



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE CARBOXILASAS BIOTINILADAS EN  
CEREBRO, HÍGADO Y ÚTERO DE RATA HEMBRA  
ADULTA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**  
P R E S E N T A

M Ó N I C A R O S A S L E M U S



México, D.F.,

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Prof **Marco Antonio Cerbón Cervantes**  
**VOCAL:** Prof **Carmen Adriana Mendoza Rodríguez**  
**SECRETARIO:** Prof **José Ignacio Páramo Ramírez**  
**1er. SUPLENTE:** Prof **Perla Deyanira Maldonado Jiménez**  
**2° SUPLENTE:** Prof **Elly Natty Sánchez Rodríguez**

**Laboratorio de biología de la reproducción**  
**Facultad de Química, L-206 edificio F, UNAM.**

**Asesor del tema** \_\_\_\_\_

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

**Supervisor técnico** \_\_\_\_\_

M. en C. Luciano Mendoza Garcés

**Sustentante** \_\_\_\_\_

Mónica Rosas Lemus

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Marco Antonio Cerbón por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, apoyo y confianza en mi persona para poder llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Adriana Mendoza por sus valiosas sugerencias, correcciones y paciencia durante todo el desarrollo de este trabajo. A Luciano Mendoza Garcés por enseñarme las bases técnicas y científicas del trabajo de investigación, su apoyo y todo el conocimiento transmitido.

A Carolina Álvarez delgado por su ayuda incondicional para el progreso de este trabajo y su valiosa amistad.

A mis compañeros del laboratorio por formar un lugar especial al llegar a trabajar, Gracias: Natty, Karina, Nacho, Luciano, Caro, Paz, Montse por las sonrisas y apoyo.

Al Dr. Ignacio Páramo por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A mi familia por el apoyo, las sonrisas, educación y palabras de aliento.

A los teóricos: Marco y Bere por los momentos agradables, el chal y el café.

Mis amigos del CCH: Harumy, Sandra, Iskra, Enrique, Ricardo, Laura, Liz, Pau, Rodolfo, Luis E, Lalo, Gerardo y Rafa Por tantos momentos tan divertidos e intensos.

Agradezco también el apoyo económico proporcionado por PAPIIT(IN207207) y CONACYT (46759-Q y P47829-Q).

## **DEDICADA**

**A todas esas pequeños pedacitos que han logrado formar parte de la esencia de mi ser:**

Familia: Gracias Martín, Alba, Ernesto, Marbella, Roberto, Oniver y Kendra por su apoyo, sonrisas, ser mis guías, la confianza, educación y las palabras de aliento pero sobre todo porque son mi familia.

Para Ivone Ramírez Flores por ser mi mejor amiga durante toda la vida y desde el principio de los tiempos.

Compañeros del laboratorio: Caro, Natty, Luciano, Kari, Nacho, Dr Cerbón y Dra. Adriana.

Mis amigos de la casa, que me han enseñado a crecer y ser feliz por el hecho de vivir, hacer que valga la pena la vida para compartir con ustedes momentos tan especiales, Gracias: Beto M, Gina I, Jorge M, Sergio M, Bere M, Luis G, Juan Carlos P, Juan Carlos F, Luis M y Alex que sejas con nosotros desde donde quiera que te encuentres.

A mis compañeros de la licenciatura: Cris, Neus, Mau, Ale Quijano, por todos los momentos que pasamos juntos inolvidables, útiles, productivos e improductivos, gracias a eso soy lo que soy ahora, los quiero.

A Luis Ángel Contreras por su apoyo y cariño durante los casi tres años que estuvimos juntos.



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Las hormonas esteroideas.....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Generalidades .....	5
2.1.2 <i>Cambios en los niveles hormonales de la rata adulta</i> <i>y el ciclo estral.....</i>	6
2.1.3 <i>Efectos del estradiol sobre corteza cerebral,</i> <i>hígado y útero de rata.....</i>	10
2.1.4 <i>Estructura y características moleculares de los receptores</i> <i>a hormonas esteroideas.....</i>	13
2.1.5. <i>Regulación de la expresión genética</i> <i>por hormonas esteroideas.....</i>	14
<b>2.3 Carboxilasas.....</b>	<b>17</b>
2.3.1 Generalidades.....	17
2.3.2 <i>Función en el metabolismo .....</i>	<i>19</i>
2.3.2.1. <i>Acetil -CoA carboxilasa (AC).....</i>	<i>20</i>
2.3.2.2 <i>3-Metilcrotonil -CoA carboxilasa (MCC).....</i>	<i>22</i>
2.3.2.3 <i>Piruvato carboxilasa (PC).....</i>	<i>23</i>
2.3.2.4 <i>Propionil-Coa-carboxilasa(PCC).....</i>	<i>25</i>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>26</b>

<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>27</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
6.1 Animales de experimentación.....	28
6.2 Procesamiento del tejido.....	29
6.3 Técnica de western blot.....	29
6.4 Determinación de la expresión de carboxilasas.....	30
6.5 Tratamiento de resultados y análisis estadístico.....	31
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>7.1 Cambios en la expresión de ACC biotinilada.....</b>	<b>32</b>
7.1.1 <i>Cambios en la expresión de ACC biotinilada</i>	
<i>para el modelo farmacológico.....</i>	<i>32</i>
7.1.2 <i>Cambios en la expresión de ACC biotinilada</i>	
<i>en condiciones fisiológicas.....</i>	<i>33</i>
<b>7.2 Cambios en la expresión de PC biotinilada.....</b>	<b>34</b>
7.2.1 <i>Cambios en la expresión de PC biotinilada</i>	
<i>en el modelo farmacológico.....</i>	<i>34</i>
7.2.2 <i>Cambios en la expresión de PC biotinilada</i>	
<i>en condiciones fisiológicas .....</i>	<i>35</i>



<b>7.3. Variaciones en la expresión de MCC biotinilada.....</b>	<b>36</b>
7.3.1. <i>Cambios en la expresión de MCC biotinilada</i>	
<i>en condiciones farmacológicas.....</i>	<i>36</i>
7.3.2. <i>Cambios en la expresión de MCC biotinilada</i>	
<i>en condiciones fisiológicas.....</i>	<i>37</i>
<b>7.4 Cambios en la expresión de PCC biotinilada.....</b>	<b>38</b>
7.4.1. <i>Cambios en la expresión de PCC biotinilada</i>	
<i>en el modelo farmacológico.....</i>	<i>38</i>
7.4.2. <i>Cambios en la expresión de PCC biotinilada</i>	
<i>en condiciones fisiológicas.....</i>	<i>39</i>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>8.1 Factores que intervienen en la regulación</b>	
<b>de la expresión de carboxilasas.....</b>	<b>40</b>
<b>8.2 Efecto del estradiol en la regulación</b>	
<b>de la expresión de ACC.....</b>	<b>41</b>
<b>8.3 Efecto del estradiol en la regulación</b>	
<b>de la expresión de PC.....</b>	<b>42</b>
<b>8.4 Efecto del estradiol en la regulación</b>	
<b>de la expresión de MCC.....</b>	<b>44</b>
<b>8.5 Efecto del estradiol en la regulación</b>	
<b>de la expresión de PCC.....</b>	<b>45</b>

<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>11. ANEXOS</b>	
<b>11.1 Anexo 1.....</b>	<b>55</b>
<b>11.2 Anexo 2.....</b>	<b>57</b>

## **1.RESUMEN**

El estradiol es una hormona esteroide del tipo de los estrógenos, la cual se biosintetiza y se secreta principalmente por los ovarios. Juega un papel fundamental en la regulación de una amplia gama de procesos fisiológicos tales como proliferación celular, conducta sexual, reproductiva, maternal, cognitivo, procesos importantes relacionados con la memoria (Mitchell *et al*, 2001), mantenimiento de la homeostasis hidroléctrica (Junhui Zhang, 2008) y excitación neuronal (Joëls M, 1995).

Los efectos de las hormonas esteroides pueden llevarse a cabo en periodos de tiempo muy variados debido a que tienen diversos mecanismos de acción (Camacho-Arroyo *et al*, 1995; Katzenellenbogen B.S.,200), los cuales han sido clasificados como mecanismo genómico ó clásico y no genómicos ó no clásicos.

El mecanismo de acción genómico ó clásico involucra la participación de receptores nucleares, los cuales son factores de transcripción dependientes del ligando (Tsai M.J y O'Malley, 1994).

Por otra parte, el mecanismo no genómico se caracteriza por ser más rápido, debido a que puede llevarse a cabo en el citoplasma o iniciarse desde la membrana plasmática y así las hormonas pueden tener efecto mediante la inhibición de la síntesis de ARN ó de proteínas (Reichardt *et al*; 1999; Katzenellenbogen, 1996).

Las carboxilasas son enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos, proteínas y gluconeogénesis, las cuales para que puedan llevar a cabo sus funciones, deben encontrarse unidas a la biotina, la cual es una vitamina hidrosoluble que a su vez actúa como regulador de la expresión génica de estas

carboxilasas y otras proteínas involucradas en el proceso de biotinylación (Rodríguez-Melendez, 2004).

Se ha demostrado que algunas hormonas del tipo de los esteroides, como los glucocorticoides y prolactina tienen gran influencia sobre la regulación de la expresión de algunas carboxilasas biotinyladas mediante la activación de correguladores como CREB y STAT5, que se unen a elementos de respuesta ubicados en el promotor de los genes de piruvato carboxilasa (PC) (Herzig, 2001) y acetil CoA carboxilasa (ACC) (Mao, 2002).

Con base en el mecanismo de acción clásico de las hormonas esteroides y la influencia que tiene el estradiol sobre el funcionamiento y proliferación celular, en el presente estudio se determinó la expresión de 4 principales carboxilasas biotinyladas involucradas en el metabolismo celular, acetil CoA carboxilasa, piruvato carboxilasa (PC), metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) y propionil CoA carboxilasa (PCC) en hígado, corteza cerebral y útero de rata hembra adulta, en un modelo farmacológico y durante diferentes etapas del ciclo estral.

Los resultados del modelo farmacológico mostraron un aumento en la expresión para PC en corteza cerebral por efecto del estradiol y ningún cambio significativo para ACC, MCC y PCC en ningún otro tejido.

En condiciones fisiológicas se observó que los cambios observados en cuanto a expresión de carboxilasas se dieron únicamente en el útero el cual es un tejido de alta tasa de proliferación siendo la ACC y la PC las enzimas cuyos cambios son significativos en la expresión en útero, los cuales no se llevan a cabo de la misma manera para las dos enzimas y en ninguno de los dos casos correlaciona directamente con las concentraciones plasmáticas de estradiol pues mientras la

PC disminuye significativamente su expresión durante el proestro , tiene su máxima expresión en el diestro siendo lo contrario para la ACC donde se observó la mínima expresión durante el diestro y se mantuvo constante durante el resto del ciclo.

Los resultados obtenidos, sugieren que las carboxilasas biotiniladas estudiadas se expresan de manera diferente en cada tejido y sólo algunas de ellas muestran un efecto de regulación significativo por efecto del estradiol sobre su expresión, lo cual puede deberse a los requerimientos metabólicos, energéticos, cantidad de receptores a estrógenos y sensibilidad de cada tejido. Estos resultados sugieren un efecto de regulación de la expresión tejido específica.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Las hormonas esteroides.**

#### **2.1.1 Generalidades**

Las hormonas esteroides son un conjunto de moléculas que son biosintetizadas a partir del colesterol en las gónadas y otras glándulas, las cuales aunque guardan relación estructural con su precursor, tienen efectos totalmente diferentes. Juegan un papel fundamental en la regulación de una amplia gama de procesos fisiológicos tales como proliferación, desarrollo, mantenimiento de la homeostasis electroquímica (Zhang J, 2008 ) y excitación neuronal (Marian Joëls, 1997).

La biosíntesis de las hormonas esteroides se lleva a cabo en células específicas del ovario, testículo, la corteza suprarrenal, la placenta y el sistema nervioso central (Feling P, 1995).

Se clasifican en progestinas, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos.

Estas hormonas no se almacenan, una vez que son sintetizadas se secretan al torrente sanguíneo y ahí pueden circular libres o unidas a proteínas plasmáticas como la albúmina o las globulinas, donde pueden actuar como reserva y posteriormente son transportadas hacia otros órganos para su metabolismo y excreción (Williams, 1992).

Los efectos de las hormonas esteroides pueden llevarse a cabo en periodos de tiempo muy variados dependiendo de sus mecanismos de acción y el tejido sobre el cual estén ejerciendo sus efectos (Camacho-Arroyo *et al*, 1995).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Existe una gran cantidad de factores que regulan el metabolismo de las células, el cual se ve modificado por procesos de proliferación y muerte celular. Se sabe desde hace mucho tiempo que las hormonas esteroides, juegan un papel fundamental en procesos de proliferación y muerte celular y se ha demostrado que de este grupo de hormonas, los glucocorticoides y la prolactina tienden a regular la expresión de algunas de las carboxilasas biotiniladas mediante la activación de factores transcripcionales como CREB, JAK 2 y STAT 5. Por lo tanto siguiendo el mecanismo de acción clásico de las hormonas esteroides, es posible que el estradiol tenga un papel similar al de las otras hormonas esteroides, regulando así la expresión de carboxilasas biotiniladas

### ***2.1.2 Cambios en los niveles hormonales de la rata adulta y el ciclo estral.***

Las hormonas esteroides actúan de manera similar en todos los mamíferos, por lo cual la rata es un modelo adecuado para llevar a cabo estudios acerca de los efectos de las hormonas esteroides en condiciones fisiológicas.

