche durante la lactancia, y la especial vulnerabilidad del desarrollo de los circuitos cerebrales en esta época, sería necesario continuar con la investigación para detectar los posibles efectos adversos de la ingesta de genisteína en estos periodos del desarrollo.

Bibliografía

- Anand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951). Localization of a “feeding center” in the hypothalamus of the rat. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *77*(2), 323–325.
- Andreoli, M. F., Stoker, C., Rossetti, M. F., Alzamendi, A., Castrogiovanni, D., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2015). Withdrawal of dietary phytoestrogens in adult male rats affects hypothalamic regulation of food intake, induces obesity and alters glucose metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *401*, 111–119.
- Ariyani, W., Miyazaki, W., Amano, I., Hanamura, K., Shirao, T., & Koibuchi, N. (2020). Soy isoflavones accelerate glial cell migration via GPER-mediated signal transduction pathway. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 554941.
- Asarian, L., & Geary, N. (2006). Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *361*(1471), 1251–1263.
- Asarian, L., & Geary, N. (2013). Sex differences in the physiology of eating. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *305*(11), R1215–67.
- Attili, S. M., Silva, M. F. M., Nguyen, T. V., & Ascoli, G. A. (2019). Cell numbers, distribution, shape, and regional variation throughout the murine hippocampal formation from the adult brain Allen Reference Atlas. *Brain Structure & Function*, *224*(8), 2883–2897.
- Azcoitia, I., Arevalo, M. A., & Garcia-Segura, L. M. (2018). Neural-derived estradiol regulates brain plasticity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *89*, 53–59.
- Bäckberg, M., Hervieu, G., Wilson, S., & Meister, B. (2002). Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake: Chemical Identity of Hypothalamic OX-R1 Neurons. *The European Journal of Neuroscience*, *15*(2), 315–328.
- Bake, T., Le May, M. V., Edvardsson, C. E., Vogel, H., Bergström, U., Albers, M. N., Skibicka, K. P., Farkas, I., Liposits, Z., & Dickson, S. L. (2020). Ghrelin receptor stimulation of the lateral parabrachial nucleus in rats increases food intake but not food motivation. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *28*(8), 1503–1511.
- Barker, J. M., & Galea, L. A. M. (2009). Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *General and Comparative Endocrinology*, *164*(1), 77–84.

- Bohler, H. C., Tracer, H., Merriam, G. R., & Petersen, S. L. (1991). Changes in proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in the rostral periaruate region of the female rat during the estrous cycle. *Endocrinology*, *128*(3), 1265–1269.
- Bouret, S. G. (2010). Leptin, nutrition, and the programming of hypothalamic feeding circuits. En *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series: Pediatric Program* (pp. 25–39).
- Bouret, S. G. (2017). Development of hypothalamic circuits that control food intake and energy balance. En *Appetite and Food Intake* (pp. 135–154). CRC Press.
- Bouret, S. G., Draper, S. J., & Simerly, R. B. (2004). Trophic action of Leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5667), 108–110.
- Brooks, J. D., & Thompson, L. U. (2005). Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *94*(5), 461–467.
- Brown, L. M., & Clegg, D. J. (2010). Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *122*(1–3), 65–73.
- Brown, L. M., Gent, L., Davis, K., & Clegg, D. J. (2010). Metabolic impact of sex hormones on obesity. *Brain Research*, *1350*, 77–85.
- Butera, P. C. (2010). Estradiol and the control of food intake. *Physiology & Behavior*, *99*(2), 175–180.
- Campbell, J. N., Macosko, E. Z., Fenselau, H., Pers, T. H., Lyubetskaya, A., Tenen, D., Goldman, M., Verstegen, A. M. J., Resch, J. M., McCarroll, S. A., Rosen, E. D., Lowell, B. B., & Tsai, L. T. (2017). A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nature Neuroscience*, *20*(3), 484–496.
- Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, *9*(3), 399–431.
- Canonaco, M., Giusi, G., Madeo, A., Facciolo, R. M., Lappano, R., Canonaco, A., & Maggiolini, M. (2008). A sexually dimorphic distribution pattern of the novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 in some brain areas of the hamster. *The Journal of Endocrinology*, *196*(1), 131–138.
- Cardona-Gómez, G. P., Mendez, P., DonCarlos, L. L., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2001). Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Research Reviews*, *37*(1–3), 320–334.

- Carrillo, B., Collado, P., Díaz, F., Chowen, J. A., Grassi, D., & Pinos, H. (2020). Blocking of estradiol receptors ER α , ER β and GPER during development, differentially alters energy metabolism in male and female rats. *Neuroscience*, *426*, 59–68.
- Carrillo, B., Collado, P., Díaz, F., Chowen, J. A., Pérez-Izquierdo, M. Á., & Pinos, H. (2019). Physiological and brain alterations produced by high-fat diet in male and female rats can be modulated by increased levels of estradiol during critical periods of development. *Nutritional Neuroscience*, *22*(1), 29–39.
- Carrillo, B., Collado, P., Díaz, F., Chowen, J. A., & Pinos, H. (2016). Exposure to increased levels of estradiol during development can have long-term effects on the response to undernutrition in female rats. *Nutritional Neuroscience*, *19*(9), 414–422.
- Carrillo, B., Pinos, H., Guillamón, A., Panzica, G., & Collado, P. (2007). Morphometrical and neurochemical changes in the anteroventral subdivision of the rat medial amygdala during estrous cycle. *Brain Research*, *1150*, 83–93.
- Casals-Casas, C., & Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual Review of Physiology*, *73*(1), 135–162.
- Casanova, M., You, L., Gaido, K. W., Archibeque-Engle, S., Janszen, D. B., & Heck, H. A. (1999). Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *51*(2), 236–244.
- Cassidy, A. (2003). Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International de Vitaminologie et de Nutrition*, *73*(2), 120–126.
- Castelló-Ruiz, M., Torregrosa, G., Burguete, M. C., Salom, J. B., Gil, J. V., Miranda, F. J., Jover-Mengual, T., Marrachelli, V. G., & Alborch, E. (2011). Soy-derived phytoestrogens as preventive and acute neuroprotectors in experimental ischemic stroke: influence of rat strain. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *18*(6), 513–515.
- Cave, N. J., Backus, R. C., Marks, S. L., & Klasing, K. C. (2007). Oestradiol, but not genistein, inhibits the rise in food intake following gonadectomy in cats, but genistein is associated with an increase in lean body mass. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *91*(9–10), 400–410.
- Cederroth, C. R., & Nef, S. (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *304*(1–2), 30–42.

- Cederroth, C. R., Vinciguerra, M., Kühne, F., Madani, R., Doerge, D. R., Visser, T. J., Foti, M., Rohner-Jeanrenaud, F., Vassalli, J.D., & Nef, S. (2007). A phytoestrogen-rich diet increases energy expenditure and decreases adiposity in mice. *Environmental Health Perspectives*, *115*(10), 1467–1473.
- Chambers, J. B., Schurdak, J. D., Benoit, S. C., & Clegg, D. J. (2007). Behavioral and metabolic phenotyping of GPR30 and neuronal estrogen receptor- α knockout mice. *Appetite*, *49*, 272–341.
- Chapelot, D., & Charlot, K. (2019). Physiology of energy homeostasis: Models, actors, challenges and the glucostatic loop. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *92*, 11–25.
- Chen, L. R., Ko, N. Y., & Chen, K. H. (2019). Isoflavone supplements for menopausal women: A systematic review. *Nutrients*, *11*(11), 2649.
- Chowen, J. A., Argente, J., González-Parra, S., & Garcia-Segura, L. M. (1993). Differential effects of the neonatal and adult sex steroid environments on the organization and activation of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons. *Endocrinology*, *133*(6), 2792–2802.
- Chowen, J. A., Freire-Regatillo, A., & Argente, J. (2019). Neurobiological characteristics underlying metabolic differences between males and females. *Progress in Neurobiology*, *176*, 18–32.
- Chronwall, B. M. (1985). Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, *6* Suppl 2, 1–11.
- Chu, X.L., Zhang, T., Kong, F.X., Xiao, Y.Y., & Chi, X.X. (2020). The regulatory effect of genistein on P450 aromatase and follicle-stimulating hormone receptor in mouse experimental model of menopausal metabolic syndrome. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *104*(1), 371–378.
- Clegg, D. J. (2012). Minireview: the year in review of estrogen regulation of metabolism. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *26*(12), 1957–1960.
- Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., & Benoit, S. C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, *55*(4), 978–987.
- Clegg, D. J., Riedy, C. A., Smith, K. A. B., Benoit, S. C., & Woods, S. C. (2003). Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes*, *52*(3), 682–687.
- Cone, R. D. (1999). The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *10*(6), 211–216.

- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8(5), 571–578.
- Cooke, P. S., & Naaz, A. (2004). Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229(11), 1127–1135.
- Crain, D. A., Janssen, S. J., Edwards, T. M., Heindel, J., Ho, S.M., Hunt, P., Iguchi, T., Juul, A., McLachlan, J. A., Schwartz, J., Skakkebaek, N., Soto, A. M., Swan, S., Walker, C., Woodruff, T. K., Woodruff, T. J., Giudice, L. C., & Guillette, L. J., Jr. (2008). Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertility and Sterility*, 90(4), 911–940.
- Crespillo, A., Alonso, M., Vida, M., Pavón, F. J., Serrano, A., Rivera, P., Romero-Zerbo, Y., Fernández-Llebrez, P., Martínez, A., Pérez-Valero, V., Bermúdez-Silva, F. J., Suárez, J., & de Fonseca, F. R. (2011). Reduction of body weight, liver steatosis and expression of stearoyl-CoA desaturase 1 by the isoflavone daidzein in diet-induced obesity: Pharmacological effect of daidzein in obesity. *British Journal of Pharmacology*, 164(7), 1899–1915.
- Davis, K. E., Carstens, E. J., Irani, B. G., Gent, L. M., Hahner, L. M., & Clegg, D. J. (2014). Sexually dimorphic role of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in modulating energy homeostasis. *Hormones and Behavior*, 66(1), 196–207.
- de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S., 2nd, Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M., & Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), 322–327.
- Dearden, L., Bouret, S. G., & Ozanne, S. E. (2021). Nutritional and developmental programming effects of insulin. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(4). <https://doi.org/10.1111/jne.12933>
- Dearden, L., & Ozanne, S. E. (2015). Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 39, 3–16.
- del Abril, A., Segovia, S., & Guillamón, A. (1987). The bed nucleus of the stria terminalis in the rat: regional sex differences controlled by gonadal steroids early after birth. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 32(2), 295–300.
- del Abril, A., Segovia, S., & Guillamón, A. (1990). Sexual dimorphism in the parastrial nucleus of the rat preoptic area. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 52(1–2), 11–15.

- Di Sebastiano, A. R., Yong-Yow, S., Wagner, L., Lehman, M. N., & Coolen, L. M. (2010). Orexin mediates initiation of sexual behavior in sexually naive male rats, but is not critical for sexual performance. *Hormones and Behavior*, *58*(3), 397–404.
- Diamond, M. C., Dowling, G. A., & Johnson, R. E. (1981). Morphologic cerebral cortical asymmetry in male and female rats, *Exp. Neurol*, *71*, 261–268.
- Diamond, M. C., Johnson, R. E., & Ehlert, J. A. (1979). Comparison of cortical thickness in male and female rats-normal and gonadectomized, young and adult. *Behav Neural Biol*, *26*, 485–491.
- Dixon, R. A., & Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, *60*(3), 205–211.
- Döhler, K. D., Coquelin, A., Davis, F., Hines, M., Shryne, J. E., Sickmüller, P. M., Jarzab, B., & Gorski, R. A. (1986). Pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology*, *42*, 443–448.
- Douglas, A. J., Bicknell, R. J., Leng, G., Russell, J. A., & Meddle, S. L. (2002). B-endorphin cells in the arcuate nucleus: Projections to the supraoptic nucleus and changes in expression during pregnancy and parturition: B-endorphin projections to the SON. *Journal of Neuroendocrinology*, *14*(10), 768–777.
- Du, Z. R., Feng, X. Q., Li, N., Qu, J. X., Feng, L., Chen, L., & Chen, W.-F. (2018). G protein-coupled estrogen receptor is involved in the anti-inflammatory effects of genistein in microglia. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, *43*, 11–20.
- Edmunds, K. M., Holloway, A. C., Crankshaw, D. J., Agarwal, S. K., & Foster, W. G. (2005). The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells. *Reproduction, nutrition, development*, *45*(6), 709–720.
- Escribano, J. J. (2010). Evaluación de la eficacia de una dosis diaria de 40-80 mg de isoflavonas de soja (*Glycine max* L.) en el tratamiento de la sintomatología climaterica. Universidad Autónoma de Madrid.
- Fernandez-Garcia, J. M., Carrillo, B., Tezanos, P., Collado, P., & Pinos, H. (2021). Genistein during development alters differentially the expression of POMC in male and female rats. *Metabolites*, *11*(5).
- Fischer, E. K., & O'Connell, L. A. (2017). Modification of feeding circuits in the evolution of social behavior. *The Journal of Experimental Biology*, *220*(1), 92–102.

- Flowers, M., Sanek, N. A., & Levine, J. E. (2014). Maternal Phytoestrogen Consumption Programs Body Weight Regulation By Non-Classical Estrogen Receptor Alpha Signaling in Female Offspring. <https://endo.confex.com/endo/2014endo/webprogram/Paper15289.html>
- Frank, A., Brown, L. M., & Clegg, D. J. (2014). The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(4), 550–557.
- Fusi, F., Trezza, A., Tramaglino, M., Sgaragli, G., Saponara, S., & Spiga, O. (2020). The beneficial health effects of flavonoids on the cardiovascular system: Focus on K⁺ channels. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 152(104625), 104625.
- Gali Ramamoorthy, T., Begum, G., Harno, E., & White, A. (2015). Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 126.
- Gao, H.R., Zhuang, Q.X., Zhang, Y.X., Chen, Z.P., Li, B., Zhang, X.Y., Zhong, Y.T., Wang, J.J., & Zhu, J.N. (2017). Orexin directly enhances the excitability of globus pallidus internus neurons in rat by co-activating OX1 and OX2 receptors. *Neuroscience Bulletin*, 33(4), 365–372.
- Gao, Q., & Horvath, T. L. (2007). Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 367–398.
- Gao, Q., & Horvath, T. L. (2008). Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Letters*, 582(1), 132–141.
- Gao, Q., Mezei, G., Nie, Y., Rao, Y., Choi, C. S., Bechmann, I., Leranth, C., Toran-Allerand, D., Priest, C. A., Roberts, J. L., Gao, X.B., Mobbs, C., Shulman, G. I., Diano, S., & Horvath, T. L. (2007). Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nature Medicine*, 13(1), 89–94.
- García-Segura, L. M., Baetens, D., & Naftolin, F. (1985). Sex differences and maturational changes in arcuate nucleus neuronal plasma membrane organization. *Brain Research*, 351(1), 146–149.
- Gardner, C. D., Newell, K. A., Cherin, R., & Haskell, W. L. (2001). The effect of soy protein with or without isoflavones relative to milk protein on plasma lipids in hypercholesterolemic postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(4), 728–735.
- González-Burgos, I., del Angel-Meza, A. R., & Barajas-López, G. (1993). Morphometric characterization of the arcuate nucleus neurons of the rat. A Golgi study. *Neuroscience Letters*, 155(1), 99–101.
- Gorski, R. A., Gordon, J. H., Shryne, J. E., & Southam, A. M. (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Research*, 148(2), 333–346.

- Greany, K. A., Nettleton, J. A., Wangen, K. E., Thomas, W., & Kurzer, M. S. (2004). Probiotic consumption does not enhance the cholesterol-lowering effect of soy in postmenopausal women. *The Journal of Nutrition*, *134*(12), 3277–3283.
- Grill, H. J., & Kaplan, J. M. (2001). Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *25 Suppl 5*(S5), S73-7.
- Guan, J. L., Saotome, T., Wang, Q. P., Funahashi, H., Hori, T., Tanaka, S., & Shioda, S. (2001). Orexinergic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport*, *12*(3), 547–551.
- Guillamón, A., & Segovia, S. (1997). Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Research Bulletin*, *44*(4), 377–382.
- Guillamón, A., Segovia, S., & del Abril, A. (1988). Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior region and the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *44*(2), 281–290.
- Gundersen, H. J. G., & Jensen, E. B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, *147*(3), 229–263.
- Haas, E., Bhattacharya, I., Brailoiu, E., Damjanović, M., Brailoiu, G. C., Gao, X., Mueller-Guerre, L., Marjon, N. A., Gut, A., Minotti, R., Meyer, M. R., Amann, K., Ammann, E., Perez-Dominguez, A., Genoni, M., Clegg, D. J., Dun, N. J., Resta, T. C., Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2009). Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circulation Research*, *104*(3), 288–291.
- Håkansson, M., de Lecea, L., Sutcliffe, J. G., Yanagisawa, M., & Meister, B. (2001). Leptin Receptor- and STAT3-Immunoreactivities in Hypocretin/Orexin Neurons of the Lateral Hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, *11*(8), 653–663.
- Han, Y., Yuan, K., Zheng, Y., & Lu, L. (2020). Orexin receptor antagonists as emerging treatments for psychiatric disorders. *Neuroscience Bulletin*, *36*(4), 432–448.
- Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1942). The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. *The American Journal of Physiology*, *136*(4), 609–617.
- Hill, J. W., & Faulkner, L. D. (2017). The role of the melanocortin system in metabolic disease: New developments and advances. *Neuroendocrinology*, *104*(4), 330–346.

- Hines, M., & Goy, R. W. (1985). Estrogens before birth and development of sex-related reproductive traits in the female guinea pig. *Hormones and Behavior*, *19*(3), 331–347.
- Hopkins, M.; Blundell, J.; Halford, J.; King, N.; Finlayson, G. (2015). The Regulation of Food Intake in Humans. *Endotext* [Internet]; MDText.com, Inc.: South Dartmouth, MA, USA.
- Horan, T. S., Marre, A., Hassold, T., Lawson, C., & Hunt, P. A. (2017). Germline and reproductive tract effects intensify in male mice with successive generations of estrogenic exposure. *PLoS Genetics*, *13*(7), e1006885.
- Horvath, T. L., Diano, S., & van den Pol, A. N. (1999). Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(3), 1072–1087.
- Horvath, T. L., Peyron, C., Diano, S., Ivanov, A., Aston-Jones, G., Kilduff, T. S., & van Den Pol, A. N. (1999). Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the *locus coeruleus* noradrenergic system. *The Journal of Comparative Neurology*, *415*(2), 145–159.
- Houseknecht, K. L., & Portocarrero, C. P. (1998). Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology*, *15*(6), 457–475.
- Hsu, H. K., Chen, F. N., & Peng, M. T. (1980). Some characteristics of the darkly stained area of the medial preoptic area of rats. *Neuroendocrinology*, *31*(5), 327–330.
- Hsu, H. K., & Peng, M. T. (1978). Hypothalamic neuron number of old female rats. *Gerontology*, *24*(6), 434–440.
- Ibrahim, M. M. H., Bheemanapally, K., Sylvester, P. W., & Briski, K. P. (2020). Sex differences in glucoprivic regulation of glycogen metabolism in hypothalamic primary astrocyte cultures: Role of estrogen receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *518*(111000), 111000.
- Ishii, Y., & Bouret, S. G. (2012). Embryonic birthdate of hypothalamic leptin-activated neurons in mice. *Endocrinology*, *153*(8), 3657–3667.
- Jayagopal, V., Albertazzi, P., Kilpatrick, E. S., Howarth, E. M., Jennings, P. E., Hepburn, D. A., & Atkin, S. L. (2002). Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *25*(10), 1709–1714.
- Jefferson, W. N., Patisaul, H. B., & Williams, C. J. (2012). Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction*, *143*(3), 247–260.

- Jensen, M. N., & Ritskes-Hoitinga, M. (2007). How isoflavone levels in common rodent diets can interfere with the value of animal models and with experimental results. *Laboratory Animals*, *41*(1), 1–18.
- Jungbauer, A., & Medjakovic, S. (2014). Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *139*, 277–289.
- Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z., & Fekete, C. (2009). Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *Journal of Neuroscience Methods*, *184*(1), 115–118.
- Kauffman, A. S., Gottsch, M. L., Roa, J., Byquist, A. C., Crown, A., Clifton, D. K., Hoffman, G. E., Steiner, R. A., & Tena-Sempere, M. (2007). Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, *148*(4), 1774–1783.
- Kelley, L., Verlezza, S., Long, H., Loka, M., & Walker, C. D. (2020). Increased hypothalamic projections to the lateral hypothalamus and responses to Leptin in rat neonates from high fat fed mothers. *Frontiers in neuroscience*, *13*.
- Kelly, M. J., Qiu, J., & Rønnekleiv, O. K. (2005). Estrogen signaling in the hypothalamus. *Vitamins and Hormones*, *71*, 123–145.
- Kelly, M. J., & Rønnekleiv, O. K. (2008). Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *290*(1–2), 14–23.
- Kennedy, G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings. Biological Sciences*, *140*(901), 578–592.
- Khan, S. I., Zhao, J., Khan, I. A., Walker, L. A., & Dasmahapatra, A. K. (2011). Potential utility of natural products as regulators of breast cancer-associated aromatase promoters. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *9*(1).
- Kim, D.J., Seok, S. H., Baek, M. W., Lee, H. Y., Na, Y. R., Park, S. H., Lee, H. K., Dutta, N. K., Kawakami, K., & Park, J. H. (2009). Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein concentrations in zebrafish embryos. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *19*(3), 251–256.
- Kim, J. S., Rizwan, M. Z., Clegg, D. J., & Anderson, G. M. (2016). Leptin signaling is not required for anorexigenic estradiol effects in female mice. *Endocrinology*, *157*(5), 1991–2001.
- Korf, H. W., & Møller, M. (2021). Arcuate nucleus, median eminence, and hypophysial pars tuberalis. En *The Human Hypothalamus - Middle and Posterior Region* (pp. 227–251). Elsevier.

- Kuiper, G. G., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., & Gustafsson, J.Å. (1998). The estrogen receptor β subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *19*(4), 253–286.
- Leal, S., Andrade, J. P., Paula-Barbosa, M. M., & Madeira, M. D. (1998). Arcuate nucleus of the hypothalamus: effects of age and sex. *The Journal of Comparative Neurology*, *401*(1), 65–88.
- Lenz, K. M., & McCarthy, M. M. (2010). Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus: Steroids and the developing hypothalamus. *The European Journal of Neuroscience*, *32*(12), 2096–2104.
- Lephart, E. D. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *22*(1), 1–26.
- Lephart, E. D., Taylor, H., Jacobson, N. A., & Watson, M. A. (1998). Calretinin and calbindin-D28K in male rats during postnatal development. *Neurobiology of Aging*, *19*(3), 253–257.
- Lephart, E. D., Porter, J. P., Hedges, D. W., Lund, T. D., & Setchell, K. D. R. (2004). Phytoestrogens: implications in neurovascular research. *Current Neurovascular Research*, *1*(5), 455–464.
- Lephart, E. D., Porter, J. P., Lund, T. D., Bu, L., Setchell, K. D., Ramoz, G., & Crowley, W. R. (2004). Dietary isoflavones alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine function in Long-Evans male rats. *Nutrition & Metabolism*, *1*(1), 16.
- Li, S.B., & de Lecea, L. (2020). The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. *Neuropharmacology*, *167*(107993), 107993.
- Linford, N. J., Yang, Y., Cook, D. G., & Dorsa, D. M. (2001). Neuronal apoptosis resulting from high doses of the isoflavone genistein: role for calcium and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *299*(1), 67–75.
- Llorente, R., Marraudino, M., Carrillo, B., Bonaldo, B., Simon-Areces, J., Abellanas-Pérez, P., Rivero-Aguilar, M., Fernandez-Garcia, J. M., Pinos, H., Garcia-Segura, L. M., Collado, P., & Grassi, D. (2020). G protein-coupled estrogen receptor immunoreactivity fluctuates during the estrous cycle and show sex differences in the amygdala and dorsal hippocampus. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 537.
- López, M., & Tena-Sempere, M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *26*(8), 411–421.

