



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis in vivo de la función de la enzima PPII en la inactivación de la TRH en el
ratón

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Ana Melissa Rosas León

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Jean Louis Charli Casalonga
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles
[Instituto de Biotecnología](#)

Dra. Edith Sánchez Jaramillo
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2016



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.

Índice

Índice de figuras.....	4
Abreviaturas.....	5
Resumen.....	6
Introducción	
1. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	8
1.1 Hipotálamo.....	9
1.2 TRH.....	9
1.3 Hipófisis.....	11
1.4 TSH.....	12
1.5 Tiroides.....	12
1.6 Hormonas tiroideas.....	13
1.7 Regulación de los niveles de HT.....	13
1.7.1 Desyodasas.....	14
1.7.2 Transportadores de HT.....	14
2. Regulación neuroendocrina de la homeostasis energética.....	15
2.1 Señales periféricas sensadas en el hipotálamo.....	15
2.2 Control de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas por señales del balance energético.....	16
3. Funciones de la TRH no hipofisiotrópica en la homeostasis energética.....	16
4. Catabolismo de TRH.....	17
4.1 Piroglutamil peptidasa II.....	18
Antecedentes	
1. Tanicitos como reguladores del eje HPT.....	20
2. Ratón nulo para la PPII.....	23
2.1 Pasos involucrados en la generación de un ratón nulo.....	25
Justificación.....	27
Hipótesis.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
Metodología.....	28
Materiales y métodos	

1. Genotipificación de los ratones por PCR.....	28
2. Presencia de ARNm de la PPII y TRH hipotálamo por RT-PCR.....	31
3. Medición de la actividad de PPII en cerebro y otros tejidos con un ensayo fluorométrico.....	33
4. Histoquímica de la β -galactosidasa en cortes de cerebro.....	34
5. Actividad enzimática de β -galactosidasa.....	38
6. Actividad locomotora.....	39
7. Análisis estadístico.....	39
Resultados	
1. Efecto de la mutación del gen de PPII sobre la expresión y actividad de PPII en cerebro.....	40
1.1 Expresión de ARNm.....	40
1.2 Datos de actividad de PPII.....	41
2. Patrón de expresión de la PPII en el cerebro de ratón	
2.1 Actividad enzimática de β –galactosidasa	
2.1.1 Hembras.	43
2.1.2 Machos.	44
2.2 Distribución histológica de actividad de β –galactosidasa en cerebro.....	45
3. Análisis de movimiento espontáneo.....	
3.1 Locomoción en hembras y machos.....	49
Discusión.....	53
Conclusiones y perspectivas.....	58
Bibliografía.....	59
Anexos.....	61

Índice de figuras

Fig 1. Esquema de la maquinaria involucrada en la retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	8
Fig 2. Estructura tridimensional de PPII obtenida por modelado de homología.....	19
Fig 3. Representación esquemática de la estructura primaria de PPII.....	19
Fig. 4 Distribución del ARNm de PPII en el hipotálamo medio basal.....	21
Fig. 5 Mecanismo propuesto de inactivación de TRH a través de la PPII presente en tanicitos $\beta 2$	22
Fig. 6 Estrategia de selección.....	24
Fig. 7 Expresión del mensajero de la PPII en hipotálamo y corteza cerebral de macho.....	40
Fig.8 Expresión del mensajero de la PPII en hipotálamo de hembra.....	40
Fig.9 Actividad específica de la PPII en cerebro e hígado de macho.....	41
Fig.10 Actividad específica de la PPII en hígado de macho.....	42
Fig.11. Actividad β -gal en ratones hembras.....	43
Fig.12. Actividad β -gal en ratones machos.....	44
Fig. 13 Distribución de la β -galactosidasa.....	46
Fig.14 Movimiento total para ratones macho.....	48
Fig.15 Mediciones de la locomoción por genotipo y sexo.....	49
Fig. 16 Mediciones de la locomoción por periodo circadiano en hembras y machos silvestres.....	51

Abreviaturas

α-MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
AgRP	Proteína relacionada a Agouti
AMP	Adenosín monofosfato
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
D1	Yodotironina desyodasa tipo 1
GABA	Ácido gamma aminobutírico
HT	Hormonas tiroideas
LHRH	Hormona liberadora de gonadotropina
MCT	Transportadores de mono-carboxilato
NIS	Simportador Na ⁺ /I ⁻
NPV	Núcleo paraventricular
NPY	Neuropéptido Y
NT	Neurotensina
OATP1C1	Polipéptido 1c1 transportador de aniones orgánicos
PPI	Piroglutamil peptidasa I
PPII	Piroglutamil peptidasa II
POMC	Proopiomelanocortina
T3	Triyodotironina
T4	Tetrayodotironina
Tg	Tiroglobulina
TR	Receptores de hormonas tiroideas
TRE	Elemento de respuesta a T3
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TRH-R	Receptor de TRH
TSH	Tirotropina u hormona estimulante de la tiroides
TSH-R	Receptor de TSH
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
SNC	Sistema nervioso central

Resumen

Se ha demostrado previamente que la enzima PPII (piroglutamil peptidasa II) degrada de manera específica a la TRH, la hormona que controla la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, que regula el metabolismo celular y la termogénesis. A la TRH se le atribuyen diferentes funciones denominadas como no hipofisiotrópicas, siendo un ejemplo el aumento de la locomoción después de su administración.

Se han dilucidado diferentes características de la PPII; siendo ésta una ectopeptidasa (cuya región catalítica se encuentra de cara al medio extracelular). PPII pertenece a la familia de metalo-peptidasas M1 dependientes de zinc, se distribuye de manera ubicua en el sistema nervioso central, siendo de especial interés su expresión en tanicitos los cuales recubren dos terceras partes del tercer ventrículo. Los tanicitos pertenecen a población de células gliales especializadas capaces de transmitir señales químicas provenientes del fluido cerebro espinal al hipotálamo y de la sangre periférica al Sistema Nervioso Central.

Hasta el momento se ha propuesto un modelo en el que la presencia de PPII en los tanicitos es importante para la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideo, puesto que los axones terminales de las neuronas TRHérgicas se extienden hacia la eminencia media en donde entran en contacto con extensiones citoplasmáticas de los tanicitos. Sin embargo se requieren otros enfoques para corroborar la validez de esta premisa. La inactivación génica es una herramienta útil para delimitar el papel biológico de una proteína, de modo que la ruptura específica de un gen (“gene targeting”) permite interrumpir el marco de lectura abierto de este y bloquear su expresión en el ratón.

En este trabajo se realizó el análisis de algunas características fenotípicas en un animal modelo donde se desactivó la PPII en el que se sustituyó el exón 1 (de los 19 exones que conforman a la enzima) por un casete de selección que contiene al gen de lacZ, con la finalidad de entender con mayor claridad el papel de esta enzima en la comunicación de TRH y delimitar de manera precisa los alcances fisiológicos de la peptidasa. Estos ratones parecen tener una alteración de su balance energético, ya que tienden a tener un peso corporal menor al de los

silvestres. Para evaluar los efectos de la mutación se analizó la expresión del ARN mensajero de la PPII a nivel de hipotálamo, su actividad enzimática en cerebro e hígado, la distribución de beta galactosidasa en el cerebro así como sus niveles de actividad. Finalmente se observó el efecto del noqueo genético de esta enzima en la actividad locomotora del animal mutante. Como resultado de este análisis se observó una expresión residual del ARNm de la enzima y una expresión baja de la actividad enzimática de la PPII en dos tejidos diferentes del animal homocigoto para la mutación. La expresión del reportero LacZ en el cerebro correspondió con la distribución previamente reportada para el ARNm de la PPII en rata, lo que sugiere similitud en las funciones de la PPII en roedores. Además no se observó un efecto obvio en la locomoción espontánea. En conjunto con otros datos del laboratorio, estos datos iniciales apuntan a que la eliminación de la PPII altera el balance de energía por una modificación de la ingesta y/o del estado tiroideo puesto que se descarta que la disminución del peso corporal de estos animales tenga como causa el incremento de su locomoción.

Introducción

1. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

La síntesis y secreción de HT es regulada por un sistema de retroalimentación negativa que involucra al hipotálamo, hipófisis y glándula tiroides. La TRH es un tripéptido sintetizado en el NPV del hipotálamo. Es transportada a través de los axones hacia la eminencia media y posteriormente a la adenohipófisis a través del plexo de capilares portales. La TRH se une a su receptor en los tirótrofos de la hipófisis, una subpoblación de células hipofisarias que secreta TSH. La estimulación genera la liberación y síntesis de nueva TSH en tirótrofos (Fig. 1). La TSH es una glicoproteína compuesta por dos subunidades, alfa y beta. La

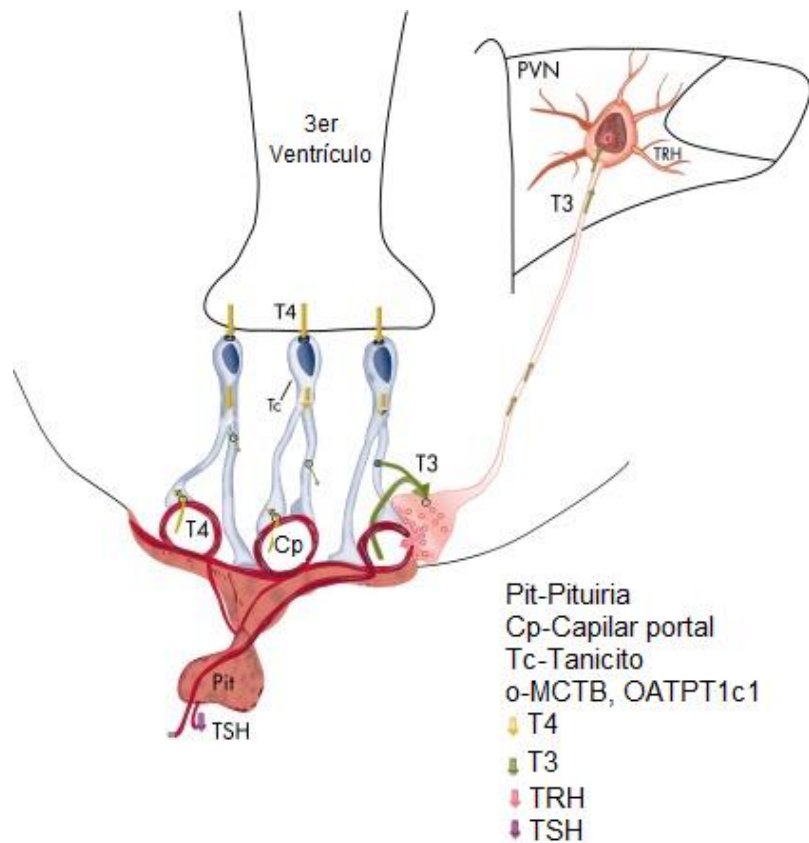


Fig 1. Esquema de la maquinaria involucrada en la retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipofisario-tiroides (modificado de Fekete y Lechan, 2014). El aumento en la concentración de T4 tiene diferentes efectos a nivel de la eminencia media, ya que a través de la desyodasa D2 presente en tanicitos es capaz de transformarse en su forma biológicamente más activa, T3. Ésta es capaz de disminuir la liberación y la transcripción de la TRH que finalmente lleva al descenso en la liberación y síntesis de TSH por parte de la pituitaria.

subunidad alfa es compartida con otras hormonas de la hipófisis por lo que se considera a la subunidad beta como la subunidad reguladora. La TSH es el regulador principal de la liberación y secreción de HT. La secreción tanto de TRH como de TSH es regulada de manera negativa por HT (Yen et al., 2001).

1.1 Hipotálamo

El hipotálamo es una estructura que se encuentra en la parte basal del encéfalo anterior, está formado por distintas agrupaciones neuronales ampliamente interrelacionadas. No obstante, cada uno de estos núcleos posee un patrón complejo de conexiones con diferentes zonas del encéfalo. Estas agrupaciones neuronales hipotalámicas se organizan longitudinalmente en tres zonas: la lateral, la medial y la periventricular. La zona lateral es aquella que queda en una posición más externa de la línea media (hacia los hemisferios). La zona media queda entre la zona periventricular y la zona lateral. Mientras que la zona periventricular se refiere a aquellas neuronas hipotalámicas adyacentes al revestimiento ependimal del tercer ventrículo. La distribución citoarquitectónica de las neuronas hipotalámicas varía en función de la zona en la que se localizan. De esta forma, por ejemplo, las neuronas de la zona lateral se distribuyen de una forma difusa, mientras que las neuronas de la zona medial forman núcleos bien organizados y claramente delimitados. El hipotálamo tiene una gran variedad de funciones fisiológicas y conductuales, y para ello, este conjunto de núcleos ha de establecer conexiones con diferentes zonas de la corteza y del encéfalo anterior, del tronco del encéfalo y de la médula espinal, de la retina y del sistema endócrino. El hipotálamo ha de convertir la información sináptica en señales humorales, hecho que le permite influir sobre sistemas ampliamente diferenciados y localizados a distancias relativamente lejanas. El hipotálamo por medio de sus conexiones con la hipófisis, ejerce un papel clave en el control de la secreción neuroendócrina. (Redolar, 2008)

1.2 TRH

El péptido TRH (pGlu-His-ProNH₂) es el principal regulador del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, y es por tanto responsable de controlar respuestas fisiológicas relacionadas al metabolismo celular ante cambios en el ambiente tanto interno como

externo del organismo (referencias en Nillni et al. 2010) Las neuronas que sintetizan TRH están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central, incluyendo muchos núcleos en bulbo raquídeo, hipotálamo e hipocampo. Mientras que en la mayoría de estos grupos neuronales la TRH funciona como un neuromodulador, en las denominadas neuronas "hipofisiotrópicas TRHérgicas" que regulan la secreción de TSH en la adenohipófisis, la TRH funciona como una neurohormona. Estas neuronas hipofisiotrópicas están localizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo, un núcleo localizado en los límites dorsales del tercer ventrículo (Fekete y Lechan, 2007).

La TRH deriva del procesamiento de la proteína preproTRH, que en rata está compuesta por 255 aminoácidos. Los 25 aminoácidos del N-terminal que comprenden al péptido señal, dirigen a la proteína hacia el retículo endoplásmico y al escindirse, dejan una proteína proTRH que contiene cinco copias progenitoras de TRH, Gln-His-Pro-Gly, cuatro péptidos no relacionados a TRH y los péptidos C-terminal y N-terminal a los flancos (Nillni et al, 1999).

El procesamiento de la proteína proTRH toma lugar en la red trans Golgi y en la vía secretora. Los péptidos progenitores de la TRH son flanqueados por un par de aminoácidos básicos, Lys-Arg o Arg-Arg, que sirven como señales para las enzimas convertasa de prohormona 1/3 y 2. Estos residuos básicos son removidos de manera posterior por la carboxipeptidasa E. El TRH progenitor, Gln-His-Pro-Gly, es entonces amidado por la peptidilglicin monooxigenasa α amidante usando el C-terminal de la glicina como donador de amida. Finalmente, la glutamina N-terminal es ciclizada a piroglutamato, reacción catalizada por la N-glutaminil ciclasa, resultando en la forma madura de TRH (Nillni et al, 1999).

Hasta el momento se han identificado dos tipos de receptores acoplados a proteína G para TRH. TRH-R1, se encuentra en alta abundancia en la adenohipófisis y está involucrado en la señalización de TRH con las áreas endocrinas, pero exhibe un patrón de expresión limitado en otras regiones del SNC. A diferencia de TRH-R1, TRH-R2 está ampliamente distribuido en corteza cerebral y cerebelar, habénula media, núcleo geniculado medio, núcleo pontino, y a través de la formación reticular (Heuer et al, 2000). La unión de TRH al receptor tipo 1 de

TRH en la hipófisis anterior resulta en activación de la fosfolipasa C, movilización de calcio, y activación de la proteína cinasa C. Esta cascada lleva a estimular la síntesis de la subunidad α -glicoproteínica de TSH. En contraste, la regulación de la síntesis de la subunidad β es mediada por un factor de transcripción tipo 1 específico de la hipófisis y factores de transcripción tipo proteína de unión a CREB. La TRH también tiene un papel importante en regular la glicosilación de TSH al alterar la composición de oligosacáridos y estructura de sus tres cadenas de carbohidrato, importante para el plegamiento, ensamble, secreción, aclaramiento metabólico y la actividad biológica de TSH. La deficiencia de TRH en ratones y humanos resulta en bioactividad de TSH disminuida y niveles bajos de HT periféricas (referencias en Fekete y Lechan, 2014).