La rata es un mamífero de ovulación espontánea, ovulan durante todo el año y su ciclo estral está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro (también llamado diestro temprano) y diestro. Las ratas presentan ciclos de cuatro a cinco días de duración. En ratas que presentan ciclo de cuatro días de duración, los niveles de estradiol en plasma periférico son basales ( $8 \pm 2$  pg/ml) durante el estro (Brown-Grant et al, 1970; Butcher et al, 1974; Freeman, 1988). Los niveles de estradiol en plasma empiezan a aumentar en la tarde del metaestro y durante el diestro hasta llegar a su máximo valor ( $45 \pm 2$  pg/ml) entre las 9:00 am y las 13:00 del proestro (Butcher et al, 1974). Durante la tarde del proestro los niveles de estradiol caen rápidamente y alcanzan valores basales en las primeras horas de la mañana del estro. El estradiol es secretado por los folículos de De Graaf que se encuentran en desarrollo. Los tipos celulares responsables de dicha secreción son las células de la teca interna y las células de la granulosa.

El aumento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH a su vez desencadena la secreción de la hormona luteinizante (LH) por la hipófisis. Los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse alrededor de las 2 a 3 p.m. del proestro, y



alcanzan su nivel máximo ( $37 \pm 5$  ng/ml) entre las 5 y las 7 p.m. esa misma tarde (Figura 1) (Brown-Grant et al, 1970; Butcher et al, 1974; Freeman, 1988). (Hafez, 1970 )

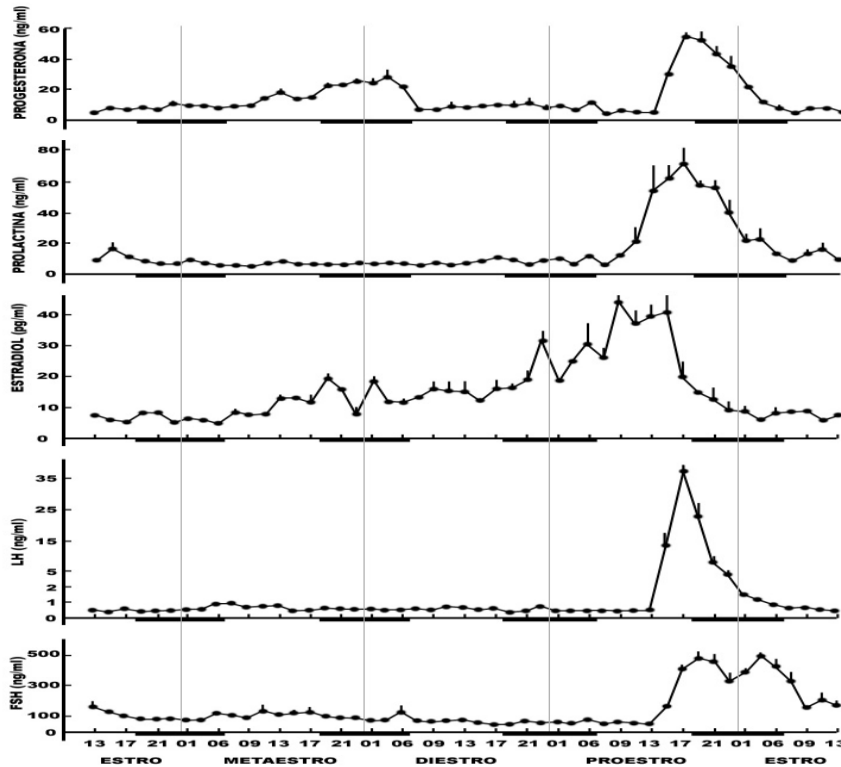


Figura 1. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral. Concentración de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los intervalos de obscuridad en la colonia y los números en la base representan la hora del día (Freeman, 1988).

El rápido incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación en las primeras horas del estro. El nivel de LH en sangre empieza a disminuir en la noche del proestro, alcanza niveles basales ( $0.5 \pm 0.15$  ng/ml) en las primeras horas de la mañana del estro y permanece así durante el metaestro y el diestro (Brown-Grant et al, 1970; Butcher et al, 1974; Freeman, 1988). El patrón de

secreción de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y prolactina durante el ciclo estral es similar al de LH.

Durante el ciclo estral se presentan dos incrementos en los niveles de progesterona secretada en plasma periférico (Figura 1). Durante la tarde del proestro se observa un incremento de progesterona, secretada por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, la cual alcanza su valor máximo entre las 6:00 y 9:00 pm ( $46 \pm 7$  ng/ml). Este incremento sucede casi simultáneamente al incremento de LH. Los niveles de progesterona vuelven a niveles basales ( $2 \pm 1$  ng/ml) para la mañana del estro (Butcher et al, 1974; Freeman, 1988). Un segundo pico, de origen lúteo, se presenta alrededor del mediodía del metaestro ( $24 \pm 3$  ng/ml), se prolonga hasta las primeras horas de la mañana del diestro y desciende a niveles basales poco tiempo después del amanecer del diestro.

Pocas horas después del incremento de progesterona en la tarde del proestro se presenta un comportamiento característico de lordosis. Es probable que el aumento de los niveles de estrógenos seguido por el aumento de los niveles de progesterona facilite la lordosis en el estro, ya que este comportamiento no se presenta en ninguna otra etapa del ciclo estral.

El cambio en las concentraciones de hormonas durante el ciclo estral afecta la actividad del oviducto, útero, cervix y vagina, así como también algunos efectos fisiológicos generalizados. La forma más común como se determina la etapa del ciclo estral, en el que se encuentra cada animal, es por medio del estudio de los cambios morfológicos en las células del epitelio vaginal. En un frotis vaginal pueden presentarse dos o más tipos celulares, pero es el tipo celular

predominante el que indica la etapa del ciclo estral en el que se encuentra. Los tres diferentes tipos celulares que se pueden observar en un frotis vaginal de rata son: a) células epiteliales nucleadas, b) leucocitos polimorfonucleares y c) células epiteliales cornificadas. La pared vaginal durante el estro presenta un aspecto seco, blanco y carente de brillo pero cambia durante el metaestro presentando un aspecto húmedo y rosado. Estos cambios están asociados con la cornificación de las capas superiores durante el estro y con la extensa descamación al final de esta etapa. A medida que se aproxima el proestro los tipos celulares presentes en los fluidos vaginales consiste de células epiteliales nucleadas y leucocitos y ocasionalmente algunas células cornificadas (Figura 2). Durante el proestro, los leucocitos desaparecen, las células epiteliales nucleadas aumentan en número y son gradualmente reemplazadas por células cornificadas sin núcleo. El principio del estro ocurre cuando el frotis presenta 75% de células nucleadas y 25% de células cornificadas (Figura 2). Eventualmente, las células cornificadas son las únicas presentes. El metaestro y el diestro se caracterizan por la aparición de un gran número de leucocitos y la desaparición de las células cornificadas (Figura 2), (Baker, 1979).

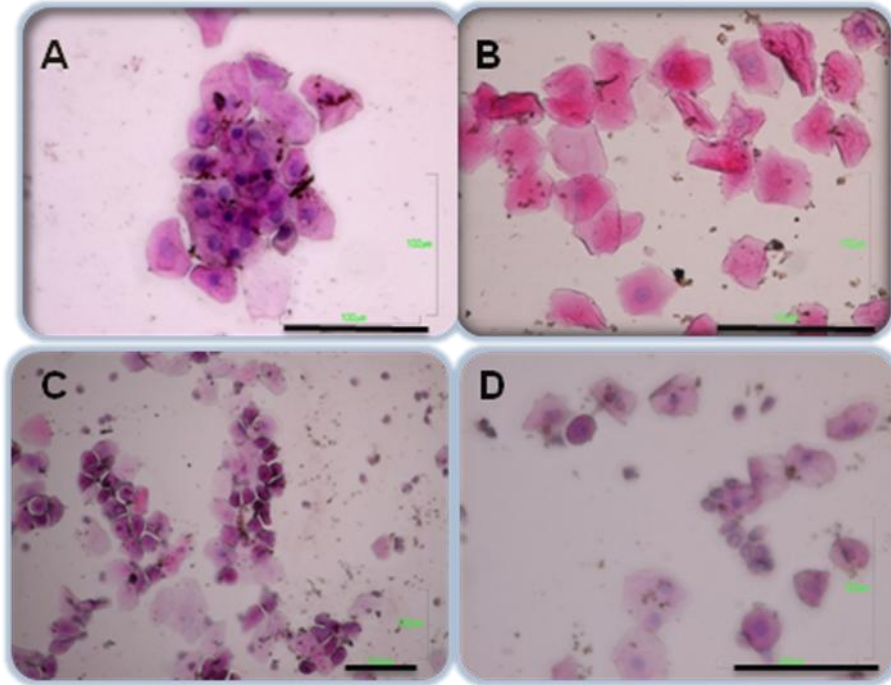


Figura 2. Muestra la morfología celular vaginal de la rata durante el ciclo estral. En la fotografía A se muestran células nucleadas y en racimo características del proestro, en la fotografía B se muestran células cornificadas sin núcleo características del estro, en la fotografía C se muestran células cornificadas y presencia de leucocitos denotando el metaestro, en la fotografía D se observan leucocitos y pocas células cornificadas típicas del diestro.

Durante el proestro, el endometrio está bajo la influencia de los estrógenos producidos por los folículos ováricos (fase folicular), su vascularización se incrementa, el epitelio se convierte en un epitelio columnar bajo y las glándulas presentan cierto crecimiento. La actividad proliferativa del epitelio da lugar a un gran incremento en el área superficial; la proliferación principal es del epitelio luminal. Las células epiteliales secretan un fluido de constitución líquida que contiene algunas proteínas, principalmente enzimas proteolíticas. En esta etapa aumenta la contractibilidad y excitabilidad del endometrio (Hafez, 1970, Perusquia M, 2005).

Durante el estro y el metaestro (fase lútea) las estructuras del endometrio están controladas por la progesterona producida por el cuerpo lúteo: el endometrio se expande, el epitelio luminal se convierte a uno de tipo columnar alto y las glándulas crecen hasta su máximo tamaño, las glándulas ahora son activamente secretoras; secretan un fluido rico en glicoproteínas, carbohidratos y aminoácidos. Las células del estroma se hacen más largas y más hinchadas. La progesterona actúa sobre el miometrio causando el crecimiento de las células y, en contraste con los estrógenos, disminuye la excitabilidad de la musculatura uterina (Hafez, 1970; Perusquia M, 2005). Al final de la fase lútea, durante el diestro, el epitelio secretor se colapsa, el endometrio se reabsorbe y es reemplazado por una pequeña capa de estroma cubierta con tejido epitelial lista para entrar a un nuevo ciclo (Hafez, 1970; Perusquia M, 2005).

### **2.1.3 Efectos del estradiol sobre corteza cerebral, hígado y útero de rata.**

El estradiol es una hormona esteroide sexual del grupo de los estrógenos y es secretada principalmente por el ovario. Tiene diversas e importantes funciones en el organismo, no sólo en la regulación de procesos de proliferación, muerte celular, conducta sexual y reproductiva, sino también en otros órganos como hígado y médula ósea (B.S. Katzenellenbogen *et al* 2000).

Recientemente se ha asociado el estradiol con procesos importantes relacionados con la memoria (Mitchell *et al*, 2001) y se ha demostrado que la terapia con estrógenos en mujeres pos menopáusicas, modula el metabolismo y función de regiones cerebrales relacionadas con la memoria, tales como la corteza

frontal, parietal, temporal e hipocampo (Maki y Resnick, 2000; Resnick et al, 1998; Shaywitz et al, 1999).

Muchos estudios reportan que las variaciones hormonales durante el ciclo menstrual están asociados con cambios en la actividad cerebral, al realizar trabajo motor y de lenguaje (Dietrich *et al*, 2001; Fernández *et al*, 2003; Goldstein *et al*, 2005). Se ha observado que de las hormonas sexuales, el estradiol presenta un efecto excitatorio en la actividad neuronal, mientras que la progesterona parece tener el efecto contrario (Marian Joëls, 1997).

Los receptores a hormonas esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y tanto la isoforma  $\alpha$  como la  $\beta$  tienden a expresarse de manera simultánea a lo largo del sistema nervioso central, sin embargo existen regiones en el cerebro donde hay una mayor expresión en alguna de las dos isoformas. Por ejemplo, en el núcleo hipotalámico ventromedial sólo se expresa el receptor a estrógenos alfa (ER  $\alpha$ ). En contraste las neuronas del bulbo olfatorio, supraóptico, paraventricular, zona incierta, área tegmental ventral, cerebelo, lámina III-V, VIII y la glándula pineal, expresan exclusivamente ER $\beta$  (Weiser M, 2007).

Recientes estudios han demostrado que en la glia se expresan ambas isoformas, sin embargo no se conoce cuál es la función del ER $\beta$  en estas células (Mitra *et al*, 2003).