- Losa, S. M., Todd, K. L., Sullivan, A. W., Cao, J., Mickens, J. A., & Patisaul, H. B. (2011). Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *31*(3), 280–289.
- Luo, J., & Liu, D. (2020). Does GPER really function as a G protein-coupled estrogen receptor in vivo? *Frontiers in endocrinology*, *11*.
- Luo, T., Miranda-Garcia, O., Sasaki, G., Wang, J., & Shay, N. F. (2018). Genistein and daidzein decrease food intake and body weight gain in mice, and alter LXR signaling *in vivo* and *in vitro*. *Food & Function*, *9*(12), 6257–6267.
- MacKay, H., Patterson, Z. R., & Abizaid, A. (2017). Perinatal exposure to low-dose bisphenol-A disrupts the structural and functional development of the hypothalamic feeding circuitry. *Endocrinology*, *158*(4), 768–777.
- Malyala, A., Kelly, M. J., & Rønnekleiv, O. K. (2005). Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids*, *70*(5–7), 397–406.
- Marcos, P., & Coveñas, R. (2021). Involvement of the orexinergic system in feeding. *Applied Sciences (Basel, Switzerland)*, *12*(1), 86.
- Marraudino, M., Carrillo, B., Bonaldo, B., Llorente, R., Campioli, E., Garate, I., Pinos, H., Garcia-Segura, L. M., Collado, P., & Grassi, D. (2021). G protein-coupled estrogen receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus is widely distributed in neurons, astrocytes, and oligodendrocytes, fluctuates during the estrous cycle, and is sexually dimorphic. *Neuroendocrinology*, *111*(7), 660–677.
- Marraudino, M., Farinetti, A., Arevalo, M. A., Gotti, S., Panzica, G., & Garcia-Segura, L. M. (2019). Sexually dimorphic effect of genistein on hypothalamic neuronal differentiation in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10), 2465.
- Marraudino, M., Miceli, D., Farinetti, A., Ponti, G., Panzica, G., & Gotti, S. (2017). Kisspeptin innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus: sexual dimorphism and effect of estrous cycle in female mice. *Journal of Anatomy*, *230*(6), 775–786.
- Marraudino, M., Ponti, G., Moussu, C., Farinetti, A., Macchi, E., Accornero, P., Gotti, S., Collado, P., Keller, M., & Panzica, G. (2021). Early postnatal genistein administration affects mice metabolism and reproduction in a sexually dimorphic way. *Metabolites*, *11*(7), 449.

- Mårtensson, U. E. A., Salehi, S. A., Windahl, S., Gomez, M. F., Swärd, K., Daszkiewicz-Nilsson, J., Wendt, A., Andersson, N., Hellstrand, P., Grände, P.-O., Owman, C., Rosen, C. J., Adamo, M. L., Lundquist, I., Rorsman, P., Nilsson, B. O., Ohlsson, C., Olde, B., & Leeb-Lundberg, L. M. F. (2009). Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology*, *150*(2), 687–698.
- Matsumoto, A., & Arai, Y. (1980). Sexual dimorphism in ‘wiring pattern’ in the hypothalamic arcuate nucleus and its modification by neonatal hormonal environment. *Brain Research*, *190*(1), 238–242.
- Mauvais-Jarvis, F. (2015). Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biology of Sex Differences*, *6*(1), 14.
- Mauvais-Jarvis, F., Bairey Merz, N., Barnes, P. J., Brinton, R. D., Carrero, J.-J., DeMeo, D. L., De Vries, G. J., Epperson, C. N., Govindan, R., Klein, S. L., Lonardo, A., Maki, P. M., McCullough, L. D., Regitz-Zagrosek, V., Regensteiner, J. G., Rubin, J. B., Sandberg, K., & Suzuki, A. (2020). Sex and gender: modifiers of health, disease, and medicine. *Lancet*, *396*(10250), 565–582.
- Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D. J., & Hevener, A. L. (2013). The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine Reviews*, *34*(3), 309–338.
- Mayer, J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England Journal of Medicine*, *249*(1), 13–16.
- Mayer, J. (1996). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *Obesity Research*, *4*(5), 493–496.
- Merchenthaler, I., Lane, M. V., Numan, S., & Dellovade, T. L. (2004). Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: In vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *The Journal of Comparative Neurology*, *473*(2), 270–291.
- Meyer, M. R., Clegg, D. J., Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors: Obesity, insulin resistance and diabetes: role of oestrogen. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *203*(1), 259–269.
- Mitchell, C. S., & Begg, D. P. (2021). The regulation of food intake by insulin in the central nervous system. *Journal of Neuroendocrinology*, *33*(4).
- Mong, J. A., & McCarthy, M. M. (1999). Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes: Implications for synaptic patterning. *Journal of Neurobiology*, *40*(4), 602–619.

- Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *15*(6), 367–378.
- Münzberg, H., & Morrison, C. D. (2015). Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *64*(1), 13–23.
- Murray, R., Bender, K. D., Botham, A., Kennelly, M., Rodwell, P. J., & Weil, V. W. (2013). Harper, Bioquímica Ilustrada. *México*.
- Muschamp, J. W., Dominguez, J. M., Sato, S. M., Shen, R. Y., & Hull, E. M. (2007). A role for hypocretin (orexin) in male sexual behavior. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(11), 2837–2845.
- Myers, M. G., Cowley, M. A., & Münzberg, H. (2008). Mechanisms of Leptin action and Leptin resistance. *Annual Review of Physiology*, *70*(1), 537–556.
- Naaz, A., Zakroczymski, M., Heine, P. A., Taylor, J., Saunders, P. T., Lubahn, D. B., & Cooke, P. S. (2002). Effect of Ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERα): a potential role for estrogen receptor beta (ERβ). *Horm Metab Res*, *34*, 758–763.
- Naftolin, F., Ryan, K. J., & Petro, Z. (1971a). Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human foetuses. *The Journal of Endocrinology*, *51*(4), 795–796.
- Naftolin, F., Ryan, K. J., & Petro, Z. (1971b). Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *33*(2), 368–370.
- Naftolin, F., Ryan, K. J., & Petro, Z. (1972). Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. *Endocrinology*, *90*(1), 295–298.
- Nielsen, A. J., & McNulty, J. (2019). Polyphenolic natural products and natural product–inspired steroidal mimics as aromatase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, *39*(4), 1274–1293.
- Nilsson, I., Johansen, J. E., Schalling, M., Hökfelt, T., & Fetissov, S. O. (2005). Maturation of the hypothalamic arcuate agouti-related protein system during postnatal development in the mouse. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *155*(2), 147–154.
- Olde, B., & Leeb-Lundberg, L. M. F. (2009). GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *20*(8), 409–416.

- Palou, M., Picó, C., McKay, J. A., Sánchez, J., Priego, T., Mathers, J. C., & Palou, A. (2011). Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. *The British Journal of Nutrition*, *106*(5), 769–778.
- Parker, J. A., & Bloom, S. R. (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*, *63*(1), 18–30.
- Patisaul, H. B. (2005). Phytoestrogen action in the adult and developing brain. *Journal of Neuroendocrinology*, *17*(1), 57–64.
- Patisaul, H. B., & Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *31*(4), 400–419.
- Patisaul, H. B., Melby, M., Whitten, P. L., & Young, L. J. (2002). Genistein affects ER beta- but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology*, *143*(6), 2189–2197.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2015). *The rat brain, 7ª edición*. Elsevier Ltd.
- Pedram, A., Razandi, M., Lewis, M., Hammes, S., & Levin, E. R. (2014). Membrane-localized estrogen receptor α is required for normal organ development and function. *Developmental Cell*, *29*(4), 482–490.
- Peng, M. T., & Hsu, H. K. (1982). No neuron loss from hypothalamic nuclei of old male rats. *Gerontology*, *28*(1), 19–22.
- Pérez, S. E., Chen, E. Y., & Mufson, E. J. (2003). Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *145*(1), 117–139.
- Périan, S., & Vanacker, J. M. (2020). GPER as a receptor for endocrine-disrupting chemicals (EDCs). *Frontiers in endocrinology*, *11*.
- Pilozzi, A., Carro, C., & Huang, X. (2020). Roles of β -endorphin in stress, behavior, neuroinflammation, and brain energy metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 338.
- Pinos, H., Carrillo, B., Díaz, F., Chowen, J. A., & Collado, P. (2018). Differential vulnerability to adverse nutritional conditions in male and female rats: Modulatory role of estradiol during development. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *48*, 13–22.

- Pinos, H., Collado, P., Rodríguez-Zafra, M., Rodríguez, C., Segovia, S., & Guillamón, A. (2001). The development of sex differences in the *locus coeruleus* of the rat. *Brain Research Bulletin*, *56*(1), 73–78.
- Ponti, G., Rodriguez-Gomez, A., Farinetti, A., Marraudino, M., Filice, F., Foglio, B., Sciacca, G., Panzica, G. C., & Gotti, S. (2017). Early postnatal genistein administration permanently affects nitrenergic and vasopressinergic systems in a sex-specific way. *Neuroscience*, *346*, 203–215.
- Ponti, G., Farinetti, A., Marraudino, M., Panzica, G., & Gotti, S. (2019). Postnatal genistein administration selectively abolishes sexual dimorphism in specific hypothalamic dopaminergic system in mice. *Brain Research*, *1724*(146434), 146434.
- Poschner, S., Maier-Salamon, A., Zehl, M., Wackerlig, J., Dobusch, D., Pachmann, B., Sterlini, K. L., & Jäger, W. (2017). The impacts of genistein and daidzein on estrogen conjugations in human breast cancer cells: A targeted metabolomics approach. *Frontiers in pharmacology*, *8*.
- Prossnitz, E. R., & Hathaway, H. J. (2015). What have we learned about GPER function in physiology and disease from knockout mice? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *153*, 114–126.
- Qiu, J., Bosch, M. A., Tobias, S. C., Grandy, D. K., Scanlan, T. S., Ronnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (2003). Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(29), 9529–9540.
- Qiu, J., Bosch, M. A., Tobias, S. C., Krust, A., Graham, S. M., Murphy, S. J., Korach, K. S., Chambon, P., Scanlan, T. S., Rønnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (2006). A G-protein-coupled estrogen receptor is involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(21), 5649–5655.
- Qiu, J., Bosch, M. A., Zhang, C., Rønnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (2020). Estradiol protects neuropeptide Y/Agouti-related peptide neurons against insulin resistance in females. *Neuroendocrinology*, *110*(1–2), 105–118.
- Rice, D., & Barone, S., Jr (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, *108 Suppl 3*, 511–533.
- Roepke, T. A. (2009). Oestrogen modulates hypothalamic control of energy homeostasis through multiple mechanisms. *Journal of Neuroendocrinology*, *21*(2), 141–150.

- Roepke, T. A., Yang, J. A., Yasrebi, A., Mamounis, K. J., Oruc, E., Zama, A. M., & Uzumcu, M. (2016). Regulation of arcuate genes by developmental exposures to endocrine-disrupting compounds in female rats. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *62*, 18–26.
- Roepke, T. A., Yasrebi, A., Villalobos, A., Krumm, E. A., Yang, J. A., & Mamounis, K. J. (2017). Loss of ER α partially reverses the effects of maternal high-fat diet on energy homeostasis in female mice. *Scientific Reports*, *7*(1).
- Roseberry, A. G., Liu, H., Jackson, A. C., Cai, X., & Friedman, J. M. (2004). Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron*, *41*(5), 711–722.
- Ruhlen, R. L., Howdeshell, K. L., Mao, J., Taylor, J. A., Bronson, F. H., Newbold, R. R., Welshons, W. V., & vom Saal, F. S. (2008). Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the “fetal estrogenization syndrome” and obesity in CD-1 mice. *Environmental Health Perspectives*, *116*(3), 322–328.
- Russell, N., & Grossmann, M. (2019). Mechanisms in endocrinology: Estradiol as a male hormone. *European journal of endocrinology*, *181*(1), R23–R43. <https://doi.org/10.1530/eje-18-1000>
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R. S., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., ... Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, *92*(4), 573–585.
- Santollo, J., & Daniels, D. (2015). Multiple estrogen receptor subtypes influence ingestive behavior in female rodents. *Physiology & Behavior*, *152*, 431–437.
- Santti, R., Mäkelä, S., Strauss, L., Korkman, J., & Kostian, M.-L. (1998). Phytoestrogens: Potential endocrine disruptors in males. *Toxicology and Industrial Health*, *14*(1–2), 223–237.
- Sato, T., Miyagawa, S., & Iguchi, T. (2016). Estradiol-17 β . En *Handbook of Hormones* (pp. 520-e94G-4). Elsevier.
- Sawai, N., Iijima, N., Takumi, K., Matsumoto, K., & Ozawa, H. (2012). Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rats. *Neuroscience Research*, *74*(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2012.05.011>

- Schafer, D., Kane, G., Colledge, W. H., Piet, R., & Herbison, A. E. (2018). Sex- and sub region-dependent modulation of arcuate kisspeptin neurones by vasopressin and vasoactive intestinal peptide. *Journal of Neuroendocrinology*, *30*(12), e12660.
- Scott, N., Prigge, M., Yizhar, O., & Kimchi, T. (2015). A sexually dimorphic hypothalamic circuit controls maternal care and oxytocin secretion. *Nature*, *525*(7570), 519–522.
- Segovia, S., Garcia-Falgueras, A., Carrillo, B., Collado, P., Pinos, H., Perez-Laso, C., Vinader-Caerols, C., Beyer, C., & Guillamon, A. (2006). Sexual dimorphism in the vomeronasal system of the rabbit. *Brain Research*, *1102*(1), 52–62.
- Setchell, K. D. R. (2006). Assessing risks and benefits of genistein and soy. *Environmental Health Perspectives*, *114*(6), A332-3.
- Sharma, G., Hu, C., Brigman, J. L., Zhu, G., Hathaway, H. J., & Prossnitz, E. R. (2013). GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. *Endocrinology*, *154*(11), 4136–4145.
- Sharma, G., Hu, C., Staquicini, D. I., Brigman, J. L., Liu, M., Mauvais-Jarvis, F., Pasqualini, R., Arap, W., Arterburn, J. B., Hathaway, H. J., & Prossnitz, E. R. (2020). Preclinical efficacy of the GPER-selective agonist G-1 in mouse models of obesity and diabetes. *Science Translational Medicine*, *12*(528), eaau5956.
- Sharma, G., & Prossnitz, E. R. (2017). G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) and sex-specific metabolic homeostasis. En *Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity* (pp. 427–453). Springer International Publishing.
- Shen, W., Yao, T., Kong, X., Williams, K. W., & Liu, T. (2017). Melanocortin neurons: Multiple routes to regulation of metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1863*, 2477–2485.
- Shi, H., & Clegg, D. J. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology & Behavior*, *97*(2), 199–204.
- Shi, H., Sorrell, J. E., Clegg, D. J., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2010). The roles of leptin receptors on POMC neurons in the regulation of sex-specific energy homeostasis. *Physiology & Behavior*, *100*(2), 165–172.
- Shughrue, P. J., Komm, B., & Merchenthaler, I. (1996). The distribution of estrogen receptor- β mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*, *61*(12), 678–681.

- Shughrue, P. J., & Merchenthaler, I. (2001). Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, *436*(1), 64–81.
- Sirotkin, A. V., & Harrath, A. H. (2014). Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology*, *741*, 230–236.
- Sobrino, C., Perianes, A., Puebla, L., Barrios, V., & Arilla E. (2014). Peptides and Food Intake. *Frontiers in endocrinology*, *5*.
- Sohn, J. W., Xu, Y., Jones, J. E., Wickman, K., Williams, K. W., & Elmquist, J. K. (2011). Serotonin 2C receptor activates a distinct population of arcuate pro-opiomelanocortin neurons via TRPC channels. *Neuron*, *71*(3), 488–497.
- Steculorum, S. M., & Bouret, S. G. (2011). Developmental effects of ghrelin. *Peptides*, *32*(11), 2362–2366.
- Stincic, T. L., Rønnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (2018). Diverse actions of estradiol on anorexigenic and orexigenic hypothalamic arcuate neurons. *Hormones and Behavior* (Vol. 104). Academic Press Inc.
- Thangavel, P., Puga-Olguín, A., Rodríguez-Landa, J. F., & Zepeda, R. C. (2019). Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(21), 3892.
- Thomas, P., & Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *102*(1–5), 175–179.
- Toda, C., Santoro, A., Kim, J. D., & Diano, S. (2017). POMC neurons: From birth to death. *Annual Review of Physiology*, *79*(1), 209–236.
- Tong, Q., Ye, C.-P., Jones, J. E., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature Neuroscience*, *11*(9), 998–1000.
- Tsuneki, H., Wada, T., & Sasaoka, T. (2010). Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *198*(3), 335–348.
- Vail, G. M., & Roepke, T. A. (2020). Organophosphate flame retardants excite arcuate melanocortin circuitry and increase neuronal sensitivity to ghrelin in adult mice. *Endocrinology*, *161*(11).

- van den Pol, A. N., Acuna, C., Davis, J. N., Huang, H., & Zhang, X. (2019). Defining the caudal hypothalamic arcuate nucleus with a focus on anorexic excitatory neurons. *The Journal of Physiology*, *597*(6), 1605–1625.
- Walker, D. M., Goetz, B. M., & Gore, A. C. (2014). Dynamic postnatal developmental and sex-specific neuroendocrine effects of prenatal polychlorinated biphenyls in rats. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *28*(1), 99–115.
- Walker, D. M., Kermath, B. A., Woller, M. J., & Gore, A. C. (2013). Disruption of reproductive aging in female and male rats by gestational exposure to estrogenic endocrine disruptors. *Endocrinology*, *154*(6), 2129–2143.
- Wang, A., Luo, J., Moore, W., Alkhalidy, H., Wu, L., Zhang, J., Zhen, W., Wang, Y., Clegg, D. J., Bin Xu, Cheng, Z., McMillan, R. P., Hulver, M. W., & Liu, D. (2016). GPR30 regulates diet-induced adiposity in female mice and adipogenesis in vitro. *Scientific Reports*, *6*, 34302.
- Wang, L., & Moenter, S. M. (2020). Differential roles of hypothalamic AVPV and arcuate kisspeptin neurons in estradiol feedback regulation of female reproduction. *Neuroendocrinology*, *110*(3–4), 172–184.
- Wardlaw, S. L. (2011). Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance. *European Journal of Pharmacology*, *660*(1), 213–219.
- West, M. J. (2012). Estimating volume in biological structures. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2012*(11), db top071787.
- Williams, R. W., & Herrup, K. (1988). The control of neuron number. *Annual Review of Neuroscience*, *11*(1), 423–453.
- Wimer, R. E., Wimer, C. C., Vaughn, J. E., Barber, R. P., Balvanz, B. A., & Chernow, C. R. (1976). The genetic organization of neuron number in Ammon's horns of house mice. *Brain Research*, *118*(2), 219–243.
- Woods, S. C., Benoit, S. C., Clegg, D. J., & Seeley, R. J. (2004). Regulation of energy homeostasis by peripheral signals. Best Practice and Research. *Clinical Endocrinology and Metabolism*, *18*(4), 497–515.
- Woods, S. C. (2013). Metabolic signals and food intake. Forty years of progress. *Appetite*, *71*, 440–444.
- Xiao, Y. Q., Shao, D., Tong, H. B., & Shi, S. R. (2019). Genistein increases progesterone secretion by elevating related enzymes in chicken granulosa cells. *Poultry Science*, *98*(4), 1911–1917.

- Yang, J. A., Yasrebi, A., Snyder, M., & Roepke, T. A. (2016). The interaction of fasting, caloric restriction, and diet-induced obesity with 17 β -estradiol on the expression of KNDy neuropeptides and their receptors in the female mouse. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *437*, 35–50.
- Yang, S. L., Hsu, C., Hsu, H. K., Liu, K. M., & Peng, M. T. (1993). Effects of long-term estradiol exposure on the hypothalamic neuron number. *Acta Endocrinologica*, *129*(6), 543–547.
- Yoshimura, R., Yamamoto, E., & Endo, Y. (2011). Morphological effects of isoflavones (daidzein and genistein) on hypothalamic oxytocin neurons in the neonatal mouse brain slice cultures. *Neuroscience Letters*, *505*(2), 87–92.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*(6505), 425–432.
- 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.

Anexo _____

Abridged Thesis in English

Doctoral Thesis

Abridged Thesis in English

2023



EFFECTS OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON HYPOTHALAMUS ORGANIZATION IN RATS

Jose Manuel Fernández Garcia

Doctoral Program in Health Psychology

Director:

Dr. Helena Pinos Sánchez

Abstract

Phytoestrogens are a class of plant compounds with structure and actions similar to mammalian oestrogens that, despite being included in the category of endocrine disruptors, are considered to be beneficial to health. Genistein, a phytoestrogen belonging to the isoflavone family, is present in high concentrations in soybeans, a legume from Asia which is commonly used in drink form as a substitute for breast milk or cow's milk. Due to the increase in the consumption of foods derived from soy that has occurred in recent years in Western societies and the ability of genistein to act as an endocrine disruptor, the objective of this thesis is to determine the long-term effects of administering this phytoestrogen during the second week of postnatal life on some of the hypothalamic nuclei that regulate food intake and energy metabolism.

For this purpose, Wistar rats of both sexes were injected with different doses of genistein, 10 µg/gr of body weight or 50 µg/gr of body weight, from postnatal day 6 to postnatal day 13. Physiological parameters such as caloric intake and body weight were recorded weekly from postnatal day 33 to postnatal day 89. On the day of the sacrifice, postnatal day 90, plasma was collected in order to determine oestradiol and testosterone levels. Once the brain was fixed with paraformaldehyde, an immunohistochemical process was carried out to analyse the expression of both proopiomelanocortin and G-protein-coupled estrogenic membrane receptor, GPER, in the arcuate nucleus of the hypothalamus. Orexin expression was analysed in the dorsomedial hypothalamus, the perifornical area, and the lateral hypothalamus. In addition, the effect of treatment with genistein on the morphology of the arcuate nucleus regarding the volume and number of neurons was studied, using Nissl staining with cresyl violet.