1.3 Hipófisis

La hipófisis es una glándula de secreción interna, conectada con el hipotálamo por el tallo hipofisiario; se halla dividida en dos lóbulos: el anterior o adenohipófisis y el posterior o neurohipófisis. (Corsi, 2004) La adenohipófisis constituye, aproximadamente, el 80% del total de la glándula y se divide a su vez en dos partes denominadas pars distalis y pars tuberalis. La neurohipófisis está constituida por tres porciones: la pars nervosa o lóbulo posterior, el infundíbulo y la eminencia media que es el punto de unión entre hipotálamo e hipófisis. El infundíbulo y la pars tuberalis conforman al tallo hipofisiario. (Arce, 2006)

La mayor parte de los núcleos hipotalámicos implicados en el control de la secreción de hormonas adenohipofisiarias se localizan en la región supraóptica e hipotálamo medial. Los axones de estas neuronas proyectan sobre la eminencia media, donde liberan las hormonas hipofisiotrópicas (Arce, 2006). La adenohipófisis está conectada con el hipotálamo por medio de un complejo sistema vascular denominado sistema portal hipotálamo hipofisiario. Este sistema consta de dos plexos capilares, conectados entre sí por los denominados vasos portales largos que recorren el tallo hipofisiario en sentidos descendente. En el sistema portal hipotálamo-hipofisiario el flujo de sangre es de hipotálamo a hipófisis. Esta disposición permite que los factores liberados en la eminencia media lleguen con facilidad a las células adenohipofisiarias. El denominado plexo primario se distribuye

alrededor de la eminencia media, y su función es recoger las hormonas liberadas por las terminales nerviosas que proyectan sobre esta región hipotalámica. Los capilares del plexo primario confluyen hasta formar los vasos portales largos que al llegar a la parte inferior del tallo hipofisiario, se ramifican, dando origen a la segunda red de capilares (plexo secundario). El plexo secundario se distribuye por toda la adenohipófisis, permitiendo que los factores hipotalámicos alcancen fácilmente las células adenohipofisarias. Además, el plexo secundario es el encargado de recoger las hormonas producidas en la adenohipófisis para transportarlas a la circulación general. (Arce, 2006)

1.4 TSH

La TSH es el regulador principal de la liberación de HT y su síntesis. También tiene un papel crítico en el crecimiento y desarrollo de la tiroides. La unión de la TSH a su receptor genera un cambio conformacional, que activa la subunidad α de la proteína G heterotrimérica, activando así la producción de AMPc y la activación de proteína cinasa A, la cual media la mayor parte de los efectos de la TSH. En el hombre, el TSH-R no se localiza sólo en la tiroides, sino que también se ha observado en otros tejidos como riñón, timo, músculo cardíaco y células del tejido adiposo (Stavreus, 2012).

1.5 Tiroides

En esta glándula, el yoduro es transportado activamente y concentrado por NIS. El yoduro atrapado es oxidado por TPO en presencia de peróxido de hidrógeno e incorporado en los residuos Tyr de una glicoproteína de 660 kDa, Tg. Esta yodinación de Tyr específicas localizadas en la Tg produce residuos mono- y diyodados que son enzimáticamente acoplados para formar T4 y T3. La Tg que contiene monoyodotirosinas, diyodotirosinas, T4 y T3, es almacenada de manera extracelular como un polipéptido en el coloide dentro del lumen de las células foliculares tiroideas. La secreción de hormonas tiroideas requiere la endocitosis de la Tg yodada almacenada de la superficie apical de las células foliculares tiroideas. La Tg es incorporada en fagolisosomas, sufre una digestión proteolítica, se recapturan las monoyodotirosinas y las diyodotirosinas, y se libera T4 y T3 a la circulación a través de la superficie basal.

1.6 Hormonas tiroideas

La mayor parte de las hormonas tiroideas liberadas se encuentran en forma de T4, la concentración de T4 total en suero se halla hasta 40 veces más alta que la de T3. Sólo 0.03% de la T4 sérica total está libre, mientras que el resto se halla unida a proteínas acarreadoras tal como la globulina de unión a tiroxina, la albúmina y la pre albúmina de unión a tiroideas. Aproximadamente 0.3% de la T3 sérica total es libre y el resto se encuentra unida a la globulina de unión a tiroxina y albúmina. Son las HT libres las que entran en las células blanco y generan la respuesta biológica. (Yen, 2001)

Las hormonas tiroideas ejercen su acción genómica solo en tejidos que expresan TR. Se han identificado dos TRs (α y β); ellos dan lugar a diferentes variantes por empalme alternativo del ARN. El gen TR α codifica cinco productos proteicos; sólo TR α 1 une T3. El gen TR β codifica cuatro productos (TR β 1, TR β 2, TR β 3 y Δ TR β 3 truncado) que unen T3, pero solo la isoforma truncada no se une al DNA. Además, algunas funciones no genómicas de las hormonas tiroideas se han atribuido a las isoformas truncas de los TRs. (Carreón-Rodríguez et al, 2009)

Los receptores nucleares regulan la transcripción génica a través del reconocimiento y unión a una secuencia específica de ADN que se localiza en la región promotora de los genes blanco. En el caso de las hormonas tiroideas, la formación de complejos T3-TR, y su unión a TRE, es el primer paso crítico para la regulación positiva o negativa de los genes blanco y la subsiguiente regulación de la síntesis de numerosas proteínas. Dada esta función de regular la transcripción de sus genes blanco, los TR se consideran factores de transcripción regulados por ligando que modulan la expresión génica mediante su interacción con correpresores y coactivadores nucleares y la maquinaria de transcripción asociada (Solís et al. 2011).

1.7 Regulación de los niveles de HT

Es posible modular de manera local la cantidad disponible de hormonas tiroideas para las células antes de que se unan a su receptor. Los transportadores y desyodasas son importantes para determinar la disponibilidad de hormonas tiroideas de manera específica para cada tejido (Luongo et al. 2013).

1.7.1 Desyodasas

Las selenodesyodasas catalizan la activación (D1 y D2) e inactivación (D3) de las hormonas tiroideas al remover diferentes átomos de yodo del anillo interno o del anillo externo de su estructura. La D1 y la D2 convierten la tiroxina en la forma metabólica más activa, la T3, por desyodación del anillo externo; y la D3 convierte a T4 y T3 en las formas inactivas, T3 reversa y diyodotironina, respectivamente, por desyodación del anillo interno. D1 es expresada mayoritariamente en hígado, riñón, tiroides, y pituitaria; D2 es expresada primariamente en la tiroides, SNC, pituitaria, cóclea en desarrollo, tejido adiposo pardo y músculo esquelético; D3 es expresada prevalentemente en muchos tejidos fetales, placenta, cerebro y piel y en menor extensión en útero preñado y células pancreáticas B (Luongo et al. 2013). Los roedores derivan su T3 sérica primordialmente a través de la acción de la D1, pero los humanos dependen de la D2 (Brent, 2012).

La D1 y la D3 están localizadas en la membrana plasmática, mientras que la D2 es una proteína residente del retículo endoplásmico. La D2 genera T3 en el citosol con un potencial para acceder al núcleo por virtud de la proximidad física entre retículo endoplasmático y el compartimiento nuclear. La propiedad bioquímica decisiva que caracteriza el comportamiento homeostático de la D2 es su corta vida media (~40 min), que puede ser reducida por la exposición a concentraciones fisiológicas de su sustrato, T4, y en situaciones experimentales, T3 reversa o incluso mayores concentraciones de T3. La disminución de la actividad de D2 por sustrato es un mecanismo de regulación por retroalimentación rápida y potente que controla eficientemente la producción de T3 y la concentración intracelular de T3 basado en disponibilidad de T4. Se explica por un cambio conformacional inducido por el sustrato que expone dos residuos críticos de lisina K237 y K244 para su ubiquitinación, lo cual inactiva a la D2 pero no causa un desensamble terminal de la molécula, permitiendo la posibilidad de que ésta pueda ser reactivada por desubiquitinación antes de la degradación por el proteosoma (Gereben et al., 2008).

1.7.2 Transportadores de HT

A pesar de que las HT son moléculas lipofílicas, requieren transportadores específicos en la membrana plasmática para entrar en sus células blanco. Se han

identificado varias familias de transportadores; pero solo MCT8, MCT10 y OATP1C1 tienen alta especificidad por hormonas tiroideas. OATP1C1 es altamente expresado en hígado y cerebro, y MCT10 es expresado en intestino, riñón, hígado y placenta (Luongo et al. 2013).

2. Regulación neuroendocrina de la homeostasis energética

2.1 Señales periféricas sensadas en el hipotálamo

La homeóstasis energética es un proceso que por definición tiene que ser bien regulado, con diferentes mecanismos de control que permiten el ajuste del metabolismo a una eficiencia máxima. Para mantener un peso estable, la ingesta energética debe estar en balance con el gasto energético, al cual contribuyen el metabolismo basal, el ejercicio voluntario e involuntario y la termogénesis (de Gortari, 2006).

El hambre y la saciedad son controlados por neuromoduladores (la mayoría de ellos de naturaleza peptidérgica); la ghrelina es una hormona orexigénica de origen gástrico liberada algunas horas después de la toma de alimento, que transfiere información del estómago al hipotálamo e influye en la respuesta a cambios en el estado nutricional. Administrada de manera periférica, potencia el apetito y la ingesta alimenticia en roedores y humanos. Los receptores de ghrelina han sido visualizados en neuronas que co-expresan orexigénicos como NPY, AgRP y GABA (Popovic et al. 2005) Por el contrario, la leptina es una hormona que participa en el proceso de saciedad; es secretada por el tejido adiposo y su liberación es proporcional al tamaño y volumen de los adipocitos, controlando el estado del almacenaje a largo tiempo al reactivar el gasto energético (de Gortari, 2006).

La ghrelina, la leptina y otras moléculas de origen periférico informan al cerebro sobre el balance de energía. El núcleo arcuato del hipotálamo tiene neuronas de primer orden que perciben los niveles de estas hormonas. A través de proyecciones hacia neuronas de segundo orden que yacen en núcleos hipotalámicos y extrahipotalámicos, las neuronas del arcuato regulan la ingesta y el gasto de energía (van den Top y Spanswick, 2006).

2.2 Control de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas por señales del balance energético

Entre las hormonas que controlan la ingesta y el gasto de energía, la leptina es un conocido regulador de la secreción de TRH y TSH a través de acciones directas en el NPV y de acciones indirectas en el núcleo arcuato. En la vía directa, la leptina estimula las neuronas TRHérgicas al inducir la fosforilación de STAT3, y regula la transcripción de preproTRH. En la vía indirecta, la leptina inhibe las neuronas del núcleo arcuato que producen los péptidos NPY y AgRP y estimula a las que producen a la POMC. Uno de los productos de POMC, la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH), es un potente anorexigénico, que estimula a la proteína CREB en las neuronas TRHérgicas (Mullur et al., 2014).

3. Funciones de la TRH no hipofisiotrópica en la homeostasis energética

▫Regulación del apetito: Además de los efectos indirectos de la TRH en la regulación del apetito al controlar los niveles circulantes de HT, la TRH también tiene acciones diversas e independientes en la regulación del apetito a través de efectos ejercidos directamente dentro del sistema nervioso central. La administración central de TRH o análogos del TRH reducen consistentemente la ingesta alimenticia y el tiempo de interacción con la comida en todos los modelos animales estudiados. El locus preciso del efecto de la TRH no se conoce pero una inyección directa de TRH dentro del hipotálamo medial y núcleo accumbens, regiones que contienen terminales axónicas de TRH, pueden inducir anorexia. (Lechan y Fekete, 2006)

▫Termogénesis: El área preóptica (en el hipotálamo anterior) es un sitio principal en el sistema nervioso central para la termorregulación, la cual a través de vías multisinápticas al bulbo raquídeo y médula espinal, coordina una variedad de respuestas que incrementan la producción de calor por termogénesis. Cuando la TRH se inyecta al área preóptica, disminuye la actividad de las neuronas sensibles al calor e incrementa la actividad de las neuronas sensibles al frío, las cuales pueden tener el efecto de incrementar la producción de calor. (Lechan y Fekete, 2006)

▫Vigilia: Tanto la administración central como la sistémica de TRH incrementa el tiempo de vigilia, puede activar animales que previamente habían sido inducidos a

narcosis y disminuye el tiempo de movimientos espontáneos en animales inconscientes por lesiones en la cabeza. Uno de los mecanismos propuestos a través del cual la TRH ejerce esta acción puede ser a través de la liberación de acetilcolina desde vías que conectan el septum al hipocampo (Lechan y Fekete, 2006).

▫Excitación y activación locomotora: La TRH también tiene efectos profundos en la actividad locomotora incluyendo motricidad gruesa y motricidad fina. Como los efectos de la TRH en la actividad locomotora pueden reproducirse cuando se inyecta en el núcleo accumbens y son bloqueados con antagonistas dopaminérgicos, la evidencia sugiere que los efectos de la TRH en la actividad locomotora están mediados a través del sistema mesolímbico dopaminérgico. Inyecciones de TRH en el hipotálamo ventromedial y el área tegmental ventral, independientemente, también pueden producir locomoción, indicando que puede estar involucrada más de una región en el cerebro en los efectos de la TRH (Lechan y Fekete, 2006).

El control de los efectos TRHérgicos centrales en la actividad locomotora y en el control del movimiento parece mediado predominantemente por las neuronas que expresan el TRH-R2 en los sistemas piramidales y extrapiramidales a diferentes niveles de las vías motoras centrales (Heuer et al. 2000).

4. Catabolismo de TRH

Todos los efectos de la TRH son transitorios, de muy corta duración (algunos minutos). La fugacidad de los efectos es probablemente debida en gran parte a la inactivación del TRH en el medio extracelular. Consistente con esto, los análogos de la TRH resistentes a la degradación producen efectos más potentes y de mayor duración (Ogasawara et al, 1995).

Existen cuatro enzimas que degradan in vitro a la TRH:

- La PPI, es una cisteín proteasa soluble que hidroliza el enlace peptídico piroGlu-His de TRH. También hidroliza péptidos como LHRH, NT y bombesina.
- La prolil endopeptidasa, es una serina proteasa soluble que corta en el lado carboxilo del residuo prolina de la TRH para generar TRH-OH. También actúa

en otros neuropéptidos, incluyendo LHRH, NT y sustancia P (Nillni y Sevarino, 1999).

Las evidencias funcionales (Charli et al, 1998) indican que estas dos enzimas no entran en contacto con el péptido *in vivo*.

- Por otro lado, la PPII, es una metalopeptidasa que hidroliza el enlace peptídico pGlu-His de TRH. Las características distintivas (comparando con la PPI) de la PPII son su mayor especificidad por sustrato (solo hidroliza al TRH) y localización subcelular (proteína integral de membrana). La PPII está presente en las fracciones sinaptosomales del SNC, y en la membrana plasmática de la adenohipófisis. Su mayor actividad se observa en el hipocampo y corteza cerebral. Evidencias funcionales (Lazcano et al, 2012) indican que tiene un papel importante en la inactivación del TRH en el medio extracelular *in vivo*.
- La tiroliberinasa es una isoforma soluble de la PPII producida por el hígado (Schmitmeier et al, 2002) presente en el lumen del sistema circulatorio.

4.1 Piroglutamil peptidasa II

En humano y rata, la PPII es codificada por un solo gen pero en rata se han detectado múltiples variantes del ARN en el cerebro y pituitaria que van de 4.5 a 9kb. (Chávez-Gutiérrez et al. 2005). La estructura primaria (Fig. 3) indica que es un miembro de la familia de metalopeptidasas M1 que se hayan ancladas a membrana, incluye un fragmento amino terminal intracelular pequeño, un segmento transmembranal y una gran región carboxilo terminal extracelular que contiene los motivos de exopeptidasa (G/A)(A/G)MEN y catalítico (441HEXXHX18E464). Se ha propuesto que los residuos H y E dentro del motivo catalítico coordinan al átomo de Zn^{+2} , E-442 activa una molécula de agua, y Y-528 estabiliza el estado de transición (Chávez-Gutiérrez, 2006). En la figura 2 se puede apreciar la estructura terciaria de la PPII adquirida por modelado por homología con otras peptidasas de familia de metaloproteasas M1.

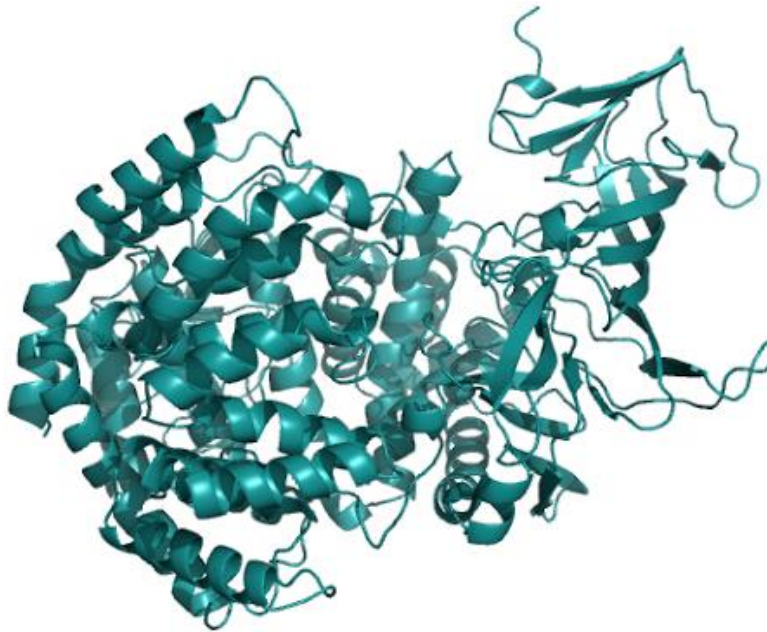


Fig 2. Estructura tridimensional de PPII obtenida por modelado por homología (36.94% de identidad) a partir del pdb 4hom.1.A (Chen et al., 2012).

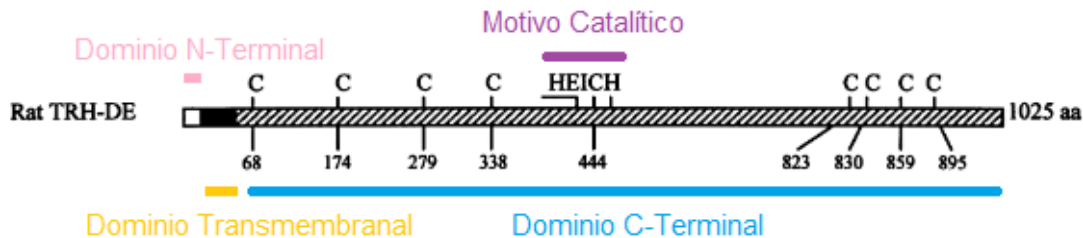


Fig 3. Representación esquemática de la estructura primaria de PPII de rata (modificado de Papadopoulos et al., 2000). La caja blanca indica el dominio N-terminal intracelular y la caja negra indica el dominio transmembranal. La caja sombreada indica el dominio C-terminal extracelular.