El hígado es un órgano con alto índice de metabolismo, por lo cual existen una gran cantidad de factores que regulan su funcionamiento y proliferación. Algunos de estos factores son de tipo hormonal. Se ha demostrado que existen receptores a estrógenos en hepatocitos, que son un sistema altamente específico

y saturable implicado en el control de la proliferación en el hígado (Francavilla *et al*, 1993). Así mismo se ha reportado que los estrógenos actúan como promotores de tumores del hígado del hámster y el uso prolongado de estos aumenta la probabilidad de padecer hepatomas e hiperplasia nodular en humanos (Baum *et al*, 1973; Davis *et al*, 1975; Christopherson *et al*, 1975). Se sabe también que múltiples genes son regulados por estrógenos en los hepatocitos. Entre estos los más conocidos, son los de hormonas transportadoras de esteroides como la SHBG o globulina transportadora de esteroides sexuales. Por otra parte en recientes estudios se ha demostrado que la oxidación de ácidos grasos se ve disminuida en el hígado de ratas ovariectomizadas (Paquette A, 2009).

En cuanto al estudio de los mecanismos de acción de hormonas esteroides el tejido más utilizado ha sido el útero ya que durante el ciclo estral presenta cambios morfológicos de gran importancia. El útero está compuesto por dos capas: miometrio y endometrio. El miometrio es la porción muscular de la pared uterina. Consiste de dos capas de músculo liso: una capa gruesa interna que es circular y una capa más delgada externa que es longitudinal. Entre ambas capas se encuentra una capa de tejido conectivo que contiene nervios, vasos linfáticos y sanguíneos. El endometrio consiste de una matriz o estroma, sobre la cual se asienta un epitelio columnar simple bajo (epitelio luminal) con extensiones glandulares (epitelio glandular) que penetran el estroma (Hafez, 1970). El útero también presenta cambios cíclicos, dependientes de esteroides, tanto en su estructura como en su función debido a que los cambios cíclicos en los niveles de estradiol y progesterona inducen la proliferación y la muerte del epitelio uterino durante el ciclo estral, así que durante cada ciclo, el útero inicialmente se prepara

para recibir y transportar el espermatozoide del cervix al oviducto (Bertalanffy y Lau, 1963; Marcus, 1974; Spornitz *et al*, 1994, Mendoza Rodríguez *et al* 2003; 2005). Estos eventos ocurren en respuesta a los cambios cíclicos de los niveles de hormonas esteroides (Butcher *et al*, 1974).

Los estrógenos tienen gran influencia sobre la replicación del ADN y la proliferación celular en el útero de los mamíferos (Clark, 1971; Kaye *et al*, 1972; Marcus, 1974), la cual es inhibida por la progesterona (P4) (; Martin *et al*, 1973; Kirkland *et al*, 1979; Kurita, 2001). De todos los tipos celulares que conforman el útero (epitelios, estroma y miometrio), solamente el EL y el EG proliferan en respuesta primaria a los estrógenos en la rata adulta ovariectomizada (Clark, 1971).

#### **2.1.4 Estructura y características moleculares de los receptores a hormonas esteroides.**

Los esteroides sexuales llevan a cabo su función debido a que interactúan con receptores específicos. Estos receptores a hormonas esteroides forman parte de una súper familia de proteínas con un alto grado de homología, los cuales son activados al unirse el ligando. Estos receptores funcionan como factores de transcripción que tienen estructura y funciones muy similares. La mayoría de los estudios indican que estos factores de transcripción al interactuar con el ADN aumentan el reclutamiento del complejo de pre-iniciación con los factores generales de la transcripción (FGT) en promotores específicos (Mendoza-Rodríguez *et al*, 2001a).



El análisis detallado de la estructura y función de estos receptores ha permitido establecer características generales de los miembros de esta súper familia. En forma breve podemos decir que a lo largo del receptor encontramos diferentes funciones: en la región amino terminal (dominio A/B) se encuentra la función de activación o AF-1. En la región central (dominio C) se encuentra el dominio de unión al ADN (o DNA binding domain -DBD), así como una región de charnela o bisagra (dominio D) la cual contiene la señal de localización nuclear. En la región carboxilo terminal (dominio E) se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD), así como otra función de activación (AF-2) y una región de dimerización (Mendoza-Rodríguez *et al*, 2001) Figura 3.

#### **2.1.5. Regulación de la expresión genética por hormonas esteroides**

El mecanismo de acción de las hormonas esteroides es sumamente complejo, sin embargo la mayoría de los estudios realizados hasta ahora han permitido la caracterización casi completa del mecanismo de acción de estos receptores activados por el ligando.

Los estrógenos tienen acción gracias a la unión de estos con su receptor (RE), el cual es un factor de transcripción ligando específico. El complejo RE-ligando específico interacciona con sitios de unión específicos del ADN llamados elementos de respuesta a estrógenos (ERE), localizados en genes blanco, los cuales se asocian con coactivadores (o correpresores) y otras proteínas reguladoras las cuales forman lo que se llama el complejo de transcripción activo (Mendoza-Rodríguez *et al*, 2001a). El complejo RE-ligando activo modifica la

expresión de múltiples genes, entre los cuales podemos citar al receptor de progesterona (PR) (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Savouret et al, 1994), el factor de crecimiento epidermoide (Di Augustine et al, 1988; Huet-Hudson et al, 1990) y el factor de crecimiento similar a la insulina.

Una vez que el receptor activado interacciona con el ADN, se ha demostrado que los receptores son capaces de reclutar corre reguladores. A la fecha, se han identificado más de 30 diferentes Coactivadores o complejos Coactivadores que están involucrados en la activación de la transcripción regulada por receptores nucleares (McKenna *et al*, 1999).

Muchos de estos coactivadores son bifuncionales, ya que contienen una actividad enzimática además de su dominio de coactivación. Entre las actividades enzimáticas que se han caracterizado en diferentes Coactivadores se encuentran dominios con actividad de acetiltransferasa, metiltransferasa, ATPasa, cinasa y ubiquitin-ligasa, los cuales actúan sobre histonas, receptores, complejos de cofactores y factores generales de transcripción basal, facilitando la entrada subsecuente de diferentes complejos preparando al promotor para la iniciación de la transcripción. El incremento en la acetilación del extremo amino terminal de las histonas se ha correlacionado con la activación de la transcripción, mientras que la hipoacetilación se ha asociado con represión. La visión que prevalece actualmente es que la hiperacetilación del extremos amino terminales de las histonas resulta en alteraciones de las interacciones entre las cargas positivas de las histonas y las cargas negativas del ADN, creando, por lo tanto, un ambiente más accesible a los factores de transcripción (Wolffe y Pruss, 1996). Un efecto adicional de la acetilación de los residuos de lisina de los extremos amino terminales de las histonas es el de

alterar la estructura de la cromatina (Rhodes, 1997). Algunos cofactores que presentan la actividad enzimática de acetiltransferasa son: p300, CBP (CREB binding protein), PCAF (p300/CBP-associated factor) y la familia de proteínas SRC (steroid receptor coactivator) (McKenna *et al*, 1999). Otros Coactivadores que alteran la estructura del nucleosoma son aquellos que tienen actividad intrínseca de ATPasa como los productos de los genes *brm* (brahma) y *brg-1* (brahma-related gene 1) (McKenna *et al*, 1999). Un modelo para el papel que juegan las acetiltransferasas y las enzimas que modifican la cromatina en el reclutamiento del complejo de preiniciación por receptores unidos a su ligando se describe a continuación. El receptor unido a su ligando se asocia con miembros de la familia de SRC y otras acetilasas de histonas (PCAF, p300 y CBP), así como Coactivadores que tienen actividad enzimática de ATPasas capaces de modificar la estructura de la cromatina (hBRM/BRG-1). Estos Coactivadores efectúan alteraciones en el nucleosoma en la región del enhancer/promotor. Subsecuentemente se lleva al cabo la interacción con complejos Coactivadores tales como DRIP/ARC y Mediator, los cuales se piensa que establecen un vínculo directo con los factores generales de la transcripción y la ARN Pol II, lo cual resulta en la estabilización del complejo de preiniciación y la activación de la transcripción (McKenna-NJ y O'Malley, 2000) (Figura 3).

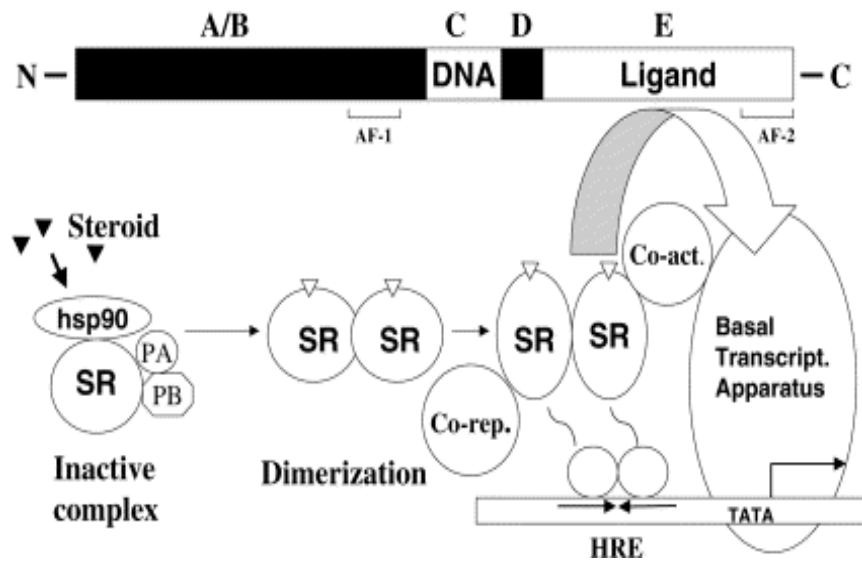


Figura 3.- Se muestra la estructura de los receptores nucleares a hormonas esteroides y su mecanismo de acción a través del reclutamiento de Coactivadores que participan en el complejo basal de la transcripción.

## 2.3 Carboxilasas

### 2.3.1 Generalidades

Las enzimas biotiniladas llevan a cabo procesos de carboxilación, transcarboxilación y descarboxilación de moléculas mediante una reacción acoplada a hidrólisis de ATP.

Las carboxilasas son enzimas biotiniladas que desempeñan un papel muy importante para el metabolismo, ya que participan en procesos esenciales para el mantenimiento de las células tales como la gluconeogénesis, síntesis y degradación de ácidos grasos y proteínas.

Las carboxilasas biotiniladas están conformadas por tres dominios que se diferencian por su función y alto grado de conservación de secuencias, dos de ellos

son catalíticos y uno es estructural. El dominio estructural es donde se encuentra unida la biotina y es llamado dominio de biotinilación. Uno de los sitios catalíticos es donde se lleva a cabo la transferencia del grupo carboxilo a la biotina y se denomina sitio de carboxibiotinilación. El segundo sitio catalítico es donde se lleva a cabo la transferencia del grupo carboxilo al sustrato y se le denomina sitio de transcarboxilación (Basil J. Nikolau, 2003).

La reacción de carboxilación se lleva a cabo en dos fases: Primero se lleva a cabo una reacción de transferencia de un grupo carboxilo proveniente del sustrato bicarbonato al átomo 1'N del grupo prostético de la enzima llamado biotina que se encuentra unida a la carboxilasa y finalmente se transfiere este grupo carboxilo al sustrato aceptor (Figura 4).

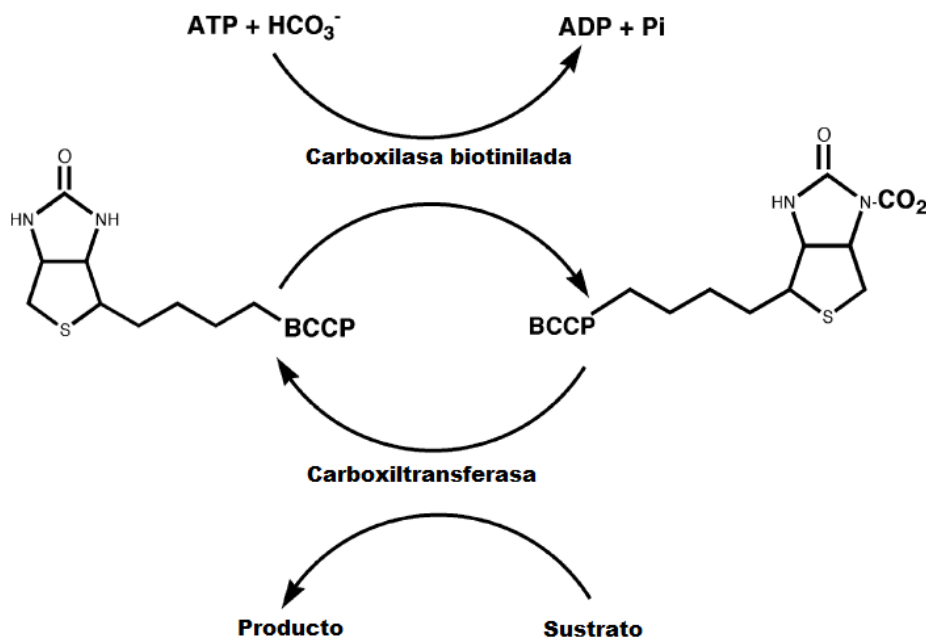


Figura 4. Mecanismo de acción de las carboxilasas biotiniladas.

Modificado de John E., 2002.

La expresión de carboxilasas se encuentra altamente regulada por la dieta, hormonas y otros factores fisiológicos (Abu-Elheiga, *et al*, 2001).

Uno de los factores de la dieta más estudiado es la biotina, una vitamina hidrosoluble poco abundante que se une a la carboxilasas en el dominio de biotinilación, el cual se encuentra en la región amino terminal de un residuo de lisina. En esta región se lleva a cabo la unión covalente de la biotina con la carboxilasa la cual es catalizada por la HCS (holocarboxilasa sintetasa). Esta unión es revertida mediante la biotinidasa, para que la biotina pueda ser reciclada y de esta manera asegurar el buen funcionamiento de regulación de actividad y transcripción tanto de las carboxilasas como de la HCS y biotinidasa (Rodriguez-Melendez *et al*, 2003).