In the analysis of physiological variables, the results show a delay in the appearance of normal sexual dimorphism in body weight in the groups treated with the highest dose of genistein. Plasma testosterone levels were not affected by genistein, but instead, oestradiol levels increased in both males and females, with a marked increase in males in the high-dose group. As regards the expression of the food intake regulatory peptides studied, a significant decrease in the number of immunoreactive proopiomelanocortin cells in the medial subdivision of the arcuate

nucleus was found in the two groups of females treated with genistein. However, no alteration in the number of orexin neurons was observed in either males or females. In the analysis of the expression of the estrogenic membrane receptor GPER in the arcuate nucleus, sexual dimorphism was found in the medial posterior subdivision, with a larger number of neurons in the control group males with respect to the females of the same group. The effects of genistein treatment on GPER expression occur exclusively in males in all subdivisions of the arcuate nucleus except in the medial subdivision, with patterns dependent on the area studied and the dose. In the study of the morphology of the arcuate nucleus, the estimation of the volume and number of neurons of this nucleus, made by Nissl staining with cresyl violet, revealed the existence of sexual dimorphism, since a greater volume and number of neurons was found in the male control groups with respect to the same group of females in the posterior medial subdivision of the arcuate nucleus. Likewise, it has been possible to verify that treatment with low dose genistein has an effect on the morphology of the nucleus in females, increasing the number of neurons in the medial subdivision.

These results are in line with those previously described in the literature on the effects of phytoestrogens, results in which dose and sex are fundamental parameters for studying the consequences of including these compounds in the diet, both in early development and in adults. Additionally, in this thesis the importance of studying the different areas of the arcuate nucleus is highlighted, since the effects of the treatment with genistein found in the subdivisions of the arcuate nucleus could be reflecting the different functions of each subdivision in the processes in which it intervenes. Many factors affect the mechanisms underlying these processes, but nutrition seems to be one of the most relevant. A significant number of studies have shown that alterations in adulthood in the system controlling energy metabolism are due to a poor diet during the early pre and postnatal periods, be it quantity or quality, and the study of compounds with estrogenic properties can help to clarify the factors through which these circuits are programmed and the role they play in these early periods of development.

Keywords: genistein, arcuate nucleus, oestradiol, proopiomelanocortin, orexin, GPER

Abbreviations

- %:** Percentage.
- °C:** Grades (centigrade).
- α -MSH:** Melanocyte-stimulating hormone.
- μ m:** Micras.
- ACTH:** Corticotropin.
- AgRP:** Agouti-related protein
- ANOVA:** Analysis of variance.
- ARC:** Arcuate nucleus of the hypothalamus.
- ArcD:** Dorsal subdivision of the arcuate nucleus.
- ArcL:** Lateral subdivision of the arcuate nucleus.
- ArcLP:** Lateral posterior subdivision of the arcuate nucleus.
- ArcM:** Medial subdivision of the arcuate nucleus.
- ArcMP:** Medial posterior subdivision of the arcuate nucleus.
- BPA:** Bisphenol A.
- BSA:** Bovine serum albumin.
- BNST:** Bed nucleus of the stria terminalis.
- CART:** Cocaine and amphetamine-regulated transcript.
- CeA:** Central nucleus of the amygdala.
- DAB:** Diaminobenzidine.
- DEC:** Endocrine disruptor.
- DMH:** Dorsomedial hypothalamus nucleus.
- DMV:** Dorsal motor nucleus of the vagus.
- DNA:** Deoxyribonucleic acid.
- EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid.
- ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay.
- ER:** Oestrogen receptor.
- ER α :** Oestrogen receptor α .
- ER β :** Oestrogen receptor β .
- ERE:** Oestrogen response element.
- GABA:** Gamma-aminobutyric acid.
- GP α R:** G-protein-coupled oestrogen membrane receptor.
- LH:** Lateral hypothalamus.
- LC:** *Locus coeruleus*.
- LepR:** Leptin receptor.
- MCR3:** Melanocortin receptor 3.
- MCR4:** Melanocortin receptor 4.
- ME:** Medium eminence.
- ml:** Millilitres.
- mm:** Millimetres.
- mm²:** Square millimetres.
- mm³:** Cubic millimetres.
- mPOA:** Medial preoptic area.
- N α cc:** Nucleus *accumbens*.
- NPY:** Neuropeptide Y.
- NTS:** Nucleus of the solitary tract.
- OXR1:** Orexin receptor 1.
- OXR2:** Orexin receptor 2.
- PB:** Parabrachial nucleus.
- PBS:** Saline phosphate buffer.
- PFA:** Perifornical area.
- POMC-ir:** Proopiomelanocortin immunoreactive neurons.
- Pomc:** Proopiomelanocortin gene.
- POMC:** Proopiomelanocortin.
- PVH:** Paraventricular nucleus of the hypothalamus.
- RNA:** Ribonucleic acid.
- S-N-K:** Student–Newman–Keuls.
- s.c.:** Subcutaneous injection.
- SDN-POA:** Sexually dimorphic nucleus of the preoptic area.
- STAT3:** Signal transducer and transcription activator 3.
- TSH:** Thyroid-stimulating hormone
- VMH:** Ventromedial hypothalamus.

Experimental groups

CM: Male rat control group.

G10M: Male rats treated with the low dose of genistein (10µg/gr).

G50M: Male rats treated with the high dose of genistein (50µg/gr).

CF: Female rat control group.

G10F: Female rats treated with the low dose of genistein (10µg/gr).

G50F: Female rats treated with the high dose of genistein (50µg/gr).

Index

Introduction	150
1. ENERGY HOMEOSTASIS AND FOOD INTAKE BEHAVIOUR	150
2. NEUROENDOCRINE CONTROL OF FOOD INTAKE BEHAVIOUR.....	150
2.1. <i>Proopiomelanocortin</i>	151
2.2. <i>Orexin in the regulation of food intake behaviour</i>	153
3. HYPOTHALAMIC CIRCUITS THAT REGULATE INTAKE BEHAVIOUR: THE ARCUATE NUCLEUS OF THE HYPOTHALAMUS	154
3.1. <i>Sexual dimorphism in the arcuate nucleus</i>	155
4. THE ROLE OF OESTRADIOL IN REGULATING FOOD INTAKE BEHAVIOUR	156
5. PHYTOESTROGENS.....	157
5.1. <i>Genistein</i>	158
Objectives	161
Material and methods	162
1. ANIMALS	162
2. PROCESSING	162
3. TISSUE PREPARATION	164
4. PLASMA LEVELS OF OESTRADIOL AND TESTOSTERONE	164
5. IMMUNOHISTOCHEMISTRY PROCESSING.....	165
6. ESTIMATION OF THE NUMBER OF NEURONS	165
6.1. <i>Estimation of the number of POMC-ir neurons in the ARC</i>	166
6.2. <i>Estimation of number of orexin-ir neurons in the ARC</i>	168
6.3. <i>Estimation of the number of GPER-ir neurons in the ARC</i>	169
6.4. <i>Nissl staining</i>	170
6.4.1. Volume estimation	171
6.4.2. Estimation of the number of neurons	172
7. STATISTICAL ANALYSIS	174
Results	175
1. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON THE EVOLUTION OF BODY WEIGHT	175
2. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON FOOD INTAKE	176
3. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON PLASMA LEVELS OF OESTRADIOL AND TESTOSTERONE.....	177
3.1. <i>Oestradiol</i>	177
3.2. <i>Testosterone</i>	179
4. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON THE NUMBER OF POMC-IR NEURONS	179
5. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON THE NUMBER OF OREXIN-IR NEURONS	180
6. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON THE NUMBER OF GPER-IR NEURONS	180
7. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON ARC VOLUME	183
8. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON THE NUMBER OF NEURONS IN THE ARC.....	184
9. EFFECT OF GENISTEIN EXPOSURE DURING DEVELOPMENT ON ARC DENSITY	187
Discussion	188
Conclusions	198

Index of figures

Figure 1. Peptides involved in the regulation of food intake	151
Figure 2. Diagram of the central melanocortin system.....	152
Figure 3. Representation of genistein’s molecular structure	160
Figure 4. Schematic representation of the procedure used	163
Figure 5. Micrographs of a series of POMC-ir neurons in coronal sections	166
Figure 6. Detail of the atlas of the rat brain marking the subdivisions of the ARC according to Paxinos and Watson (2015).....	167
Figure 7. Grid and marking by the ImageJ software of POMC-ir neurons in the ARC.....	167
Figure 8. Micrographs with immunohistochemical marking of orexin-ir neurons in two coronal sections in the LH and the PFA/DMH continuum.....	168
Figure 9. Micrograph of a coronal section showing the grid and marking by imageJ software of orexin-positive neurons in the PFA/DMH (blue) and LH (red) continuum	168
Figure 10. Immunohistochemical labeling showing positive examples for GPER-ir.....	169
Figure 11. Micrographs showing the grid with quadrants with an area of 3300 μm^2 and marking of the GPER-ir cells for quantitative analysis	170
Figure 12. Grid with quadrants with an area of 3300 μm^2 on a micrograph of a coronal section of the ARC with Nissl staining.....	172
Figure 13. Image of a histological section with Nissl staining in the ARC.....	173
Figure 14. Image of a section with Nissl staining with a grid with area quadrants of 1497.69 μm^2 and the marking used to estimate the number of neurons	173
Figure 15. Evolution of weight during development in all groups	175
Figure 16. Weight at perfusion (P90) in all groups.....	176
Figure 17. Evolution of food intake during development in all groups.....	176
Figure 18. Total food intake (P90) in all groups	177
Figure 19. Plasma oestradiol concentrations in all groups.....	178
Figure 20. Plasma oestradiol concentrations in males.....	178
Figure 21. Plasma oestradiol concentrations in females	178
Figure 22. Number of POMC-ir neurons in ArcM subdivision	179
Figure 23. Micrographs of coronal sections showing the reduction produced by genistein in the ArcM subdivision	180
Figure 24. Number of GPER-ir neurons in the ArcMP subdivision in the control groups.....	181
Figure 25. Micrographs of coronal sections showing the sexual dimorphism in the ArcMP subdivision	181
Figure 26. Number of GPER-ir neurons in the ArcL subdivision in males and ArcL location in the rat brain atlas by Paxinos and Watson (2015)	182
Figure 27. Number of GPER-ir neurons in the ArcMP subdivision in males and ArcMP location in the rat brain atlas by Paxinos and Watson (2015)	182
Figure 28. Number of GPER-ir neurons in the ArcLP subdivision in males and ArcLP location in the rat brain atlas by Paxinos and Watson (2015)	183
Figure 29. Volume of the ArcMP subdivision in the control groups.....	183

Figure 30. Number of neurons of the ArcMP subdivision in the control groups184

Figure 31. Micrographs showing the lower number of neurons in the ArcMP subdivision in the female control group.....184

Figure 32. Number of neurons of the ArcL subdivision in the low-dose G10 groups.....185

Figure 33. Micrographs showing the lower number of neurons in the ArcL subdivision in male low-dose G10 group.....185

Figure 34. Number of ArcMP subdivision neurons in the low-dose G10 groups185

Figure 35. Micrographs showing the lower number of neurons in the ArcMP subdivision in female low-dose G10 group186

Figure 36. Number of ArcD subdivision neurons in the high-dose G50 groups186

Figure 37. Micrographs showing the lower number of neurons in the ArcD subdivision in the male high-dose G50 group186

Figure 38. Number of neurons in the ArcM subdivision in females and ArcM location in the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2015).....187

Figure 39. Density of the ArcL subdivision in the low-dose G10 groups187

Introduction

1. Energy homeostasis and food intake behaviour

In 1929, Walter Cannon introduced the concept of homeostasis to refer to the mechanism by which organisms maintain internal physiological variables within adequate parameters (Cannon, 1929). Related to this concept, energy homeostasis refers to the biological process that regulates the balance between energy supply and expenditure through food intake and metabolism. This process is modulated by various factors, both external and internal, which integrate the signals of hunger, satiety and adiposity that will determine food intake behaviour and the regulation of energy balance. Among the external factors that regulate food intake are social and environmental factors, such as timing, context, circadian rhythms, and hedonic memories, which determine guidelines for regulating how often you eat, as well as the quality and quantity of food you eat at each meal. Also, within the external factors are highly important sensory factors associated with the consumption of food, such as palatability, which can induce people to increase the amount of food that is ingested or to choose certain foods from the different options available. A well-characterized phenomenon in the literature associated with palatability is sensory specific satiety, which produces a decline in the pleasure associated with food when ingested continuously (Hopkins et al., 2015; Chapelot and Charlot, 2019). As for internal factors, there are numerous neuroendocrine compounds involved in appetite control, whose discovery over the last 100 years has served to clarify and identify the mechanisms that regulate food intake.

2. Neuroendocrine control of food intake behaviour

Neuroendocrine control of food intake behaviour occurs by activating different structures in the central nervous system, mainly in the hypothalamus, which respond to peripheral signals coming from the gastrointestinal system and adipose tissue. These structures set in motion the central circuits responsible for regulating energy metabolism through the secretion of various neuropeptides, whose function is to promote the initiation or cessation of food intake with the aim of achieving adequate energy homeostasis. Figure 1 shows a diagram with the main peptides, both central and peripheral, involved in the regulation of food intake behaviour.

At the centre of the integration of food intake signals is the arcuate nucleus (ARC), which due to its strategic location in the ventral area of the hypothalamus, has the capacity to integrate peripheral hormonal signals and activate central signalling pathways in the mammalian brain. One of the most important neuronal populations in the ARC are the neurons that express proopiomelanocortin (POMC), part of the melanocortin system, that respond to some of the principal hormones and neurotransmitters implicated in the regulation of food intake behaviour, such as leptin, insulin, serotonin and oestradiol (Toda et al., 2017). This neuropeptide, together with orexin, has been the target of study in the present research, so in the following section its main characteristics are defined.

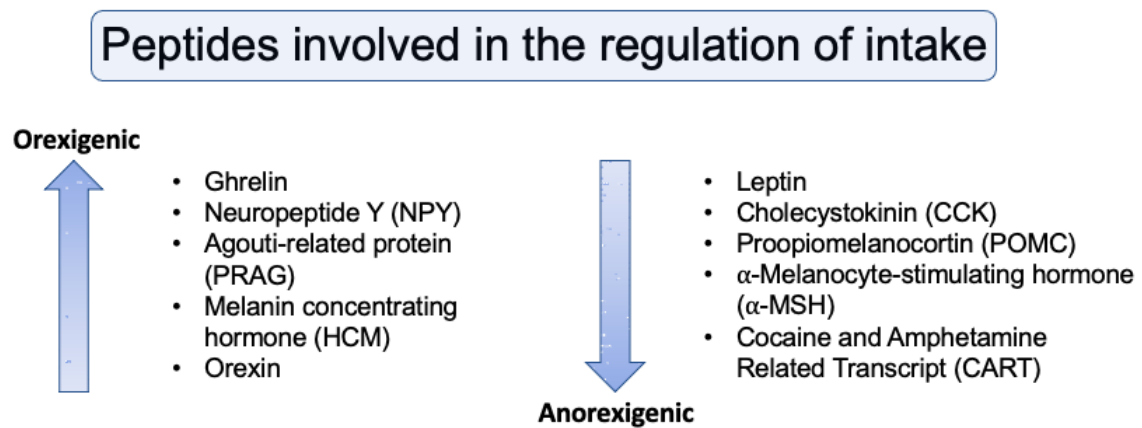


Figure 1. Peptides involved in the regulation of food intake.

2.1. Proopiomelanocortin

The neuropeptide POMC is part of the melanocortin system, one of the neural pathways most studied in the regulation of energy homeostasis due to its influence on food intake, glucose regulation and blood pressure, among other processes. In addition to the neuronal populations that express POMC in the ARC, other populations included in this system are the neuropeptide Y (NPY) and Agouti-related protein (AgRP) neurons in the ARC, the POMC neurons in the nucleus of the solitary tract (NTS) and the melanocortin receptors 3 and 4 (MCR3 and MCR4) (Cone, 2005). An outline of the melanocortin system is shown in Figure 2. Proopiomelanocortin is a precursor molecule of several peptides, such as α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), corticotropin (ACTH) and β -endorphin, and its privileged location in the ARC of the hypothalamus and the NTS of the brainstem gives it the ability to interact with numerous hormonal signals and other brain structures (Cone, 1999; Hill and Faulkner, 2017).

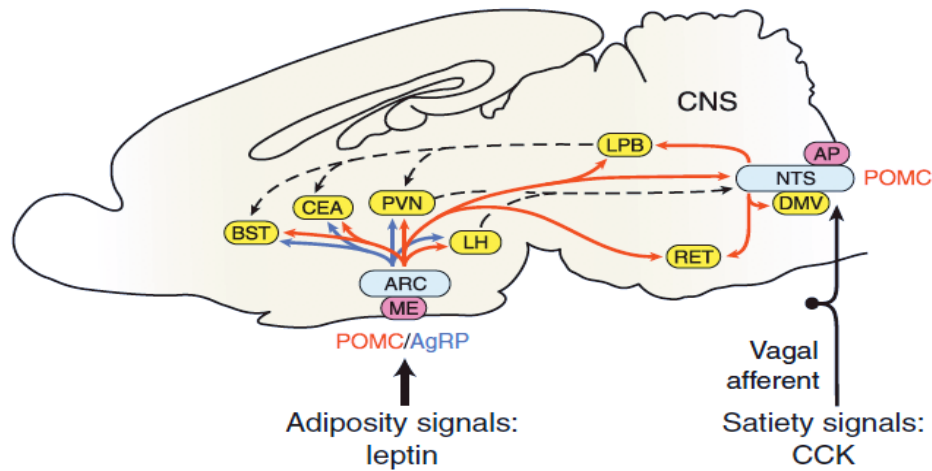


Figure 2. Diagram of the central melanocortin system. In blue, nuclei with POMC; yellow neurons, nuclei containing MCR4-positive neurons; red arrows, projections of POMC neurons; blue arrows, projections of neurons of AgRP neurons; dotted arrows, secondary projections that join POMC neurons in the hypothalamus and brainstem with common effector sites. AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; BNST, bed nucleus of the stria terminalis; CeA, central nucleus of the amygdala; DMV, dorsal motor nucleus of the vagus; LH, lateral hypothalamus; LPB, lateral parabrachial nucleus; ME, middle eminence; NTS, nucleus of the solitary tract; PVH, paraventricular nucleus of the hypothalamus; RET, reticular nucleus. Adapted from Cone (2005).

Within the melanocortin system, the neuronal populations that express POMC seem to be the main integrators of the homeostatic signals that reach the ARC, so they play a fundamental role in the regulation of energy balance in both the short and long term. Mice with *Pomc* gene deletion or POMC neuron ablation are obese while, in contrast, genetic models of POMC overexpression have been shown to protect against obesity (Wardlaw, 2011; Toda et al., 2017). In addition to their important role in regulating metabolism and food intake behaviour, POMC-expressing neuronal populations also play a very important role in the development of hypothalamic circuit connections. In mice, the projections to other hypothalamic nuclei are incomplete at birth, and in response to increased leptin levels between postnatal day 6 (P6) and P14, axonal growth is completed. (Bouret, 2010; Toda et al., 2017).

2.2. Orexin in the regulation of food intake behaviour

In addition to POMC, the other neuropeptide related to food intake behaviour studied in detail in this thesis is orexin. Orexin or hypocretin is a neuropeptide discovered almost simultaneously by two research groups in 1998 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). It was initially attributed a role in the central feedback that regulates food intake, while later its field of action was expanded to the control of the sleep-wake cycle, the processing of reward related feeding behaviours and glucose metabolism (Marcos and Coveñas, 2021).

The name comes from the Greek word "orexis" which means appetite, since it can stimulate the consumption of food when administered centrally. It occurs exclusively in the lateral hypothalamus (LH), the dorsomedial hypothalamus (DMH) and the perifornical area (PFA). There are two forms of this peptide, orexin A and orexin B, which act on two different G-protein-coupled receptors (OXR1 and OXR2), derived from separate genes and expressed differently throughout the central nervous system.

Research on orexin that has been conducted for more than twenty years has shown that intracerebroventricular injections of orexin A increase food intake in rats, especially the intake of high-fat foods. Its location in the LH, DMH and PFA gives orexin a very important role in the integration of the hedonic aspects of feeding, since it sends afferences to the neuronal populations that express both NPY and POMC in the ARC and to the ventral tegmental area (VTA) of the mesolimbic pathway of the reward circuits (Gao et al., 2019; Marcos and Coveñas, 2021). In rats, the results of various studies reveal that orexin neurons in the LH directly innervate the ARC, forming synapses with neurons expressing NPY and POMC (Guan et al., 2001). In addition, orexin-expressing neurons also show immunoreactivity to the leptin receptor (LepR), which could indicate the existence of a direct interaction between leptin and orexin, intervening in the central regulation of metabolic and endocrine processes in both rodents and primates (Horvath, Diano y van den Pol., 1999).

The extensive projections of the neurons that express orexin in the hypothalamus show the great variety of physiological functions regulated by these neuronal populations, turning the orexinergic system into a possible integrator of the different homeostatic signals via both direct and indirect connections between the different hypothalamic nuclei and the mesolimbic reward system.

3. Hypothalamic circuits that regulate intake behaviour: the arcuate nucleus of the hypothalamus

In the ARC, the circuits that communicate with other hypothalamic structures are integrated to exert their orectic and anorectic effects. The neuronal populations that express NPY and POMC in the ARC innervate the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH) and the LH to produce both the orexigen and anorectic responses that regulate food intake behaviour. In addition to the hypothalamic nuclei, other regions of the brainstem participate in the regulation of food intake. For example, the NTS connects signals from the gastrointestinal system and hypothalamus, forming projections with the PVH and the ARC through the parabrachial nucleus (PB). Likewise, the metabolic information channelled by the ARC also modulates the activity of the mesolimbic dopaminergic system through connections to the nucleus *accumbens* (NAcc) to the LH and the VTA, acting in the striated and cortical reward systems to modulate the motivational aspect of eating in conjunction with the homeostatic systems (Grill and Kaplan, 2001; Gao and Horvath, 2008; Bake et al., 2020). All of the above highlights the important role of the ARC in the integration and regulation of the signals that regulate the intake behaviour.

The ARC is located in the periventricular zone of the hypothalamus with a rostrocaudal length of approximately 2.6 mm (from Bregma -1.72 mm to Bregma -4.36 mm) around the ventral area of the third ventricle. In its most rostral part, it begins surrounded by the retrochiasmatic area, with a population of neurons located ventrally to the third ventricle. Once the median eminence becomes visible, the medial and lateral subdivisions of the anterior area of the ARC can be distinguished, extending approximately from Bregma -1.92mm to Bregma -3.36 mm, coinciding with the most caudal part of the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH). From this location, the posterior area of the ARC begins, in which the medial and lateral subdivisions can be distinguished until approximately Bregma -4.36 mm where the third ventricle ends (Chronwall, 1985). Using Golgi staining, various types of neurons have been identified in the ARC, including unbranched, branched, branched bipolar, small multipolar, and large multipolar neurons (González-Burgos et al., 1993). Probably, this heterogeneity reflects the diversity of functions in which the nucleus is involved.