La PPII es la única metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} que contiene una cisteína dentro del motivo catalítico. La mutagénesis dirigida de los 9 residuos de cisteína presentes en la estructura primaria de la enzima, los cuales se hallan en el dominio extracelular, revela que la PPII consiste de dos subunidades idénticas asociadas de manera no covalente. Papadopoulos et al., 2000, reportan que la mutación de un residuo involucrado en la formación de los puentes disulfuro, C68, no parece ser esencial para la biosíntesis, actividad enzimática o transporte a la

superficie celular, pero los residuos C restantes son importantes para la estructura de la subunidad individual.

De modo que en la familia M1, la dimerización covalente no es requerida para la actividad (Chávez-Gutiérrez et al. 2005).

Antecedentes

1. Tanicitos como reguladores del eje HPT

Muchos de los núcleos clave en el control del balance energético (como el núcleo arcuato, ventro medial y paraventricular) se encuentran en proximidad al tercer ventrículo. La parte dorsal del revestimiento de este ventrículo contiene una capa de células endimarias ciliadas. Conforme se progresa de manera más ventral en la pared del ventrículo, aparecen los tanicitos, inicialmente intercalados con células endimarias, antes de volverse más numerosos; los tanicitos se hallan contiguos en la pared del ventrículo hacia la eminencia media. Las células endimarias son aproximadamente cuboides, poseen muchos cilios y tienen un proceso muy corto. En contraste, los tanicitos carecen de cilios, poseen microvellosidades, otras especializaciones apicales, y tienen procesos largos que proyectan hacia el parénquima cerebral (Bolborea et al., 2013).

Basado en su localización, morfología, citoquímica y ultra estructura, los tanicitos pueden ser clasificados en cuatro subtipos: tanicitos $\alpha 1$ y $\alpha 2$, que se hallan cerca de los núcleos hipotalámicos dorsomedial y ventromedial; mientras que aquellos más ventrales cerca del núcleo arcuato y la eminencia media son referidos como $\beta 1$ y $\beta 2$ (tal como se observa en la Fig. 4). Los tanicitos $\beta 2$ difieren de los demás, ya que estos tienen acceso directo al plasma circulante a través de fenestraciones en la barrera hematoencefálica encontradas en la eminencia media.

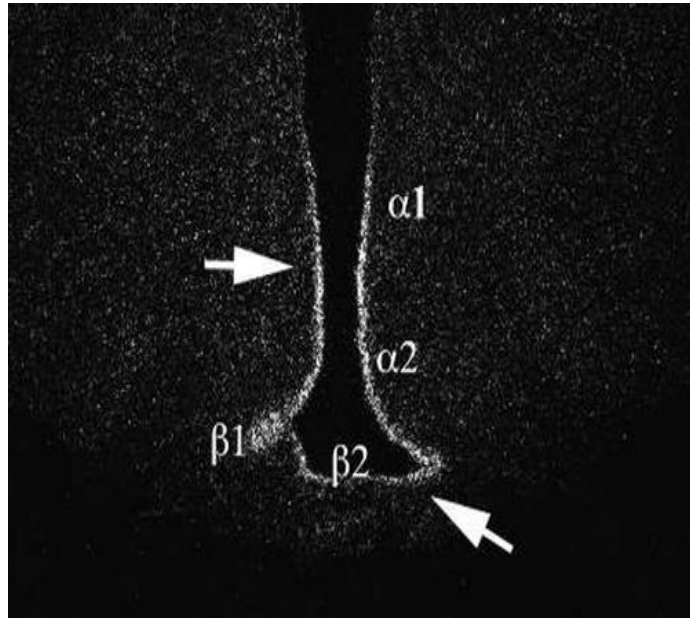


Fig. 4 Distribución del ARNm de PPII en el hipotálamo medio basal (Tomado de: Sánchez et al., 2009) El efecto estimulante de las HT sobre la síntesis de PPII permite que tras la inyección de L-T4 en rata macho adulta se detecte la presencia de PPII a través de la hibridación *in situ* para su ARNm. Éste se observa como cúmulos de plata en el piso y paredes infralaterales del tercer ventrículo que corresponden a su vez con las diferentes poblaciones de tanicitos presentes en él.

Los procesos de los tanicitos pueden encontrarse en asociación cercana con capilares y arteriolas en el hipotálamo (Bolborea et al., 2013).

Los diferentes subtipos de tanicitos también difieren en sus firmas químicas, sugiriendo que estos tienen funciones independientes. Los tanicitos α y β_1 expresan el transportador de glucosa 1, un marcador de la barrera hematoencefálica. Los tanicitos β_2 carecen del transportador de glucosa 1 pero expresan rab 4, una proteína involucrada en el transporte vesicular (Fekete y Lechan, 2014).

A nivel ultraestructural, una característica común de los tanicitos es la presencia de endosomas tempranos y tardíos cerca de la superficie apical de los cuerpos celulares, sugiriendo que todos los tipos de tanicitos incorporan de manera activa sustancias del fluido cerebro espinal (Fekete y Lechan, 2014).

Además, son el locus principal para la expresión de la D2 en el cerebro de roedor, y por lo tanto para la producción local de T3. También expresan los

transportadores de hormonas tiroideas OAT1C1 y MCT8 (Bolborea et al., 2013). Notablemente, la expresión de D2 no está presente en el PVN, sugiriendo que la T3 generada de manera local difunde a esta área proveniente de otros núcleos en el hipotálamo. (Gereben, 2008). Los tanicitos expresan receptores de HT, por lo que son sensibles a los cambios locales que generan ellos mismos en la disponibilidad de hormonas tiroideas (Fekete y Lechan, 2014).

Además, los tanicitos expresan la enzima degradadora de TRH, la PPII, cuya expresión y actividad es regulada en paralelo con los niveles circulantes de hormona tiroidea. Sánchez et al 2009, demostraron que todas las subpoblaciones de tanicitos en el hipotálamo mediobasal, incluyendo subtipos $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, expresan el ARN mensajero para PPII (Fig. 4).

La yuxtaposición cercana de los botones terminales que contienen pro-TRH con las terminaciones de los tanicitos β -2 que se extienden dentro de la zona externa de la eminencia media sugiere un papel específico para la PPII, presente en este subtipo de tanicitos, en la regulación de la cantidad de TRH transportada a la adenohipófisis en la sangre portal al controlar la tasa de la degradación de TRH en los espacios periportales. (Fig. 5; Sánchez et al, 2009)

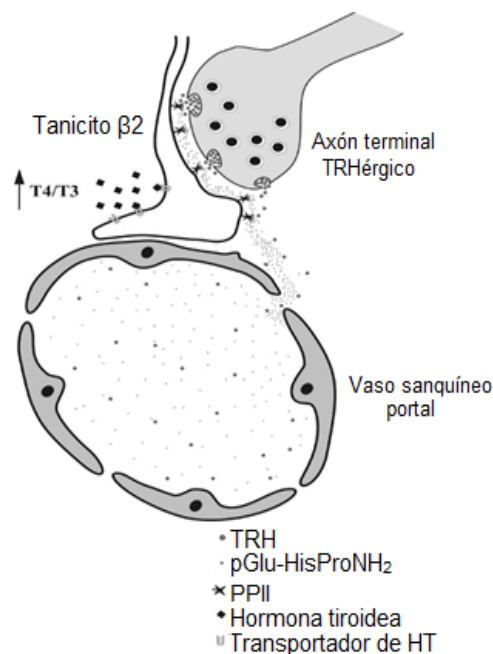


Fig. 5. Mecanismo propuesto de inactivación de TRH a través de la PPII presente en tanicitos $\beta 2$ (Modificado de Sánchez et al, 2009). Este se basa en la yuxtaposición entre los axones terminales de las neuronas TRHérgicas y la presencia de PPII en la membrana de tanicitos $\beta 2$ que revisten las paredes del tercer ventrículo; al ser una exopeptidasa, la PPII podría generar la inactivación previa del triptépido antes de que éste llegue a la circulación portal que comunica al hipotálamo con la hipófisis.

Este concepto es apoyado por evidencia de que un inhibidor específico de la PPII incrementa la recuperación de TRH liberada de la eminencia media in vitro y que la inhibición de PPII in vivo resulta en un aumento significativo de los niveles de TSH circulante después de una administración exógena de TRH o después de exposición al frío, que es un estímulo para la secreción endógena de TRH (Sánchez et al, 2009).

2. Ratón nulo para la PPII

La técnica de disrupción genética o “gene targeting” permite la introducción de mutaciones genéticas diseñadas en un ratón en un locus determinado. El proceso para generar modelos con mutaciones dirigidas se desarrolló a partir del descubrimiento de la recombinación homóloga y el aislamiento de células troncales murinas. La recombinación homóloga es un mecanismo de reparación del ADN que es empleado en la selección genética para insertar una mutación diseñada en el locus genético homólogo. La recombinación homóloga seleccionada puede llevarse a cabo en células troncales a través de la electroporación de la construcción de selección. Estas células troncales son totipotenciales y, cuando se inyectan en un blastocisto de ratón, se pueden diferenciar en todo tipo de células de un ratón quimérico. Un ratón quimérico que porte las células derivadas de la clona de estas células troncales puede entonces generar un ratón completo que posea la mutación deseada. El paso inicial para la generación de un ratón con una mutación seleccionada es la construcción de un vector de selección eficiente que pueda ser introducido en las células troncales (Hall, 2009).

Existe una línea de ratón nulo (“knockout”) para la PPII la cual fue sujeta a una observación fenotípica amplia e imparcial que pretendió identificar defectos potenciales en el metabolismo general, metabolismo de huesos o en la función cardiovascular, el sistema neural e inmune (Tang et al. 2010).

Targeting Strategy

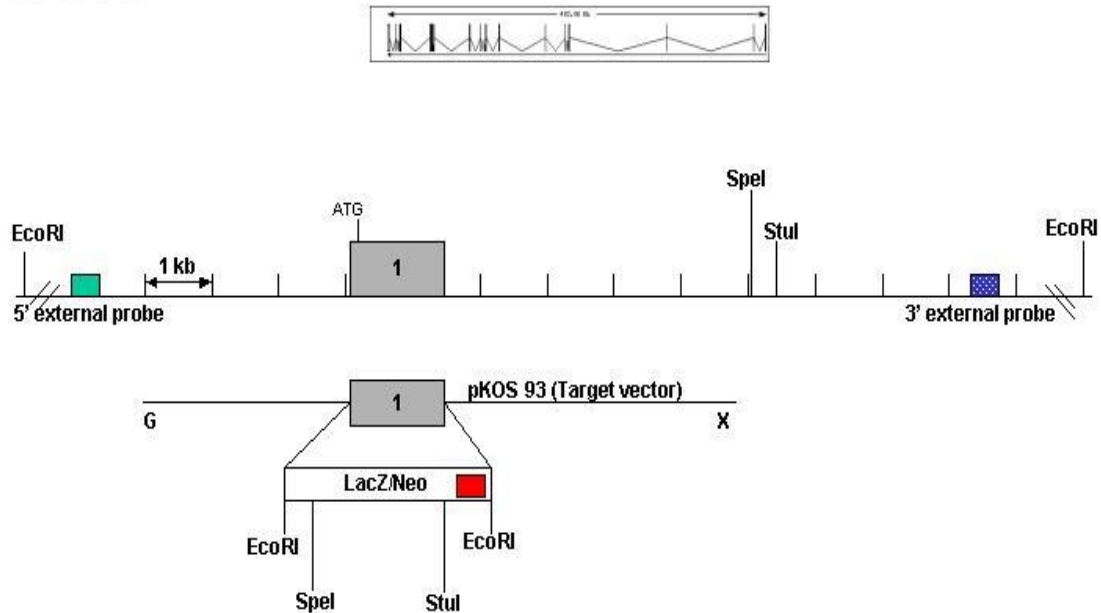


Fig. 6 Estrategia de selección (Tomada de MMRRC, 2010) El gen de PII consiste de 19 exones. Se noqueó el exon 1 a través de recombinación homóloga con un vector pKOS 93 que contenía un cassette de selección LacZ/Neo.

La estrategia utilizada para generar al ratón nulo fue eliminar el exón 1 de la PII a través de recombinación homóloga con un vector de selección (Fig.6). El locus genómico que se reporta en la estrategia experimental de Lexicon corresponde a 10 kpb que flanquean al exón 1 del gen de PII, la región eliminada, el cual se halla en el cromosoma 10 del ratón. Reportan que el casete de selección usado, IRES- β gal-MC1-Neo, tiene un tamaño de 5290 nucleótidos y que los brazos de homología izquierdo y derecho tienen una longitud de 4012pb y 4585 pb, respectivamente. El casete reportero de selección comprende a la secuencia del gen LacZ antecedido por un elemento viral IRES (Sitio interno de entrada al ribosoma) que permite la traducción independiente de cap del reportero, y también contiene al gen fosfotransferasa de neomicina bajo control independiente al promotor MC1 (MMRRC, 2010).

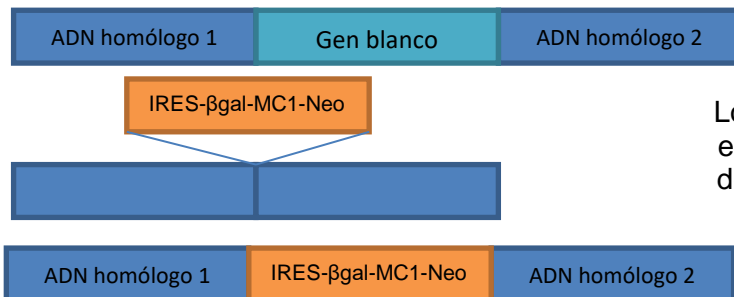
Las mutaciones fueron generadas en células troncales derivadas de la cepa 129/SvEvBrd. El ratón quimérico se desarrolló en un ratón C57BL/6J para generar animales heterocigotos (Lexicon, 2010). La estrategia general para la generación del ratón está descrita en la sección 2.1.

Una de las pocas características fenotípicas que se encontró alterada durante el desarrollo de los ratones con mutación nula para la PPII fue la disminución de peso con respecto a los controles o incluso con los animales que eran heterocigotos para la mutación, tanto en hembras como en machos, pero la disminución de peso fue mucho más notoria en los machos homocigotos.

Falta explicar a qué se debe este fenotipo, porque por el momento no hay datos funcionales que lo explican. Los antecedentes sobre el papel del TRH sugieren que se pudiera deber a un decremento de la ingesta de alimentos y/o a un incremento del gasto energético basal y/o a un incremento de la actividad motora espontánea.

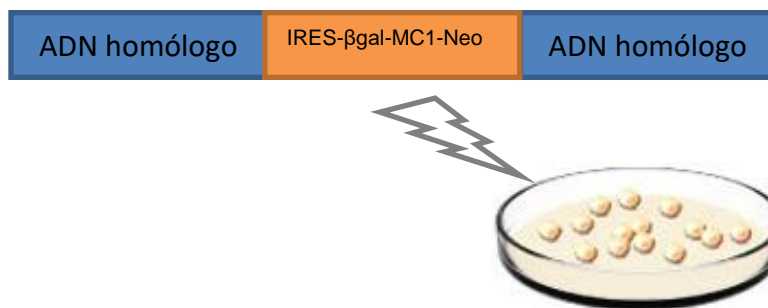
2.1 Pasos involucrados en la generación de un ratón nulo

Paso 1: Diseño del vector de selección



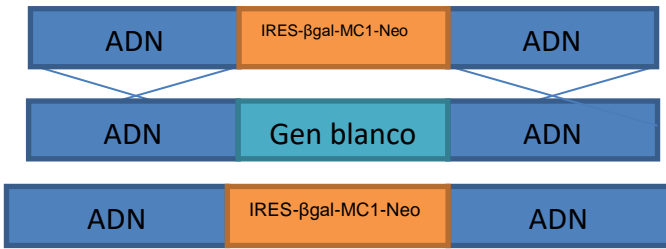
Los marcadores de selección se insertan en un vector con la secuencia homóloga del gen blanco para generar el vector de selección.

Paso 2: Insertar el vector de selección en células madre embrionarias



El vector de selección se inserta en las células madre a través de electroporación.

En algunas células el vector de selección recombina con el gen blanco y noquea una copia del gen blanco



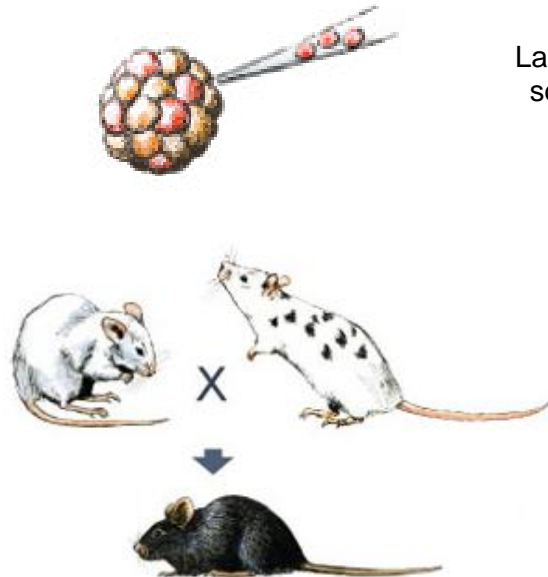
Resultado, las células con el gen noqueado presentan:
-Resistencia a neomicina
-Expresión de β -Gal

Paso 3: Seleccionar células



Sólo las células que han incorporado correctamente el vector de selección, sobrevivirán en presencia de neomicina y expresarán el gen de la β -galactosidasa. Se confirma la inserción por Southern Blot.