Otro de los mecanismos de regulación de la expresión de estas enzimas es el hormonal. Se ha demostrado que la insulina, glucocorticoides y la prolactina tienen efectos sobre la regulación de la actividad y expresión de algunas de las carboxilasas biotiniladas mediante la interacción de corre reguladores que actúan sobre elementos de respuesta a hormonas HRE de la piruvato carboxilasa (PC) y acetil-CoA-carboxilasa (ACC) (Munday *et al*, 1999). Sin embargo no se sabe si los estrógenos podrían modular la expresión de estas enzimas a través de este mecanismo.

### **2.3.2 Función en el metabolismo**

Debido a que son múltiples las funciones de las carboxilasas, en este apartado se hablará de cada una de ellas por separado destacando la importancia de sus funciones, la estructura, los mecanismos de regulación tanto genética como estructural y los trastornos ó enfermedades que se producen ocasionados por la deficiencia de cada una de ellas.

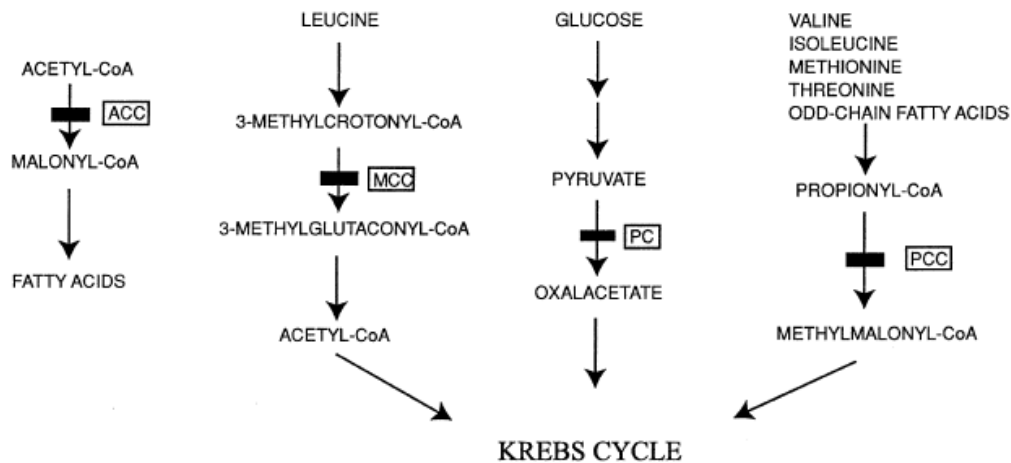


Figura 5.-Función en el metabolismo de las carboxilasas biotiniladas, todas confluyen en el ciclo de Krebs (Pacheco D, 2002) ACC, acetil-CoA-carboxilasa, PC, piruvato carboxilasa, MCC Metilcrotonil-CoA-carboxilasa, PCC, propionil-CoA- carboxilasa.

### 2.3.2.1 Acetil-CoA carboxilasa.

La ACC es una enzima que cataliza la reacción de acetil CoA a malonil CoA para la biosíntesis de ácidos grasos y regula la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria .Es una proteína de alto peso molecular, que en animales, incluyendo los humanos, se encuentra principalmente en dos isoformas, ACC $\alpha$  y ACC $\beta$ , con un peso molecular de aproximadamente 265 y 280KDa, respectivamente. Son sintetizadas a partir de dos genes diferentes, por lo cual se encuentran distribuidas y actúan de manera diferente en cada tejido (Abu-Elheiga, 2003).

Su principal diferencia estructural es un excedente de 114 aa para la ACC $\beta$ , de los cuales los primeros 20 son altamente hidrofóbicos y permiten que esta enzima se encuentre pegada a la matriz mitocondrial.

En contraste, la ACC $\alpha$  se localiza en el citosol, lo cual ha hecho que tengan propiedades diferentes, siendo la ACC $\alpha$  importante para la síntesis de ácidos grasos y la ACC $\beta$  importante para su oxidación (Abu-Elheiga,2003).

La expresión y actividad de ambas isoformas, sobre todo la de la isoforma  $\beta$ , se encuentra estrictamente regulada por hormonas como la prolactina, insulina, cambios en el estado de fosforilación y concentraciones de malonil-CoA, ATP y citrato (Allan GJ, 2002 ).

La regulación de la expresión tejido-específica tanto de la isoforma  $\alpha$  como la  $\beta$ , se encuentra regulada por tres promotores PI, PII y PIII (Lopez-Casillas F, 1991;Travers & Balver 1997), de los cuales PI se expresa principalmente en adipocitos, PII en glándula mamaria y PIII en la mayoría de los tejidos como músculo, hígado e inclusive se encuentra presente también en la glándula mamaria (Mao J, 2002 ).Lo cual trae como consecuencia una isoforma alternativa de ACC $\alpha$  que no parece tener diferencia funcional con la ya reportada.

La ACC $\beta$  se expresa principalmente en tejidos como corazón, músculo y el hígado ( Abu- Elheiga, *et al*,2001).

Por otra parte se ha estudiado en glándula mamaria de bobino la interacción entre la prolactina y el PIII, demostrándose que la prolactina puede regular la transcripción mediante la activación de JAK2 cinasa y fosforilación de STAT5 (Liu X, 1995) lo cual promueve la interacción de este factor de transcripción con su sitio de unión dentro del promotor (Mao, 2002).



Se ha observado que la glucosa y la insulina inhiben la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético de humanos debido a un incremento en los niveles de malonil-CoA, lo cual puede ser causante de un incremento en la concentración de citrato en la célula, el cual, junto con la fosforilación, es un regulador alostérico muy potente que aumenta la actividad de ACC significativamente (Munday MR, 2002).

Se sabe que existen variaciones importantes en la oxidación, síntesis y esterificación de los ácidos grasos en el hígado durante el ciclo reproductivo (Munday MR, 1981 ) y estos cambios están asociados con cambios en el metabolismo mitocondrial de los ésteres de acil- carnitina y en la actividad de otras enzimas (McNeillie EM, 1981).

#### *2.3.2.2. Metilcrotonil-Co-A carboxilasa.*

La metilcrotonil-Co-A carboxilasa (MCC) es una enzima mitocondrial que cataliza la reacción de 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaril-CoA durante el catabolismo de leucina y ácido isovalérico para alimentar con acetoacetato y acetil-CoA el ciclo de Krebs (Figura 5). Se ha reportado su presencia en mamíferos, plantas y algunas bacterias (Pacheco D, 2002).

Está formada por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  con masas moleculares aproximadas de 80KDa y 61.3 KDa en mamíferos (Sonja C., 2005).

La deficiencia de esta enzima produce un raro síndrome llamado 3-metilcrotonilglicinuria. Es causado por mutaciones en los genes que codifican para ambas cadenas de la proteína y de herencia autosómica recesiva (M.E. Gallardo, 2001). Puede ser normal ó asintomático durante la infancia y se caracteriza por la acumulación y excreción en la orina de ácido 3-hidroxiisovalérico, 3-metilcrotonilglicina y 3-hidroxiisovalerilcarnitina (Pacheco D, 2002).

No se conoce mucho acerca de la regulación de la expresión y actividad de esta enzima más allá de la biotina y compuestos análogos.

#### *2.3.2.3 Piruvato carboxilasa.*

La piruvato carboxilasa (PC) Es una enzima de cadena simple que presenta multidominios y secuencias altamente conservadas y tiene una masa molecular de 130 KDa en eucariontes y en la mayoría de las bacterias.

Es una enzima que tiene dos diferentes propósitos, ya que provee de oxaloacetato para la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCK) y así alimentar la gluconeogénesis ó bien mediante el oxaloacetato alimentar al ciclo de Krebs

(Figura 5) (Jitrapakdee, 2006), el cual es de suma importancia en la biosíntesis de glutamato en los astrocitos.

En mamíferos, la PC tiene un papel crucial en la gluconeogénesis en el hígado y musculo, en la lipogénesis y gliceroneogénesis en adipocitos, inducción de la secreción de insulina en células beta el páncreas y en la biosíntesis de ácido gama amino butírico en astrositos (Jitrapakdee,1999).

La deficiencia en el funcionamiento de esta enzima produce acidosis láctica, hipoglicemia, retardo psicomotor y en ocasiones la muerte.

En mamíferos, la PC es regulada por dos distintos promotores, proximal y distal. El promotor proximal genera mRNA que se expresa en tejidos gluconeogénicos y tejido adiposo, mientras que el promotor distal produce mRNA, el cual se ubiquitina y es abundante en islotes pancreáticos (Jitrapakdee, 2006).

Se sabe que los glucocorticoides, la insulina y el glucagon son reguladores de la gluconeogénesis. Recientemente se ha demostrado una regulación transcripcional de PC mediado por AMP cíclico y CREB (Herzig S. 2001) para el promotor proximal en el hígado y adipocotos, mientras que para el promotor distal presente en células  $\beta$  del páncreas las proteínas SP1, SP3 y factor nuclear Y (N-FY), son los más grandes reguladores de la transcripción (Figura 6) (Sunyakumthorn, 2005).

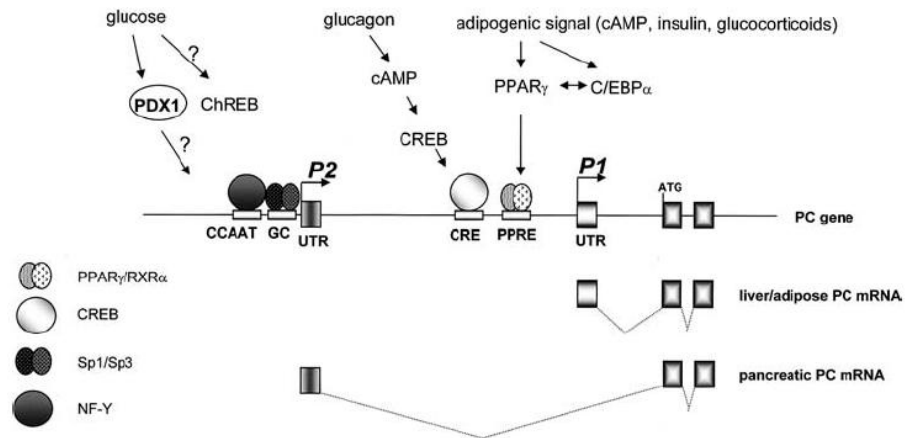


Figura 6.- Muestra los factores de transcripción que pueden interactuar con el promotor de PC y desencadenar actividad lipogénica (cAMP, insulina, glucocorticoides) ó gluconeogénica (Glucagon / CREB) (Jitrapakdee,2006).

#### 2.3.2.4 Propionil-CoA carboxilasa.

La propionil-CoA carboxilasa (PCC) es una enzima mitocondrial, que participa en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y ácidos grasos, catalizando la conversión de propionil-CoA en metilmalonil-CoA , para alimentar de esta forma al ciclo de Krebs con succinato (Figura 5) (Campeau,2001).

Está formada por dos cadenas de polipéptidos,  $\alpha$  y  $\beta$ , codificados por genes independientes, de las cuales sólo la alfa es dependiente de biotina (Cifuentes, 2008) y tienen una masa molecular aproximada de 73 KDa (Campeau,1999) y 54 KDa (Hua J.,2005) respectivamente.

La mutación en los genes que codifican para ambas isoformas de PCC, produce una deficiencia en la expresión de proteína funcional la cual es causante de acidemia propiónica, un desorden metabólico suficientemente severo como para provocar la muerte en neonatos. Se hereda de manera autosómica recesiva y se caracteriza por vómito, dificultad en la alimentación, hipotonía, letargia, acidosis metabólica, cetosis e hiperamonemia.

No se conoce mucho acerca de la regulación de la actividad y expresión de esta enzima además de la biotina y compuestos análogos.

#### **4. OBJETIVOS.**

➤ **Objetivo general**

Analizar el papel que juega el estradiol en la regulación de la expresión de carboxilasas biotiniladas en la rata hembra adulta ovariectomizada y durante el ciclo estral.

➤ **Objetivos particulares:**

- Determinar el efecto del estradiol sobre la expresión de AC, PC, MCC y PCC en corteza cerebral, hígado y útero de rata hembra adulta en un modelo farmacológico.
- Evaluar si existe una regulación de la expresión de AC, PC, MCC y PCC en corteza cerebral, hígado y útero de rata hembra adulta en condiciones fisiológicas.

#### **5. HIPÓTESIS:**

El estradiol tiene influencia sobre procesos de proliferación celular, lo cual implica un alto metabolismo celular. Por lo tanto, puede ser uno de los factores que participen en la regulación de la expresión de enzimas metabólicas, como las carboxilasas biotiniladas.



## **6. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **6.1 Animales de experimentación.**



#### ***Modelo farmacológico.***

Se utilizaron 6 ratas hembras de la cepa wistar ovariectomizadas (Anexo 1) de (3-4 meses de edad), mantenidas bajo ciclos de 12/12 horas de luz- oscuridad con comida y agua *ad libitum*. Quince días después de la ovariectomía, tres ratas fueron tratadas con 3µg de estradiol y las otras tres con el vehículo polietilenglicol (PEG) vía subcutánea y ambos grupos se sacrificaron a las 8h después del tratamiento mediante decapitación.



