



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de estradiol y prolame sobre la expresión de  
los receptores a estrógeno en un modelo animal de  
menopausia y depresión**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**PAULA ARELLANO PÉREZ**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. OLIVIA TANIA  
HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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

### 1. Antecedentes

- 1.1 Concepto de depresión y prevalencia en mujeres
- 1.2 Neurobiología de la depresión
- 1.3 Modelos animales de depresión y menopausia
  - 1.3.1 Prueba de nado forzado
  - 1.3.2 Modelo animal de menopausia
- 1.4 Estrógenos y su uso en terapia de reemplazo hormonal
- 1.5 Estrógenos
- 1.6 Biosíntesis del estrógeno
- 1.7 Compuestos derivados de estrógeno
- 1.8 Regulación endócrina del estrógeno
- 1.9 Receptores a estrógeno
  - 1.11 Regulación de los RE por E<sub>2</sub> en el sistema nervioso
  - 1.12 Efecto antidepressivo de E<sub>2</sub> y prolame

### 2. Planteamiento del problema

### 3. Justificación

### 4. Hipótesis

### 5. Objetivos

### 6. Materiales y Método

- 6.1 Animales
- 6.2 Grupos experimentales
- 6.3 Obtención de muestras
- 6.4 Extracción de proteínas totales
- 6.5 Cuantificación de proteínas
- 6.6 Inmunodetección de proteínas (Western Blot)
- 6.7 Análisis densitométrico
- 6.8 Análisis estadístico

### 7. Resultados

- 7.1 Cambios en la expresión del RE $\alpha$  en el hipocampo.
- 7.2 Cambios en la expresión del RE $\beta$  en el hipocampo.
- 7.3 Cambios en la expresión del RE $\alpha$  en la corteza prefrontal.
- 7.5 Cambios en la expresión del RE $\beta$  en la corteza prefrontal
- 7.5 Comparación en las tasas de expresión de los receptores respecto a la región disectada.

### 8. Discusión

- 8.1 Influencia del tratamiento en la expresión de los RE
- 8.2 Influencia del TPOVX en la expresión de los RE
- 8.3 Diferencias en la regulación de los RE, respecto a la región cerebral analizada.

### 9. Conclusiones

### 10. Perspectivas

### 11. Anexos

### 12. Referencias

# Listado de tablas y figuras

## Figuras

- Figura 1.** Estructura química de los estrógenos producidos por el cuerpo de la mujer.
- Figura 2.** Variaciones en los niveles hormonales en las fases lútea y folicular del ciclo menstrual.
- Figura 3.** Anatomía del folículo ovárico y la asociación de células teca y granulosa en la síntesis de estrógenos.
- Figura 4.** Biosíntesis y metabolismo de los estrógenos.
- Figura 5.** Estructura química de  $E_2$  y el  $17\beta$ -aminoestrogeno prolame.
- Figura 6.** Secreción de estrógenos, progesterona, relaxina e inhibina en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal del ciclo reproductor femenino.
- Figura 7.** Sistema de retroalimentación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.
- Figura 8.** Organización estructural de los RE  $\alpha$  y  $\beta$ .
- Figura 9.** Vías de señalización clásica y no clásica mediada por  $E_2$ .
- Figura 10.** Efecto tipo antidepressivo de  $E_2$  y prolame en ratas sometidas al FST.
- Figura 11.** Esquema representativo de la electroforesis.
- Figura 12.** Esquema del montaje del gel de poliacrilamida y la membrana de PVDF dentro de la cámara de transferencia.
- Figura 13.** Contenido de la proteína del RE $\alpha$  en hipocampo.
- Figura 14.** Efecto de  $E_2$  y prolame sobre la expresión del RE $\alpha$  en el hipocampo.
- Figura 15.** Contenido de la proteína del RE $\beta$  en hipocampo.
- Figura 16.** Efecto de  $E_2$  y prolame sobre la expresión del RE $\beta$  en el hipocampo.
- Figura 17.** Contenido de la proteína del RE $\alpha$  en corteza prefrontal.
- Figura 18.** Efecto de  $E_2$  y prolame sobre la expresión del RE $\alpha$  en corteza prefrontal.
- Figura 19.** Contenido de la proteína del RE $\beta$  en corteza prefrontal.
- Figura 20.** Efecto de  $E_2$  y prolame sobre la expresión del RE $\beta$  en corteza prefrontal.

## Tablas

- Tabla 1.** Principales ventajas y desventajas del uso de compuestos estrogénicos en terapias de restitución hormonal.
- Tabla 2.** Tasa de expresión expresado en porcentaje de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  en el hipocampo y corteza prefrontal.