Paso 4: Inyectar células en un embrión nuevo



Las células que contengan el vector de selección son seleccionadas e inyectadas en un embrión normal en desarrollo.

La quimera resultante contiene una mezcla de sus propias células y las células del noqueo heterocigoto. Este ratón se reproduce con un ratón normal. Entre en su descendencia hay ratones que son capaces de pasar el gen nulo a su propia descendencia.

Justificación

Los datos obtenidos en diferentes laboratorios sugieren que la PPII inactiva al TRH en el medio extracelular y controla la eficacia del TRH. Sin embargo, falta resolver muchas interrogantes, en particular sobre el papel exacto de la PPII en distintos contextos in vivo.

Se han desarrollado inhibidores de la actividad de PPII, pero son poco adecuados para estudiar el balance energético, porque el estudio requiere manipulación del animal a largo plazo. Por lo cual se propone analizar el balance de energía en modelos animales en los cuales se haya inactivado el gen de la PPII. El propósito de este proyecto es la caracterización fenotípica ligada al balance energético de una línea de ratones transgénicos deficientes de PPII. La caracterización de estos ratones permitirá utilizar estos modelos para resolver en el futuro otras preguntas sobre el papel de la PPII.

Hipótesis

La hipótesis del proyecto es:

- La inactivación generalizada de la PPII en los ratones “knockout” incrementará el efecto anoréxico del TRH y su efecto locomotor.

Objetivo general

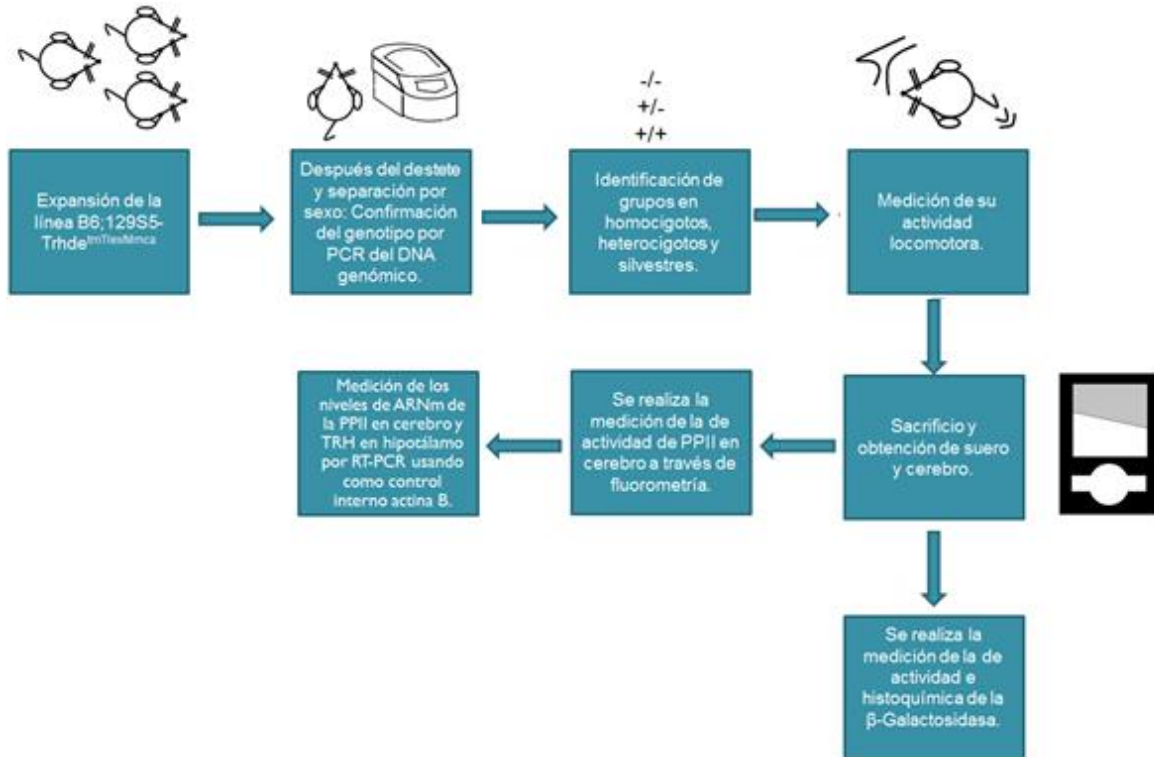
Aclarar el papel de la PPII en el control del balance energético in vivo, a través de un análisis de la locomoción de ratones “knockout” para la PPII.

Objetivos particulares

- Determinar el impacto de la mutación sobre la expresión y actividad de PPII in vivo en cerebro.
- Analizar la distribución de la expresión de PPII en el cerebro del ratón, aprovechando que la mutagénesis introduce el gen de la β galactosidasa bajo el promotor de la PPII.
- Determinar el impacto de la mutación sobre la actividad locomotora espontánea.
- Comparar los efectos en machos y hembras.

Metodología

Estrategia experimental



Cabe mencionar que todos los experimentos con animales fueron previamente aprobados por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología-UNAM (solicitud #208).

Materiales y métodos

1. Genotipificación de los ratones por PCR.

Se obtuvo un fragmento de la cola de cada uno de los ratones, posteriormente se obtuvo el ADN genómico y se purificó. Se obtuvo el ADN a través de la digestión del tejido con un buffer que contenía 150 μ L de buffer STE más 15 μ L de proteinasa K (150 μ g/muestra); se aplicó una ligera agitación con vórtex y se incubó el tejido toda la noche a 55 °C con movimiento. Posteriormente, se añadieron 15 μ L de SDS al 10% y se aplicó una ligera agitación con vórtex, se incubaron las muestras sobre hielo por 5 minutos, después se agregaron 150 μ L de NaCl saturado, se le aplicó una ligera agitación con vórtex y se incubaron las muestras sobre hielo por 10

minutos; las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 13500 rpm a 4°C. Al término de la centrifugación, se transfirió el sobrenadante a tubos de 2 mL nuevos (250 µL) y se adicionaron 500 µL de ETOH absoluto frío (-20 °C).

Las muestras se mezclaron por inversión suave varias veces, posterior a esto, las muestras se dejaron precipitando al menos 3 horas a -20 °C, al pasar este tiempo las muestras se mezclaron por inversión y se centrifugaron 15 minutos a 4 °C a 13500 rpm, se retiró el sobrenadante con cuidado y se lavó de una a dos veces el pellet de ADN con ETOH al 70% y se mezcló con vórtex, se centrifugó por 15 minutos a 13500 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante con cuidado para no perder el pellet. Se dejó secar el pellet de ADN a temperatura ambiente aproximadamente 10 minutos y se resuspendió en 75 µL de TE. El ADN se cuantificó con un espectrofotómetro (Eppendorf) utilizando una dilución 1:250 con agua miliQ, tomando lecturas a 230, 280 y 260; se hicieron diluciones para tener una concentración de 50 ng/µL, y se guardaron a 4 °C y se procedió a realizar la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación rápida del ADN hasta mil millones de veces a partir del ADN obtenido de una región seleccionada de un genoma; mediante métodos químicos se sintetizan dos oligonucleótidos del ADN, seleccionados para flanquear la secuencia de nucleótidos que se desea amplificar (Tabla 1).

Oligonucleótidos		
WT	S	5' CTC TCG GAC CCG TGG GCT G 3'
	AS	5' GCA TCA AAT TGT AGT GCA GCC 3'
NEO	S	5' CCA TCG TAA CCT GAG AAG TTG 3'
	AS	5' GCA GCG CAT CGC CTT CTA TC 3'

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la PCR de la genotipificación.

Estos oligonucleótidos se utilizan como cebadores para la síntesis de ADN sobre cadenas de una sola hebra generadas al desnaturalizar el ADN por calentamiento. El ADN recién sintetizado es el producto de la reacción *in vitro* de una ADN

polimerasa purificada y los cebadores acaban quedando en los extremos 5' de los fragmentos de ADN sintetizados (Alberts, *et al.* 2010).

La genotipificación del ADN genómico de la cola de ratón se realizó por PCR usando oligonucleótidos específicos para los ratones silvestres y nulos (NEO) en una reacción múltiple que generó una banda en las lecturas (Zhang, *et al.* 2008) de 421 pb para los ratones WT y 496 pb en el caso de los ratones nulos.

2. Presencia de ARNm de la PPII en hipotálamo y corteza cerebral por RT-PCR

De los cerebros obtenidos, se disecaron segmentos de hipotálamo que incluían al PVN, núcleo arcuato y eminencia media, o la corteza. Para la purificación del ARN, se añadieron 350 μ L de buffer D (Tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 2.5 mM pH7.0, sarcosil 0.5%, 2 mercaptoetanol 0.1M), sobre hielo, al tubo con el tejido de interés guardado a -70 °C y previo a que se descongele. El tejido se disgregó y se rompió con sonicación 2 veces por 10 segundos incubando en el intersonicado 5 minutos sobre hielo, se agregaron 20 μ L de acetato de sodio 2M pH 4.0, con agitación por vórtex de 35 segundos y se agregó 200 μ L de fenol saturado en agua y 80 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico, con agitación violenta durante 70 segundos, posteriormente la muestra se incubó 15 minutos sobre hielo. (Chomczynski y Sacchi, 1987)

Las muestras se centrifugaron 20 minutos a 10000 rpm a 4 °C y se procedió a recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo y rotulado, cuidando de no tomar la interfase. Se agregaron a las muestras 300 μ L de isopropanol frío, se mezcló con vórtex suave y se incubaron por 3 horas a -20 °C. Después de la incubación se mezclaron las muestras por vórtex y se centrifugaron 30 minutos de 13500 rpm a 4°C. (Chomczynski y Sacchi, 1987)

Se eliminó el sobrenadante por decantación y se resuspendió el botón en 1/3 del volumen inicial (120 μ L) y se agregaron 300 μ L de isopropanol, se mezclaron las muestras por vórtex y se incubaron toda la noche a -20 °C. Al otro día, se mezclaron con vórtex y centrifugaron 30 minutos a 13500 rpm a 4 °C y se eliminó el sobrenadante por decantación y el botón de ARN se lavó con 300 μ L de etanol al

70% con H₂O DEPC, pasando el etanol por todas las paredes para eliminar sales, y se incubó 5 minutos sobre hielo. (Chomczynski y Sacchi, 1987)

Las muestras se centrifugaron 19 minutos a 13500 rpm y se decantó el etanol, para eliminar totalmente el sobrenadante, se dio un pulso en la microcentrífuga y se quitó el líquido con una punta amarilla de la pipeta Gilson (p200). En el caso de las muestras que aún tenían sales en la tapa del tubo, se tomó una gasa estéril y se colocaron 200 µL de H₂O DEPC, empleando esta parte para limpiar la tapa y así eliminar las sales. El resto se dejó secar por evaporación y se guardaron las muestras a -70 °C. El botón de ARN total se resuspendió con 19 µL de H₂O DEPC con vórtex suave 3 veces por 30 segundos. Se tomaron 2.5 µL y se colocaron en 498 µL de agua millipore para leer la absorbancia a 230, 280 y 260 nm para saber la concentración de sales, proteínas y RNA respectivamente. (Chomczynski y Sacchi, 1987) Se realizaron los cálculos para tener 1 µg de RNA en un volumen de 15 µL y hacer así la RT en un volumen de 30 µL.

Además se tomaron 0.2 µg del RNA total y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X, corriendo el ARN con TBE 0.5X a 100 volts por 45 minutos; después se tiñó el gel con bromuro de etidio (4uL/100mL) durante 12 minutos y se destiñó 20 minutos con agua. Se visualizó posteriormente el gel en el trans-iluminador y se verificó la presencia de ARN.

La técnica de transcripción inversa-PCR (RT-PCR) realiza una amplificación del ARN (especialmente ARNm) a través de la síntesis previa de su ADNc (ADN complementario al ARN), que posteriormente se amplifica por PCR. La mezcla de reacción inicial contiene ARN, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, cebadores y dNTPs. El proceso inicia con la síntesis de una hebra de ADNc por la acción de la transcriptasa inversa, una polimerasa de ADN dirigida por ARN; posteriormente, a partir del dúplex comienza la amplificación según el mecanismo de una PCR normal: la hebra de ADNc liberada actúa como molde para una segunda hebra de ADN y luego el dúplex se amplifica en los ciclos sucesivos (Luque, *et al.* 2006).

Considerando la concentración de ARN en cada muestra se tomó lo necesario para tener 1 µg y llevarlo con H₂O DEPC a un volumen de 15 µL, las muestras se calentaron durante 5 minutos a 65 °C y se incubaron 5 minutos sobre hielo.

Se adicionaron 15 μ L con la mezcla de transcripción reversa:

- 6 μ L de Buffer first strand 5X
- 3 μ L de DTT 0.1M
- 1 μ L de Oligo dT(0.5 μ g/ μ L)
- 0.6 μ L de dNTPs mix10mM
- 0.5 μ L de RVT 200 U/ μ L
- CBP 15 μ L con H₂O DEPC

Se incubó las muestras durante 2 horas a 37 °C, y al terminar el tiempo las muestras se almacenaron a -20 °C o se realizó la PCR.

Para la medición de los niveles de ARNm de PPII, se realizó una RT-PCR-cualitativa usando el ARN, de actina B como control interno. Un microgramo de ARN se incubó con 100 pmoles de oligo-dT L5 y 100 U de M- MLV transcriptasa inversa (Invitrogen Corp) durante 2 horas a 37 °C.

Se obtuvieron los oligonucleótidos para PPII, y Actina B de la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM para llevar a cabo las PCR's del experimento (Tabla 2).

Oligonucleótidos			Sitio en el gen (pb)
PPII	S	5' CTG GAT CGC ATA CAA AAA 3'	1642 a 1660
	AS	5' GGA CAG CCA AAT AAT TGC T 3'	2059 a 2041
Actina B	S	5' TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT 3'	924 a 949
	AS	5' CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG 3'	1208 a 1183

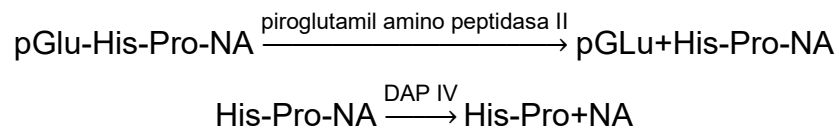
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR semi cuantitativa de PPII. Los Oligonucleótidos que se observan fueron utilizados en los experimentos para ambos géneros (machos y hembras) y para los tres diferentes grupos analizados (Silvestres, +/-, -/-).

Los productos de la PCR fueron separados por la técnica de electroforesis en gel, la cual es una técnica utilizada para la separación de macromoléculas de acuerdo a su peso y su carga; se utilizaron geles de agarosa al 2% para PPII (409 pb). Para

analizar cada amplificado se corrió a la par el producto de la amplificación del ARNm de actina B (284 pb). Los geles se tiñeron posteriormente con bromuro de etidio durante 13 minutos, y se destiñeron con agua durante 26 minutos. Los productos de la PCR analizaron a través del equipo Fluor S Multilmager (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.).

3. Medición de la actividad de PPII en cerebro e hígado con un ensayo fluorométrico

Se determinó la actividad enzimática de la PPII por fluorimetría; este ensayo consiste en utilizar al sustrato fluorogénico TRH-BNA (pGlu-His-Proβnaftilamida), así como un exceso de la enzima DPP IV (Kelly et al., 1999). El fundamento de este ensayo es el siguiente: la PPII hidroliza el enlace peptídico pGlu-His de TRH, lo que genera el producto pGlu más el His-Pro-BNA. Posteriormente el enlace Pro-BNA del His-Pro-BNA es hidrolizado por la enzima DAP IV. Esta última hidrólisis genera los productos His-Pro más el fluoróforo libre que puede ser detectado en el espectrofluorómetro.



La mezcla de reacción en un volumen final de 240 μL de buffer fosfatos fue la siguiente:

- 50 μg de una preparación de proteínas de membranas
- 20 μL de DPP IV (2 mU). Una miliunidad de enzima (mU) se define como la cantidad de enzima requerida para convertir un nanomol de sustrato (His-Pro-βNaftilamida) en producto por minuto.
- 5 μL de bacitracina (Sigma) y N-etilmaleimida (Sigma) 10 mM cada una (200 μM final). La bacitracina y la N-etilmaleimida son inhibidores de la enzima Prolin endopeptidasa y la enzima Piroglutamil peptidasa I respectivamente, enzimas citosólicas que pueden degradar al TRH *in vitro*. Se completó el volumen a 240 μL con buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5.

Esta mezcla se preincubó durante 10 minutos a 37 °C, se adicionaron 10 µL de sustrato (TRH-BNA, 400 uM final) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la cinética de la reacción. La reacción se detuvo con un volumen de 50 µL de metanol frío al 100 % y posteriormente se agregaron 300 µL de metanol al 50 % en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5. Las alícuotas se centrifugaron a 10 000 g por 3 minutos (para precipitar componentes que puedan interferir con la lectura de fluorescencia). El sobrenadante se utilizó para medir la fluorescencia en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS 508 Shelton, con los parámetros: 335 nm de excitación y 410 nm de emisión. Para realizar las lecturas de fluorescencia fue necesario preparar una curva estándar de concentraciones conocidas de BNA para calibrar el espectrofluorómetro. Se preparó el blanco que contenía solo buffer fosfatos y metanol en una relación 1:1 así como concentraciones de 50, 100 y 200 picomoles de BNA.