#### ***Modelo fisiológico***

Se utilizaron 15 ratas hembra de la cepa Wistar de 2.5 meses de edad, mantenidas bajo ciclos de 12/12 horas de luz- oscuridad con comida y agua *ad libitum*. Se les determinó la etapa del ciclo estral mediante frotis vaginales diarios realizados en el mismo horario. Una vez que tuvieron 4 ciclos regulares (4 días), fueron sacrificadas quedando grupos de 3 ratas (3-4 meses de edad) para cada una de las etapas del ciclo estral.



## **6.2 Procesamiento del tejido.**

Se disecaron ambos cuernos uterinos, el hígado y la corteza cerebral de cada rata y fueron preservados en buffer de lisis (Anexo 2) para proteínas con inhibidor de proteasas a 4 °C, posteriormente se realizó la extracción de proteína por fraccionamiento mecánico (POLY TRON® PT-MR 2100 ) sometiendo el tejido a 3 pulsos de 10 s a 4°C y posterior centrifugación (12 500 rpm durante 15min a 4°C). Se separó el sobrenadante (extracto proteico) y fue conservado a -70 °C hasta su utilización.

## **6.3 Técnica de western blot**

1.- Se cuantificaron los extractos proteicos de corteza cerebral, hígado y útero por el método de Bradford (BIO-RAD) (Anexo 1).

2.-Preparación de muestras para electroforesis en buffer para carga de proteínas con  $\beta$ - mercaptoetanol y se someten a 100°C durante 5 min. Posteriormente, se llevan a 4°C hasta que son depositadas en el gel de poliacrilamida.

3.- Se cargan 20 $\mu$ g de proteína por cada pozo y 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular ( Precision plus protein standars caleidoscope BIO-RAD )en el gel SDS-PAGE se somete a un voltaje de 60 v en el gel concentrador 5% durante 1.5 h y a 80 V en gel separador 8%, (cámara de electroforesis BIO-RAD) durante 5-.6 h.

4.-Se transfirieron las proteínas a la membrana por método semi seco (Trans-Blot® SD de BIO-RAD) y se bloquearon con BSA 1% en PBS- Tween 1% durante 12-14 h a 4°C en agitación constante

5.-Se realizaron 3 lavados suaves con PBS-Tween 1% y se agregó streptavidina 1:20 (DAKO LSAB+ HRP) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente en agitación constante.

6.- Se realizaron 2 lavados de 10 min con PBS-Tween 1% a temperatura ambiente y agitación constante.

7.-Las membranas son tratadas con el reactivo de detección ECL™ (Amersham Biosciences) y se exponen en la oscuridad las placas ( Hyperfilm™ ECL Amersham Biosciences sensibles a quimioluminiscencia) hacia a las membranas tratadas.

8.- Se revelan las placas (Solución de revelado y fijado de Kodak).

9.-Se cuantifica la intensidad de banda por área en el programa Kodak ID 3.6 y se calcula la expresión relativa de cada proteína.

10.- Se calculó el promedio y la desviación estándar de la expresión de cada proteína por grupo de animales del experimento.

#### **6.4 Determinación de la expresión de carboxilasas.**

1. Se utilizó el programa Kodak ID 3.6 para cuantificar la intensidad de las bandas de cada carboxilasa así como del control de carga (se sumaron las bandas de Tubulina fosforilada (60 KDa) como de Tubulina no fosforilada (50KDa)) y se calculó la expresión relativa para cada carboxilasa.

## **6.5 Tratamiento de resultados y análisis estadístico.**

1.-Se realizó una normalización en porcentaje de expresión relativa de cada una de las carboxilasas por experimento, asignandole el valor de 1 de expresión relativa a la intensidad de las bandas de las ratas Ovx en el modelo farmacológico y para el modelo fisiológico se utilizó la etapa del estro.

2.- Se calculó el promedio, la desviación estándar y se realizó un análisis de varianza seguido de una comparación múltiple mediante t de tukey para cada una de las carboxilasas en condiciones fisiológicas y una comparación de t para el grupo del modelo farmacológico. Se realizaron las gráficas correspondientes para cada una de las enzimas en ambos modelos.



## 7. RESULTADOS.

### 7.1 Cambios en la expresión de ACC biotinilada.

#### 7.1.1 Cambios en la expresión de ACC biotinilada para el modelo farmacológico.

Al realizar la detección de ACC biotinilada se observó que no presenta diferencia estadísticamente significativa entre las ratas OVX y OVX +E<sub>2</sub> en hígado (Figura 7) y no se detectó en corteza cerebral ni en útero.

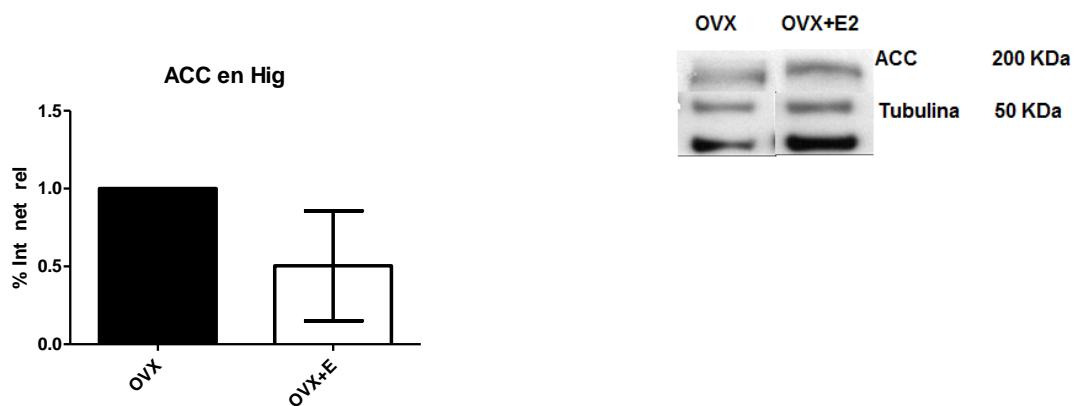


Figura 7.- Expresión de ACC biotinilada. Gráfica de la media y el error estándar de tres experimentos independientes y fotografías de western blot representativos de los cambios en la expresión de ACC para el modelo farmacológico en hígado. OVX, ovariectomizada; OVX + E, ovariectomizada + Estradiol.

### 7.1.2 Cambios en la expresión de ACC biotinilada en condiciones fisiológicas.

Los resultados de la detección de ACC muestran que únicamente hay cambios estadísticamente significativos en la expresión de ACC biotinilada en el útero, siendo notorio una disminución de la expresión durante el diestro, mientras que para la corteza cerebral e hígado no hay cambios estadísticamente significativos en su expresión (Figura 8).

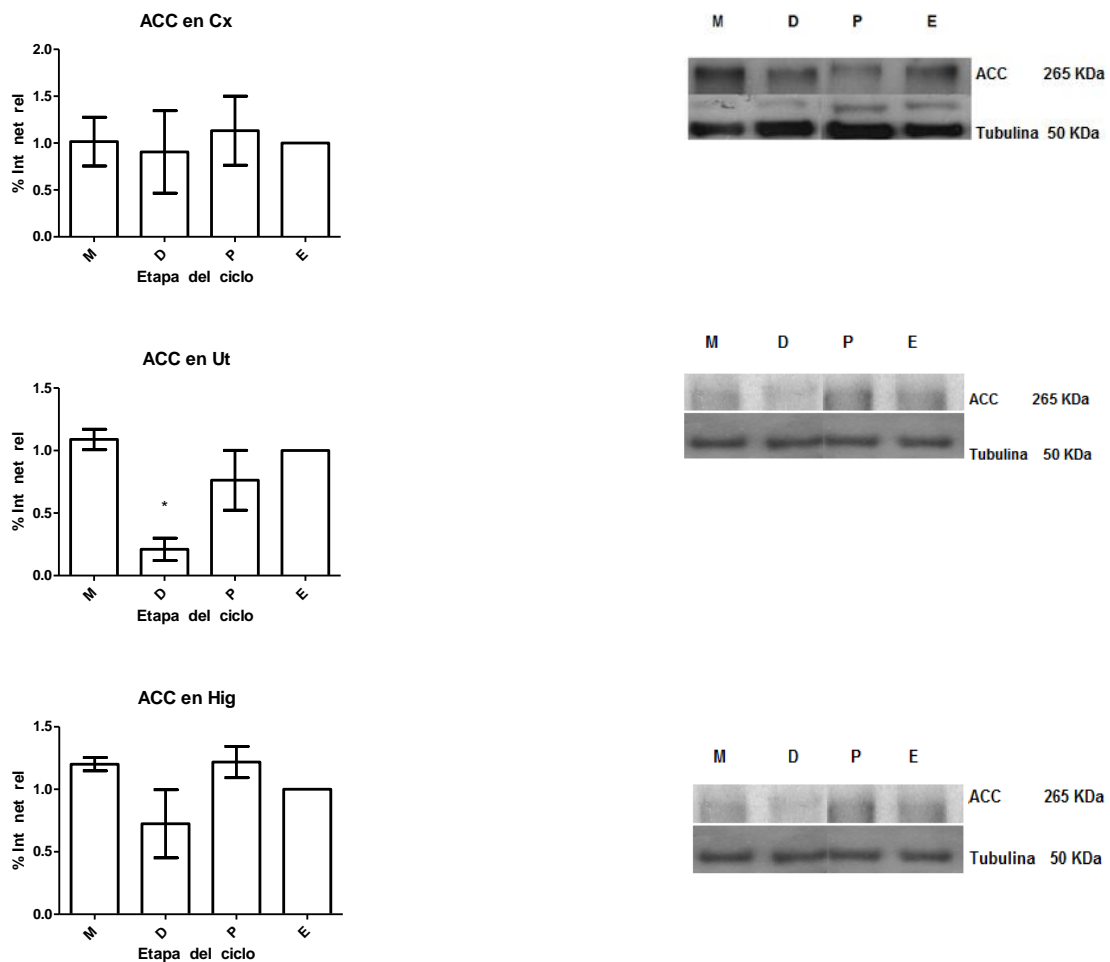


Figura 8.- Expresión de ACC biotinilada. Gráfica y fotografía de western blot representativos de tres experimentos independientes de los cambios en la expresión de ACC biotinilada en condiciones fisiológicas para corteza cerebral, hígado y útero. M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  D vs P, E y M.

## 7.2 Cambios en la expresión de PC biotinilada.

### 7.2.1. Cambios en la expresión de PC biotinilada en el modelo farmacológico.

En el estudio de detección de PC puede observarse que hay un aumento estadísticamente significativo en la expresión de PC en la corteza cerebral por efecto del estradiol. No así para el hígado y el útero en ratas OVX y OVX+E<sub>2</sub> (Figura 9).

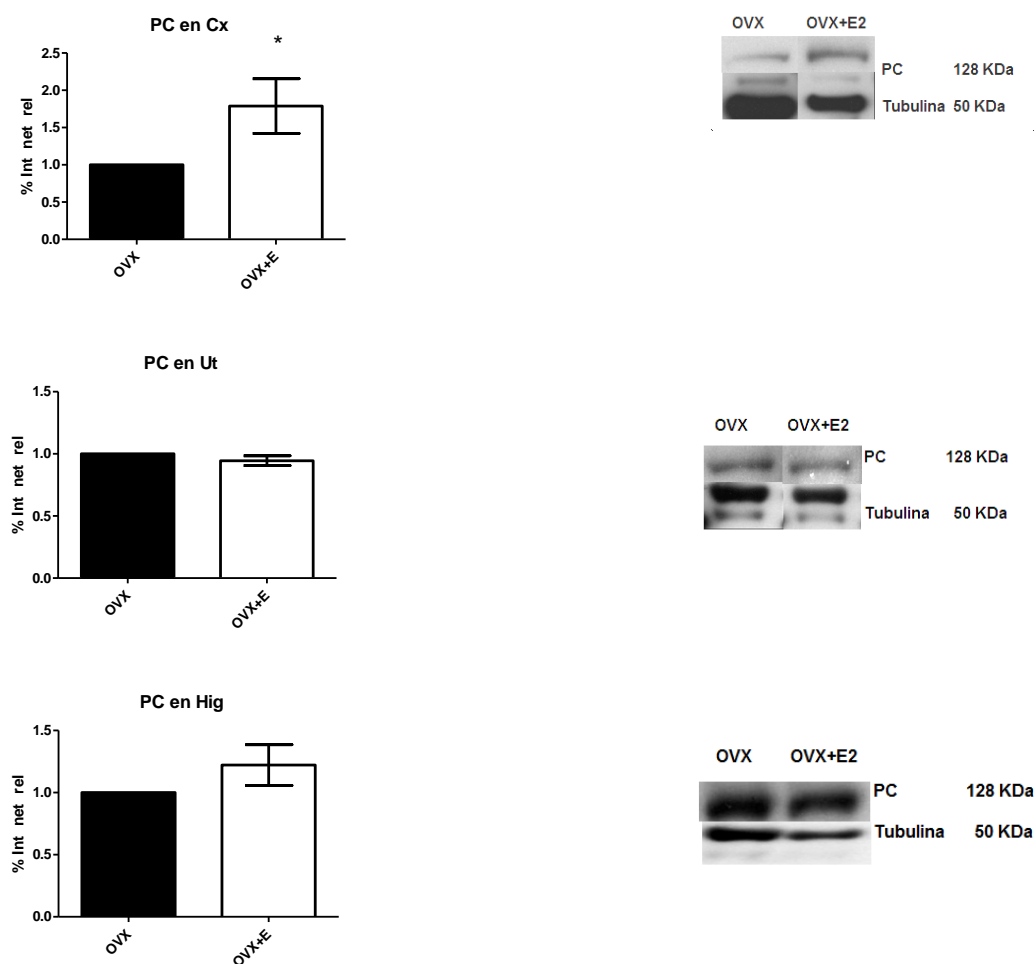


Figura 9.- Expresión de PC biotinilada. Gráfica de la media y el error estándar de tres experimentos independientes y fotografías de western blot representativas de los cambios en la expresión de PC biotinilada para el modelo farmacológico en corteza cerebral, hígado y útero. \* Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$ . OVX, ovariectomizada; OVX + E, ovariectomizada + Estradiol

### 7.2.2. Cambios en la expresión de PC biotinilada en condiciones fisiológicas.

Puede observarse mediante el estudio de western blot, que únicamente hay cambios estadísticamente significativos en la expresión de PC en útero, siendo notorio un incremento de la expresión durante el diestro, así como una disminución significativa de la expresión durante el proestro. Para el hígado y la corteza no se observaron cambios estadísticamente significativos en su expresión (Figura 10).