The melanocortin system is one of the main neuronal populations of the ARC. The somas of the melanocortin system's neurons are located in both the medial and lateral

areas and are generally more abundant in a ventrolateral position and lateral to the conventional edges of the ARC. POMC and cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) positive cell bodies can be found throughout the rostrocaudal extension of the nucleus. The somas of these neurons are big in size, 10-15 μm in diameter, polygonal and with relatively large dendrites (Chronwall, 1985). These populations make numerous connections with extrahypothalamic structures, such as the anterior commissure, the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and the lateral septal nucleus, as well as the putamen and the NAcc. More caudally, fibres project towards the periventricular region of the thalamus and towards the medial amygdala. Within the hypothalamus, denser fibres project into the periventricular nucleus, PVH, and perifornical region, although some fibres can be observed in most hypothalamic regions (Chronwall, 1985). POMC-expressing ARC neurons also send two descending sets of projections to the brainstem: one through the periaqueductal and dorsomedial grey tegment, which innervates the rostral NTS and lateral reticular nucleus, and the other, through the descending beam of the VTA, which innervates the rostral NTS, the ambiguous nucleus of the ventrolateral cord, and the spinal cord (Cone, 2005). As already noted, within the melanocortin system there are also neurons that express NPY. There is a very high density of these neuronal populations, with a small, rounded soma located in the medial part of the ARC, in both rostral and caudal areas (Chronwall, 1985).

3.1. Sexual dimorphism in the arcuate nucleus

Sex differences in the central nervous system result in two morphological patterns. In one, males show larger measurements than females and, in the other, the opposite. Sexual differentiation depends on both genetic and organizational effects due to the presence and amount of sex hormones and their respective receptors, as well as the substrates and enzymes necessary for their production, both in the gonads and within the brain itself (Asarian and Geary, 2013). This sexual dimorphism has been described with respect to the volume and number of cells in structures such as the *locus coeruleus* (LC) and the amygdala (Pinos et al., 2001; Carrillo et al., 2007). Likewise, in the hypothalamus there are sexually dimorphic nuclei, such as the VMH, the medial preoptic area (mPOA), the BNST and the anteroventral periventricular nucleus, with different patterns depending on the structure analyzed (del Abril et al., 1987; Guillamón et al., 1988; Scott et al., 2015). In the literature, estimates have already been made of the volume, number of neurons and

density of ARC in male and female rats (Hsu and Peng, 1975; Peng y Hsu., 1982; Yang et al., 1993), although only one paper has analysed the differences between sexes in these morphological values (Leal et al., 1998), founding that adult male rats have higher values than females, both in the volume and number of neurons.

4. The role of oestradiol in regulating food intake behaviour

In addition to their important role in controlling reproductive behaviours, sex hormones are responsible for many other functions. Oestradiol plays a key role in controlling energy homeostasis and glucose and lipid metabolism. The actions of oestradiol in skeletal muscle, liver, adipose tissue and immune cells regulate insulin sensitivity and the prevention of lipid accumulation and inflammation, as well as acting on the hypothalamic nuclei to differentially control food intake, energy expenditure and adipose tissue distribution (Asarian and Geary, 2006). The diversity of oestradiol's actions is possible because its receptors are distributed throughout the nervous system. Classical well-characterized genomic mechanisms of transactivation involve ligand binding, nuclear receptor dimerization, and binding to oestrogen response elements (EREs). In the membrane, oestrogen receptor (ERs) act as G-protein-coupled receptors that promote various signal transduction cascades (chains of molecules that transmit information within the neuron) and impact both genomic and non-genomic functions. (Pedram et al., 2014). Oestradiol deficiency promotes metabolic dysfunction, resulting in a predisposition to obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes (Mauvais-Jarvis, 2015). In addition, oestrogen receptor α (ER α) mutations in mice lead to an obese phenotype and an increase in body mass, while restoring the non-functioning receptors in the EREs is sufficient to reverse the associated metabolic deficits, which seems to indicate an important function of non-EREs-associated signalling in the mechanisms of oestradiol (Stincic et al., 2018). The anorectic effect of oestradiol on food intake and metabolic activity is mediated, in part, by the inhibition and potentiation of the signalling of hypothalamic neuronal populations, with the ARC being the main receptor of these signals, where POMC/CART neurons are potentiated and NPY/AgRP neurons are inhibited (Clegg, 2012; López and Tena-Sempere, 2015; Yang et al., 2016). The injection of oestradiol into ARC and VMH reduces food intake behaviour in both males and females. Oestradiol signalling through the ER α receptor in POMC neurons has been shown to be a critical component in the regulation of energy homeostasis, as the removal

of the ER α receptor from POMC neurons in mice is characterized by a significant increase in body weight in males and an increase in food intake and energy expenditure in females (Roepke, 2009; Clegg, 2012; Stincic et al., 2018). Melanocortin synthesis also responds to gonadal steroids due to the fact that POMC messenger ribonucleic acid (mRNA) fluctuates throughout the oestrous cycle in the rat, with the most significant changes during proestrus when plasma oestradiol peaks are highest (Bohler et al., 1991).

While oestrogens such as oestradiol act by binding to ERs, many pharmacological, environmental and dietary compounds are also able to bind to and act on these receptors, so these compounds can interfere with the processes promoted by oestrogen activity, enhancing their action or competing as a weak agonist or antagonist at these receptors and decreasing the effects produced by these hormones (Frank et al., 2014).

5. Phytoestrogens

Phytoestrogens are plant compounds of natural origin that are structurally and/or functionally similar to mammalian oestrogens, which gives them the ability to act on ERs and alter the functioning of other types of compounds, such as sex hormone binding proteins, the aromatase enzyme and the inhibition of protein kinases, thus modulating different processes that are responsible for the effects, both beneficial and harmful to health, that have been described as regards these compounds (Patisaul, 2005).

Phytoestrogens include several groups of nonsteroidal estrogenic compounds, widely distributed in the plant kingdom, which are present in fruits, vegetables, and whole grains. One of the most important subgroups into which phytoestrogens are divided are flavonoids, phenolic compounds that include isoflavones, coumestans, and phenylflavonoids. While isoflavones are found in legumes, mainly soybeans, coumestans are present in clover, alfalfa, and soybean sprouts (Cederroth and Nef, 2009).

Dietary phytoestrogens are metabolized by gut bacteria, absorbed and conjugated in the liver, circulated in plasma, and excreted in the urine (Cassidy, 2003). Phytoestrogens can be modified to more active oestrogenic compounds, such as genistein and daidzein, after metabolization by intestinal microorganisms. For example, the effects of daidzein vary depending on individuals and their ability to convert daidzein into equol, a much more active compound. There are a growing number of studies on how the consumption of phytoestrogens or their components could be a highly efficient tool to prevent and treat various diseases and pathologies, such as menopausal syndrome,

osteoporosis, cardiovascular disorders and breast cancer, although not all the results of the various studies carried out are congruent with each other and currently a growing number of researches warn that the health benefits often attributed to phytoestrogens, might be exaggerated (Patisaul and Jefferson, 2010; Sirotkin and Harrath, 2014).

Phytoestrogens are part of the group of compounds called endocrine disruptors (EDCs), generally considered to be toxic to health in their synthetic forms (Patisaul, 2005). EDCs can bind to cell membrane receptors and promote the formation of cytoplasmic cyclic nucleotides and protein kinases that can control the expression of target genes. In this way, they can alter the synthesis, metabolism, transport and administration of hormones, as well as the expression of receptors and, therefore, the subsequent signals they transmit. EDCs are compounds that can promote or restrict a hormonal signal, as they can act as agonists or antagonists. Therefore, phytoestrogens, such as EDCs, can potentially affect all oestrogen-regulated processes (Roepke, 2009; Périan and Vanacker, 2020).

5.1. Genistein

Genistein is a phytoestrogen found in a wide variety of plant-based foods, especially soy and soy-based foods. Its inclusion in food intake has been linked to positive effects on pathologies such as osteoporosis, cardiovascular diseases and menopause. Soy is a fundamental component of the Asian diet, and its consumption is associated with the lower rates of certain types of cancer found in this continent compared to Western societies, although there are differences that must be considered when evaluating these comparisons (Patisaul, 2005; Setchell, 2006; Sirotkin and Harrath, 2014). While in Asia, genistein is ingested as part of the diet through foods rich in this compound, in Western countries it is used as a substitute for meat or as an additive to certain foods or beverages due to its beneficial properties, so depending on the metabolic enzymes that synthesize its active compounds and the way it is included in the diet, the bioavailability of genistein can vary between individuals or even between ethnicities (Patisaul and Jefferson, 2010). In animal models it has been shown to be an inhibitor of tumour cells through the modulation of genes related to cell cycle control and apoptosis, mainly through its inhibition of protein tyrosine kinases, but it should be noted that genistein behaves differently when injected or administered orally, because the intestinal barrier modifies the biological activity of this compound and can limit bioavailability. Parental administration of genistein leads to plasma concentrations of free genistein that are much

higher than if administered orally, particularly at high doses. This makes it difficult to extrapolate its effects in different species, since the effect of genistein can depend on numerous factors, such as age, health status and even the presence or absence of specific intestinal microflora (Setchell, 2006; Patisaul and Jefferson, 2010). Some results are contradictory; for example, the administration of pure genistein has been found to have tumour-promoting effects in mice, although these effects have not been replicated with *in vitro* studies, so more research is needed on the safety of consuming pure genistein (Jungbauer and Medjakovic, 2014).

Likewise, several studies indicate that genistein may alter the neurohormonal regulation of food intake behaviour, including alterations in leptin and insulin levels and adipose tissue, with growing evidence of the effect of phytoestrogens on body weight regulation in obese rats (Lephart, Porter, Hedges et al., 2004; Cederroth and Nef, 2009; Crespillo et al., 2011; Rivera et al., 2013).

As can be seen in Figure 3, genistein shares important structural characteristics with oestradiol, which gives it the ability to compete with oestradiol when binding to ERs, with a preference for oestrogen receptor β (ER β) and allows it to exert both oestrogenic and antiestrogenic effects, the latter competing for the receptor with oestradiol as a weak antagonist (Dixon and Ferreira, 2002). ERs, after binding with the ligand, can move from the cytoplasm to the nucleus and affect the deoxyribonucleic acid (DNA) or RNA transcription (Sirotkin and Harrath, 2014). Effects of genistein have been found in areas of the brain where ERs are expressed, such as PVH, VMH, sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA), and LC, altering sexual behaviour, stress response, thyroid function, and age-dependent cognition (Patisaul, 2005). Like other isoflavones, it can exhibit oestrogenic and antiestrogenic behaviour based on endogenous oestradiol level and number and type of ERs. In addition to its binding affinity to the classical ER α and ER β , genistein can also bind to oestrogenic membrane receptors such as the G protein-coupled membrane oestrogen receptor (GPER), although the mechanisms of action of this isoflavone through these receptors are not yet known (Xiao et al., 2019). Within the category of endocrine disruptors, genistein was the most effective competitor to GPER, with a relative binding affinity of 13% with respect to oestradiol (Thomas and Dong, 2006). This indicates that genistein has the potential to interfere with oestrogenic signalling through GPER by acting either as an agonist or as an antagonist. Therefore, although genistein has traditionally been considered to act through ER β , its recently found GPER affinity increases the mechanisms through which this molecule can interfere or

modulate the role of oestradiol, showing how GPER-mediated actions are potentially susceptible to being altered by environmental compounds (Zimmerman et al., 2016; Poschner et al., 2017).

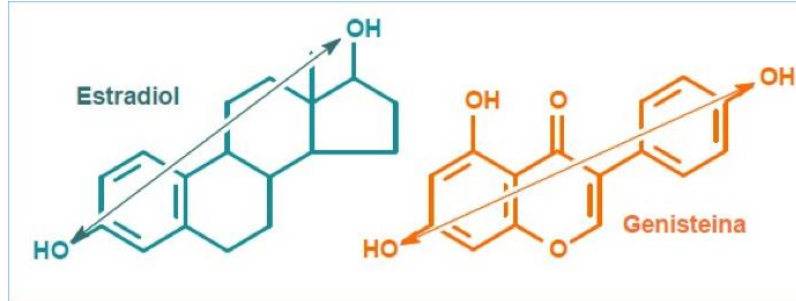


Figure 3. Representation of genistein's molecular structure. The two hydroxyl (OH) groups can be observed to have an arrangement and distance similar to those of oestradiol which allow genistein to interact with oestrogen receptors forming a ligand-receptor complex functionally similar to that formed by oestradiol. Adapted from Escribano (2010).

Few studies have focused on the effects of phytoestrogen exposure in the perinatal period and the results of including genistein in the diet during early development are unknown. As already mentioned, genistein has a greater affinity for $ER\beta$, although an effect on $ER\alpha$ cannot be ruled out, either through nuclear receptors or membrane receptors, or by intervening in signal transduction mechanisms within neurons. As regards the latter, in studies carried out with rats, it has been found that the absence of phytoestrogens in the diet causes a downregulation in the expression of the $ER\alpha$ in the POMC neurons in the ARC, affecting the catabolic signal of leptin to inhibit food intake and increase energy expenditure (Andreoli et al., 2015). However, the manner by which genistein could exert a downregulation on these receptors is unknown.

Objectives

Based on the concept that the nervous system is vulnerable to environmental factors during development, the idea of this study arises due to the increase in the use of phytoestrogens as food supplements in the Western diet that has occurred in recent years. Exposure to genistein during the most sensitive periods of development can alter the neuroendocrine system involved in regulating food intake, but there is still a debate about whether the consumption of phytoestrogens in these periods can be beneficial or harmful to health. Taking into account that soy drinks are the main milk substitute in infants and that the lactation period is a sensitive period for the maturation of the brain structures that regulate energy intake and metabolism, research to verify the possible effect of genistein on development may serve to determine the safety of the use of this compound in these periods. To this end, in experiment 1, the long-term effects of exposure to different doses of genistein during the second week of life on body weight, food intake and neuronal populations expressing the neuropeptides proopiomelanocortin and orexin in the hypothalamus has been studied, both in males and females. It has long been known that genistein has the ability to alter oestradiol signalling in the nervous system, although the mechanisms this isoflavone's actions remain unknown. Within the category of endocrine disruptors, genistein was the most effective competitor for the oestrogen membrane receptor GPER. The next objective of this thesis, developed in experiment 2, is to examine whether the population of neurons expressing the oestrogenic membrane receptor GPER in the ARC is altered by genistein treatment during early development, since there is increasing evidence that this membrane receptor could be a relevant pathway in the action of phytoestrogens in the brain.

In all the studies carried out so far, the ARC subdivisions have not been considered and it has been treated as a homogeneous area or solely classifying between the anterior and posterior area of the nucleus. In experiment 3, we have studied the differences between sexes and the effects of treatment with genistein during the second week of life on the volume, number of neurons and cell density in the divisions and subdivisions of the ARC, parameters that can shed light on the morphological and functional characterization of the different regions of this structure. More and more studies suggest a specialization of the neuronal populations that are located in the different subdivisions of this nucleus, so the detailed study of the effect of genistein treatment on the ARC can provide relevant information to corroborate this data.

Material and methods

1. Animals

All the experiments presented in this thesis were designed in accordance with the guidelines published in the "NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", according to the principles presented in the "Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research" from the Neuroscience Society of the European Union (Council Directives 86/609/EEC and 2010/63/EU) and the Spanish Government Directive (R.D. 1201/2005). The experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of our institution (UNED, Madrid). Special care was taken to minimize the suffering of animals and reduce the number of animals used to a required minimum. For this experiment, 8 female Wistar rats (Charles River, Lyon, France) were used. They were housed in the UNED Faculty of Psychology's animal facility, in a barn with temperature control $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, with a relative humidity of $55 \pm 10\%$ and with day/night cycle of 12h (light cycle from 8:00am to 8:00pm and dark cycle from 8:00pm to 8:00am) with food and water *ad libitum*. For the mating, one male was housed in a cage with two females for 7 days with a daily check of the vaginal plug. When the presence of the plug was detected, the females were individually housed in a plastic box with sawdust and nest material. After the birth, the litters were crossed and standardized on P1, at which time the offspring were weighed, sexed and distributed among the different nursing mothers to avoid the "litter effect". All litters were standardized to 10 offspring (5 males and 5 females) per mother to ensure equal conditions in all litters.

2. Processing

6 litters were selected and randomly assigned to three experimental conditions. The control group (C), where the offspring were exposed to the vehicle substance (90% corn oil + 10% ethanol) by subcutaneous injection (s.c.), and two treatment groups with genistein administered s.c., one at low doses of $10\mu\text{g}/\text{gr}$ (G10) and the other at high doses of $50\mu\text{g}/\text{gr}$ (G50). In other studies, phytoestrogens have shown dose-dependent effects (Naaz et al., 2003; Cederroth et al., 2007), so in this study one treatment was carried out with a low dose, similar to a moderate food intake in the diet, and another at a high dose, which would mean a very high consumption of this compound in the diet, in order to

evaluate this dose-dependent effect. In all groups, the offspring, both males and females, were treated with the corresponding dose from P6 to P13, a period in which oestradiol programming effects have been shown in male and female rats (Carrillo et al., 2020). The resulting groups were male control (n=10, CM), female control (n=9, CF), male G10 (n=10, G10M), female G10 (n=9, G10F), male G50 (n=10, G50M) and female G50 (n=8, F50M). Synthetic genistein (Genistein Synthetic, 98%, Sygma-Aldrich) dissolved according to weight and volume was used in the treatment following the manufacturer's recommendations. It was mixed by sonication, kept at 4°C and protected with film until its subcutaneous administration at room temperature.

On day 21, weaning was performed, each animal was individualized and provided with food (20% casein, Panlab, Barcelona) and water *ad libitum*. After a period of acclimatization of 12 days, from P33 the body weight and food intake of the animals were measured every 7 days up to P89, for the study of these two factors throughout development. An outline of the procedure used can be seen in Figure 4.

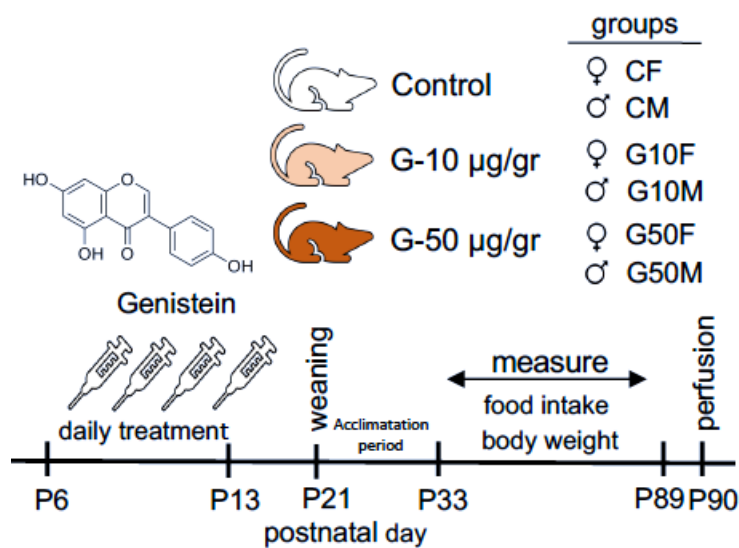


Figure 4. Schematic representation of the procedure used. From P6 to P13, daily injections of synthetic genistein (10µg/gr or 50µg/gr) or the vehicle were administered, according to the experimental group. From weaning on P21 to P33 a period of acclimatization was implemented. Food intake and body weight were measured weekly from P33 to P89. The animals were sacrificed on P90.

3. Tissue preparation

A day before the sacrifice, a vaginal smear was taken from all the females to determine the phase of the oestrous cycle and 12 hours before the sacrifice, on P90, their food was removed. All animals were sacrificed between 9:00 a.m. and 12:00 p.m. for three consecutive days with all females in the dioestrus phase of the hormonal cycle and with the same number of animals in each group. Each animal was weighed and anaesthetised with an intraperitoneal injection of ketamine (100mg/Kg body weight) and xylazine (10mg/Kg body weight) and a transcardiac infusion was performed with a 0.9% saline solution until the blood vessels were completely free of blood, followed by 4% paraformaldehyde to fix the tissue. Blood was collected by transcardiac injection in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in glass tubes, centrifuged for 15 minutes at 2000hz at 4°C. Once this process was finished, the plasma was collected and stored in aliquots at -80°C. The brains were then extracted, stored in a paraformaldehyde solution for two hours at 4°C, then stored in a 30% sucrose solution in phosphate buffer saline tampon (PBS) at 4°C until the day they were processed, at which time the brains were frozen with Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura), cut into coronal sections 40µm thick using a cryostat (Microm HM 500-O) following a caudal face axis from bregma -1.10 mm to bregma -2.55 mm according to Paxinos and Watson (2015). The sections were collected into four series. Three of the series were placed in flotation on a multiwell plate, three washes were carried out with PBS at 0.1% and then they were put in a cryoprotectant maintained at -20°C until the time of processing by immunohistochemistry with antibodies directed against POMC and orexin (series 1 and 2), which constitute experiment 1 and GPER (series 2) that was used for experiment 2. The last series (series 4) was arranged in gelatine holder and underwent a histological staining of Nissl with cresyl violet (experiment 3).

4. Plasma levels of oestradiol and testosterone

To measure oestradiol levels in plasma an ELISA kit (Enzyme-linked immunosorbent assay) (CEA461Ge, Cloud-Clone Corp.) with a detection range of 12.35 to 1000 ng/ml was used and to measure plasma testosterone levels an ELISA kit (CSB-E05100r, Cusabio) with a detection range of 0.13 to 25.6 ng/ml was used. All samples

were measured in duplicate following the manufacturer's instructions. Absorbance was measured in each well with a Tecan Infinite µM2000 reader (Grödig, Austria).

5. Immunohistochemistry processing

In immunohistochemical techniques, antibodies are used for the localization of specific antigens in the tissue. They are based on the high specificity of antibodies, which have a high affinity for the molecules they recognise and bind to.

Immunohistochemical detection of POMC, orexin and GPER was performed after cryoprotectant washing with 0.1% PBS in all series. The sections were then washed with a PBS solution containing 0.2% bovine serum albumin (BSA) with the aim of reducing non-specific antibody bindings and 0.2% Triton X-100 for 30 minutes to facilitate tissue permeability. They were then treated to block endogenous peroxidase activity (buffer containing 1:1 methanol and 0.3% hydrogen peroxide; 10 minutes stirring, at room temperature). Next, 3 washes were performed with PBS for 5 minutes. The series were then incubated for 48 hours at 4°C while kept in agitation with a rabbit polyclonal antibody against POMC (diluted 1:2000 in PBS and 0.2% BSA, Phoenix Pharmaceuticals Inc, POMC Precursor 27-52 Antibody), orexin (diluted 1:1500 in PBS and 0.2% BSA, Sigma-Aldrich Ab3704Anti-Orexin-A Antibody), and GPER (diluted 1:250 in PBS and 0,2% de BSA, Abcam Anti-G-protein coupled receptor 30 antibody ab39742). After 48 hours, a further 3 washes of 5 minutes were performed with PBS. Then another incubation was carried out with the secondary antibody (Goat AntiRabbit 1:300) for 120 minutes in agitation, room temperature. The 3 washes with PBS were repeated and the avidin-biotin peroxidase complex was added (ABC) (1:400 Thermo 32020 + 3% milk powder). After another 3 washes of 5 minutes with PBS at 0.1%, the development process was carried out with diaminobenzidine (DAB) (Sigma D5637) and H₂O₂. The procedure used DAB at 0.05% and H₂O₂ at 0.025%, in low light conditions during 3minutes and 40 seconds. The sections were placed on gelatinized slides and protected with glass covers coated with DPX mountant for histology.