4. Histoquímica de la β -galactosidasa en cortes de cerebro

La β -galactosidasa es una molécula reportera utilizada como indicador de transgenes y es codificada por el gen bacteriano *lacZ* de *Escherichia coli* para detectar los patrones de expresión espaciales y temporales de genes y proteínas. La actividad de β -gal in situ puede visualizarse ya sea por histoquímica con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) o por inmunodetección usando anticuerpos anti- β -gal; este último método permite la inmunolocalización de β -gal. En el caso de la histoquímica, β -galactosidasa hidroliza a X-gal para formar un precipitado azul que puede ser analizado de manera visual. (Turksen, 2002). A continuación se enlista la metodología utilizada:

1. Fijación por perfusión del cerebro y obtención de secciones coronales de interés.

Debido al tamaño del roedor se debe adaptar un sistema de infusión (sistema de goteo/catéter). Se coloca el extremo del sistema en un matraz lleno con buffer y se limpia la línea con buffer hasta que las burbujas de aire en la tubería sean

eliminadas. Se cierra la válvula de salida. Se debe realizar lo mismo con el contenedor con paraformaldehído al 4% (a temperatura ambiente). Posteriormente hay que probar la habilidad del sistema para mantener la presión y preparar las herramientas para la cirugía. Previo a la cirugía se administra pentobarbital (con una concentración de 63mg/ml) a través de una inyección intraperitoneal (30-90 mg/kg). (Cage, 2012)

Una vez que el animal ha alcanzado el plano quirúrgico de la anestesia, colocarlo en una charola y asegurarlo para iniciar la cirugía. Se hace una incisión lateral a través del integumento y la pared abdominal justo debajo de la caja torácica. Se separa cuidadosamente el hígado del diafragma y se hace una incisión pequeña en el diafragma usando unas tijeras de punta redonda sin filo. Hay que continuar la incisión del diafragma a toda la longitud de la caja torácica para exponer la cavidad pleural. Se procede a colocar las tijeras de punta redonda sin filo a un lado de las costillas, desplazando de manera cuidadosa los pulmones, y hacer un corte a través de la caja torácica hasta la clavícula. Se debe hacer un corte similar del lado opuesto. Se separa el esternón y se corta cuidadosamente cualquier tejido unido al corazón. Se procede a enganchar la punta del esternón con ayuda de un hemostato y colocarlo sobre la cabeza. Si se hace de manera apropiada, el timo se separa del corazón junto con el esternón, proporcionando una vista clara de los vasos mayores. A continuación se hace una pequeña incisión en el extremo posterior del ventrículo derecho usando tijeras y se pasa una aguja a través del corte del ventrículo hacia la aorta ascendente. La punta debe ser visible a través de la pared de la aorta y no debe alcanzar el arco aórtico donde divergen las arterias branquial y carótida. Debemos usar un hemostato para asegurar la aguja y prevenir el goteo. Finalmente, se hace una incisión en el atrio derecho del animal usando unas tijeras iris para crear una salida sin dañar la aorta descendente. En este punto el animal está listo para ser perfundido. Se une y se abre la válvula de salida a la base de la aguja teniendo cuidado de no introducir burbujas. Ajustamos el ángulo de la aguja (ésto es crítico para alcanzar el máximo flujo). Se cambia la válvula del buffer una vez que este casi se termine (200ml) El fluido debe estar claro. El aclaramiento del hígado es un indicador de una buena perfusión. El hígado debe estar claro en este

punto. Los temblores de la fijación deben observarse en segundos; este debe considerarse el verdadero tiempo de la fijación. Se cierra la válvula de salida una vez que el fijador casi se termine. El roedor debe estar tieso en esta etapa. El paraformaldehído utilizado debe ser colectado y almacenado para su disposición. (Cage, 2012)

Se procede a remover la cabeza usando un par de tijeras:

- Hacer una incisión a lo largo del integumento del cuello a la nariz y exponer el cráneo.
- Cortar los restos de músculo del cuello de modo que se exponga la base del cráneo; remover cualquier residuo usando tijeras.
- Colocar la punta de un par de tijeras iris en el foramen magno, deslizando las tijeras a lo largo de la superficie interna del cráneo.
- Hacer un corte que vaya al extremo distal de la superficie posterior del cráneo. Hacer un corte idéntico del lado contrario.
- Cuidadosamente, deslizar las tijeras a lo largo de la superficie interna del cráneo mientras la punta va del extremo distal dorsal posterior al extremo distal frontal, levantando la cuchilla mientras se corta para prevenir daño al cerebro. Repetir para el lado opuesto.
- Usar pinzas para retirar la superficie dorsal del cráneo. Cortar ambos lados del cráneo.
- Usar espátula, cortar los bulbos olfatorios y las conexiones nerviosas a lo largo de la superficie ventral del cerebro.
- Separar el cerebro de la cabeza.
- Remover el cerebro, colocarlo en un vial con fijador al menos 10 veces el volumen del cerebro y dejar reposar durante 1h a 4°C.
- Transferir el tejido fijado a sucrosa al 30% para su almacenamiento y posteriormente realizar la obtención de los cortes coronales (Cage, 2012).

Estas son las soluciones utilizadas para la perfusión:

▫Stock de paraformaldehído al 8%: Agregar 40 g de paraformaldehído a 500mL de dH₂O. Calentar la solución a 60-65° C mientras se mezcla. No exceder los 65° C, al hacerlo se afecta el éxito del procedimiento histoquímico. Para aclarar la solución, reducir el calor y agregar 2-3mL de NaOH 1 M con gotero. Filtrar y almacenar a 4° C hasta por un mes.

▫Buffer fosfato de sodio 0.2M: Para el stock monobásico, añadir 27.8 g de NaH₂PO₄•H₂O a 1L de dH₂O. Para el stock dibásico, añadir 28.4 g de Na₂HPO₄ a 1L de dH₂O. Añadir 810 ml del stock monobásico a 190 mL del stock dibásico.

▫Fijador de paraformaldehído al 4%: Añadir partes iguales del stock de paraformaldehído al 8% al buffer de fosfatos 0.2M. Este fijador debe prepararse fresco, no con más de 72 h de anticipación.

▫PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4: 1 L H₂O, 9 g NaCl, 144 mg KH₂PO₄, 795 mg Na₂HPO₄. Corregir pH.

2. Una vez que se tiene el tejido fijado, enjuagar 3 veces, durante 30 m cada una, con buffer de enjuague a t.a.

▫Buffer de enjuague

Fosfato de sodio 100mM

MgCl₂ 2 mM

Deoxicolato de sodio 0.01%

NP-40 0.02%

Estable a t.a. por al menos un año.

3. Teñir entre 4 y 8 h, típicamente durante la noche. Cerca del 90% de la tinción ocurrirá en las primeras 24h.

▫Solución para teñir

Buffer de enjuague más:

Ferricianuro de potasio 5 mM, de un stock 0.5M almacenado a t.a. en la oscuridad.

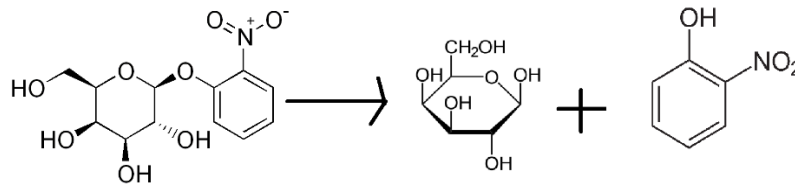
Ferrocianuro de potasio 5 mM, de un stock 0.5M almacenado a t.a. en la oscuridad.

X-gal 1mg/mL , de un stock 25mg/ml en dimetilformamida, almacenado a 20° C.

4. Post-fijado durante la noche en formalina al 10% a 4° C. (Mercer, 1995)

5. Actividad enzimática de β -galactosidasa

El o-nitrofenol- β -D-Galactopiranosido es un sustrato colorimétrico para la detección de la actividad de β -gal. Este compuesto normalmente es incoloro. Sin embargo, si la β -gal está presente, se hidroliza la molécula de ONPG en galactosa y o-nitrofenol. Este último compuesto tiene un color amarillo que puede ser usado para cuantificar la actividad enzimática por medio de un ensayo colorimétrico (a una longitud de onda de 420 nm).



Se realizó la extracción de proteína total a partir de fragmentos de cerebro y se realizó la cuantificación de la proteína obtenida de modo que se utilizaron 50ug (cuantificados por el método de Bradford) de proteína en cada ensayo realizado.

1. Para cada muestra examinada, se realizó la siguiente mezcla:

3ul de solución Mg 100X

66ul de ONPG 1x

50ug de proteína total

201 ul de fosfato de sodio 0,1 M(pH 7.5)

2. Se incubaron las reacciones a 37° C por diferentes tiempos (5, 10 y 15 h).

3. Se detuvieron las reacciones al agregar 500ul de Na₂CO₃ 1M a cada una. Se obtuvo la densidad óptica de las reacciones a una longitud de onda de 420nm (Sambrook et al., 1989).

4. Se realizó el cálculo de la pendiente

6. Actividad locomotora

Monitorear la actividad motora a través de un dispositivo automatizado de grabación es una parte integral de la evaluación del comportamiento. El dispositivo utilizado debe ser capaz de detectar el incremento y la disminución de la actividad. Se deben minimizar variaciones en las condiciones ambientales (luz, sonido, actividad) a lo largo de la evaluación. (Derelanko, 2002)

Los fotodetectores generalmente cuentan el número de interrupciones en un rayo durante la sesión de prueba. La actividad motora fue monitoreada con un PAS (Photobeam Activity System) (San Diego Instruments, Inc., San Diego, CA) que comprende jaulas con la forma de caja de zapatos.

Cada jaula individual estaba rodeada por un marco embebido con 4 fotorayos en dirección X y 8 en dirección Y. Cada sesión de prueba corresponde a un periodo de 24h y cada sesión se divide en intervalos de 1800 s (30 min). El inicio del análisis del movimiento se llevó a cabo entre las 9:00 y 10:00 a.m.

- Se trasladaron los animales al cuarto en que se realizaron las mediciones antes de encender el equipo.
- Se enciende el equipo y se colocaron a los ratones en cajas limpias junto con alimento y agua, asegurándose previamente que no se presentara algún tipo de interferencia en el paso de los haces de luz.
- Al final de la sesión se obtienen los datos en Excel. Se ordenan los datos por genotipo y se cuantifica el número de movimientos ambulatorio, fino y total, durante estas 24 horas, considerándose de 7p.m. a 7a.m como el periodo nocturno. Se descartan las primeras cuatro horas, considerándoles como un periodo de habituación.

7. Análisis estadístico

Los datos que se muestran en los histogramas corresponden a la media y la desviación estándar. Se utilizó una ANOVA de un factor, para analizar si hubo diferencias significativas en la locomoción de los ratones silvestres y los ratones que presentan la mutación en el exón número 1 del gen de la PPII.

Resultados

1. Efecto de la mutación del gen de PPII sobre la expresión y actividad de PPII en cerebro

1.1 Expresión de ARNm

Machos

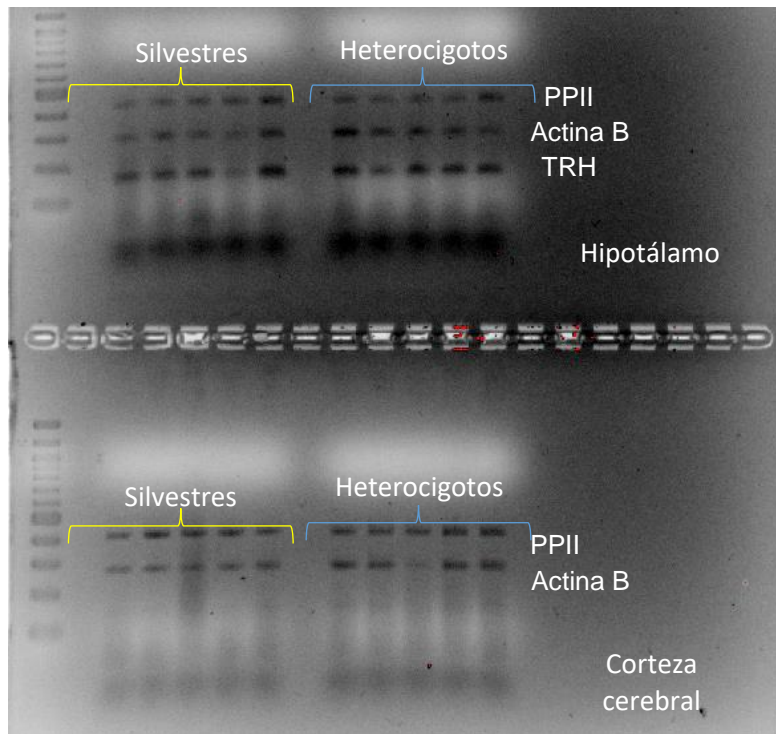


Fig. 7 Expresión del mensajero de la PPII en hipotálamo y corteza cerebral de macho. Se observa la expresión de PPII en el animal heterocigoto.

Hembras

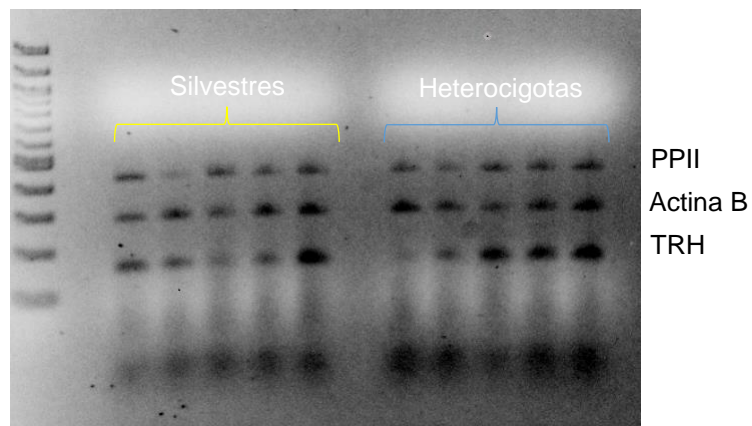


Fig.8 Expresión del mensajero de la PPII en hipotálamo de hembra. Se igual manera que con los machos heterocigotos, en las hembras se observa la expresión de PPII tanto en el animal silvestre como en el heterocigoto.

En la Fig. 7 se observa la expresión cualitativa del mensajero de la PPII, en hipotálamo y corteza, respecto a los genotipos silvestre y heterocigoto, ya que en este punto no se contaban con animales homocigotos. De igual manera se observa la expresión del ARNm de PPII en el hipotálamo de hembra (Fig. 8).

1.2 Datos de actividad de PPII

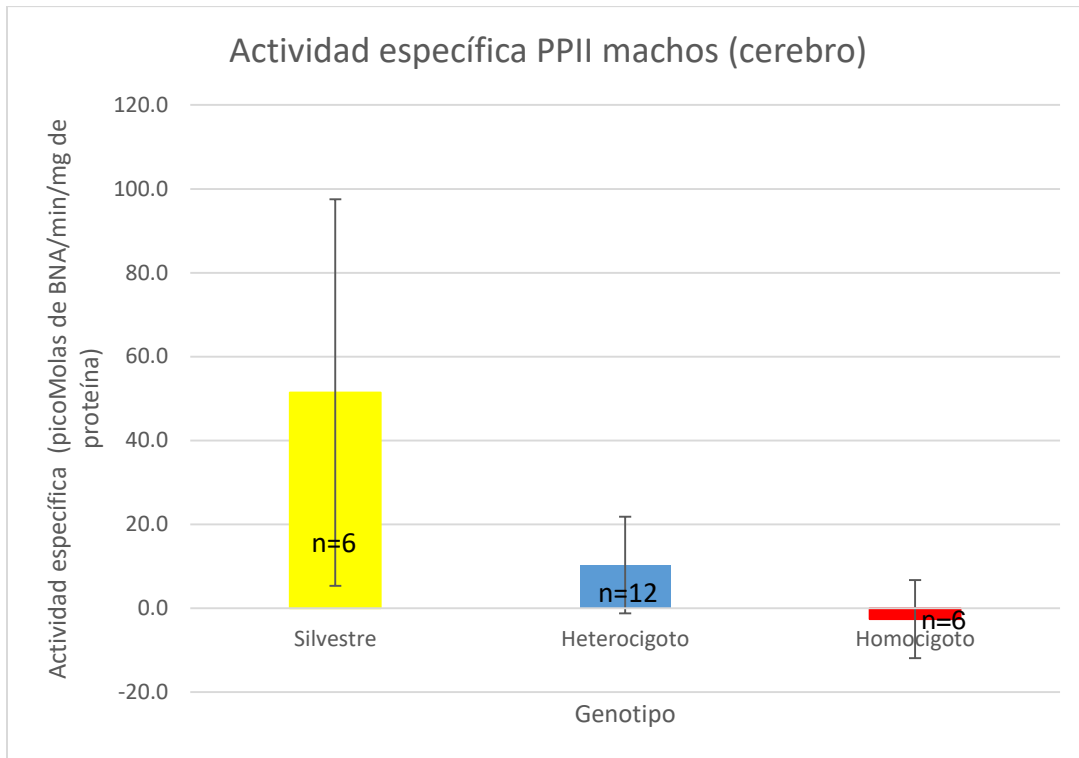


Fig.9 Actividad específica de la PPII en cerebro de macho. En esta imagen se representa la actividad específica de la PPII obtenida en homogeneizado de cerebro de macho al realizarse una cinética con el sustrato BNA. AE Silvestres: 51.359375 ± 18.8066491 picoMolas de BNA/min/mg de proteína; AE Heterocigotos: $10.0998264 \pm 2.69063255$ picoMolas de BNA/min/mg de proteína; AE Homocigotos: 0 ± 4.6909812 picoMolas de BNA/min/mg de proteína.