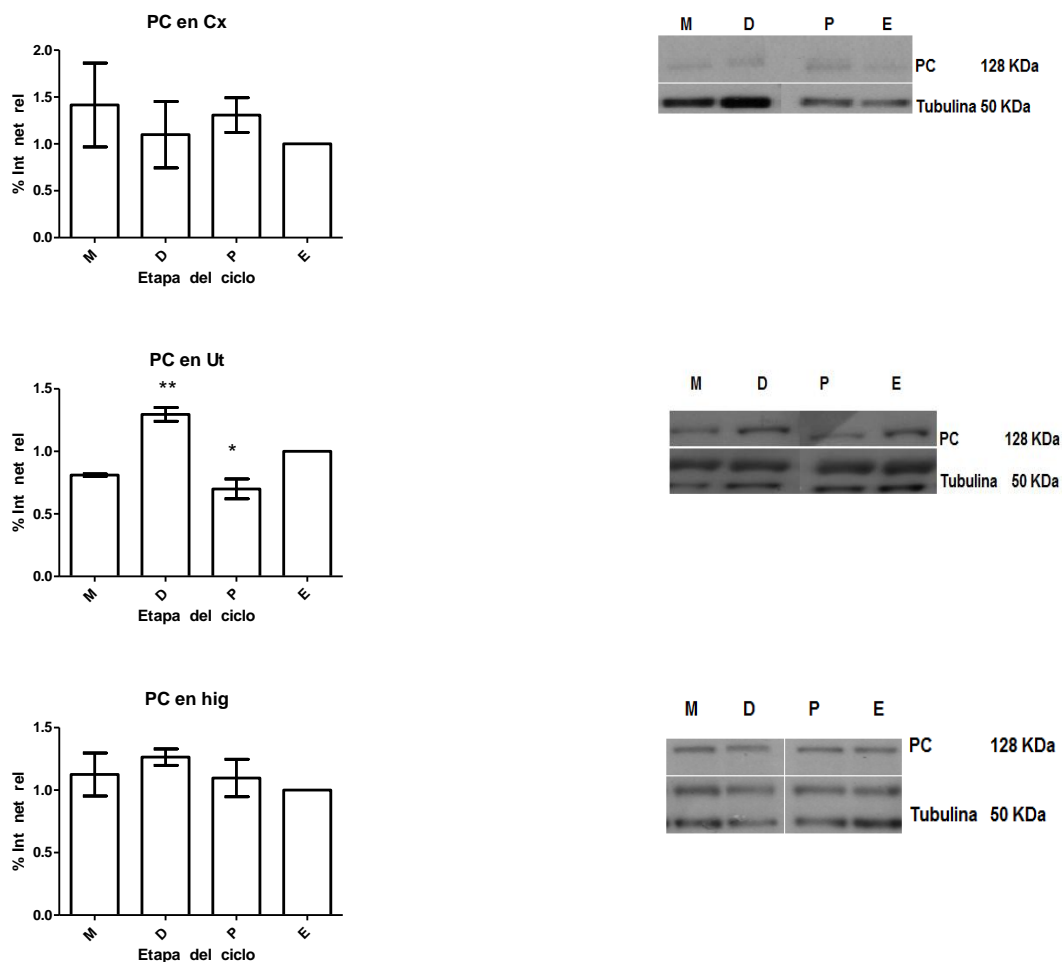


Figura 10.- Expresión de PC biotinilada. Gráfica y fotografía de western blot representativos de tres experimentos independientes de los cambios en la expresión de PC en condiciones fisiológicas para corteza cerebral, hígado y útero. M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro. \* Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  P vs E. \*\*Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  D vs P, E, y M.



### 7.3. Variaciones en la expresión de MCC biotinilada.

#### 7.3.1. Cambios en la expresión de MCC biotinilada en condiciones farmacológicas.

En la detección de MCC puede observarse que no hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión de MCC en ratas OVX y OVX+E en el hígado (Figura 11). Esta enzima biotinilada no fue detectada en la corteza cerebral ni en el útero.

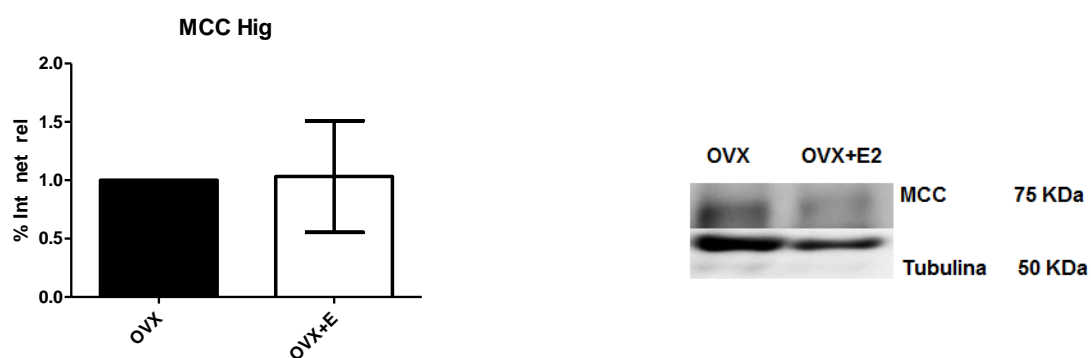


Figura 11.- Expresión de MCC biotinilada. Gráfica de la media y el error estándar de tres experimentos independientes y fotografías de western blot representativos de los cambios en la expresión de MCC para el modelo farmacológico. OVX, ovariectomizada; OVX + E, ovariectomizada + estradiol.

7.3.2. Cambios en la expresión de MCC biotinilada en condiciones fisiológicas.

La detección de MCC mediante western blot permitió observar que no hay cambios estadísticamente significativos en la expresión de MCC biotinilada para la corteza cerebral e hígado (Figura 12). En el útero no fue detectada.

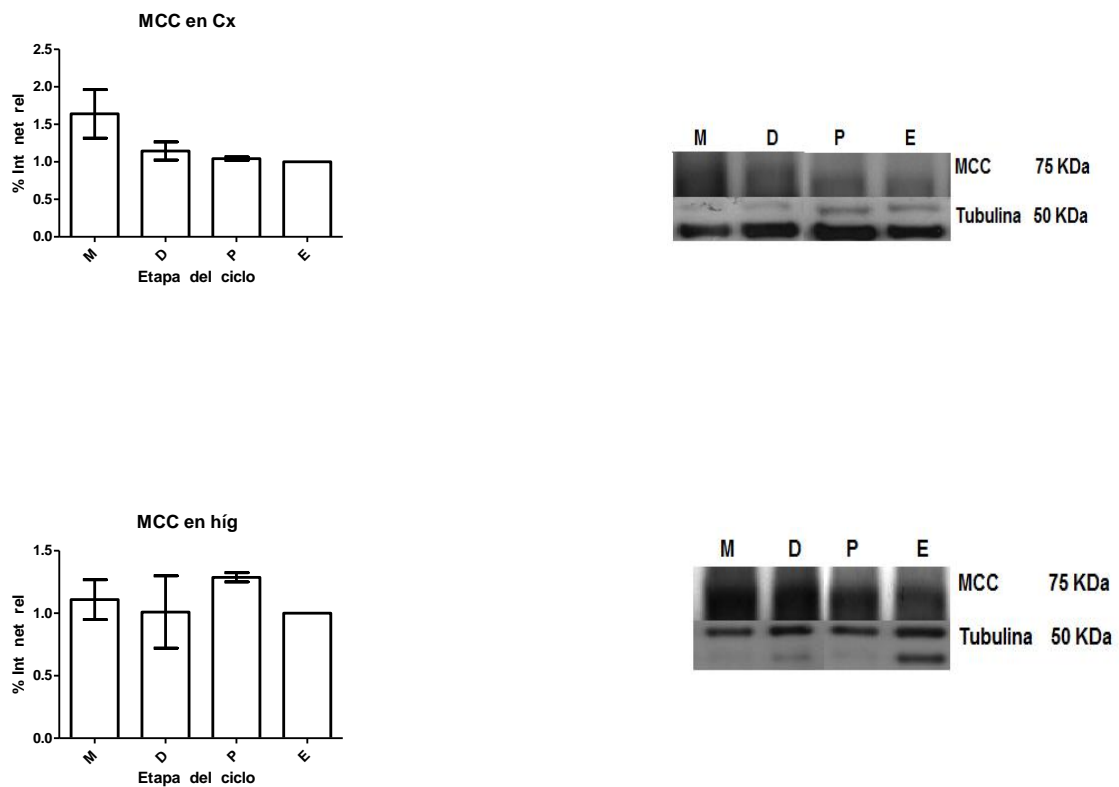


Figura 12.- Expresión de MCC biotinilada. Gráfica y fotografía de western blot representativos de tres experimentos independientes de los cambios en la expresión de MCC en condiciones fisiológicas para corteza cerebral e hígado. M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro.

## 7.4 Cambios en la expresión de PCC biotinilada.

### 7.4.1. Cambios en la expresión de PCC biotinilada en el modelo farmacológico.

En los resultados del estudio de detección para PCC se observa que no hay un cambios estadísticamente significativos en ratas OVX y OVX+E<sub>2</sub> en corteza cerebral, hígado ni útero (Figura 13).

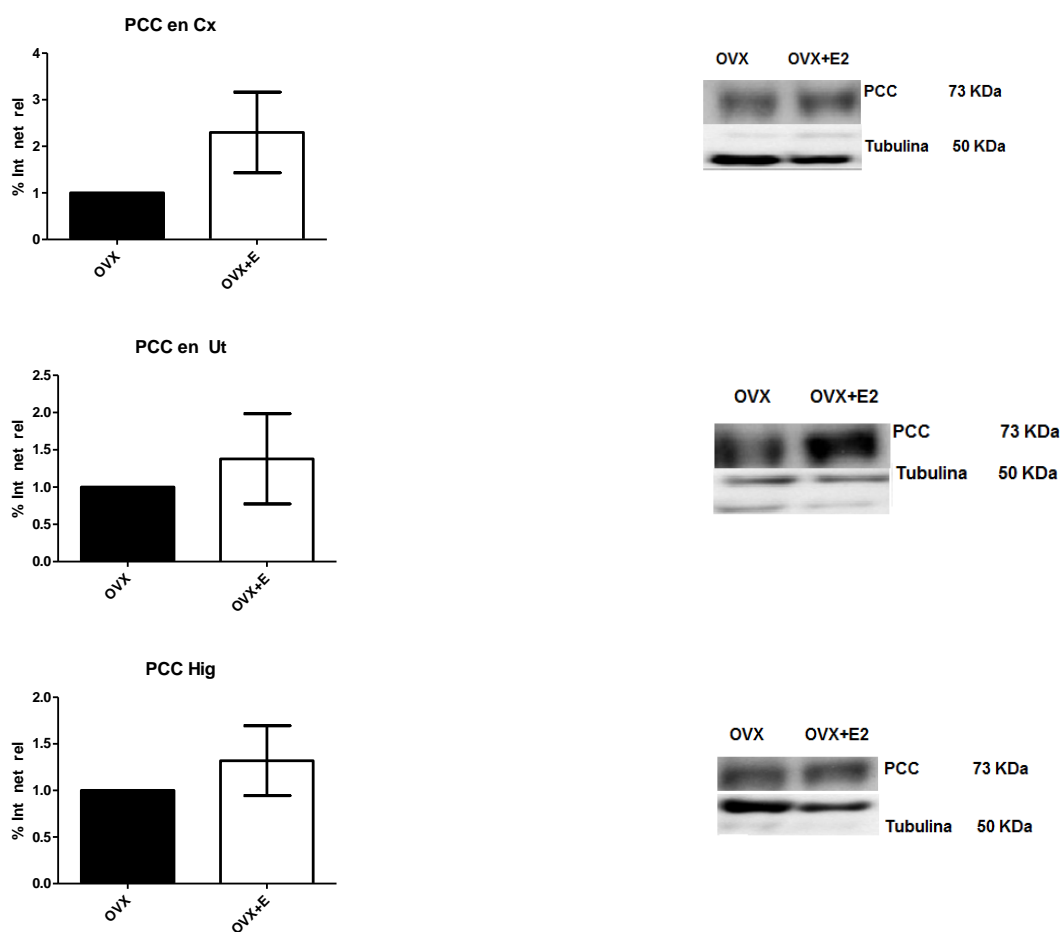


Figura 13.- Expresión de PCC biotinilada. Gráfica de la media y el error estándar de tres experimentos independientes y fotografías de western blot representativos de los cambios en la expresión de PCC para el modelo farmacológico. OVX, ovariectomizada; OVX + E, ovariectomizada + estradio

#### 7.4.2. Cambios en la expresión de PCC en condiciones fisiológicas.

Mediante el estudio de detección de PCC por western blot se puede observar que no hay cambios estadísticamente significativos en la expresión de PCC en la corteza cerebral, útero ni hígado (Figura 14).