6. Estimation of the number of neurons

The quantitative analysis of the number of neurons was carried out using photographs with a magnification of 4X, 10X and 20X taken with a NIKON Digital Sight

DS-Fi1 camera connected to a NIKON Eclipse 80i microscope with the Olympus Cella v1.1.6 program. These photographs were analysed using the ImageJ program version 2.0.0.0-rc-69/1,52n.

6.1. Estimation of the number of POMC-ir neurons in the ARC

To perform the counting of POMC immunoreactive neurons (POMC-ir), all sections of the rat brains were ordered according to Paxinos and Watson (2015), by means of photographs with a 4X magnification and all sections with positive marking in proopiomelanocortin in the ARC were selected, as shown in Figure 5.

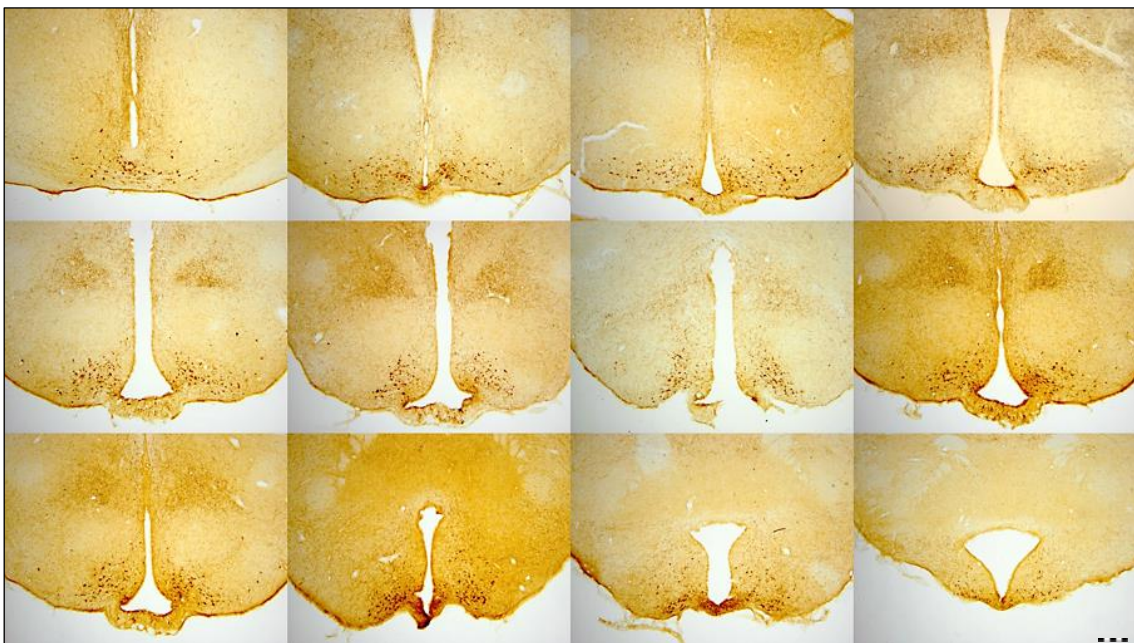


Figure 5. Micrographs of a series of POMC-ir neurons in coronal sections. Bar: 300 μ m.

Currently most of the studies carried out in the ARC do not distinguish the effects of the treatments by subdivisions. Following the atlas of Paxinos and Watson (2015), in this thesis the different subdivisions of the ARC in both axes have been differentiated; this classification by subdivisions is shown in Figure 6.

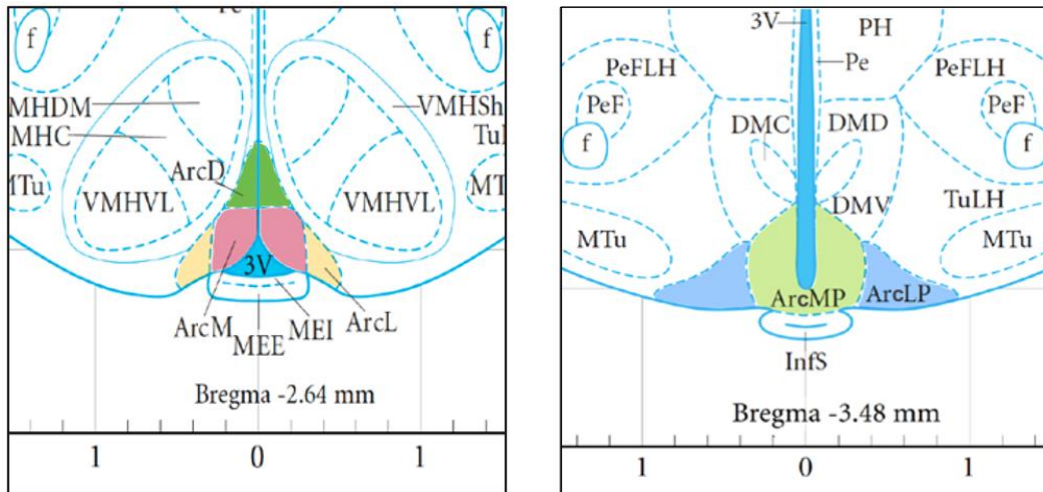


Figure 6. Detail of the atlas of the rat brain marking the subdivisions of the ARC according to Paxinos and Watson (2015).

POMC-ir cells were easily distinguished because the cell body was strongly marked. Cells expressing POMC were detected in the medial (ArcM), lateral (ArcL), medial posterior (ArcMP) and lateral posterior (ArcLP) arcuate subdivisions but not in the dorsal subdivision (ArcD). To distinguish the subdivisions, a photograph was taken per hemisphere with a magnification of 10X and a grid was used to delimit the structures. Subsequently, the subdivisions of the ARC were marked with different colours using the ImageJ software, as shown in Figure 7.

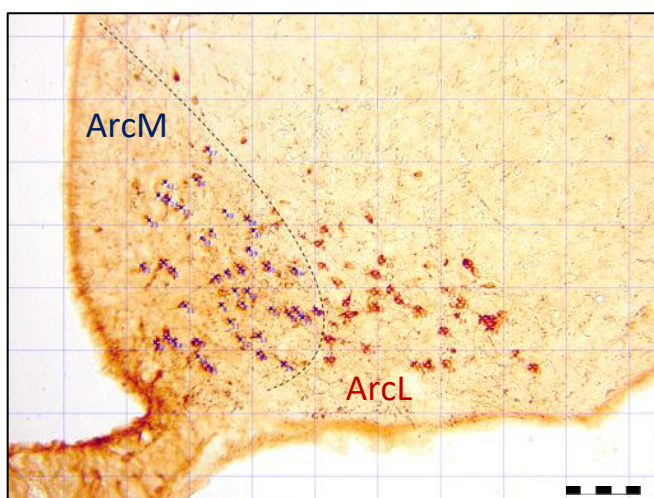


Figure 7. Grid and marking by the ImageJ software of the POMC-ir neurons in the ARC. Subdivisions ArcM (blue) and ArcL (red). Bar: 165 μ m.

6.2. Estimation of number of orexin-ir neurons in the ARC

To perform the count of the orexin-ir neurons all sections of the brains were ordered according to Paxinos and Watson (2015), by means of photographs with a 4X magnification and all sections with positive marking in orexin were selected. Orexin-ir cells were detected in the medial-ventral area of the LH. A small population of orexin-ir cells was also detected at the lateral edge of the DMH adjacent to the orexin-ir cells in the PFA, which is why the data was displayed and analysed on the PFA/DMH continuum. In all the nuclei studied, the cells that expressed orexin were easily detectable because the cell body was strongly marked, as can be seen in Figure 8.

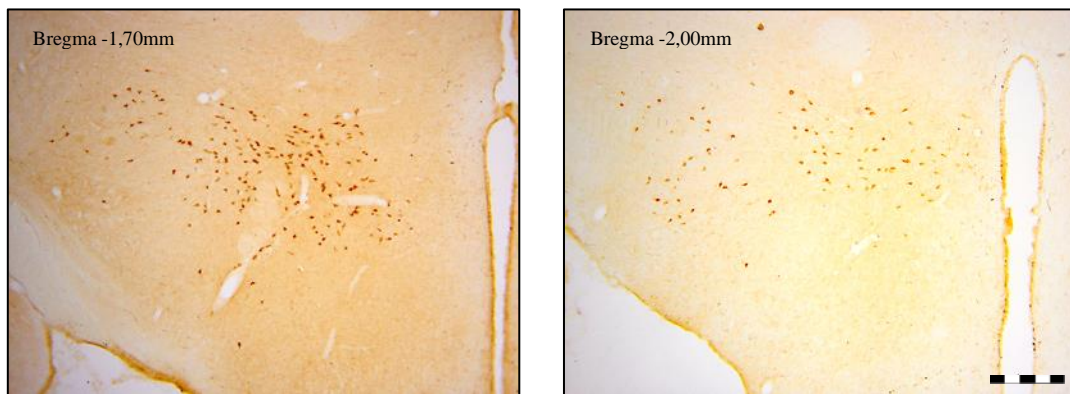


Figure 8. Micrographs with immunohistochemical marking of orexin-ir neurons in two coronal sections in the LH and the PFA/DMH continuum. Bar: 200 μ m.

To distinguish the subdivisions, a photograph was taken per hemisphere with a magnification of 10X and a grid was used to delimit the structures. Subsequently, the subdivisions of the PFA/DMH continuum and LH were marked with different colours using the ImageJ software, as shown in Figure 9.

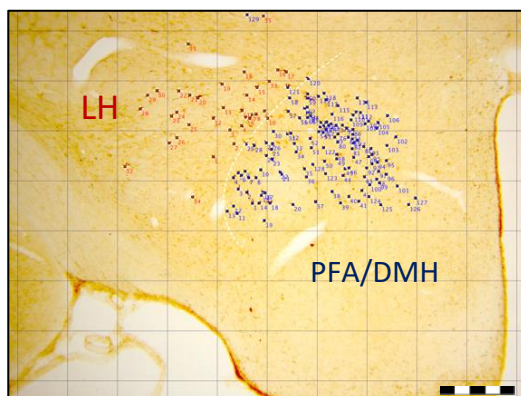


Figure 9. Micrograph of a coronal section showing the grid and marking by imageJ software of orexin-positive neurons in the PFA/DMH (blue) and LH (red) continuum. Bar: 200 μ m.

6.3. Estimation of the number of GPER-ir neurons in the ARC

The immunohistochemical marking of GPER, which has a wide distribution throughout the ARC, is predominantly cytoplasmic in character. All cells in which neuronal soma morphology could be distinguished were considered, excluding those that showed a small soma characteristic of glial cells (Llorente et al., 2020). Figure 10 shows a microphotograph of the positive marking for GPER.

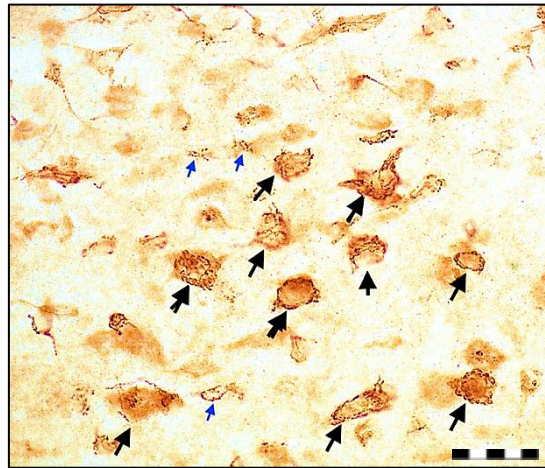


Figure 10. Immunohistochemical labelling showing positive examples for GPER-ir. Black arrows, GPER immunoreactive cells with neuronal morphology. Blue arrows, immunoreactive cells with glial morphology. Bar: 30 μm

The GPER-ir neurons in the ARC were counted using black and white photographs with 4X and 20X magnification taken with a NIKON Digital Sight DS-Fi1 camera connected to a NIKON Eclipse 80i microscope with the Olympus Cella v1.1.6 program. These photographs were analysed using the ImageJ version 2.0.0.0-rc-69/1.52n program. All sections of the brains were ordered according to Paxinos and Watson (2015) using photographs with 4X magnification and all sections with positive GPER marking were selected in the ARC. The right and left hemispheres were counted independently by photographs with 20X magnification. To do this, a grid with quadrants with an area of 3300 μm^2 was randomly placed on each section. Next, the boundaries of all the subdivisions of the ARC were established and the count was carried out, as shown in Figure 11. The method consisted of estimating the number of immunoreactive neurons by randomly selecting grid quadrants in each subdivision. Different quadrant selection measures were used due to the different sizes of the ARC subdivisions. For the medial parts, one in ten quadrants was randomly selected and for the lateral parts one in five

quadrants was randomly selected. Only somas whose total area was included within the boundaries of the nucleus subdivisions were counted. In both cases, the count began in the first quadrant, whose area was entirely inside in the delimitation of the subdivision, closest to the dorsomedial area. All cells within the quadrant were counted excluding those in which the grid lines overlapped with the neuronal somas.

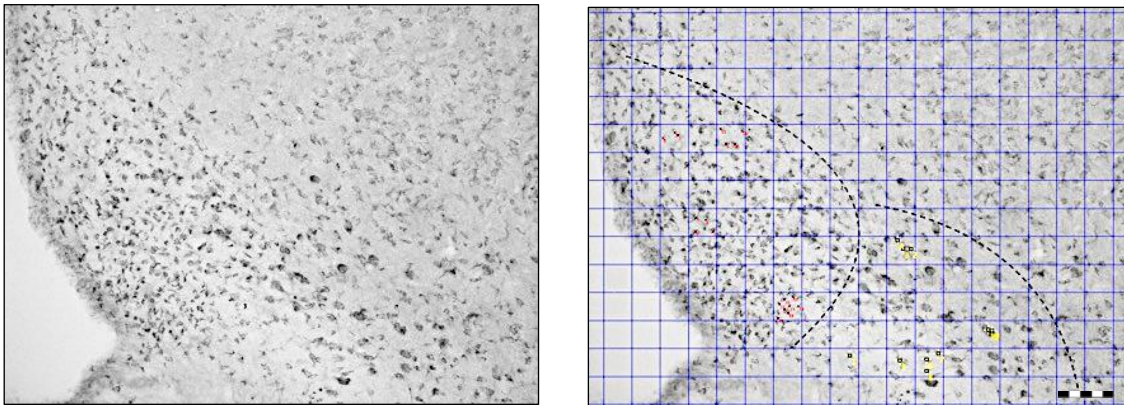


Figure 11. Micrographs showing the grid with quadrants with an area of $3300 \mu\text{m}^2$ and marking of the GPER-ir cells for quantitative analysis. Medial arcuate subdivision (ArcM) in red; lateral arcuate subdivision (ArcL) in yellow. Bar: $100 \mu\text{m}$.

6.4. Nissl staining

In this thesis, the morphological patterns of the ARC have been analysed using the Nissl staining technique, which allows the labelling and estimation of the volume and the neuronal population. The detailed analysis of the morphology of the ARC along its subdivisions could clarify the mechanisms and functionalities of these neuronal populations and their circuits.

Cresyl violet acetate solution is used to staining the Nissl substance in the cytoplasm of neurons of brain sections fixed in paraformaldehyde. This staining is commonly used to identify the neuronal structure in the brain, using a staining made with cresyl violet, which uses a basic aniline to dye the ARC blue and thus highlight the important structural characteristics of neurons. The substance nissl (rough endoplasmic reticulum) appears dark blue due to ribosomal ARC staining, which gives the cytoplasm a mottled appearance. Individual granules of extranuclear ARC are called Nissl granules (ribosomes) and the DNA present in the nucleus is stained a similar colour (Kádár et al.,

2009). Using Nissl staining and by applying the Cavalieri method, a quantitative analysis and an estimate of the volume and number of neurons was carried out as explained below.

The fourth series of brain sections obtained was dyed with 1% cresyl violet (FLUKA Rf^a 61123) according to the protocol shown below in steps:

1. Distilled water conditioned with acetic acid: 90 minutes.
2. Cresyl violet 0.1%: 6 minutes.
3. Washing with distilled water with acetic acid: 7 seconds.
4. Dehydration in 70% alcohol: 30 seconds.
5. Dehydration in 80% alcohol: 30 seconds.
6. 96% alcohol + acetic acid: 10 seconds.
7. Two quick plunges in 100% absolute alcohol.
8. Hydration with xylol. The samples were protected with glass covers coated with DPX (Surgipath Europe Ltd., Peterborough, PE3 8YD, United Kingdom).

6.4.1. Volume estimation

Once the Nissl staining was performed, all sections of Series 1 were photographed with a magnification of 10X with a NIKON Digital Sight DS-Fi1 camera connected to a NIKON Eclipse 80i microscope with the Olympus Cella v1.1.6 program. and we proceeded to differentiate the subdivisions of the ARC.

The volume of the ARC has been estimated by applying the principle of Cavalieri (1966). The right and left hemispheres were counted independently. In each section, the area of the coronal section of the ARC was estimated by superimposing a grid of crosses with an area per point of $3300 \mu\text{m}^2$ (Figure 12) using the ImageJ program version 2.0.0.0-rc-69/1,52n. All the crosses of the grid located in their entirety within the previously signalled delimitations of the ARC were counted, in order to make an estimate of the volume following the Cavalieri principle's formula in each subdivision of the ARC, as well as in the whole of the anterior and posterior area, and an estimation of the total volume of the nucleus. Cavalieri's principle, a well-established stereological technique, uses interpolation between samples to estimate the volume of three-dimensional (3D) objects. Cavalieri theorized that two solids will have the same volume when they are the same height and when their cross sections are taken parallel to their bases at the same respective distance from the bases (West, 2012). Therefore, it is possible to calculate the

total volume of a delineated section by observing the fraction of its cuts that are in the same interval using the following formula:

$$V (\text{mm}^3) = f \times (\text{SP} \times a(p) \times t)$$

Where f is the fraction used, P is the number of points counted in each of the sections, $a(p)$ is the area associated with each point and t is the thickness of the sections used.

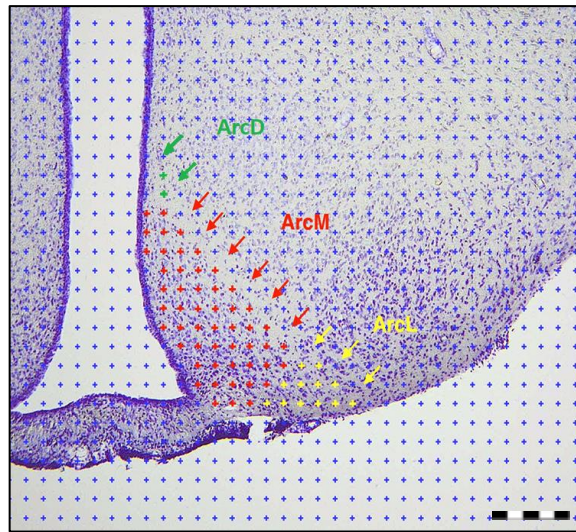


Figure 12. Grid with quadrants with an area of $3300 \mu\text{m}^2$ on a micrograph of a coronal section of the ARC with Nissl staining. Green, dorsal arcuate subdivision (ArcD); red, medial arcuate subdivision (ArcM); yellow, lateral arcuate subdivision (ArcL). Bar: $200 \mu\text{m}$.

6.4.2. Estimation of the number of neurons

The estimation of the number of neurons in the ARC was made by means of photographs taken as indicated in the previous section. Positive neurons were considered to be all those in which the nucleolus, marked by the Nissl staining and previously identified in the analysis of the sections with the microscope, was easily distinguishable, as can be seen in figure 13. For the estimation of the number of neurons, a grid with quadrants with an area of $1497.69 \mu\text{m}^2$ was placed on the photograph (Figure 14). For the analysis of the number of neurons, all the quadrants that were entirely within the area of the subdivision studied were considered. Of these, a selection of quadrants was systematically counted according to the size of the subdivisions. As in the previous experiment, in the medial parts one in ten quadrants was randomly selected and in the

lateral parts one in five quadrants. Only quadrants whose total area was included within the boundaries of the subdivisions of the nucleus were randomly selected. In both cases, the count began in the first quadrant, whose area was entirely inside in the delimitation of the subdivision, closest to the dorsomedial area of the section. Neurons in which neuronal nuclei were distinguished within the quadrant were included in the count, excluding those in which the grid lines intersected with neuronal morphology. As in the case of volume, an estimate of the number of neurons in each subdivision of the ARC was made and subsequently the totals of the anterior and posterior area, and also the estimation of the total nucleus was calculated.

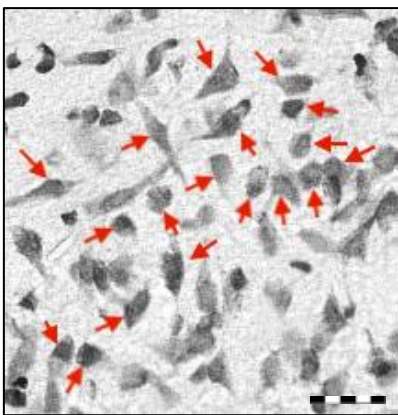


Figure 13. Image of a histological section with Nissl staining in the ARC. Examples of cells that have been considered for counting (shown with red arrows). Bar: 10 μm

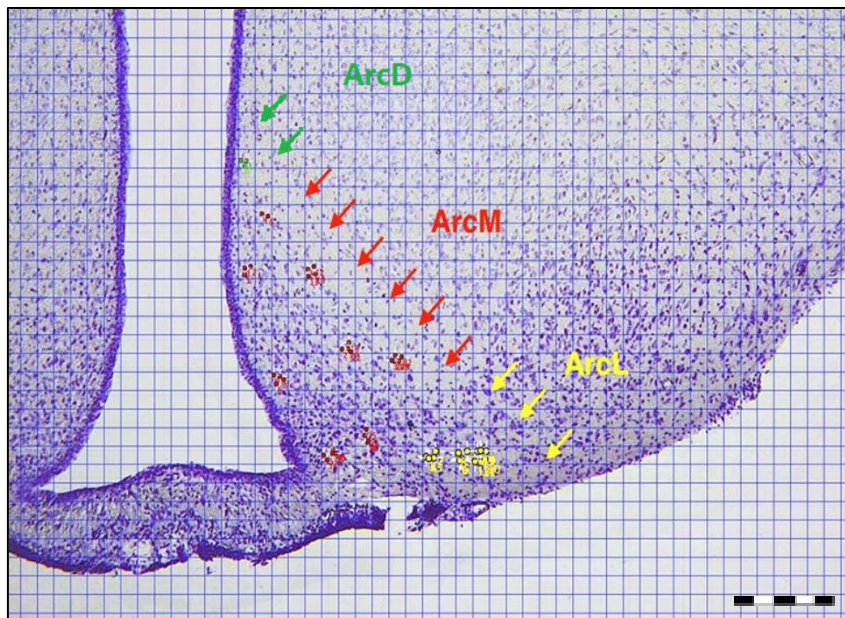


Figure 14. Image of a section with Nissl staining in the ARC with a grid with quadrants of $1497.69 \mu\text{m}^2$ and the marking used to estimate the number of neurons in the medial arcuate subdivision (ArcM), red, in the lateral arcuate subdivision (ArcL), yellow and in the dorsal arcuate (ArcD), green.