En la figura 9 se muestra la actividad específica de la PPII en el cerebro de ratones machos en los 3 genotipos. El valor de actividad específica promedio del ratón silvestre es consistente con los valores reportados en cerebro de ratón. A pesar de que el error estándar en el grupo silvestre es elevado, se observa una tendencia a la disminución de la actividad específica del ratón -homocigoto y del heterocigoto -respecto al silvestre.

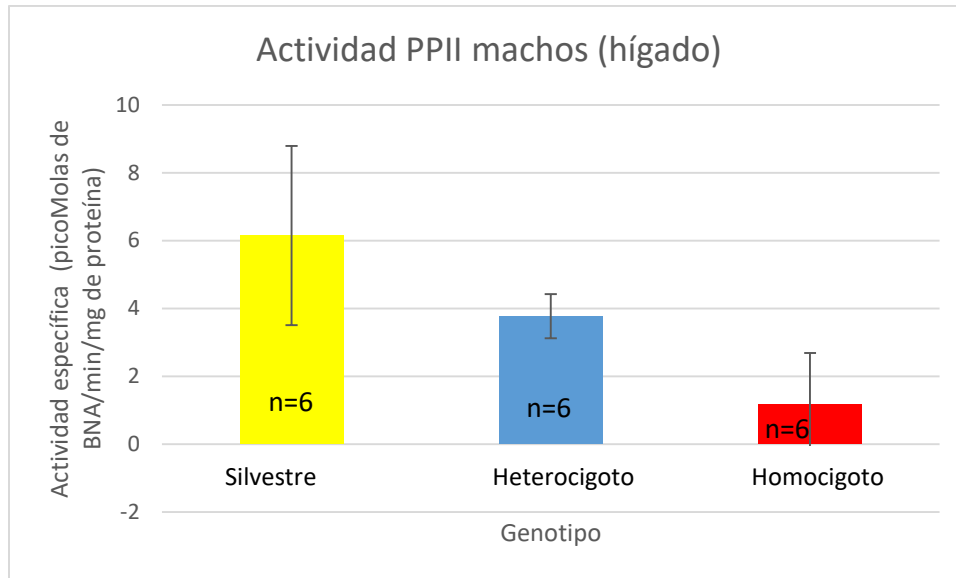


Fig.10 Actividad específica de la PPII en hígado de macho. En esta imagen se representa la actividad específica de la PPII obtenida en homogeneizado de hígado de macho al realizarse una cinética con el sustrato BNA. AE Silvestres: 6.15413654±2.6440665 picoMolas de BNA/min/mg de proteína; AE Heterocigotos: 3.77302716±0.64845016 picoMolas de BNA/min/mg de proteína; AE Homocigotos: 1.172464± 1.52213664 picoMolas de BNA/min/mg de proteína.

En la Figura 10, se muestra la actividad específica de la PPII en el hígado de ratones machos en los 3 genotipos. El hígado también es reconocido como uno de los órganos en los que se expresa la PPII, si bien se sabe que la actividad específica es menor que en cerebro. De igual manera que con el cerebro, se observa una tendencia a disminuir la actividad al incrementar el número de alelos de PPII mutados.

2. Patrón de expresión de la PPII en el cerebro de ratón

2.1 Actividad enzimática de β –galactosidasa

2.1.1 Hembras

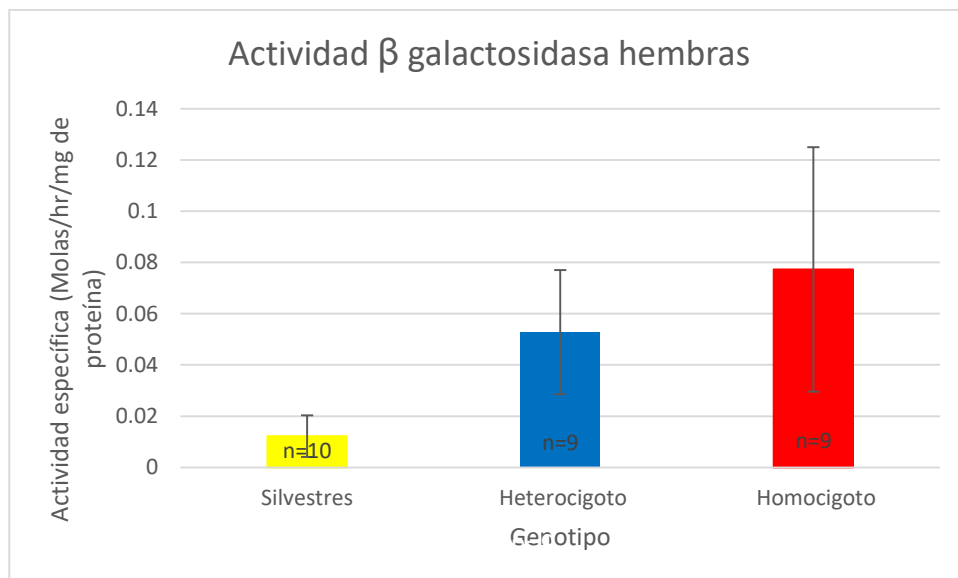


Fig. 11. Actividad de β -gal en ratones hembras. En esta imagen se representa la actividad específica de la β galactosidasa obtenida en homogeneizado de cerebro de hembra al realizarse una cinética con el sustrato ONPG. AE Silvestres: 0.0122 ± 0.0081 Molas/hr/mg de proteína; AE Heterocigotos: 0.0528 ± 0.0242 Molas/hr/mg de proteína; AE Homocigotos: 0.0773 ± 0.0477 Molas/hr/mg de proteína.

Ya que la recombinación homóloga debe haber introducido el gen de la β -galactosidasa bajo el promotor de la PPII, otra de manera de confirmar el genotipo de ratones es a través de la medición de la actividad de la enzima en el cerebro de los animales. Se realizó la cinética de la actividad del reportero a través de un ensayo espectrofotométrico en el que se tomó una alícuota cada 5h por 15h; se escogió una escala de tiempo amplia, y una cantidad de proteína elevada (50 μ g de proteína por mL) porque se anticipaba que el número de células que expresaría la enzima es una ínfima proporción de las células neurales.

En el ensayo realizado en hembras (Fig. 11), se aprecia que la actividad en el ratón heterocigoto es mayor que la del silvestre y a su vez que el ratón homocigoto presenta mayor nivel de actividad que el heterocigoto, lo cual es el comportamiento presumible si se espera una segregación mendeliana típica en la mutación.

La actividad reportada en el silvestre podría deberse a la degradación espontánea del mismo sustrato puesto que los cerebros silvestres no poseen actividad de β galactosidasa o procesos de autofagia.

2.1.2 Machos

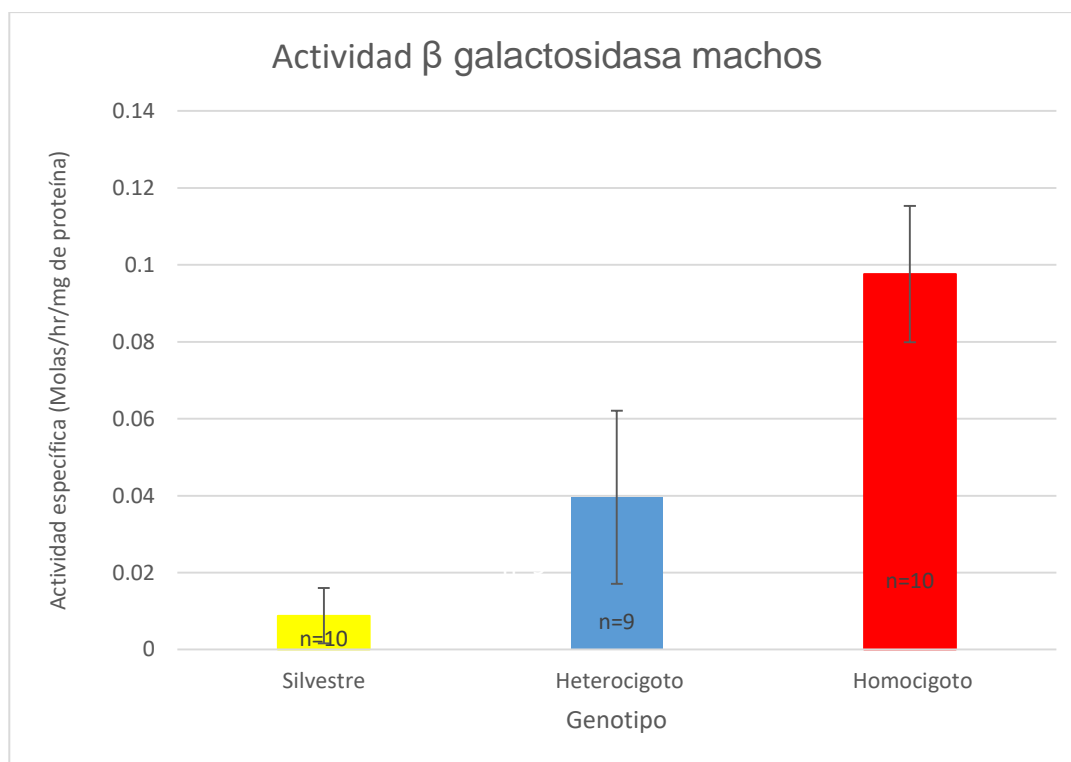
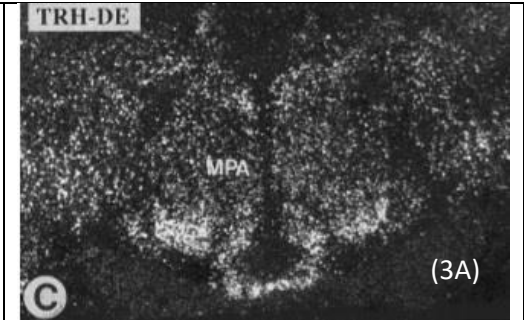
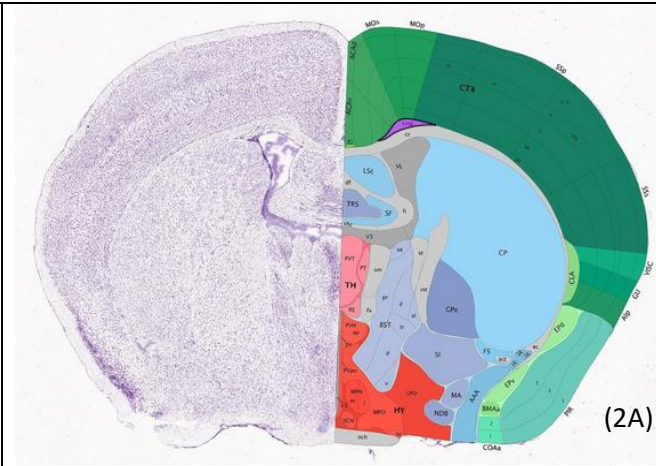
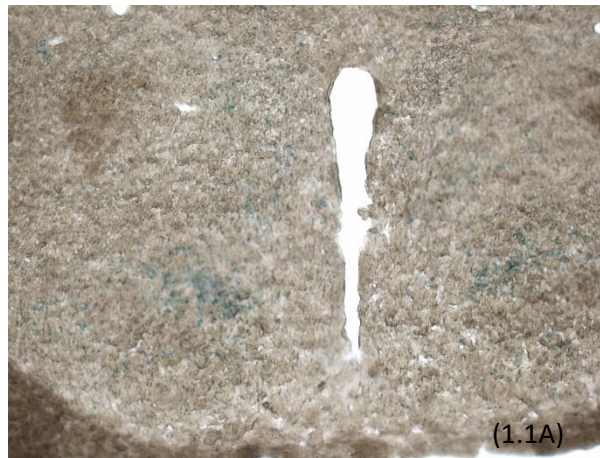


Fig. 12 Actividad de β -gal en ratones machos. Actividad específica (Molas/hr/mg de proteína) de la β galactosidasa obtenida en homogeneizado de cerebro de macho. AE Silvestres: 0.0088 ± 0.0081 Molas/hr/mg de proteína; AE Heterocigotos: 0.0396 ± 0.0225 Molas/hr/mg de proteína; AE Homocigotos: 0.0773 ± 0.0177 Molas/hr/mg de proteína.

En el macho (Fig. 12) se observan las mismas tendencias que en la hembra.

2.2 Distribución histológica de actividad de β -galactosidasa en cerebro



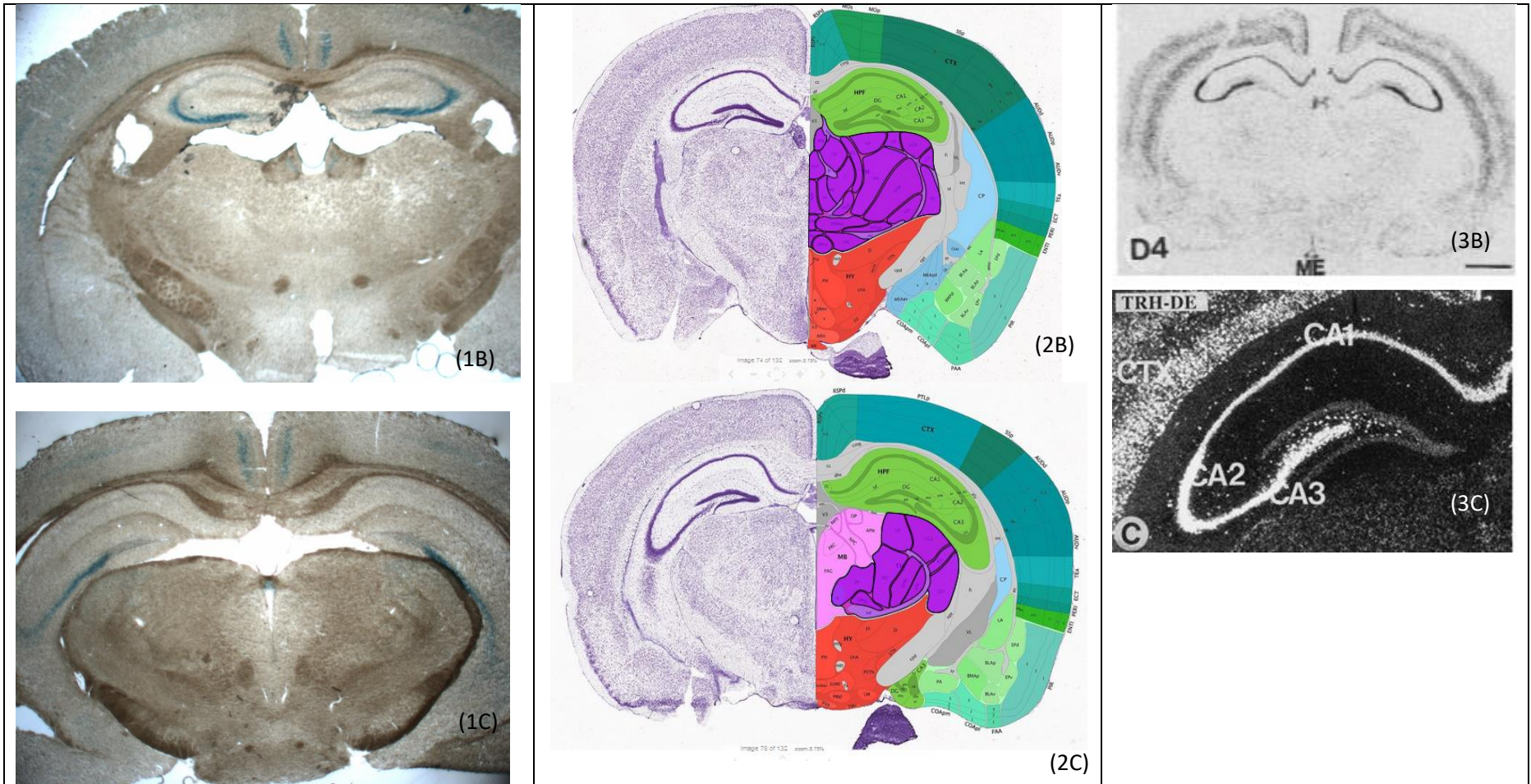


Fig. 13 Distribución de la β -galactosidasa. Se observa en diferentes cortes coronales de ratón heterocigoto la presencia de la enzima gracias al color azul del precipitado que se forma durante la tinción. Su presencia se observa en hipotálamo lateral (1.1A), corteza cerebral (1A, 1B y 1C) e hipocampo (1B y 1C). Las observaciones anteriores corresponden con las realizadas previamente por Heuer et al. (2000) en el cerebro de la rata que se aprecian en la figuras 3A, 3B y 3C. Se utilizó el Allen Brain Atlas: Mouse Brain (2015) como guía en 2A, 2B y 2C.

Para aprovechar que la construcción insertada en el mutante contiene al gen lacZ, expresado bajo el promotor de la PPII, se procedió a observar la localización de la enzima β -galactosidasa en el cerebro a través del ensayo histoquímico con el sustrato X-gal en cortes coronales de cerebro heterocigoto, para observar de una manera sencilla el patrón de expresión de la PPII en ratón.

Este ensayo reveló la presencia de la enzima en una distribución (Fig. 13) que concuerda con la reportada previamente por Heuer et al. (2000) en el cerebro de la rata. Este grupo hace uso de la hibridación in situ para observar la distribución de diferentes elementos del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides en el cerebro de rata; reportando que el ARNm de PPII está ampliamente distribuido a través de la corteza cerebral y que en la corteza cingulada, la expresión es más pronunciada en las capas externas (Fig. 13;1A). Lo anterior coincide con las imágenes 1B y 1C en la Fig. 13; en el ratón la corteza cingulada presenta un marcado color azul, siendo menor éste en el resto de la corteza (pero no hay que perder de vista que esta es la expresión en un heterocigoto).