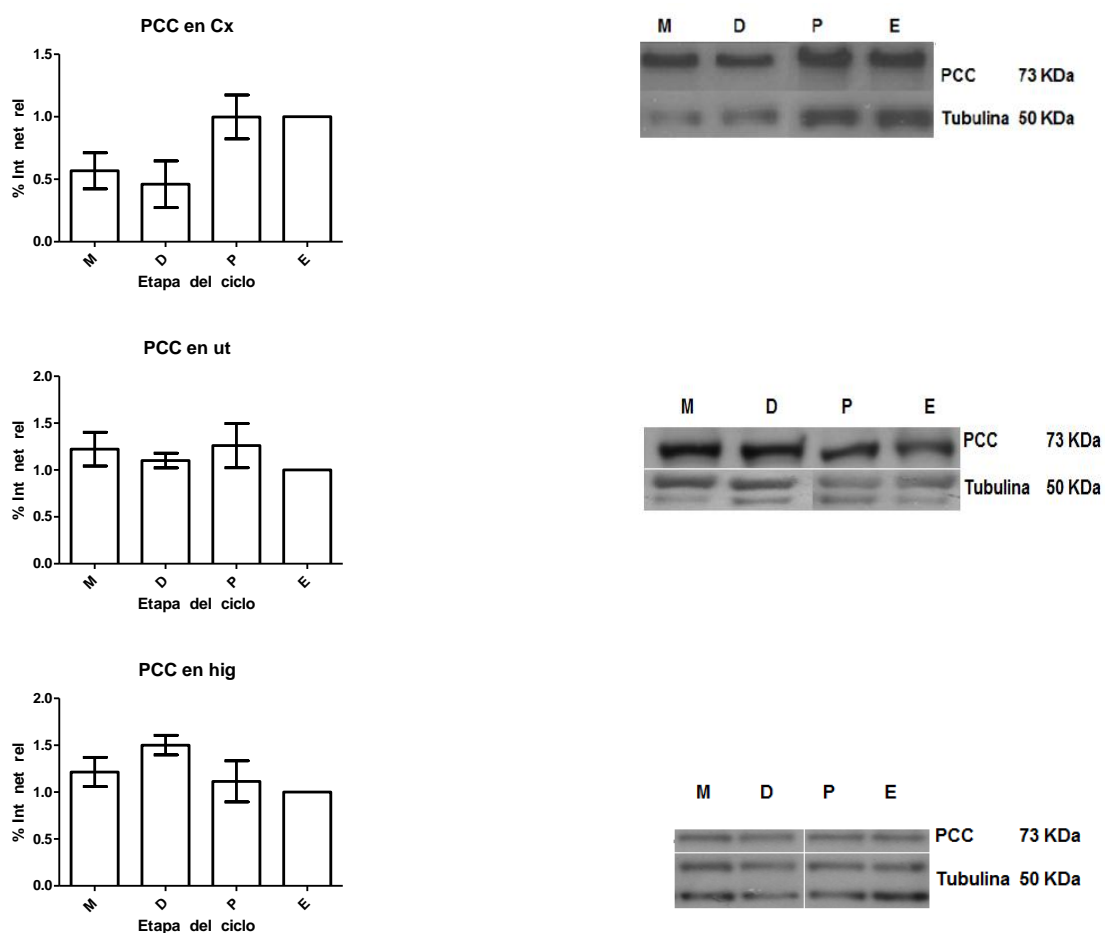


Figura 14.- Expresión de PCC biotinilada. Gráfica de la media y el error estándar de tres experimentos independientes y fotografía de western blot representativos de los cambios en la expresión de PCC en condiciones fisiológicas para corteza cerebral, útero e hígado. M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro.

## **8. DISCUSIÓN.**

### ***8.1 Factores que intervienen en la regulación de la expresión de carboxilasas.***

Es conocido desde hace tiempo que uno de los factores más importantes en la regulación de la expresión y funcionamiento de las carboxilasas es la biotina. Sin embargo, otros estudios han arrojado evidencia de la participación de otros factores de tipo hormonal que pueden modificar tanto la actividad como la expresión de algunas de las carboxilasas a nivel transcripcional mediante correguladores semejantes a los que se activan en respuesta a la unión del estradiol con su receptor nuclear (Jitrapakdee S, *et al*, 2006 .).

Es evidente que la expresión de ciertas carboxilasas sí se hace presente en mayor cantidad en algunos tejidos y no así para otros, lo cual es lógico si se toma en cuenta que cada tejido tiene mayor ó menor índice metabólico. Tal es el caso del hígado, donde se observa la presencia de las 4 carboxilasas estudiadas en una gran cantidad, seguido de la corteza cerebral y finalmente el útero.

## **8.2 Efecto del estradiol en la regulación de la expresión de ACC.**

La ACC es una enzima implicada en el metabolismo de ácidos grasos, la cual es una fuente importante de energía para la célula.

Las células en estado proliferativo, como es el caso del endometrio, requieren una gran cantidad de energía para realizar procesos de duplicación y síntesis de membranas celulares durante la división celular.

En el presente estudio se observó que la ACC biotinilada es una enzima que no se detecta en todos los órganos estudiados de manera abundante, puesto que sólo se detectó en el hígado. La expresión de esta enzima no presentó cambios significativos por efecto del estradiol en el modelo farmacológico. Lo anterior contrasta con reportes previos donde se demuestra una disminución del catabolismo de ácidos grasos por efecto del estradiol (Paquette A, 2009), aunque estos cambios pueden deberse a la participación de otras enzimas no biotiniladas que participen en el metabolismo de ácidos grasos. Así mismo, se observó que el estradiol no tiene efectos directos sobre la regulación de la expresión de esta enzima. Anteriormente se ha demostrado que el gen de esta enzima tiene elementos de respuesta a hormonas esteroides, como la prolactina (Muday MR, 1999). Sin embargo, es posible que no tenga elementos de respuesta para el estradiol y, por lo tanto, no se observe un efecto en la regulación de la expresión de esta enzima. Por otra parte, se observó que en condiciones fisiológicas existe una importante disminución en la expresión de esta enzima en el útero durante el diestro y que se mantiene en un nivel mayor de manera constante para las otras etapas del ciclo. Sin

embargo, no existe una correlación entre los niveles de ACC con la concentración plasmática del estradiol o la prolactina, ya que la concentración de esta enzima no presenta un incremento significativo en la etapa del proestro que es cuando se presentan los niveles más elevados de estradiol y prolactina (Liu B, 2008).

En el hígado y corteza cerebral no se observaron cambios significativos en su expresión.

### ***8.3 Efecto del estradiol en la regulación de la expresión de PC.***

La PC es una enzima que tiene la función de mantener una vía alternativa para iniciar la gluconeogénesis en hígado, la alimentación del ciclo de Krebs con oxaloacetato en la mayoría de los tejidos y en el cerebro está involucrada en la producción de moléculas importantes para la síntesis de neurotransmisores en las neuronas. En este estudio, la enzima PC biotinilada se detectó en todos los tejidos de las ratas ovariectomizadas, con una abundancia similar en útero e hígado entre los animales OVX y los OVX + E<sub>2</sub>, y presentó un incremento significativo en su expresión por efecto del estradiol en la corteza cerebral.

En otros estudios de la regulación de la expresión y la actividad de esta enzima se ha estudiado mucho acerca del altruismo celular, que propone el mantenimiento de moléculas importantes para la actividad de esta enzima, como la biotina, siempre disponibles en el cerebro mientras en otros órganos puede haber variaciones importantes en la disponibilidad de este factor, como podría ser el caso del hígado y el útero (León-Del Río A, 2005, Pacheco-

Alvarez, 2002). Los resultados obtenidos en este caso demuestran un importante incremento en su expresión por efecto del estradiol lo cual concuerda con la idea del altruismo y abre una nueva perspectiva acerca de los factores que intervienen en la regulación de esta enzima, puesto que en condiciones fisiológicas presentó cambios significativos en su expresión para el útero, siendo máxima durante el diestro y mínima en el proestro. La proliferación de ambos epitelios inicia en metaestro, se mantiene elevada en diestro, y en proestro solamente presenta proliferación el epitelio luminal. Durante el estro se presenta muerte de ambos epitelios y proliferación del estroma (Mendoza-Rodríguez, 2001) Por lo cual no existe una correlación entre la concentración plasmática del estradiol, la proliferación del útero y los cambios en la expresión de la enzima.

Por otra parte no se detectaron cambios significativos en la expresión de la enzima para el hígado y la corteza cerebral que son tejidos con baja tasa de proliferación, alto metabolismo, importantes requerimientos energéticos pero con menor cantidad de receptores a estradiol (Francavilla, 1993) y por tanto menos sensibles a los efectos de este.



#### **8.4 Efecto del estradiol en la regulación de la expresión de MCC.**

La MCC es una enzima involucrada en el metabolismo de aminoácidos y no es conocido mucho acerca de la regulación de su expresión por efecto de hormonas esteroides, como el estradiol. Debido a los efectos ya conocidos del estradiol sobre la proliferación de los tejidos se esperaría un alto metabolismo de estas moléculas. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión de esta enzima por efecto del estradiol ni en condiciones farmacológicas, ni en condiciones fisiológicas. Lo anterior podría sugerir que el metabolismo de aminoácidos podría estarse llevado a cabo mediante la regulación de la expresión ó actividad de otras enzimas catabólicas no biotiniladas que se ha comprobado un aumento en su expresión por efecto del estradiol como el complejo cetoácido deshidrogenasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCKDC) (Mariko O, 2004) y es por ello que no se observan cambios significativos en su expresión. Sin embargo, es importante destacar la detección diferencial de esta enzima en hígado, útero y corteza cerebral e indagar si se debe a efectos del estradiol, o es una característica intrínseca de la enzima, o es debido al sistema de detección mediante biotinilación. De acuerdo con otros estudios, se cree que su actividad podría estar siendo complementada por la PCC y podría no ser indispensable en algunos tejidos (Sealey W, 2005). En concordancia con estos datos, nosotros observamos que esta enzima no la detectamos biotinilada en la corteza cerebral en el modelo farmacológico ni en el útero en ninguno de los dos modelos estudiados.

## **8.5 Efecto del estradiol en la regulación de la expresión de PCC.**

La PCC es una enzima que se presenta de manera abundante en todos los tejidos y que no presentó cambios significativos en su expresión por efecto del estradiol, ni durante el ciclo estral. Sin embargo, no hay muchos reportes acerca de la regulación de la expresión de esta enzima y pudiera no tener elementos de respuesta a estradiol ó no activar su transcripción vía correguladores desencadenados por hormonas esteroides.

Aunque no parece haber evidencia de un efecto directo de regulación por efecto del estradiol para todas las carboxilasas en los tejidos estudiados, es importante destacar que las variaciones observadas en la expresión de enzimas biotiniladas en condiciones fisiológicas sólo se dan en el útero, el cual es un tejido con alta tasa de recambio y alta sensibilidad a cambios estructurales por efectos del estradiol. Lo anterior podría sugerir una relación indirecta de la regulación sobre la expresión de estas enzimas por parte del estradiol y el conjunto de factores fisiológicos y metabólicos que interactúan en el organismo para desencadenar cambios metabólicos en respuesta a estímulos proliferativos, pues todos los genes son multirregulados y es importante tomar en cuenta todos los factores que intervienen para la activación de su transcripción.



## **9. CONCLUSIONES.**

9.1 En el modelo farmacológico, se observó que el estradiol sí tiene efectos significativos en el aumento de la expresión de PC en corteza cerebral

9.2 Se observó que en condiciones fisiológicas, sólo se observaron cambios significativos en la expresión de PC y ACC en el útero mostrando diferentes tendencias, y sin relación directa con las concentraciones plasmáticas de estradiol.

9.3 Con base en los resultados obtenidos puede decirse que las carboxilasas biotiniladas estudiadas se expresan de manera diferente en cada tejido y sólo algunas de ellas muestran un efecto significativo del estradiol sobre su expresión, lo cual puede deberse a las necesidades, funciones, tasa de proliferación y cantidad de receptores a estrógenos de cada tejido, por lo cual se puede hablar de una regulación tejido específica.

## **10. REFERENCIAS.**

Allan GJ, Tonner E, Barber MC, Travers MT, Shand JH, Vernon RG, Kelly PA, Binart N, Flint DJ,(2002). Growth hormone, acting in part through the insulin-like growth factor axis, rescues developmental, but not metabolic, activity in the mammary gland of mice expressing a single allele of the prolactin receptor. *Endocrinology*. , 143 (11):4310-9.

Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ, (2003) The subcellular localization of Acetyl-CoA carboxylase 2, *The Journal of biochemistry* , 97 (4) 1444-1449.

Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ, (2001), Continuous Fatty Acid Oxidation and reduced Fat Storage in Mice Lacking Acetyl-CoA Carboxylase 2, *Science* ,291 (5513) 2613-2616.