Bar: 250 μm .

7. Statistical analysis

In the statistical analysis, IBM SPSS Statistics Software version 27 was used, and statistical significance was set at $p < 0.05$.

The evolution of body weight and caloric food intake during the experimental procedure was analysed by means of a repeated measures ANOVA with treatment as an intrasubject factor and body weight and caloric food intake as an intersubject factor. To determine differences between groups, single-pathway ANOVA were performed where appropriate. *Post hoc* comparisons were performed using Student-Newman-Keuls tests. The significance level was set at $p < 0.05$.

For the analysis of the number of neurons and the proportions of both POMC-ir and orexin-ir, a unifactorial ANOVA was carried out to verify the laterality of the ARC without finding statistically significant differences between the right and left hemispheres. Once laterality was discarded, the number of neurons of the total ARC in each subdivision was analysed using an ANOVA of two factors, sex and treatment and when appropriate a *post hoc* analysis using the S-N-K test, with a probability $p < 0.05$ was carried out. In addition, a unifactorial ANOVA (treatment factor) was performed independently for each of the sexes. *Post hoc* analyses to show the differences between the groups were performed using the S-N-K test, and $p < 0.05$ was established as the significance level. The data are displayed as standard mean and error of the mean.

For the analysis of the number of neurons in the ARC and the number of GPER-ir neurons, a unifactorial ANOVA was carried out to check the laterality without finding statistically significant differences between the right and left hemispheres. Once laterality was discarded, the dimorphism in the number of neurons in each subdivision was analysed using a unifactorial ANOVA comparing the groups of each sex with the same treatment. Next, a unifactorial ANOVA (treatment factor) was performed independently for each of the sexes. *Post hoc* analyses to show the differences between the groups were performed using the S-N-K test, and $p < 0.05$ was established as the significance level. Data is displayed as standard mean and standard error of the mean.

Results

1. Effect of genistein exposure during development on the evolution of body weight

Respect to the evolution of body weight per week, the data obtained showed a main effect of the sex factor ($F_{1,50}=253.559$, $p < 0.001$), but not of the treatment factor ($F_{2,50}=0.170$, $p=0.844$). No interaction was found between the two factors ($F_{2,50}=0.520$, $p=0.598$) (Figure 15).

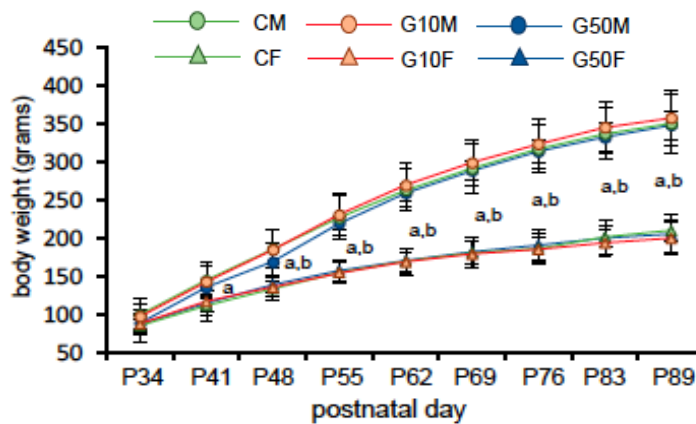


Figure 15. Evolution of weight during development in all groups. a = sexual dimorphism, in the control and G10 groups; b = Sexual dimorphism in the G50 group. CM, male control group; CF, female control group; G10M, male G10 group; G10F, female G10 group; G50M, male G50 group; G50F, female G50 group. $p < 0.05$ in all cases. All values are expressed as means \pm SEM.

In the *post hoc* analysis of the weekly evolution of the weight of males and females between groups with the same treatment (CM vs CF, G10M vs G10F and G50M vs G50F) significant differences between the sexes in body weight were found from day P40 in the control groups and G10 and from P47 in the G50 group ($p < 0.05$ in all cases). This dimorphism is maintained up to P89 in all groups.

Regarding the weight at P90, a main effect of the sex factor was observed ($F_{1,50}=396.802$, $p < 0.001$). The *post hoc* analysis of the weight at perfusion showed statistically significant differences between the 3 groups of males and females, with a greater weight in males than in females (Figure 16).

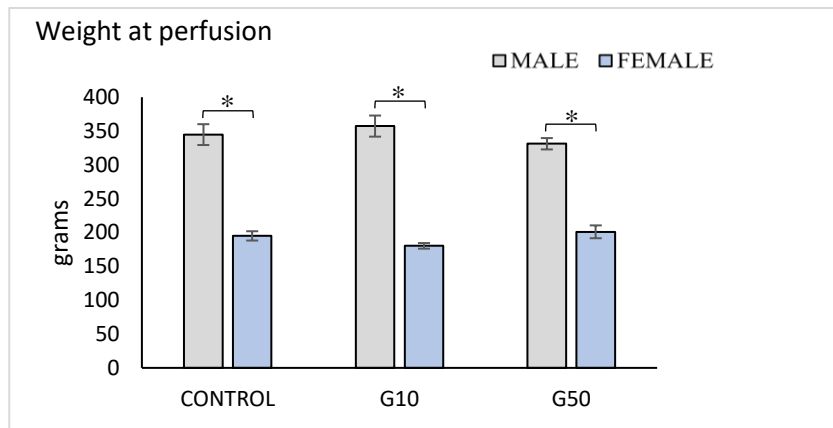


Figure 16. Weight at perfusion (P90) in all groups. C, control groups; G10, G10 groups; G50, G50 groups. * <0.05 in all cases. All values are expressed as means \pm SEM.

2. Effect of genistein exposure during development on food intake

With respect to the weekly food intake, the analysis showed a main effect of the sex factor ($F_{1,50}=297.788$, $p < 0.001$), but not of the treatment factor ($F_{2,50}=0.183$, $p=0.833$) or of the interaction between the two factors ($F_{2,30}=0.696$, $p=0.504$) (Figure 17). Regarding total food intake from P41 to P83, a main effect of the sex factor was found ($F_{1,50}=230.129$, $p < 0.001$), but not of the treatment factor ($F_{2,50}=0.161$, $p=0.852$). No interaction was found between the two factors ($F_{2,50}=0.796$, $p=0.457$). The *post hoc* analysis of the total food intake showed statistically significant differences between the 3 groups of males and females, with a higher total food intake in males than in females (Figure 18).

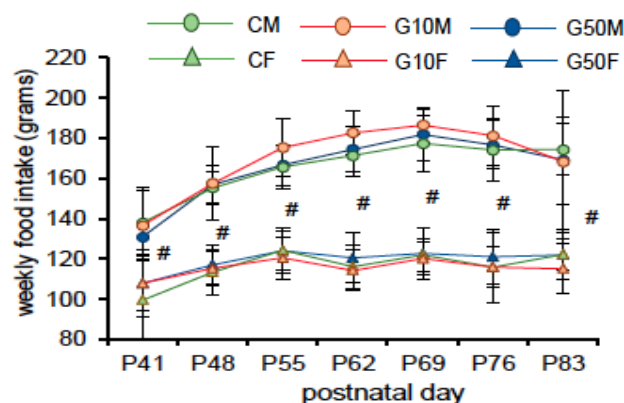


Figure 17. Evolution of food intake during development in all groups. # = Statistically significant differences of the sex factor in all groups. CM, male control; CF, female control; G10M, male G10 group; G10F, female G10 group; G50M, male G50 group; G50F, female G50 group. $p < 0.05$ in all cases. All values are expressed as means \pm SEM.

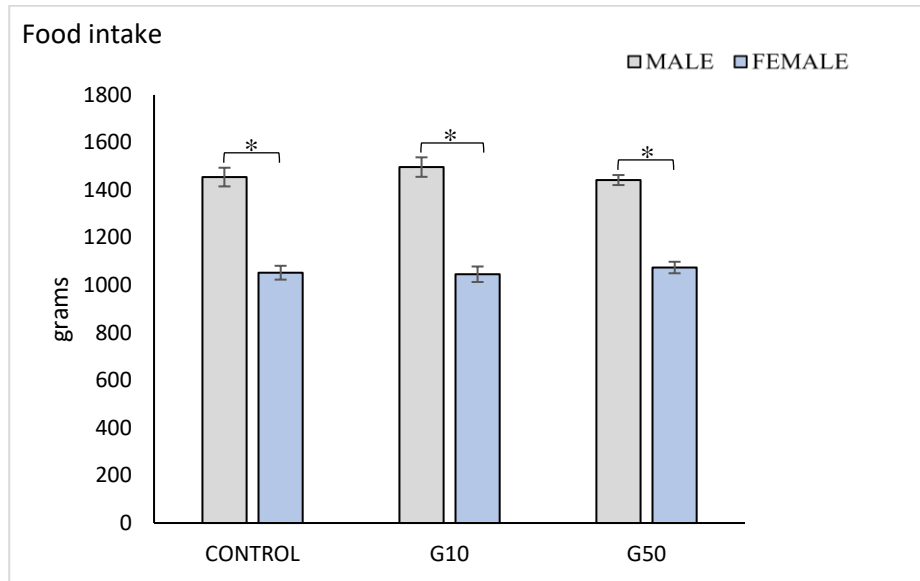


Figure 18. Total food intake (P90) of all groups. C, control groups; G10, G10 groups; G50, G50 groups.

*= $p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

3. Effect of genistein exposure during development on plasma levels of oestradiol and testosterone

3.1. Oestradiol

In the analysis of plasma oestradiol concentrations, the results showed a main effect of the sex factor ($F_{1,33}=5.777$, $p=0.022$), of the treatment factor ($F_{2,33}=15.125$, $p < 0.001$) as well as the interaction between both factors ($F_{2,33}=7.825$, $p=0.002$).

Post hoc analysis shows differences between the CM vs G50M, G10M vs G50M and G50M vs F50M groups, with males having higher values than females in the high-dose group. These differences between the sexes do not occur in the other groups (Figure 19).

When the sexes are analysed separately, the *post hoc* analysis shows statistically significant differences between the CM vs G50M and G10M vs G50M groups (Figure 20) with the G50M values being the highest in this parameter. In the case of females, the differences are found in the two treatment groups with respect to the control group, with the G10F group having the highest values (Figure 21).

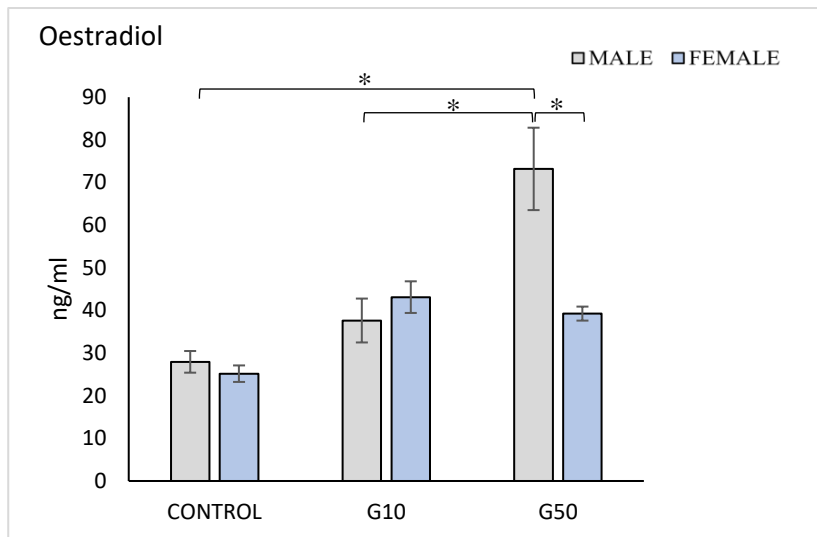


Figure 19. Plasma oestradiol concentrations in all groups. C, control groups; G10, G10 groups; G50, G50 groups. *= p<0.05. All values are expressed as means ±SEM.

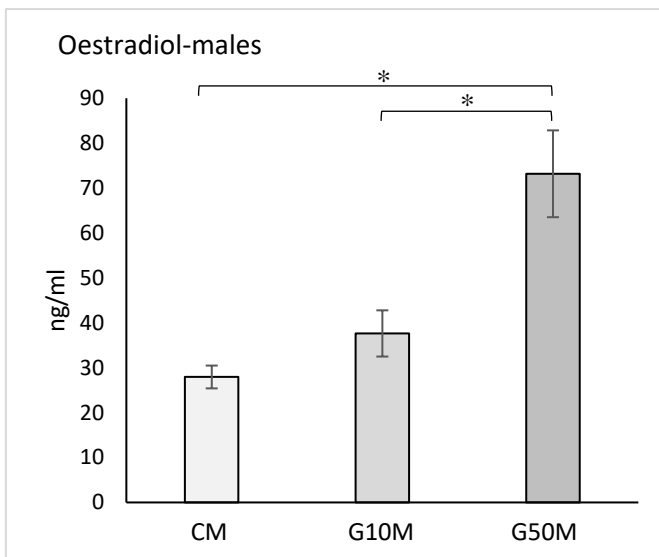


Figure 20. Plasma oestradiol concentrations in males. CM, male control group; G10M, male G10 group; G50M, male G50 group. *= p<0.05. All values are expressed as means ±SEM.

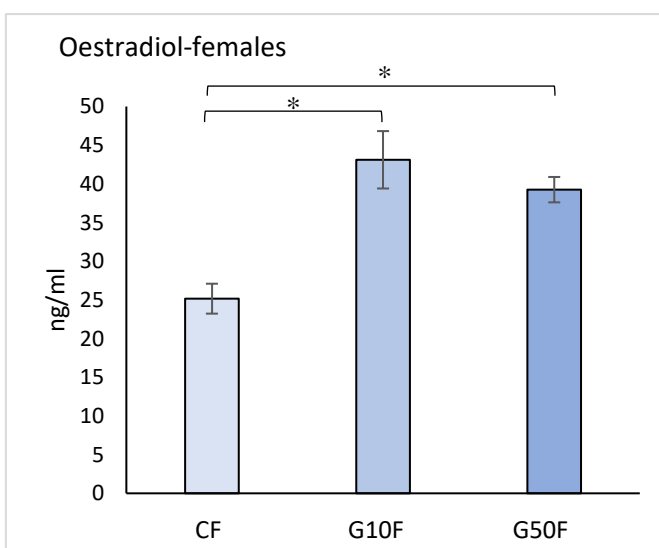


Figure 21. Plasma oestradiol concentrations in females. CF, female control group; G10F, female G10 group; G50F, female G50 group. *= p<0.05. All values are expressed as means ±SEM.

3.2. Testosterone

In the study of plasma oestradiol concentrations, the results showed no main effect of the sex factor ($F_{1,36}=3.453$, $p=0.071$), the treatment factor ($F_{2,36}=0.660$, $p=0.523$) or the interaction between the two factors ($F_{2,36}=1.029$, $p=0.367$).

4. Effect of genistein exposure during development on the number of POMC-ir neurons

In the ArcL subdivision, a main effect of sex ($F_{1,36}=5.347$, $p<0.027$) was found. When each sex was analysed separately, in females, statistically significant differences in treatment were found in the ArcM subdivision ($F_{2,18}=4.211$, $p=0.032$). The *post hoc* analysis showed statistically significant differences in the ArcM subdivision between the groups of females G10 and G50 with respect to the control group, (Figure 22). Figure 23 shows an example of the reduction in POMC-ir neurons produced by genistein treatment in females.

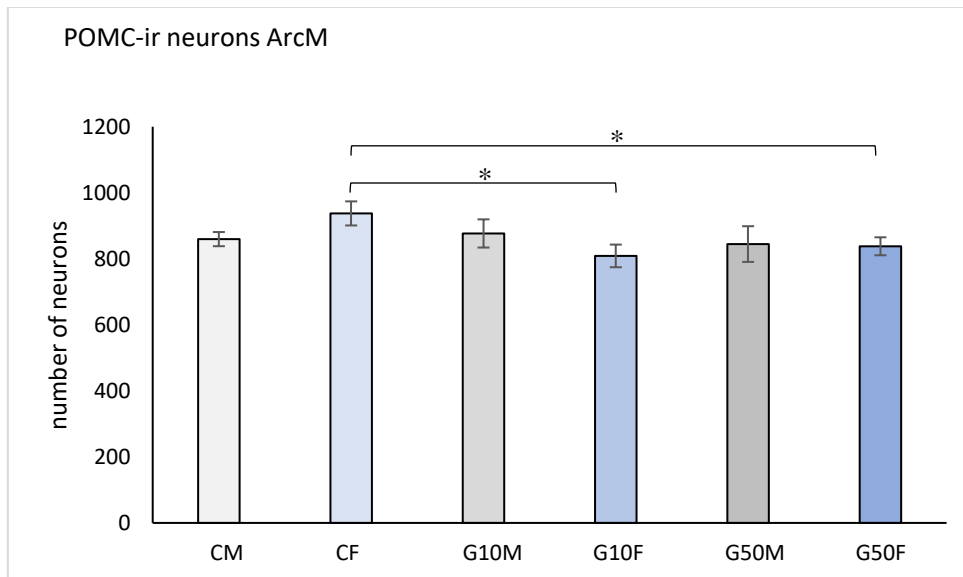


Figure 22. Number of POMC-ir neurons in the medial arcuate subdivision (ArcM). CM, male control group; CF, female control group; G10M, male G10 group; G10F, female G10 group; G50M, male G50 group; G50F, female G50 group. *= $p<0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

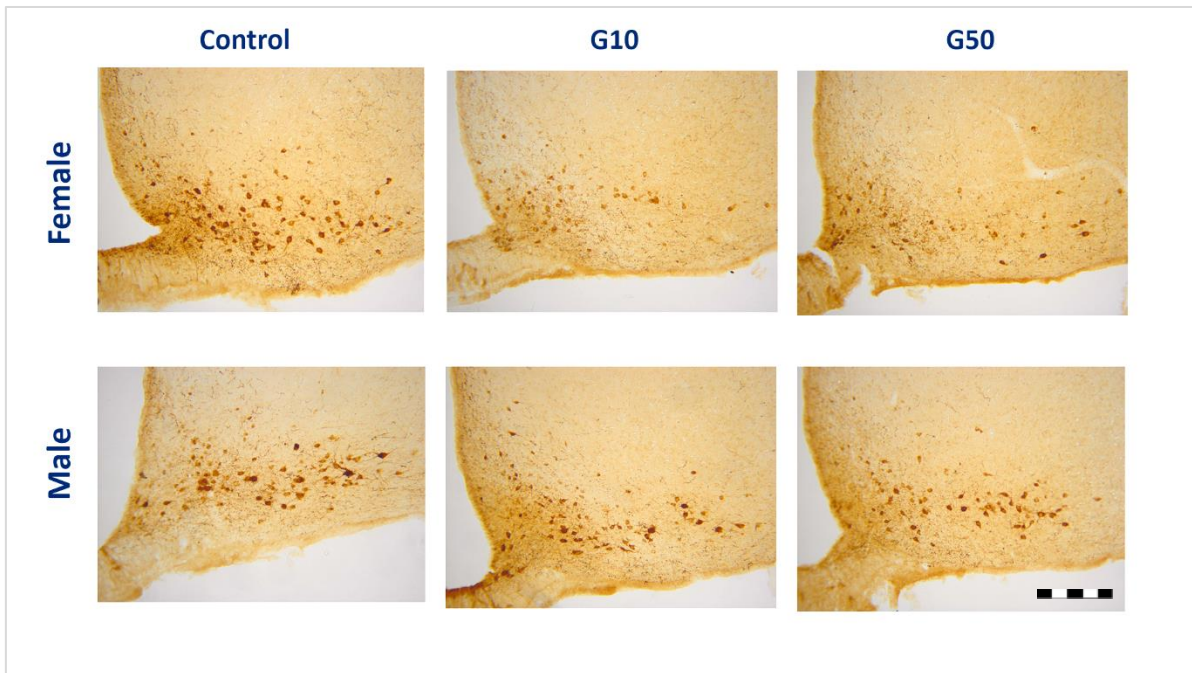


Figure 23. Micrographs of coronal sections showing the reduction produced by genistein exposure in the arcuate medial subdivision (ArcM). Bar: 200 μ m.

5. Effect of genistein exposure during development on the number of orexin-ir neurons

In the continuum PFA/DMH, no effect of sex ($F_{1,30}=0.598$, $p=0.445$), treatment ($F_{2,30}=1.614$, $p=0.216$) or interaction between factors ($F_{2,30}=0.079$, $p=0.924$) were found. The same results were found in the LH with respect to the effect of sex ($F_{1,30}=0.002$, $p=0.964$), treatment ($F_{2,30}=0.218$, $p=0.805$) or interaction between the factors ($F_{2,30}=0.234$, $p=0.793$)

6. Effect of genistein exposure during development on the number of GPER-ir neurons

In the analysis of the sex differences in the subdivisions of the ARC in the control groups of each sex regarding GPER expression, statistically significant differences were found in the ArcMP subdivision between the control groups of each sex ($F_{1,10}=14.072$, $p=0.004$), (Figure 24). Figure 25 shows an example of the dimorphism found in the ArcPM subdivision in GPER expressing neurons.

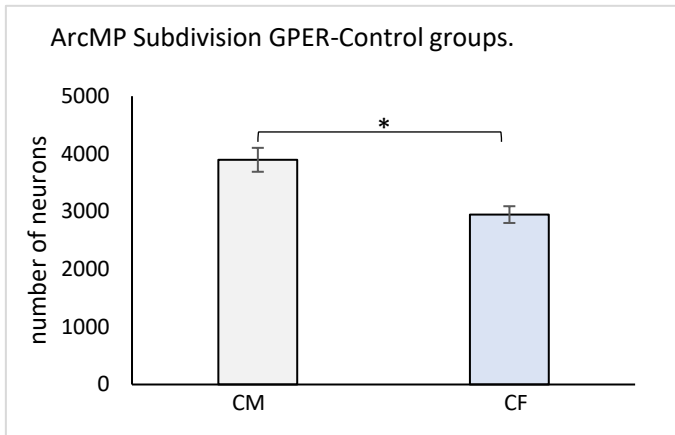


Figure 24. Number of GPER-ir neurons in the ArcMP subdivision in the control groups. CM, male control group; CF, female control group. $*=p<0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

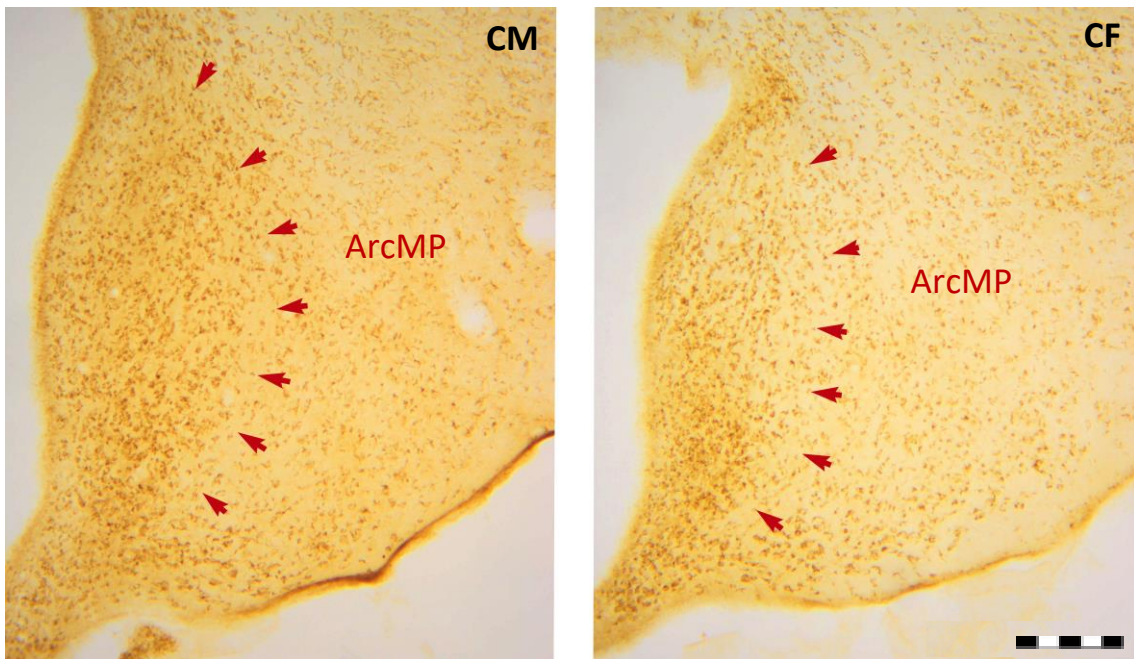


Figure 25. Micrographs of coronal sections showing the sexual dimorphism in the medial posterior arcuate subdivision (ArcMP). CM, male control group; CF female control group. Bar: 150 μ m

In the analysis of each sex separately, statistically significant differences were found in males in the subdivisions ArcL, ArcMP and ArcLP ($F_{2,15}=4.830$, $p=0.025$; $F_{2,15}=5.319$, $p=0.019$; $F_{2,15}=9.692$, $p=0.002$).