En la imagen 1A en la Fig. 13 se observa expresión de la enzima reportera en hipotálamo lateral, que corresponde con uno de núcleos hipotalámicos reportados previamente en rata (3A en la Fig. 13).

Además se sabe que en la formación hipocampal de la rata, la PPII es altamente expresada en las células piramidales de CA2 y CA3/CA4 (3C en la Fig. 13), lo cual es comparable con la expresión de la enzima observada en las imágenes 1B y 1C en la Fig. 13, demostrándose la presencia de la enzima en un recorrido rostro caudal en ésta área.

3. Análisis de movimiento espontáneo

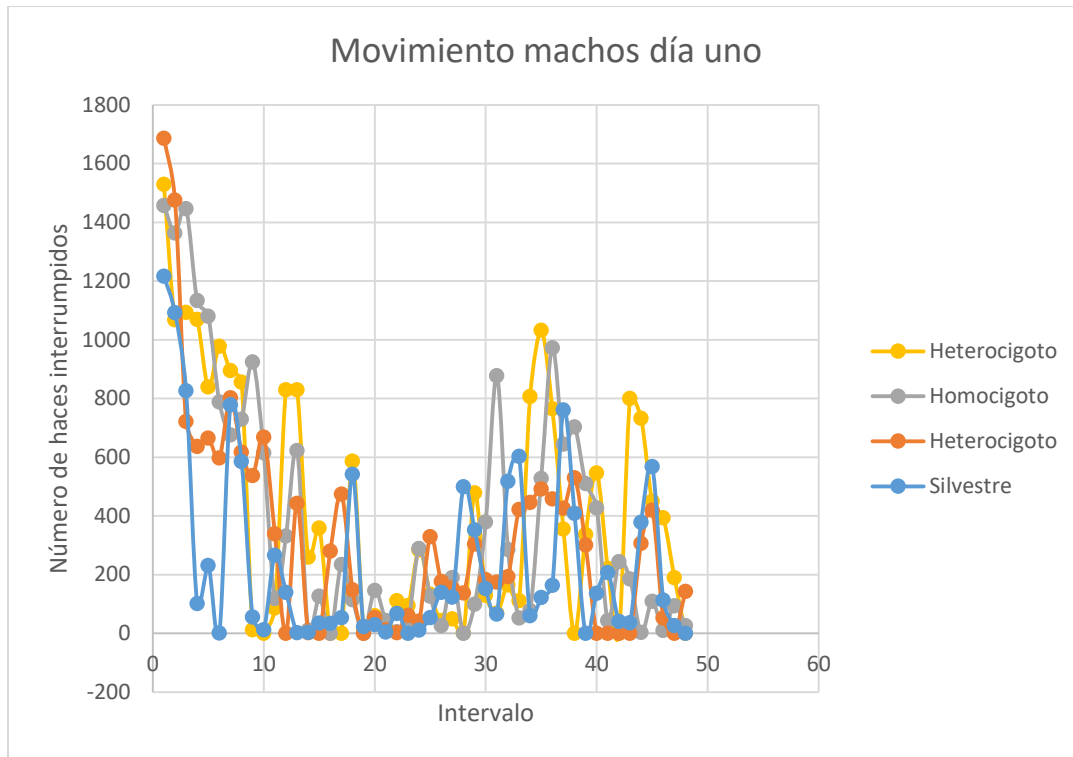


Fig.14 Movimiento total para ratones macho (día uno). En la siguiente gráfica se observa el número total de haces interrumpidos durante un intervalo con duración de 30 min a lo largo de 24 h (que corresponde a los 48 intervalos)

En la Figura 14 se ilustra el registro del movimiento total obtenido durante 1 día del experimento.

3.1 Locomoción en hembras y machos

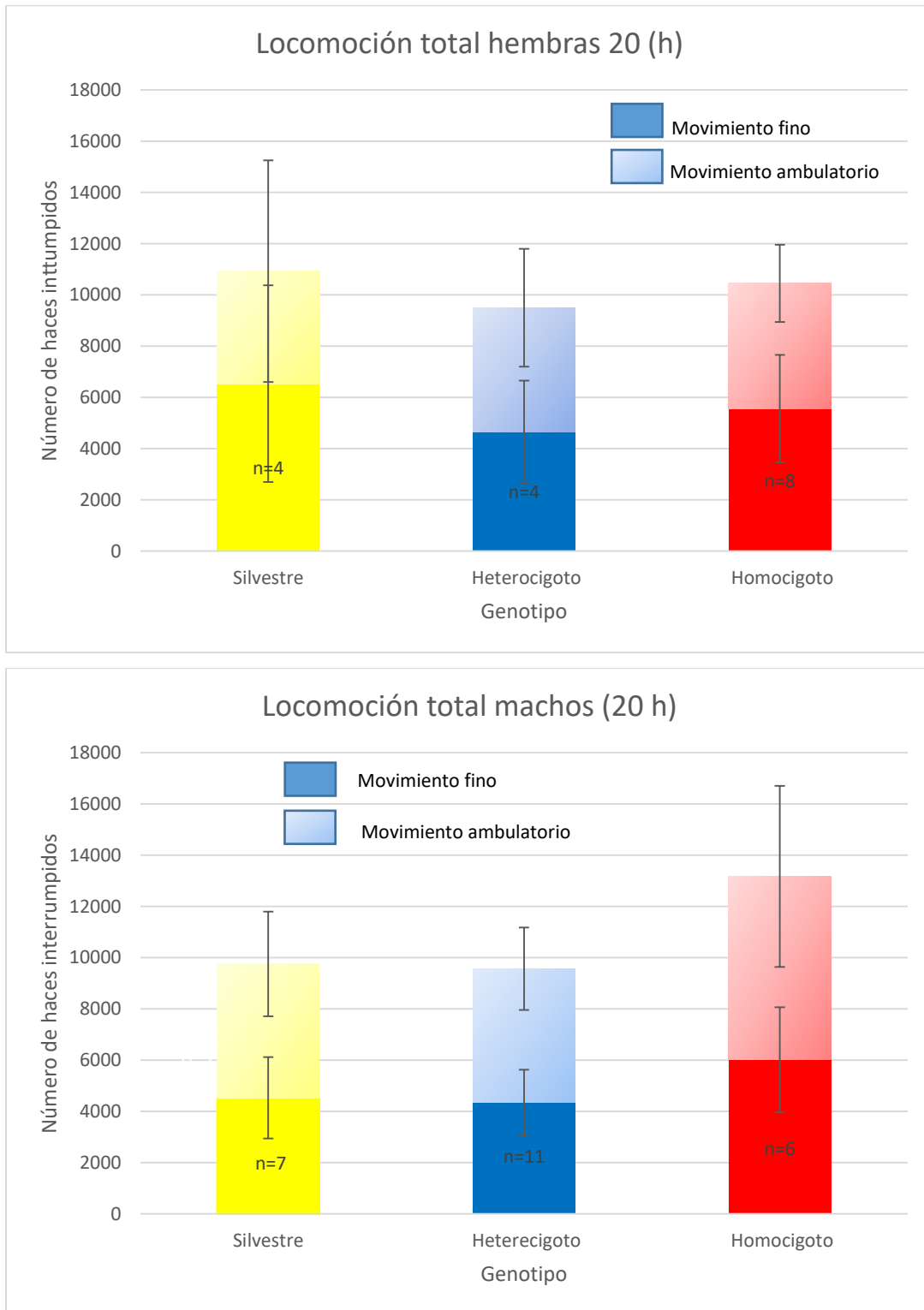


Fig.15 Mediciones de la locomoción por genotipo y sexo. Se indica la media del movimiento fino en las barras de color sólido y la media del movimiento ambulatorio en la barra de color degradado,

siendo la suma de ambos componentes el movimiento total registrado. El movimiento fino es cuantificado en el equipo PAS como la ruptura consecutiva del mismo haz de luz por más de 2 segundos, lo que corresponde a comportamientos como el acicalamiento u olfateo del animal. Mientras que el movimiento ambulatorio se relaciona al andar del individuo. Las medias de los grupos no son estadísticamente diferentes ($p > .05$).

En el experimento cuyos resultados se muestran en la Fig. 15, se registró la actividad de los animales durante un periodo de 24 h, descartándose de manera posterior las primeras 4 h, que se considerada como un periodo de habituación requerido por el animal, puesto que se exhibe un grado de estrés al colocárseles en cajas individuales.

Se realizó el ANOVA de una vía para el registro obtenido durante las 20 h siguientes. No se registraron diferencias significativas tanto en movimiento fino ($F(2,13)=0.732$, $p > .05$), como movimiento ambulatorio ($F(2,13)=0.043$, $p > .05$) o movimiento total ($F(2,13)=0.158$, $p > .05$) en la hembras.

De igual manera en machos el movimiento fino ($F(2,21)=2.325$, $p > .05$), ambulatorio ($F(2,21)=1.539$, $p > .05$) y total ($F(2,21)=1.954$, $p > .05$) no presentaron diferencias significativas. Únicamente se indica una tendencia en que los machos homocigotos presenten mayores niveles de actividad total que los machos silvestres u heterocigotos.

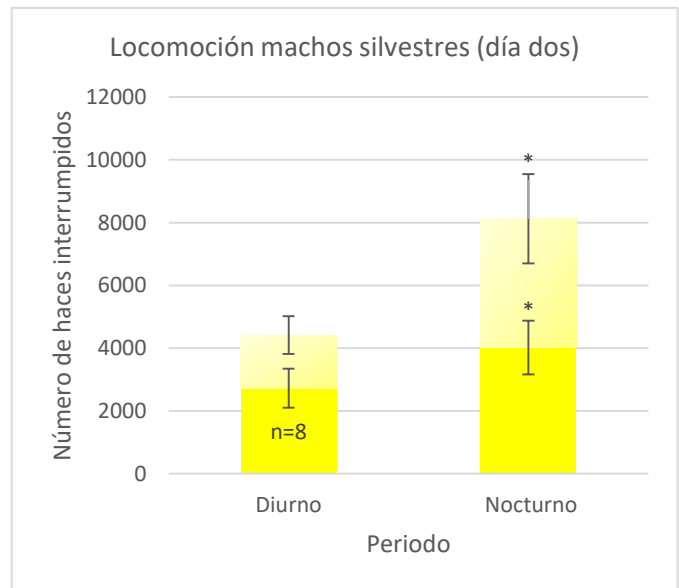
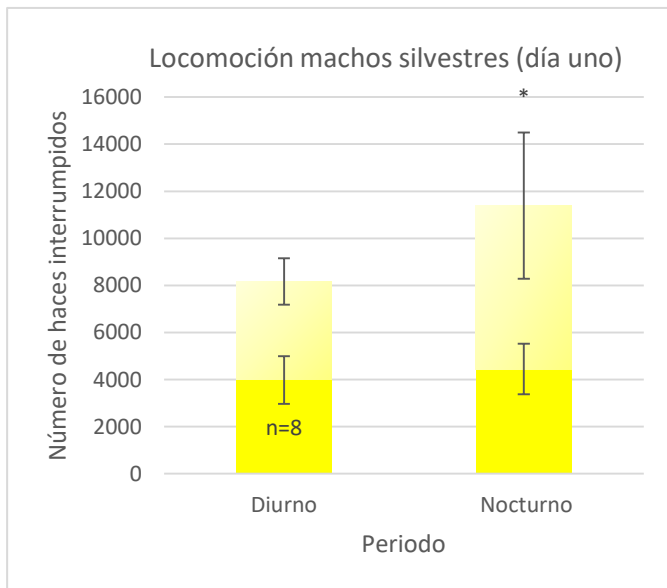
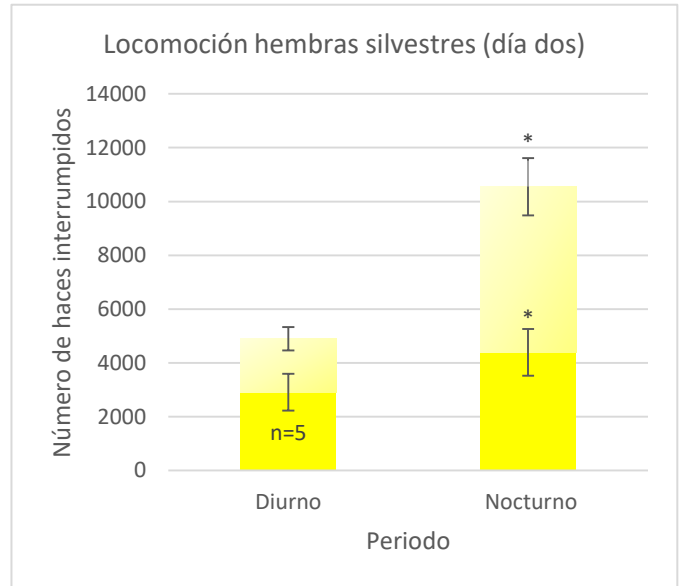
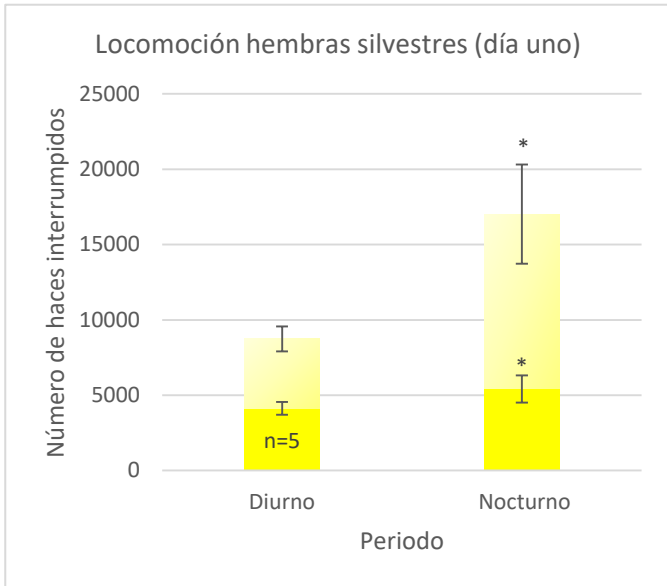


Fig. 16 Mediciones de la locomoción por periodo circadiano en hembras (n=5) y machos (n=8) silvestres. Se realizaron las mediciones durante dos días para plantearse la necesidad de un periodo de habituación mayor durante las pruebas de locomoción realizadas con el PAS en el ratón.

Hembras: Movimiento fino día uno: $F(1,9)=7.986$, $p < .05$; Movimiento ambulatorio día uno: $F(1,9)=26.794$, $p < .05$; Movimiento total día uno: $F(1,9)=38.359$, $p < .05$. Movimiento fino día dos: $F(1,8)=8.986$, $p < .05$; Movimiento ambulatorio día dos: $F(1,8)=65.954$, $p < .05$; Movimiento total día uno: $F(1,8)=181.491$, $p < .05$.

Machos: Movimiento fino día uno: $F(1,14)=0.782$, $p > .05$; Movimiento ambulatorio día uno: $F(1,14)=5.722$, $p < .05$; Movimiento total día uno: $F(1,14)=4.545$, $p > .05$. Movimiento fino día dos: $F(1,14)=12.039$, $p < .05$; Movimiento ambulatorio día dos: $F(1,14)=19.519$, $p < .05$; Movimiento total día uno: $F(1,14)=21.717$, $p < .05$.

Para corroborar que la metodología que se aplicó en el transcurso del primer experimento fuera capaz de detectar cambios en la actividad espontánea, se decidió probar una condición conocida en la que se sabe de antemano que se presentan cambios significativos en la locomoción. En este caso se probó la diferencia entre el movimiento durante el periodo diurno y el nocturno, pues se sabe que los ratones presentan mayor locomoción durante el periodo nocturno (Hutchins y Rogers, 1973). Además se consideró ampliar el periodo de habituación registrándose de este modo el movimiento durante dos días consecutivos, para evaluar el efecto del estrés provocado por el cambio de ambiente.

Para las hembras (Fig. 17, parte superior) es claro que la habituación no resulta clave en esta prueba, ya que se observa el cambio esperado en la actividad (mayor en el periodo nocturno), demostrando que tanto el método como el aparato funcionan de manera adecuada. Pero se observa una clara disminución en el número de movimientos registrados de un día al otro, dada por una capacidad de adaptación u habituación rápida del animal a su nuevo entorno.

El parte inferior de la Figura 17, se muestra el comportamiento de los ratones macho. Durante el primer día de la evaluación, los machos sólo presentaron diferencias significativas entre periodo diurno y nocturno en el movimiento fino mientras que en el segundo día se observaron las diferencias esperadas además de la disminución en los movimientos contabilizados.

Discusión

En esta tesis se analizó el impacto de la alteración por recombinación homóloga del gen de la PPII sobre la expresión y actividad de PPII, la actividad del gen reportero insertado en el locus de la PPII, y sobre la actividad física espontánea en ratones adultos de los dos sexos.

Cuando se revisan los datos de expresión del ARNm para la PPII estos no resultan concluyentes probablemente porque la técnica utilizada no era la apropiada, siendo que la PCR en tiempo real es mucho más precisa que la PCR en punto final. Sin embargo se rescata que en los animales heterocigotos se observa la expresión de la enzima, lo que concuerda con los datos cuantitativos obtenidos para la actividad enzimática tanto de PPII como β -gal.