Bertalanffy F, Lau C, (1963). Mitotic rates, renewal times renewal times, and cytodynamics of the female genital tract epithelium in the rat. *Acta Anatomica (Basel)*. , 54 ,39-81.

Brown-Grant,(1970). Peripheral plasma estradiol and luteinizing hormone concentrations during the estrous cycle of the rat, *Journal of Endocrinology* , 48[2], 295-296.

Butcher R, Collins W, Fugo N (1974). Plasma concentration of LH,FSH, prolactin,progesterone and estradiol-17 beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* , 94[6], 1704-1708.

- Camacho-Arroyo I, Pasapera A, Perez-Palacios G, Cerbón M, (1995) la progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del SNC. *Revista de Investigación Clínica* , 329-340.
- Campeau E, Dupuis L, León-Del-Río A, Gravel R, (1999), Coding Sequence Mutations in the Alpha Subunit of Propionyl-CoA Carboxylase in Patients with Propionic Acidemia. *Molecular Genetics and Metabolism* , 67, 11–22.
- Cifuentes Y (2008). Acidemia orgánica propiónica en un neonato detectada por espectrometría de masas en tándem. *Biomédica* , 28, 10-7.
- Di Augustine RP, Petrusz P, Bell GI, Brown CF, Korach KS, McLachlan JA, Teng CT. (1988), Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* , 122(6), 2355-63.
- Feling P, B D, (1995). *Endocrinology and metabolism*. New York: Mc Graw Hill.
- Francavilla A, Polimeno L, Barone M, Azzarone A, Starzl T (1993). Hepatic regeneration and growth factors. *Journal of Surg. Oncology* , 3, 1 -7.
- Freeman M, (1988). *the ovarian cycle of the rat*. E Knobil y J Neill, ed.
- Gallardo ME, Desviat LR, Rodríguez JM, Esparza-Gordillo J, Pérez-Cerdá C, Pérez B, Rodríguez-Pombo P, Criado O, Sanz R, Morton DH, Gibson KM, Le TP, Ribes A, de Córdoba SR, Ugarte M, Peñalva MA. (2001) The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of leucine catabolism, *American Journal of Human Genetics*, 68(2):334-46
- Hafez E, (1970 ), *Female reproductive organs. En: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*, Hafez ESE ed, 74.

- Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M, (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through. *Nature* , 179–183.
- Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK, Dey SK, (1990), Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Molecular Endocrinology* , 4(3):510-23.
- Jiang H, Rao KS, Yee VC, Kraus JP. ( 2005). Characterization of Four Variant Forms of Human Propionyl-CoA. Carboxylase Expressed in Escherichia coli , *The journal of biological chemistry* , 280, 27719–27727.
- Jitrapakdee S, Vidal-Puig A, Wallace JC, (2006), Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. *Cell and Molecular Life Science* , 63(7-8), 843–854.
- Jitrapakdee S, Wallace JC, (1999), Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase, *Journal of Biochemistry* , 340 ( Pt 1),1-16.
- Joëls M, Karst H, (1995), Effects of estradiol and progesterone on voltage-gated calcium and and potassium conductances in rat CA1 hippocampal neurons, *Journal of Neurosciences* , 15(6) 4289–4297. .A.
- Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* , (74)279–285.
- Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS, (1996), Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoterspecific, *Molecular Endocrinology* , 10(2), 119-131.

[Liu X](#), [Robinson GW](#), [Gouilleux F](#), [Groner B](#), [Hennighausen L](#). (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of América*, 92 8831–8835.

López-Casillas F, Ponce-Castañeda MV, Kim KH. (1991). In vivo regulation of the activity of the two promoters of the rat acetyl coenzyme-A carboxylase gene. *Endocrinology* , 129 (2) 1049–1058.

therapy on PET cerebral blood flow and cognition. *Neurobiology Aging* , 21(2), 373–383.

Mao J, Molenaar AJ, Wheeler TT, Seyfert HM, (2002), STAT5 binding contributes to lactational stimulation of promoter III expressing the bovine acetyl-CoA carboxylase alpha-encoding gene in the mammary gland, *Journal of Molecular Endocrinology* , 29(1) 73–88.

Mariko Obayashi, Yoshiharu Shimomura Naoya Nakai Nam Ho Jeoung, Masaru Nagasaki, Taro Murakami Yuzo Sato, and Robert A. Harris (2004). Estrogen Controls Branched-Chain Amino Acid Catabolism in Female Rats. *Journal of Nutrition* , 134: 2628–2633.

McKenna NJ, Xiao J. (1999 ). Nuclear receptor CoActivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology* , 69(1-6):3-12. Review.



- McNeillie EM, Zammit VA, (1981). Regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat mammary gland. Effects of incubation with Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and ATP on enzyme activity in tissue extracts. *Biochemical Journal* , 15;200(3):639-44.
- Mendoza-Rodríguez CA, Cerbon M,(2001). Tumor suppressor gene p53: mechanisms of action in cell proliferation and death. *Revista de investigación clinica* , 53(3):266-73.
- Mitra S., Hoskin, ., Yudkovitz, J, Pear L, Wilkinson H, Hayashi S, Pfaff D, Ogawa S, Rohrer S, Schaeffer J, McEwen B, Alves, S, (2003), Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144, 2055–2067.
- Munday MR, Hemingway CJ,(1999) The regulation of Acetyl CoA carboxylase a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Advanced enzyme regulation* , 39, 205-235.
- Munday MR, Williamson DH,( 1981 ), Role of pyruvate dehydrogenase and insulin in the regulation of lipogenesis in the lactating mammary gland of the rat during the starved-refed transition. *Biochemical Journal* , 15;196(3):831-7.
- Nikolau BJ, Ohlrogge JB, Wurtele E (2003). Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 414(2), 211–222.
- Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas S, Gravel R, Cervantes- Roldan R, Velazquez A, León-del Río A. (2002). Biotin in Metabolism and Its Relationship to Human Disease. *Archives of Medical Research* , 33 , 439–447.

- Paquette A, Chapados NA, Bergeron R, Lavoie JM. (2009). Fatty Acid Oxidation is Decreased in the Liver of Ovariectomized Rats. *Hormone and Metabolism Research*, 24-29.
- Perusquia M, Navarrete E, (2005). Evidence that 17alpha-estradiol is biologically active in the uterine tissue: Antiuterotonic and antiuterotrophic action, *Reproduction Biology Endocrinology*, 21;3:30.
- Reichardt HM, Schütz G.. (1999). Glucocorticoid Signalling-Multiple Variations of a Common Theme. *Molecular Cell endocrinology*,146 (12) 1-6.
- Resnick SM, Maki PM, Golski S, Kraut MA, Zonderman AB. (1998) Effects of estrogen replacement therapy on PET cerebral blood flow and neuropsychological performance, *Hormones. Behavior* , 34 (2), 171–182.
- Rhodes D, (1997). Chromatin structure. The nucleosome core all wrapped up. *Nature*, (6648):231, 233.
- Rodriguez-Melendez R, Janos Zemleni (2003). Regulation of gene expression by biotin. *Journal of Nutritional Biochemistry* , 14 , 680–690.
- Shaywitz SE, Shaywitz BA, Pugh KR, Fulbright RK, Skudlarski P, Mencl WE, Constable RT, Naftolin F, Palter SF, Marchione KE, Katz L, Shankweiler DP, Fletcher JM, Lacadie C, Keltz M, Gore JC, (1999). Effect of estrogen on brain activation patterns in postmenopausal women during working memory tasks. *The Journal of American Medical Association*, 281(13), 1197–1202.
- Sonja C. Stadler A, (2005). Mitochondrial targeting signals and mature peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 334, 939–946.

- Spornitz UM, Rinderknecht BP, Edelman A, Scheidegger B, Cairoli F, (1994). Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *Anatomic Research* , 238(2):163-76.
- Sullivan Mitchell E, Fugate Woods N. (2001), Midlife women's attributions about perceived memory changes: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study, *J. Women's Health and Gender.-Based Medicin*,10(4), 351–362.
- Sunyakumthorn P, Boonsaen T, Boonsaeng V, Wallace JC, Jitrapakdee S. (2005). Involvement of specific proteins Sp1/Sp3 and nuclear factor NF-Y in basal transcription of distal promoter of rat pyruvate carboxylase in beta cells. *Biochemical. Biophysical. Research. Communication.* , 329(1), 188-196.
- Travers MT, Barber MC, ( 1997 ), Tissue specific expression of the acetyl-CoA carboxylase gene, *Biochemical Society Transactions* , 25(4), 1215–1219.
- TsaiM.J y OMalley, B. (1994). Molecular mechanism of action of steroid/tyroid superfamily members. *Annu Rev .Biochem* , 451-486.
- Weiser J, Foradori , Handa R, (2008), Estrogen receptor beta in the brain: From form to function, *Brain Research*, 57 309–320.
- Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zemleni J, (2004). Clusters of biotine responsive genes en human peripheral blod mononuclear cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* , 15(7):433-9.
- Williams J. (1992). *Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: saunders Company p 35-164.
- Wolffe AP, Pruss D, (1996). Hanging on to histones. Chromatin. *Current Biology* , 6 (3), 234-7.

- Zhang J, Ge R, Matte-Martone C, Goodwin J, Shlomchik WD, Mamula MJ, Kooshkabadi A, Hardy MP, Geller D, (2008 ). Characterization of a novel gain of function glucocorticoid receptor knock-in mouse, *Journal of Biological Chemistry* , 284(10):6249-59.
- Leon Del-Río A. (2005). Biotin -dependent regulation of gene expression in human cells. *Journal of Nutricional Biochemistry* , 16, 432-434.
- Liu B, Arbogast L. (2008). Phosphorylation State of Tyrosine Hydroxylase in the Stalk-Median Eminence Is Decreased by Progesterone in Cycling Female Rats. *Endocrinology* , 149(4), 1462-9.
- Sealey M, Stratton S, Mock D, Hansen D, (2005). Marginal Maternal Biotin Deficiency in CD-1 Mice reduces fetal Mass of Biotin-dependent Carboxylases. *Biochemical and Molecular Actions of Nutrients* , 135, 973-977.

## **Anexo 1**

### ***Métodos.***

#### **1. Ovariectomía de ratas.**

Se realizó ovariectomía bilateral mediante inducción anestésica con maleato de midazolam (0.1 µg/g peso corporal) y clorhidrato de ketamina (2 µg/g peso corporal).

Se realizó incisión en la región lumbar sobre la línea media, de 2 cm de longitud, disectándose lateralmente al borde de los músculos paravertebrales.

Se extrajeron los ovarios, disecándose y ligando el lecho vascular con catgut 0000 y seccionando en forma bilateral y realizando cierre de herida en un plano.

#### **2.-Cuantificación por el método de Bradford.**

Se realiza una curva patrón a partir de una solución stock de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración 1mg/mL para llegar a las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla.

<b>µL de la solución stock de albúmina</b>	<b>µL de agua desionizada</b>	<b>µL reactivo de bradford</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
1	799	200	1
1.25	798.5	200	1
5	795	200	1
10	790	200	1
µL Muestra		200	1
2	798	200	1

Se midió la absorbancia de los puntos de la curva y las muestras en un espectrofotómetro PERKIN ELMER ® con luz visible a  $\lambda = 590$  nm. Se

construyó una curva de A vs [ Proteína en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]. Se obtuvo la ecuación de la recta y se interpoló el valor de la concentración de proteína total de la muestra a partir de su absorbancia.

### **3.- Preparación de muestras para electroforesis.**

Se toma una alícuota del extracto proteico de cada muestra para obtener 20 $\mu\text{g}$  de proteína total y se le adiciona agua destilada para completar 25  $\mu\text{L}$  de muestra. Posteriormente se le adiciona 5 $\mu\text{l}$  de buffer de carga (con  $\beta$ -mercaptoetanol).

Todas las muestras se someten a 100°C durante 5 minutos y posteriormente a 4°C hasta el momento de cargarlas en el gel.

## **Anexo 2**

### ***Preparación de soluciones.***

#### **1.- PBS pH= 7.5.**

- 8 g NaCl
- 0.2g KCl
- 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.24 g K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Disolver en agua destilada, ajustar pH y llevar al aforo de 1L.

#### **2.- Buffer de carga para proteínas Tris HCl pH= 6.8 50 mM**

- DTT 100 mM
- SDS 2%
- Azul de bromofenol 0.1%
- Glicerol 10 %
- β-mercaptoetanol 25 %

#### **3.- Buffer de lisis para proteínas.**

- DTT 1 mM
- Tris HCl 10 mM
- PMSF 1 mM
- Ortovanadato 1 mM
- Azida de sodio 15 mM

Mezclar en agua destilada y se agrega una tableta de inhibidor de proteasas (complete-ROCHE) por cada 50 mL de buffer.

#### 4.- Gel de poliacrilamida.

Componentes	Volumen (mL) para 5mL al 5%	Volumen (mL) para 10 mL al 8%
H <sub>2</sub> O desionizada	3.4	4.6
Acrilamida mix 30%	0.83	2.7
Tris (pH= 8.8 )1 mM	*****	2.5
Tris(pH =6.8) 1 mM	0.63	*****
SDS 10%	0.05	0.10
Persulfato de amonio 10%	0.05	0.10
TEMED	0.005	0.006

\*\*\*\*\*No se usa en este gel.

#### 5.- Buffer de corrida.

- Tris-base 25 mM
- Glicina 250 mM
- SDS 0.1%

#### 6.- Buffer de transferencia de proteínas método semiseco.

- Glicina 39 mM
- Tris base 48 mM
- SDS 0.037 %
- Metanol 20%