Once these significant changes were detected in the three subdivisions ArcL, ArcMP and ArcLP in males, the *post hoc* analysis by groups was carried out. The results showed statistically significant differences in males in the ArcL subdivision between the control group and both the G10 group and the G50 group, with more neurons in the groups treated with genistein; in the ArcMP subdivision between the control group and the G50

group, with a less neurons in the high-dose group; in the ArcLP subdivision among all the groups with a lower number of neurons in the G50 group with respect to the G10 group and with respect to the control group. In turn, the G10 group presents statistically significant differences with respect to the control group with a greater number of neurons of GPER (Figures 26, 27 and 28).

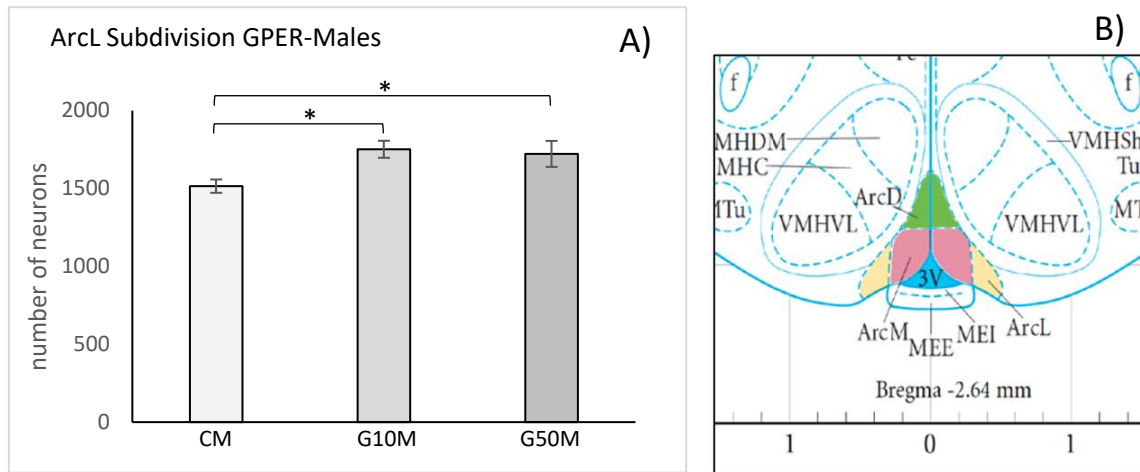


Figure 26. A) Number of GPER-ir ArcL subdivision neurons in males and B) ArcL subdivision location in the rat brain atlas by Paxinos and Watson (2015). CM, male control group; G10M, male G10 group; G50M, male G50 group. *= $p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

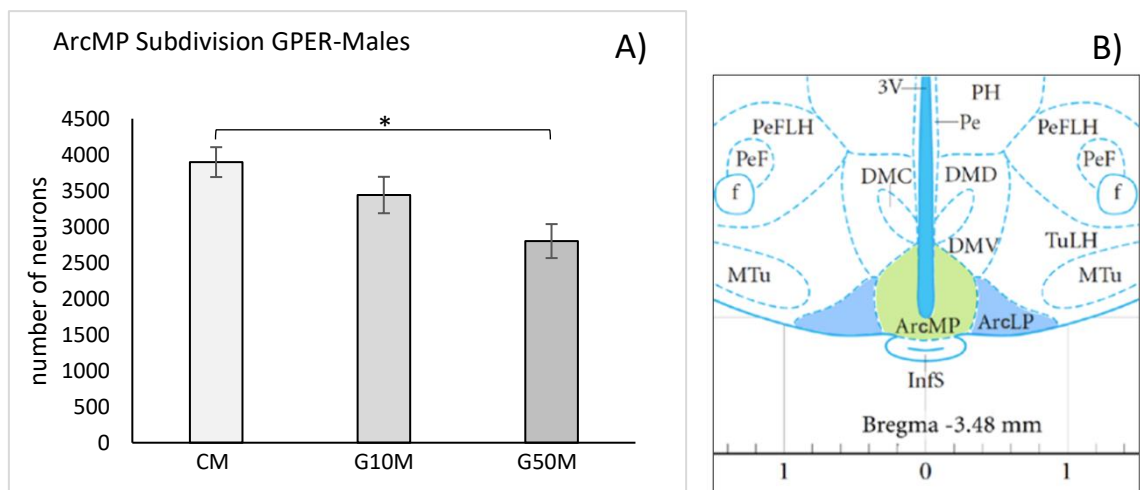


Figure 27. A) Number of GPER-ir neurons in the ArcMP subdivision in males and B) ArcMP subdivision location in the rat brain atlas by Paxinos and Watson (2015). CM, male control group; G10M, male G10 group; G50M, male G50 group. *= $p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

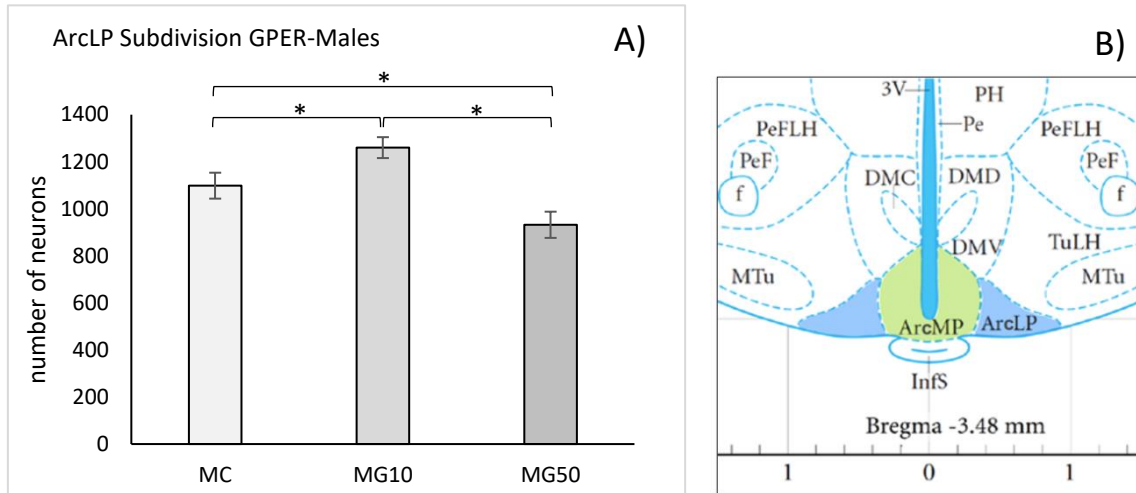


Figure 28. A) Number of GPER-ir neurons in the ArcLP subdivision in males and B) ArcLP location in the rat brain atlas by Paxinos and Watson (2015). CM, male control group; G10M, male G10 group; G50M, male G50 group. *= $p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

7. Effect of genistein exposure during development on ARC volume

In the analysis of the sex differences regarding the volume in the subdivisions of the ARC in the control groups of each sex, statistically significant differences have been found in the ArcMP subdivision, with a higher volume in the male group ($F_{1,10}=12.632$, $p=0.005$) (Figure 29).

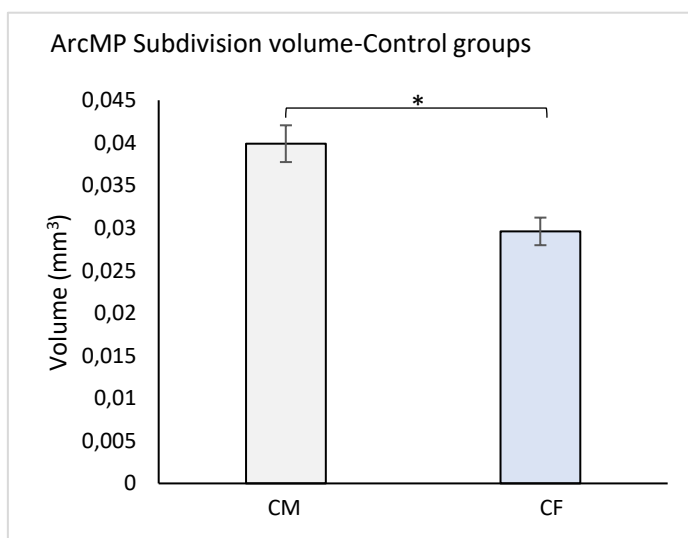


Figure 29. Volume of the ArcMP subdivision in the control groups. CM, male control group; CF, female control group. *= $p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

8. Effect of genistein exposure during development on the number of neurons in the ARC

Regarding the analysis of the number of neurons between each treatment group of males and females by subdivisions of the ARC, in the control groups statistically significant differences were found in the subdivision ArcMP ($F_{1,10}=9.061$, $p=0.013$), with a higher number of neurons in males than in females (Figure 30 and 31). In the analysis of the low dose groups G10, statistically significant differences were found in the subdivisions ArcL and ArcMP ($F_{1,10}=7.406$, $p=0.024$; $F_{1,10}=11.678$, $p=0.008$), with a male<female pattern in the ArcL subdivision (figures 32 and 33) and an opposite pattern in the ArcPM subdivision (Figures 34 and 35). In the analysis of the G50 high-dose groups, statistically significant differences were found in the ArcD ($F_{1,10}=6.260$, $p=0.034$), with a higher number of neurons in females (Figures 36 and 37).

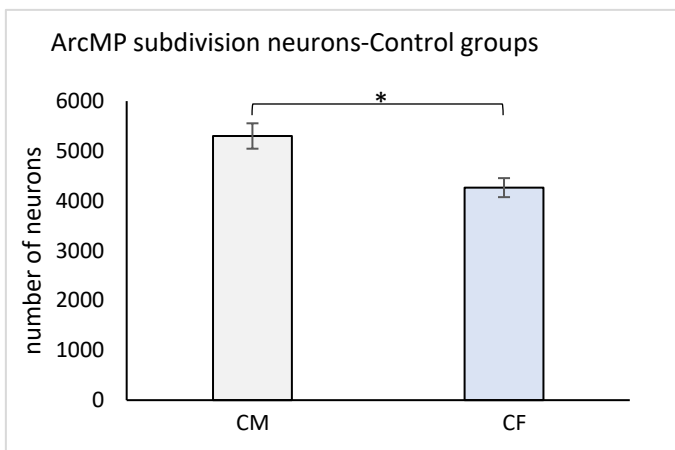


Figure 30. Number of neurons of the ArcMP subdivision in the control groups. CM, male control group; CF female control group. $*=p<0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

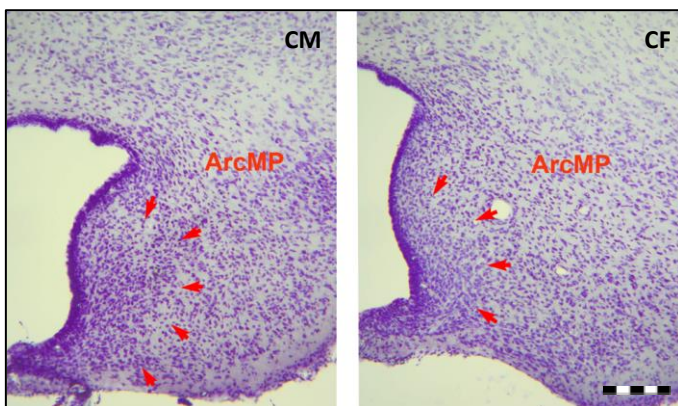


Figure 31. Micrographs showing the lower number of neurons in the ArcMP subdivision in the female control group. Bar: 150 μ m

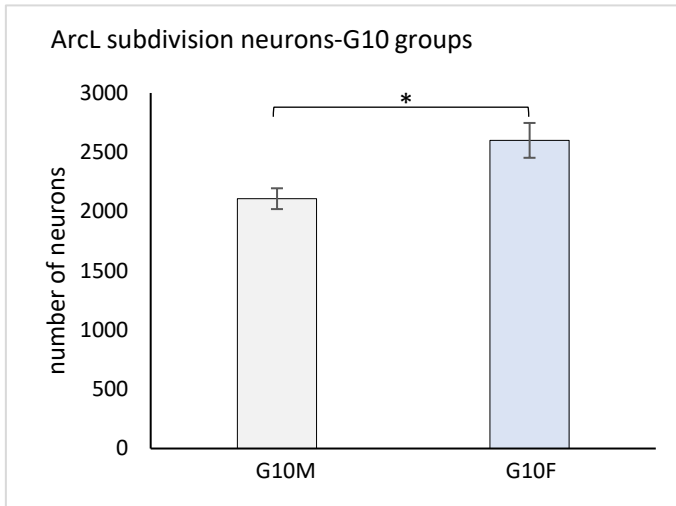


Figure 32. Number of neurons of the ArcL subdivision in the low-dose G10 groups. G10M, male G10 group; G10F, female G10 group. $^* = p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

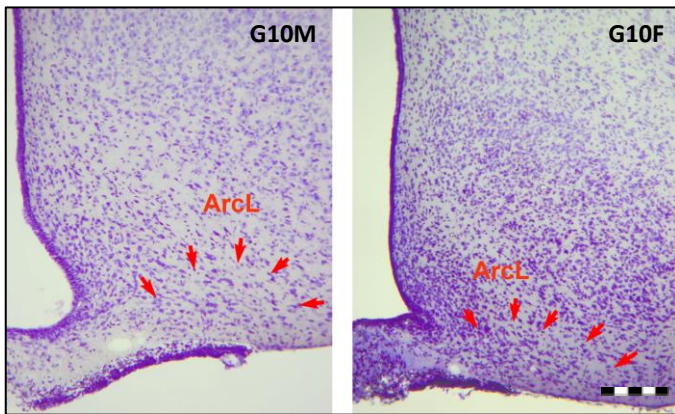


Figure 33. Micrographs showing the lower number of neurons in the ArcL subdivision in the male low-dose G10 group. Bar: 150 μ m.

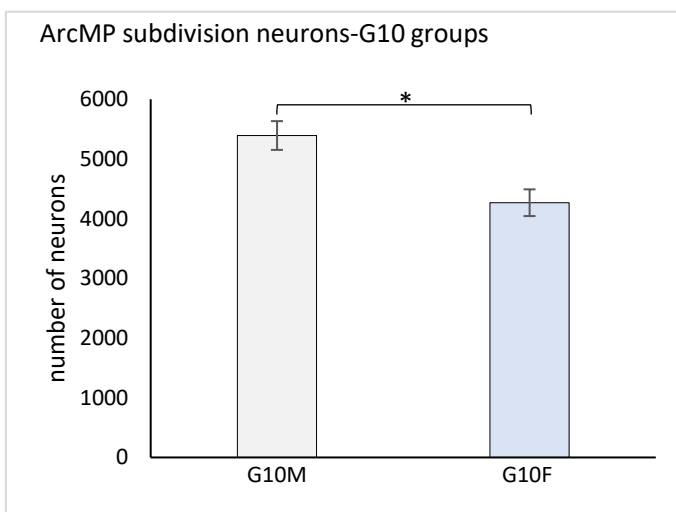


Figure 34. Number of ArcMP subdivision neurons in the low-dose G10 groups. G10M, male G10 group; G10F, female G10 group. $^* = p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

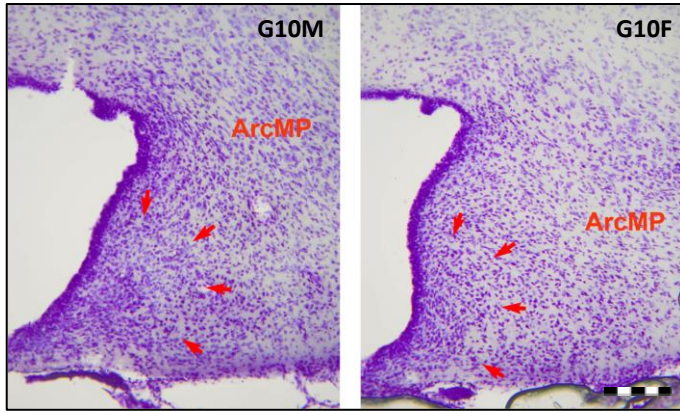


Figure 35. Micrographs showing the lower number of neurons in the ArcMP subdivision in the female low-dose G10 group. Bar: 150 μ m.

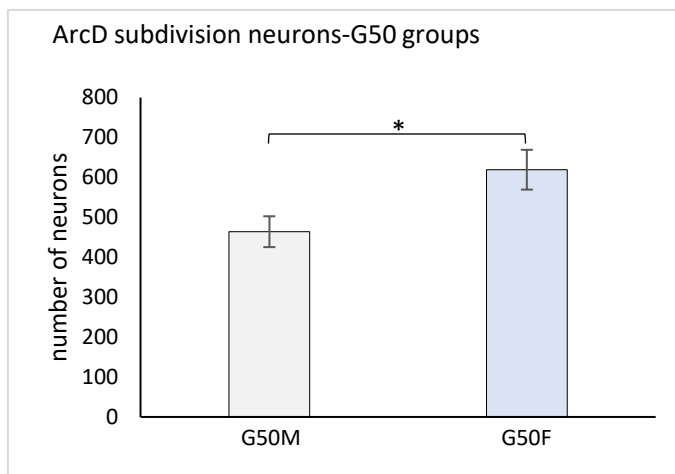


Figure 36. Number of ArcD subdivision neurons in the high-dose G50 groups. G50M, male G50 group; G50F, female G50 group. $*=p<0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

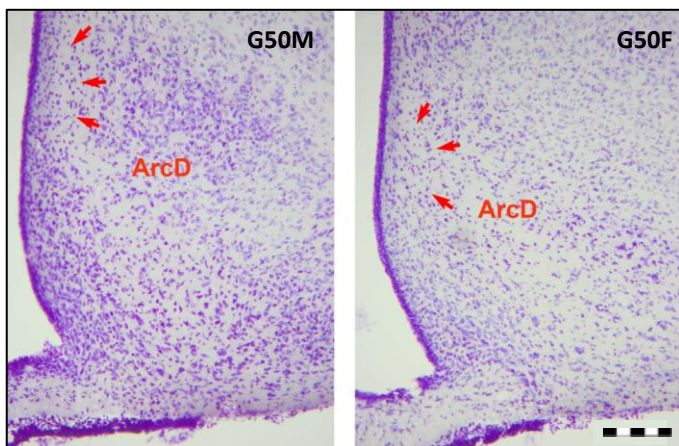


Figure 37. Micrographs showing the lower number of neurons in the ArcD subdivision in the male high-dose G50 group. Bar: 150 μ m.

In the analysis of each sex separately, an effect of treatment was found in females in the ArcM subdivision ($F_{2,13}=4.203, p=0.039$). The *post hoc* analysis showed an effect of treatment on the ArcM subdivision in the G10F group with respect to the CF group (Figure 38).

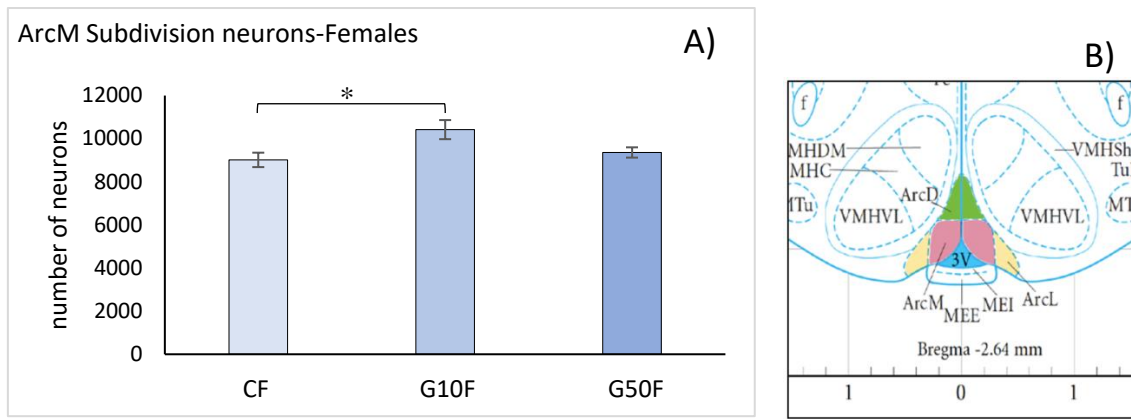


Figure 38. A) Number of neurons in the ArcM subdivision in females and B) ArcM location in the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2015). CF, female control group; G10F, female G10 group; G50F, female G50 group. *= $p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

9. Effect of genistein exposure during development on ARC density

Regarding the analysis of the density of neurons by subdivisions of the ARC between each treatment group of males and females, in the low dose group G10, statistically significant differences were found in the ArcL ($F_{1,10} = 14.482$, $p = 0.004$) (Figure 39).