La actividad específica de la PPII se reduce de manera drástica en el cerebro e hígado de ratón macho homocigoto para la mutación, con una actividad intermedia en los heterocigotos. Otros datos del laboratorio muestran un resultado similar en ratones hembras. En todos los experimentos, se observa una actividad residual en los animales homocigotos. Todavía falta aclarar a que se debe esta actividad residual, y que la posibilidad de que no sea actividad de PPII (pero más bien la actividad de otra enzima por ejemplo). Sin embargo, resulta relevante que para el ratón homocigoto para la mutación se reportó únicamente la disminución en la actividad y expresión del ARNm de la enzima mas no la remoción completa de éstas, considerándose por tanto que la peptidasa no es noqueada de manera completa. Esto podría explicarse por el tipo de mutación que se generó. Previamente se han reportado estudios de mutagénesis dirigida de la PPII en los que se comprobó la importancia de los nueve residuos de cisteína presentes a lo largo de la estructura de la enzima. Al parecer todas las cisteínas parecen ser esenciales para la actividad enzimática, sobre todo las que se hallan más expuestas al espacio extracelular, pues su mutación provoca una inhibición prácticamente completa de la actividad enzimática de la PPII (Papadopoulos et al. 2000). En el diseño experimental usado por Lexicon se decidió noquear únicamente el exón 1 de los 19 exones que conforman a la proteína puesto que este es un método rutinario en el desarrollo de

un ratón nulo; de manera general, al borrar el exón 5' se provee de una mejor oportunidad para interrumpir totalmente la formación de una proteína en lugar de usar una estrategia que selecciona exones río abajo en el C-terminal (Hall, 2009). De manera interesante, se ha hallado que seleccionar dominios funcionales es más eficiente que seleccionar los exones 5'. (Haeussler, 2016)

Al surgir como alternativa a los métodos utilizados tradicionalmente, se vuelve necesario considerar el uso del sistema CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) debido a las ventajas que presenta tal como menor costo y tiempo invertidos para obtener un organismo mutante. Éste se describió originalmente como un mecanismo inmune adaptativo contra virus en las bacterias. (Harms, 2014) El sistema constituido por una proteína componente enzima Cas9 que interactúa con los complejos ADN:ARN y cuya actividad nucleasa es guiada por dos elementos ARN no codificantes del sistema; uno es crARN (CRISPR ARN) que contiene alrededor de 20 pares de bases de una única secuencia blanco (llamada secuencia espaciadora) y la otra es tracrARN (crARN trans activador). Estos dos elementos forman un dúplex crARN: tracrARN que dirige Cas9 al ADN blanco a través de la complementariedad de las pares de bases entre el espaciador en el crARN y la secuencia complementaria (llamada protoespaciador) en el ADN blanco. Los tres nucleótidos localizados inmediatamente en el lado 3' junto a la secuencia protoespaciadora constituyen el motivo adyacente al protoespaciador que es requerido para asegurar la especificidad del corte en las secuencias blanco. (Shen et al, 2013)

Sabiéndose que el motivo exopeptidasa y el motivo catalítico se hallan en el espacio extracelular, se cuestiona un poco el razonamiento de querer noquear el exón número 1 que se encuentra en el espacio intracelular. Lo anterior debido a que se observa expresión y actividad residual en el ratón analizado. De igual modo, otro antecedente que apoya la importancia de las mutaciones en el extremo C-terminal de la enzima es la presencia de una proteína dominante negativa generada por un "splicing" alternativo que genera la inserción de parte del intrón 14, el cual al poseer dos codones de paro consecutivos interrumpe la secuencia codificante en el gen de PPII y es capaz de generar una enzima trunca que se une a la proteína

monomérica completa e inhibe su acción, probablemente porque se ha perdido la actividad de chaperona intramolecular en el dominio C-terminal (Chávez-Gutiérrez L et al. 2005). De igual manera se ha descrito que la mutación en el residuo Glu-408 del motivo exopeptidasa por Gln genera una enzima inactiva (Chávez-Gutiérrez L et al. 2006).

Hay que considerar que la actividad residual observada puede deberse a que la inserción del cassette no es suficiente como para abatir toda la actividad de PPII por la posible existencia de una isoforma debido al inicio de la traducción en un codón ATG alternativo corriente abajo o simplemente debido a la existencia de codones de inicio alternativos.

Cabe mencionar como explicación alternativa al problema del fondo genético. Éste implica que a pesar de que se realicen múltiples cruzas, el mutante nulo no tiene 100 por ciento un fondo B6. Estas cepas albergan regiones discretas de material residual de la cepa 129 las cuales pueden producir interacciones epistáticas con el gen de interés. Tales regiones pasajeras de la cepa 129 pueden llevar a conclusiones incorrectas si las diferencias alélicas entre las cepas donadora y receptora afectan los fenotipos bajo estudio. Si ocurre alguna variación en los alelos cerca del gen seleccionado, y si ésta es transportada con el gen durante el entrecruzamiento, el fenotipo del ratón seleccionado podría atribuirse a los efectos del gen seleccionado y el gen pasajero (Lusis, 2007). Ya que no sabemos qué genes están ligados al gen blanco, no podemos estar seguros si los efectos fenotípicos vistos en el ratón nulo son debidos realmente a la mutación, a los genes que flanquean, o alguna interacción entre los genes fondo de B6 y 129. (Eisener-Dorman, 2009).

Por otro lado, la inserción de un gen reportero en el locus de la PPII permite utilizar al ratón para obtener fácilmente información sobre el patrón de expresión del gen endógeno. En este trabajo se comprobó que hay expresión del reportero en el cerebro en cantidad acorde con el número de alelos mutados. El análisis histoquímico en ratones machos mostró que la expresión y actividad del gen reportero corresponde a zonas que han sido relacionadas previamente con la expresión de la PPII en cerebro de rata, siendo éstas hipotálamo, hipocampo y

corteza cerebral (Heuer et al. 2000). Basados en estos datos se puede concluir que el patrón de expresión espacial de la PPII se asemeja al de la rata, lo que debería facilitar la utilización e interpretación de datos obtenidos de ratón para aclarar el papel de la PPII.

Cote et al. (datos preliminares) realizaron el análisis de varios aspectos del fenotipo de estos ratones, todavía no descritos, con énfasis en el control del peso corporal. Encontraron en particular efectos a nivel global: en peso corporal y consumo de alimento. Se observa una tendencia en la disminución del peso corporal de los mutantes respecto a los silvestres. Se realizó la comparación de la grasa corporal entre los genotipos, observándose que el peso de la grasa epididimal, abdominal y retroperitoneal de los ratones machos homocigotos es menor que en los animales silvestres. En estas camadas además se realizó el análisis del consumo de alimento observándose que en los machos homocigotos hay una disminución en el consumo de alimento. Los efectos del fenotipo de los ratones hembra son menos claros.

Debido a que la mutación tiene como objetivo eliminar uno de los mecanismos de regulación de la TRH de manera generalizada, es necesario evaluar de manera específica cuáles son las respuestas del organismo en condiciones estándar y ante estímulos que potencien la síntesis de esta hormona, para poder concluir de manera sincrética los alcances del noqueo. De este modo se prevé que en ausencia de un elemento de regulación de la TRH, se asumen mayores niveles de esta hormona en el medio extracelular y en consecuencia se debería encontrar estimulado al eje tiroideo bien hallándose los niveles de HT elevados o bien se sospecha la disminución en la susceptibilidad de los elementos controlados por TRH. Se analizó el estatus del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, observándose lo siguiente:

- Los niveles del ARNm de TRH en cerebro (o en el NPV) no son modificados por la mutación. Las neuronas TRHérgicas en el PVN son reguladas por señales neuronales; por ejemplo, la exposición aguda al frío estimula a las neuronas TRHérgicas por lo que es reconocido generalmente como un mecanismo adrenérgico (Zoeller et al., 1995).

- Al analizar la presencia del mensajero de TRH-R1 en pituitaria de machos se identifica una menor expresión en los mutantes. Después del tratamiento con TRH intraperitoneal se observa una disminución de los niveles del ARNm en el homocigoto respecto a las condiciones estándar. Se ha reportado previamente que TRH es capaz de estimular la degradación de TRH-R por un mecanismo que involucra tanto una disminución en la estabilidad del ARNm así como un aumento en la actividad ARNasa (Gershengorn y Osman, 1996)
- Además se realizó el análisis de la expresión del ARNm de la subunidad β de TSH (elemento limitante en la síntesis de esta hormona) en pituitaria, observándose una disminución en los niveles de expresión en el animal heterocigoto y homocigoto respecto al ratón silvestre.
- Los niveles de T4 total sérica no se hallan afectados por la mutación en machos. En hembras, sin embargo, se observa un comportamiento distinto, viéndose que las hembras homocigotas presentan niveles disminuidos en suero.

A través de estas observaciones se descarta que el mutante no presenta defectos en su respuesta a TRH, a nivel hipofisiario, puesto que los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides son capaces de responder tanto a la administración exógena de esta hormona como a la estimulación de su síntesis. De manera específica, el hecho de que el mensajero de la subunidad β de TSH en la pituitaria se halle disminuido, se puede contemplar como una consecuencia de la inhibición a nivel local por la retroalimentación negativa por acción de HT o por inhibición del receptor TRH-R1 por su ligando, de acuerdo a la noción de mantener el balance crítico.

Es así que manera preliminar se concluye que pudiera existir un estado de hipertiroidismo funcional en los animales homocigotos, que pudiera contribuir a la disminución del peso corporal. Por lo que se requiere analizar la expresión de diferentes agentes anorexigénicos a nivel de hipotálamo.

El motivo principal de esta tesis era determinar si existe una alteración de la actividad locomotora espontánea al mutar el gen de la PPII, porque un incremento

de la actividad locomotora pudiera también explicar la disminución del peso corporal en los animales homocigotos macho. Los datos que obtuvimos sugieren que no hay efecto del genotipo sobre la actividad física espontánea. Sin embargo, habría que considerar estos datos con precaución, porque el experimento control (medición de la actividad física durante 48h) muestra que el estrés del aislamiento de los ratones provoca un incremento inespecífico en la actividad espontánea que pudiera haber enmascarado el efecto del genotipo. Para descartar ruido atribuible al estrés, se considera como una opción repetir el análisis de la locomoción de los tres genotipos al menos durante dos días.

Conclusiones y perspectivas

Debido a que se observa una expresión residual del ARNm de PPII en hipotálamo y que la distribución del reportero β -galactosidasa coincide con los antecedentes que describen la distribución de la PPII en el cerebro, se nos obliga a considerar que en el mutante utilizado la inserción del casete reportero sucede en el lugar correcto, es decir, el “targeting” es correcto, pero el hecho de que la ganancia de función sea suficiente como para noquear la capacidad de la enzima de escindir a su sustrato, falla, tal y como se observa así en la disminución de los niveles de expresión en cerebro y en la actividad enzimática en tejidos como cerebro e hígado. Esta situación podría deberse principalmente a dos conclusiones, o nos hallamos ante el problema de los flancos en los que la cepa C57 mutada posee regiones de homología de la cepa 129/Sv en los que se generó la mutación y que podrían permitir que la función se restaure o hay un mecanismo adicional que compense la disminución en la degradación de la TRH. Lo que actualmente se está planteando como una opción es un cambio de fondo genético. Además se debe considerar el uso del sistema CRISPR/Cas.

Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, esta tesis y otros datos del laboratorio sugieren que la disminución drástica de la actividad de la PPII tiene consecuencia sobre el peso corporal del ratón macho, que se pudiera explicar por

una disminución del consumo de alimentos, y posiblemente por un hipertiroidismo, pero que no se debe a una alteración de la actividad física.

Bibliografía

- Arce, Victor; Catalina, Pablo y Mallo, Federico. (2006) Endocrinología. Ed. Universidad de Santiago de Compostela. Pág. 73-74, 102.
- Allen Institute for Brain Science. (2015) Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet]. Disponible en: <http://developingmouse.brain-map.org>.
- Cage, G. J., Kipke, D. R., Shain, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents.(2012) *J. Vis. Exp.* (65), e3564
- Carreón-Rodríguez et al. (2009) T3 differentially regulates TRH expression in developing hypothalamic neurons in vitro. *Brain Res.* 11;1305:20-30
- Chomczynski y Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.
- Corsi, María (2004). Aproximaciones de las neurociencias a la conducta. 2a edición. Manual moderno. Pág. 264.
- De Gortari, Patricia y Joseph-Bravo, Patricia. (2006) Neuroendocrine regulation of energy homeostasis. *Molecular endocrinology*, 2006: 65-85
- Derelanko, Michael J. y Hollinger, Manfred A. (2002) *Handbook of Toxicology*. CRC Press. Segunda edición.
- Fekete, C. y Lechan, R. M. (2006) The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res.*153: 209-235
- Fekete, C. y Lechan, R. M. (2007) Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons; role of neuronal afferents and type 2 deiodinase *Front Neuroendocrinol.* 28(2-3): 97–114.
- Fekete, C. y Lechan, R.M. (2014) Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev.* 35(2):159-94.

- Heuer et al. (2000) Expression of the Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor 2 (TRH-R2) in the Central Nervous System of Rats. *The Journal of comparative neurology* 428,319-336
- Haeussler, M. y Concordet, J. P. (2016) Genome Editing with CRISPR-Cas9: Can It Get Any Better? *Journal of Genetics and Genomics*. 43(5), 239–250
- Hutchins y Rogers (1973) Some observations on Circadian Rhythm of Locomotor Activity of Mice after Depletion of Cerebral Monoamines. *Psychopharmacologia (Berl.)* 31, 343-348
- Lexicon Pharmaceuticals Inc. (2010) Gene Summary. <http://mmrrc.mousebiology.org/phenotype/Genentech/PRT357N1-treeFrame.html> [Consultado: Enero 2014]
- Melmed, Shlomo. (2011) *The pituitary*. 3ª edición. Elsevier Inc.
- Mercer, E. (1995) Bacterial beta-Galactosidase Histochemistry Bible. http://wmc.rodentia.com/docs/lacZ_bible.html [Consultado: Agosto 2014]
- Ogasawara, T. et al. NS-3(CG3703), a TRH analog, ameliorates scopolamine-induced memory disruption in rats.
- Nillni, E.A., Sevarino, K.A. (1999) The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone- derived peptides. *Endocr Rev* 1999 Oct;20 (5): 599-648
- Nillni, E. A.(2010) Regulation of the Hypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Neuron by Neuronal and Peripheral Inputs *Front Neuroendocrinol*. 2010 April; 31(2): 134–156.
- Redolar Ripoll, Diego (2008) *Cerebro y adicción*. Primera edición. Ed. UOC. Pág. 126-131
- Papadopoulus et al. (2000) Analysis of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur. J. Biochem*. 267, 2617±2623
- Sánchez E. et al. (2009) Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. 2009 May;150(5):2283-91

- Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual: 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (in 3 volumes)
- Shen et al (2013) Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Research*. 23:720–723
- Stavreus Evers, A. (2012). Paracrine Interactions of Thyroid Hormones and Thyroid Stimulation Hormone in the Female Reproductive Tract have an Impact on Female Fertility. *Frontiers in Endocrinology*, 3, 50. doi:10.3389/fendo.2012.00050
- Tang T. et al A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nature Biotechnology* 2010 Jul;28(7):749-55.
- Turksen, Kursad. (2002) Embryonic Stem Cells. *Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Volumen 185. Ed. Humana Press. Pág. 313
- Yen, Paul M. (2001) Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiological Reviews*: 1 July 2001Vol. 81no. 1097-1142

Anexos

Reporte de ANOVA

ANOVA (20h/hembras)

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Movimiento fino	Entre grupos	9593940	2	4796970	0.732	0.5
	Dentro de grupos	85195123	13	6553471		
	Total	94789063	15			
Movimiento ambulatorio	Entre grupos	657921.4	2	328960.7	0.043	0.958
	Dentro de grupos	99865291	13	7681945		
	Total	1.01E+08	15			
Movimiento total	Entre grupos	6109025	2	3054512	0.158	0.855

	Dentro de grupos	2.51E+08	13	19326870		
	Total	2.57E+08	15			

ANOVA (20h/machos)

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Movimiento	Entre grupos	11697572	2	5848786	2.325	0.122
Fino	Dentro de grupos	52828574	21	2515646		
	Total	64526146	23			
Movimiento	Entre grupos	16647942	2	8323971	1.539	0.238
Ambulatorio	Dentro de grupos	1.14E+08	21	5409691		
	Total	1.3E+08	23			
Movimiento	Entre grupos	56045057	2	28022529	1.954	0.167
Total	Dentro de grupos	3.01E+08	21	14342483		
	Total	3.57E+08	23			

ANOVA (hembras día uno)

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Movimiento	Entre grupos	3798527	1	3798527	7.986	0.02
fino	Dentro de grupos	4280651	9	475627.9		
	Total	8079178	10			
Movimiento	Entre grupos	1.4E+08	1	1.4E+08	26.794	0.001
ambulatorio	Dentro de grupos	47172645	9	5241405		
	Total	1.88E+08	10			
Movimiento	Entre grupos	1.9E+08	1	1.9E+08	38.359	0
total						

Dentro grupos	de	44597807	9	4955312		
Total		2.35E+08	10			

ANOVA (hembras día dos)

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Movimiento fino	Entre grupos	5484884	1	5484884	8.986	0.017
	Dentro grupos	4883162	8	610395.3		
	Total	10368046	9			
Movimiento ambulatorio	Entre grupos	43488932	1	43488932	65.954	0
	Dentro grupos	5275036	8	659379.5		
	Total	48763968	9			
Movimiento total	Entre grupos	79862760	1	79862760	181.491	0
	Dentro grupos	3520300	8	440037.5		
	Total	83383060	9			