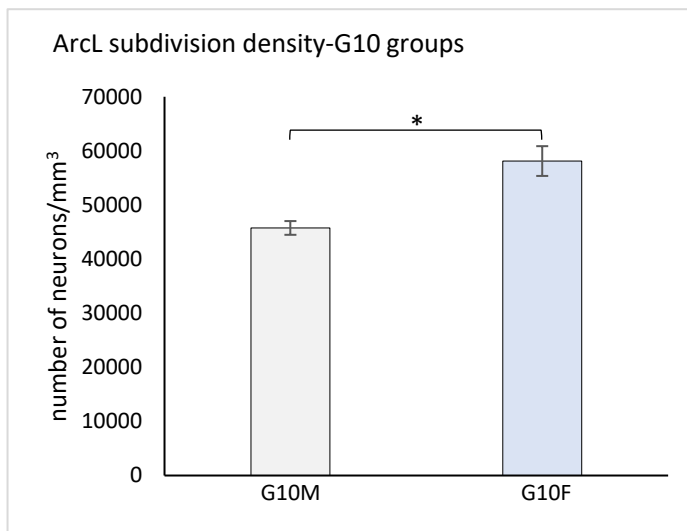


Figure 39. Density of the ArcL subdivision in the low-dose G10 groups. G10M, male G10 group; G10F, female G10 group. *= $p < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

Discussion

Neural populations of the hypothalamus are vulnerable to the effects of DEC, such as BPA, Arochlor 1221, organophosphate flame retardants, diethylstilbestrol and tributyltin, most of which produce alterations in the reproductive, endocrine, neurological and immune systems in adulthood and during development (Walker et al., 2013; Walker et al., 2014; Roepke et al., 2016; Vail and Roepke, 2020; Marraudino, Ponti et al., 2021). All these DEC have estrogenic effects and are considered harmful to health (Casals-Casas and Desvergne, 2011), as evidenced by the legislative regulations that have been implemented for the use of these compounds in the last 30 years. Phytoestrogens are also considered DEC, but unlike those mentioned above, their effects have been shown to be beneficial in preventing cardiovascular disease (Fusi et al., 2020), improving menopausal symptoms (Chen et al., 2019; Thangavel et al., 2019) or prevent ischemic strokes (Castelló-Ruiz et al., 2011). However, the results of other researches carried out in recent years have not shown these possible positive effects in clinical studies (Lephart, Porter, Lund et al., 2004; Crain et al., 2008; Patisaul and Jefferson, 2010) and still others have shown negative effects, such as cytotoxicity in primary cortical neurons increasing cell death (Linford et al., 2001), disruption of ovarian development (Losa et al., 2011) or increased neuritic arborization in primary hypothalamic neurons (Marraudino et al., 2019).

In this thesis, exposure to genistein occurs during a specific period of the early postnatal stage and the effects are detected when the animals are adults. During this specific stage of development, hypothalamic circuits are being programmed (Rice and Barone, 2000; Bouret et al., 2004; Ishii and Bouret, 2012) and could be expected that genistein administration during this period to alter this programming, as such circuits have been shown to be sensitive to the effects of estradiol during early developmental (Carrillo et al., 2016, 2019; Pinos et al., 2018). The ARC has been proposed as the main mediator of estrogenic regulation in eating behavior and metabolism, both through the classical ER α and ER β receptors and the most recently discovered estrogenic membrane receptors. Estrogen receptors are the pathways of action for the proven effects of estradiol on energy homeostasis, such as reducing body weight and food intake (Chambers et al., 2007). Estradiol modulates the activity of these hypothalamic neuronal populations through gene regulation and neuronal excitability (Roepke, 2009), with a predominant role of ER α as the main responsible for these effects, given its high expression in the

hypothalamus and the fact that the inactivation or deletion of this receptor produces an increase in weight and metabolic rate. The inclusion of new membrane receptors like the GPER, the first estrogen membrane receptor structurally unrelated to nuclear ERs (Thomas and Dong, 2006), broadens the field of action through which estradiol can exert its effects on the hypothalamus. The characterization of all these receptors in the ARC is not yet complete, such as the colocalization of the ER α receptors in the ARC neurons with other neuropeptides essential for the regulation and programming of these circuits, such as leptin, ghrelin and insulin, as well as the intracellular transduction systems through which all these signals converge. Another important aspect is how the function of estradiol can differ according to the time of development, especially in the perinatal stages, moments when this hormone might have an important role in the modulation of these circuits, adapting them to the environmental conditions to which they are exposed, and in this way determine the phenotype that will manifest in adult times.

The results of experiment 1 showed that exposure to genistein in the early stages of development modifies the long-term expression of POMC neurons in the ARC of female Wistar rats, but not males. In addition, treatment with the high dose of genistein resulted in a delay in the occurrence of sex differences in body weight and altered plasma oestradiol concentrations in both sexes. In contrast, caloric intake or orexin expression was not altered in either sex. Regarding body weight, the results show that the treatment with genistein from P6 to P13 produces an alteration in the development of normal sexual dimorphism, with a delay of one week in the appearance of sexual differences in the G50 group. Sex differences in the control and G10 groups were observed starting at P40, but at P47 in the G50 group. In all cases, the typical pattern in which the male shows a greater body weight than the female was maintained once the differences between the sexes appeared. Similar results have been reported as regards the occurrence of sex differences in a previous study by our group (Carrillo et al., 2019), where oestradiol treatment between P6 and P13 restored the body weight of males fed with a high-fat diet to that of the control group fed with a standard diet, indicating that different mechanisms underlie the action of oestradiol in male and female rats during development in this physiological variable. Such mechanisms could be due to the localization of oestradiol receptors in subcutaneous fat deposits, since the location of the oestrogen receptor in adipose tissue differs between the sexes (Cooke and Naaz, 2004) and could explain the delay in the appearance of sex differences in weight.

Regarding POMC neurons in the ARC, the results obtained in this thesis have shown that exposure to genistein in the early stages of development modifies the long-term expression of these neurons in female Wistar rats but not in males. Previous research has already shown the importance of the inclusion of phytoestrogens in the diet in the perinatal period, since the elimination of phytoestrogens from rodent's feed produces an obese phenotype in females similar to metabolic syndrome, with a significant elevation in endogenous serum estradiol levels that was associated after birth with adverse reproductive outcomes called "fetal estrogenization syndrome" (Ruhlen et al., 2008). This point could be very important in the evaluation of all research using rodent animal models, as isoflavone levels in common diets could interfere with the value of these models and with experimental results. (Jensen and Ritskes-Hoitinga, 2007).

The sex depending effect of oestrogens treatment has been shown in others research (Carrillo et al., 2019), where oestradiol administration modulated hypothalamic POMC mRNA levels in females on a low-protein or high-fat diet, but no effect was detected in male rats or in any other feeding-related peptide in either sex. In addition, when the activity of ER α , ER β and GPER receptors was blocked from P5 to P13, there was a decrease in POMC mRNA levels in female rats, but again, this effect was not detected in males and no alterations were shown in other peptides studied (Carrillo et al., 2020). Likewise, the study with mice by Qiu et al. (2020), shows how oestradiol protected females from the development of insulin resistance characteristic of an obese phenotype, without causing any effect in males. All this data suggests different mechanisms for this hormone in males and females and could explain how genistein, via agonist or antagonist activity on oestrogen receptors, alters the long-term expression of POMC during development in female rats but not in males. Similar results have been found with studies conducted with BPA, another endocrine disruptor with oestrogenic activity. In this case, male mice exposed to BPA exhibited reduced immunopositive POMC projections in PVH and a weaker *Pomc* gene expression in females in the ARC (MacKay et al., 2017). These effects could occur indirectly, through increased genistein activation of NPY/AgRP neurons and the subsequent inhibitory action of these neuronal populations on POMC neurons, possibly through gamma-aminobutyric acid (GABA), or directly, on the process of the neuropeptides that act on these neurons (Roseberry et al., 2004; Tong et al., 2008; Andreoli et al., 2015). Leptin could be the ideal candidate to exert these actions, since leptin supplementation in new-born rats during the lactation period protects against

weight gain in adulthood and improves the control of food intake. This effect has been associated with changes in POMC expression, LepR and cytokine signalling suppressor genes (Palou et al., 2011). In adulthood, leptin regulates energy homeostasis and reproduction through LepR located in POMC neurons in the ARC and has been linked to the action of gonadal oestrogens (Frank et al., 2014). Through a direct effect on POMC neurons in the ARC, both leptin and oestradiol activate the signal transducer and transcription activator 3 (STAT3) pathway (Toda et al., 2017), suggesting a synergistic effect of these two hormones in the regulation of energy homeostasis through the activation of this pathway (Pinos et al., 2018). Likewise, sexual dimorphism has been found in leptin signalling in POMC neurons in the hypothalamus (Shi et al., 2010; Frank et al., 2014), as shown by the greater activation of c-Fos and STAT3 markers produced by intraventricular administration of leptin in female rats compared to males (Clegg et al., 2006). However, other studies have shown how the ER α and LepR are not co-expressed in the same neuronal populations in the ARC (Kim et al., 2016), so it has been suggested that the two hormones act independently to reduce body weight and/or that oestradiol indirectly increases leptin sensitivity, effects that would be necessary to study in the early postnatal periods where these hormones do not have the same effects as in adulthood.

Another pathway through which the effect of genistein could be produced is the oestrogen membrane receptor GPER. The affinity of genistein for GPER is known (Thomas and Dong, 2006), and like BPA, it could alter the programming of the melanocortin circuit, decreasing the projections of populations expressing POMC in the ARC with PVH, projections that depend on the leptin peak that occurs between days P8 and P13 for their development (Bouret et al., 2004; MacKay et al., 2017). Therefore, the interference of genistein in these early postnatal stages on the processes through which leptin exerts its neurotrophic function could result in an altered development of these hypothalamic circuits. The reduction of POMC-ir neurons in females treated with genistein may indicate an interference by this compound on oestradiol and leptin functions, or on the interaction between them, at critical times of development. In short, genistein could have an antiestrogenic effect during these periods, in contrast to adulthood, where genistein has an oestrogenic effect. Therefore, more research is needed to determine the specific action of genistein during the programming period on ERs and whether genistein acts directly or indirectly on POMC neurons.

Regarding orexin expression in LH and in the PFA/DMH continuum, the results of this study have not found effects of genistein in either sex or from the different doses, showing an isomorphic male-female pattern in the expression of this neuropeptide, suggesting the absence of a direct or indirect effect of genistein in postnatal programming in the expression of these populations in rats. This data is in line with the results found in the food intake analysis, in which an effect of genistein treatment was not found either, since food intake behaviour is where orexin seems to play a relevant role along with the regulation of metabolism.

In experiment 2 in this thesis, we studied the effects of genistein on GPER expression in the ARC, with the aim of deepening the knowledge of these processes. EDCs have been shown to exert oestrogenic actions through binding to nuclear oestrogen receptors and the subsequent transcription of genes sensitive to these hormones. In addition, several of these compounds also have the ability to bind to the GPER and thus activate alternative signalling pathways (Périan and Vanacker, 2020). This membrane receptor is widely located in the hypothalamus (Canonaco et al., 2008), and could be one of the main pathways through which genistein exerts its effects on this nucleus. In the analysis carried out in this thesis on the number of neurons that express GPER in the ARC, it has been found that, in the ArcMP subdivision, males have a greater number of positive GPER-ir neurons than females. Treatment with genistein only had an effect on males, and this effect was specific to each subdivision and dose. Given the heterogeneity of the neurons that make up the ARC and the diversity of functions in which they participate (Sohn et al., 2011; Campbell et al., 2017; van den Pol et al., 2019), the study of GPER expression in the ARC subdivisions provides added value and could explain the differences in the physiology of the behaviours that regulate this nucleus, such as feeding and reproductive behaviours (Asarian and Geary, 2013; Schafer et al., 2018; Wang and Moenter, 2020).

Dimorphism in the expression of GPER in the hypothalamus has previously been demonstrated in research carried out on hamsters and rats (Canonaco et al., 2008; Marraudino, Carrillo et al., 2021). Regarding the distribution of GPER in the ARC, Canonaco's research with hamsters in 2008, using the technique of polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR), demonstrated a higher expression of GPER in rostral areas of the ARC in females. In the study of Marraudino et al. (2019) conducted with rats, the reactive GPER-ir neural population was estimated in the entire neural

population, including glial cells. In this study, a dimorphic expression was found in both rostral and caudal areas of the nucleus (anterior, middle and posterior) with a greater number of GPER-ir cells in females than in males, dependent on the oestrous cycle in females in all areas, with a greater expression in the oestrus phase.

Until the inclusion of GPER in the effects of EDCs, it was considered that the increased affinity of genistein for the ER β should mediate its effects. In the research of Shughrue and Merchenthaler (2001), it was found that, in the ARC of female rats, the number of ER β -ir cells was low, with weaker marking in the rostral areas compared to the caudal areas. Regarding the ARC divisions, the ArcM, the ArcL and the ArcMP subdivisions all contain dispersed ER β -ir cell nuclei, with the ArcM subdivision showing the lowest number of immunoreactive cells. In the study by Pérez et al. (2003) using immunohistochemical techniques in rats of both sexes, the results did not show ER β expression in the ARC at all, but rather a high expression of ER α . They also found no differences between sexes in ER α expression or age effect on P3, P7 and P14 (Shughrue and Merchenthaler, 2001; Pérez et al., 2003). The discovery of membrane oestrogen receptors and the capacity of endocrine disruptors to act via these receptors broadens the scope of these compounds as it is not possible to rule out effects independent of their affinity for classical oestrogen receptors. As already noted, among the environmental compounds with oestrogenic capabilities, genistein has been shown to have the higher affinity for GPER (Thomas and Dong, 2006). Therefore, and given the high expression of GPER in the ARC, this receptor could be the ideal candidate to mediate the actions of genistein in the ARC and even to mediate the interaction with the already known effects of ER α on the regulation of food intake (Roepke, 2009; Meyer et al., 2011; Mauvais-Jarvis et al., 2013; Frank et al., 2014; Santollo and Daniels, 2015). Likewise, a better knowledge of the interaction between classical receptors and membrane receptors could clarify the mechanisms through which these processes are regulated. In recent years, the study of GPER has been deepened to elucidate its functions in the regulation of food intake behaviour (Mårtersson et al., 2009; Davis et al., 2014; Prossnitz and Hathaway, 2015; Sharma and Prossnitz, 2017). Studies with animals, both *in vitro* and *in vivo*, has shown that GPER is involved in the regulation of body weight, eating behaviour, inflammation, and glucose and lipid homeostasis (Sharma and Prossnitz, 2017). Due to the high expression of GPER in the body, the regulation of these factors can be carried out both from the central nervous system (hypothalamus) and in the peripheral organs

(pancreas, adipose tissue, muscle and liver) and the convergence of the effects on all these structures is complex.

The results of the present study on the effect of treatment with genistein in the ARC show an alteration of the GPER-ir cells in males, and within this nucleus an effect dependent on the subdivision. The data of all the studies presented so far, including those of the present thesis, suggests an effect of oestradiol and compounds with oestrogenic properties through multiple mechanisms, many of which remain unknown. Current results indicate that the actions of oestradiol on ER α , ER β and GPER during a specific time window during development, from P6 to P13, are relevant for long-term metabolic control and emphasize the importance of studying both sexes. It is critical to unravel the mechanisms underlying the actions of oestradiol and oestrogenic compounds on food intake, both during development and in adulthood, and how this programming takes place differentially in males and females. In our study, one aspect to highlight is that the effect of genistein on the expression of GPER in the ARC in males occurs mainly in the most caudal region, coinciding with the greater expression of ER β in these areas. In previous research carried out by other authors, a higher number of glutamate excitatory neurons was found in the caudal areas of the ARC compared to the most rostral areas (van den Pol et al., 2019). The activation of glutamatergic neurotransmission in the ARC produces an anorectic effect regulated in part through the STAT3 signal transduction pathway, a pathway on which the effects of estradiol and leptin have previously been described (Toda et al., 2017). Altogether, this data suggests an important role of the posterior areas of the ARC in the regulation of energy homeostasis, areas that traditionally have not been given as much attention as the more rostral areas.

In experiment 3, the volume, number of neurons and density of the whole neural population of the ARC was studied. Regarding morphological parameters, it is widely known that volume, total number of cells and dendritic morphology are the main characteristics for the organization of the cytoarchitecture of the different brain structures (Attili et al., 2019). Traditionally, two of these parameters, the volume and number of neurons, have been used to define the two patterns of sexual dimorphism that occur in the brain (Guillamón and Segovia, 1997). The results found in the present thesis, where the male>female pattern in the number of neurons and the volume is located in the ArcMP subdivision in the control groups, is in line with the results presented from previous studies, where dimorphism is shown in different morphological characteristics of this

nucleus (Matsumoto and Arai, 1980; Garcia-Segura et al., 1985; Leal et al., 1998; Mong et al., 1999; Lenz and McCarthy, 2010). Moreover, treatment with genistein from P6 to P13 altered the pattern of sexual dimorphism of the ARC according to the subdivision analysed. Genistein eliminated the sexual dimorphism observed in the volume and the number of neurons in the ArcMP in the G50 group. Therefore, there appears to be a dose-dependent effect of genistein in the ARC on the expression of morphological sexual dimorphism. For example, in the G10 groups dimorphism has been found in the ArcL in the number of neurons with a female>male pattern, while in the G50 groups, the dimorphism appears in the number of neurons in the ArcD subdivision with the same pattern. This data shows that sexual dimorphism in the cresyl violet-stained neuronal population in the posterior region is relatively stable and is not altered by the presence of genistein during development. However, in the anterior part, this same population seems to be more vulnerable to the action of genistein depending on the dose.

As explained above, sexual dimorphism has already been described in the ARC (Matsumoto and Arai, 1980; Kauffman et al., 2007; Sawai et al., 2012). The research on sexual dimorphism in hypothalamic regions has found that, in different nuclei, differentiation may be due to the same steroid hormone, but the sexual pattern that develops is often specific to a region or type of cell (Lenz and McCarthy, 2010). In addition, even within the same structure, different patterns can be found depending on the neuronal populations that are located in each area, as for example in the BNST (del Abril et al., 1987). In 1980, Matsumoto and Arai studied sexual dimorphism in rats in the type and number of synaptic connections in the ARC and their modification by the neonatal hormonal environment. One of the most interesting results of this study is the one referring to the process of formation of these synapses. These authors showed that this process is not finished at birth and is also modulated by steroid hormones, since treatment with testosterone propionate in females and castration in males reversed sexual patterns (Matsumoto and Arai, 1980). Five years later, Garcia-Segura et al. found sex differences and oestrogen-dependent changes in the maturation of the neuronal plasma membrane organisation of the ARC, with a greater number of intermembrane proteins in females than males (Garcia-Segura et al., 1985). Regarding the volume and number of neurons in the ARC, the studies carried out are scarce and mostly focused on the effect of age on the morphology of the ARC. As noted above, in 1998 Leal et al. found a male>female pattern in the total number of neurons in the ARC of rats. In the present study, the analysis of the subdivisions has allowed us to detect differences in a specific subdivision of the ARC,

however, although the dimorphism found in these subdivisions follows, in general, the same pattern as that found by Leal et al., no sex differences have been found in the total volume or number of neurons as these authors did. This discrepancy may be due to the different age at which the animals were studied, since in our study the animals were sacrificed at postnatal day 90 and in the Leal et al. study at postnatal day 180. It is interesting to note that these authors found greater differences in volume in young animals (6 months) than in older ones (24 months), which would suggest that this difference varies by age (Leal et al., 1998). Previous research has found results of the loss of sex-specific neurons in the hypothalamus in senile rats (Hsu and Peng, 1978; Peng and Hsu, 1982). Specifically, selective loss of neurons was found in the mPOA, anterior hypothalamic area and the ARC of elderly female rats (Hsu et al., 1980). Likewise, long-term exposure to oestradiol in male rats induces this age-related loss of neurons characteristic of female rats in the anterior hypothalamic area and the ARC. However, age-related loss of neurons in these areas in female rats cannot be prevented by ovariectomy (Yang et al., 1993). The differentiation of these structures in the morphological patterns discussed is determined by the action of steroid hormones, particularly by oestradiol. One of the processes through which oestradiol could produce this regulation is through intracellular aromatization of testosterone, since neonatal castration of males feminizes characteristics such as volume, number of cells, connectivity, morphology, neurotransmitter phenotype and molecular signalling, while testosterone treatment in females in early times masculinizes them (Matsumoto and Arai, 1980; Lenz and McCarthy, 2010).

An interesting result found in this thesis is that the results show how exposure to genistein in the early stages of development modifies the long-term expression of populations of the ARC neurons in female rats, but not in males. Specifically, the number of neurons in the ArcM subdivision of female rats treated with the low dose of genistein increased with treatment, however, no effect of genistein on the number of neurons in the high or low dose groups in males was detected. These results highlight two relevant points. First, the dose-dependent effect of genistein, which has already been reported with other EDCs, and second, the differential effect of these compounds between males and females. An example of the dose-dependent effect is manifested in how soy consumption alters thyroid-stimulating hormone (TSH) levels at low doses, increasing T4 concentrations, perhaps by displacing T4 from its binding proteins, but decreases T4 concentrations at higher doses by stimulating TSH secretion (Patisaul, 2005). Likewise, in the SDN-POA there is an alteration of its volume depending on the dose, the period of

exposure and sex, following genistein administration (Patisaul, 2005). In other experimental models, the effects tend to be specific to the phenotype of certain cells, rather than the size and/or volume of a region as a whole, such as in the treatment of rat pups with bisphenol A and genistein during the first two days of life, where the total volume of SDN-POA was not affected, but the number of immunoreactive cells in male rats for the calcium-binding protein, calbindin, was increased in this region (Lephart et al., 1998).

Therefore, it can be concluded that, despite the difficulty in elucidating the mechanisms of sexual differentiation of the brain, the data of this study supports the results of other research which shows how exposure to EDCs during early life stages can have structural consequences in the development of this differentiation. Likewise, these results could indicate an interference of genistein on the modulating role of oestradiol in these early stages of development and a specificity of the ARC subdivisions due to the heterogeneity of the neuronal populations of this nucleus and their response to this hormone.

Conclusions

- The experiments carried out in this thesis show that the administration of genistein in early developmental stages can induce long-term alterations in the hypothalamic nuclei involved in the control of energy homeostasis.
- The results of experiment 1 showed a delay in the onset of sex differences in body weight in the groups treated with the highest dose of genistein. Regarding the expression of POMC in the ARC, a significant decrease in the number of neurons was found in the medial subdivision of the nucleus in the two groups of females treated with genistein. However, no alteration was observed in the rest of the subdivisions or in the expression of orexin in either sex. Therefore, it can be concluded that genistein affects the programming actions of estradiol in hypothalamic feeding circuits differentially in male and female rats during development. In addition, the alterations produced by genistein depend on the subdivision of the arcuate nucleus analyzed.
- In experiment 2, the different doses of genistein modified the expression of the GPER in male rats but not in females, specifically in the posterior medial subdivision of the arcuate nucleus. The ARC posterior subdivisions in males appear to be especially sensitive to the action of genistein, ratifying the ability of this phytoestrogen to act through the GPER and the importance of these areas of the ARC that traditionally have not been given as much attention as other areas. Likewise, the results of this experiment have shown a sexually dimorphic expression of the GPER in the ArcPM subdivision.
- The study of the ARC morphology carried out in experiments 3 shows how the volume and number of Nissl present sexual dimorphism only in certain subdivisions. In addition, this dimorphism presents a differential vulnerability to the genistein treatment in each subdivision, reflecting the heterogeneity of the neuronal populations of the ARC and the possible different functions in which this nucleus is involved in each sex.

- Due to the use of soy as a substitute for milk during lactation, and the special vulnerability of brain circuits' development at this time, further research is needed to detect the possible adverse effects of phytoestrogen intake during these periods of development.