## Lista de abreviaturas

<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>Dex</b>	Dexametasona
<b>DMI</b>	Desipramina
<b>E<sub>2</sub></b>	17 $\beta$ -estradiol o Estradiol
<b>EE<sub>2</sub></b>	Etinil estradiol
<b>FLX</b>	Fluoxetina
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>FST</b>	Prueba de nado forzado
<b>GnRH</b>	Hormona reguladora de gonadotropinas
<b>HHA</b>	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>OVX</b>	Ovariectomía
<b>POVX</b>	Post-ovariectomía
<b>RE<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrógenos $\alpha$
<b>RE<math>\beta</math></b>	Receptor de estrógenos $\beta$
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TPOVX</b>	Tiempo post-ovariectomía
<b>TRE</b>	Terapia de reemplazo estrogénico

## Resumen

Una alternativa para el tratamiento de depresión asociada a la menopausia es la terapia de reemplazo estrogénico (TRE), cuya efectividad está sujeta a factores como el periodo de inicio de la terapia. Los efectos del estradiol ( $E_2$ ), dependen de los receptores a estrógenos (RE), relacionándose con la regulación de la expresión de los receptores por el ligando. Se ha reportado que, el tratamiento con  $E_2$  incrementó el ARNm del RE $\alpha$  en células del hipotálamo de ratas con 3 semanas de tiempo post-ovariectomía (TPOVX), y que a su vez el  $E_2$  presenta un efecto antidepresivo en modelos animales, lo que sugiere que la regulación positiva de este receptor por el ligando podría estar implicada en algunos efectos sobre la conducta. Por otro lado, prolame, es un estrógeno sintético que posee actividad estrogénica, afinidad por los RE  $\alpha$  y  $\beta$ .  $E_2$  como prolame presentan un efecto antidepresivo similar en modelos animales, con diferencia de que Prolame presenta propiedades anticoagulantes que contrarresta las propiedades pro-cuagulantes de  $E_2$ , lo que podría representar una ventaja en su uso terapéutico. Hasta ahora, se desconoce la regulación de los RE por  $E_2$  y prolame en ratas con diferentes TPOVX, en regiones cerebrales asociadas a la depresión. Con estas bases, el objetivo de este proyecto es determinar el efecto de  $E_2$  y prolame en la regulación de la expresión de los RE $\alpha$  y  $\beta$  en un modelo animal de menopausia y depresión. La expresión de los RE se midió utilizando el hipocampo y corteza prefrontal de ratas Wistar ovariectomizadas (OVX) a 3, 8, 16 y 24 semanas, tratadas con vehículo,  $E_2$  y Prolame (n=6 por grupo), y evaluadas en la prueba de nado forzado (FST). El análisis de las proteínas se hizo mediante la técnica de Western Blot y los datos densitométricos (normalizados contra los resultados de  $\alpha$ -Tubulina) se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías y una vía. Los resultados en hipocampo respecto a los tratamientos mostraron que  $E_2$  incrementó significativamente (105%) el contenido de RE $\alpha$  en ratas con 8 semanas TPOVX vs el vehículo ( $p<0.05$ ); así como en el RE $\beta$  se mostró un incremento significativo (50.7%) a las 16 semanas TPOVX vs el vehículo ( $p<0.05$ ). Se mostraron diferencias entre los TPOVX en el RE $\alpha$  en 3 vs 8 y 16 semanas ( $p<0.05$ ), en el RE $\beta$  ( $p<0.05$ ) en 3 semanas vs 8 y 24 semanas, así como entre 8 y 16 semanas. Mientras que en corteza prefrontal las diferencias entre los TPOVX solo se presentaron en el RE $\beta$  entre 8 vs 3, 16 y 24 semanas ( $p<0.05$ ). Prolame y  $E_2$  muestran un efecto diferencial sobre la regulación de la expresión de los RE y sobre las regiones cerebrales estudiadas que no explica su efecto antidepresivo. Esto sugiere que los estrógenos presentan mecanismos de acción diferentes. En conclusión, se observa un incremento por  $E_2$  en hipocampo de la expresión de RE $\alpha$  a las 8 semanas y de RE $\beta$  a las 16 semanas TPOVX vs el grupo tratado con vehículo. Prolame no incrementó la expresión de los RE en hipocampo y corteza prefrontal.

## 1. Antecedentes

## **1. 1 Concepto de depresión y prevalencia en mujeres**

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más frecuentes, ya reconocida desde la antigüedad por los egipcios como una entidad patológica definida. En el siglo XIX, el empleo común del término “depresión” se inició principalmente con los intentos del psiquiatra Emil Kraepelin de crear una palabra que tuviera mayor especificidad diagnóstica que “melancolía” (Goldman, 1996). En la actualidad, se emplea el término trastorno depresivo mayor como una entidad diagnóstica que hace referencia a un trastorno caracterizado por la presencia de un ánimo triste, vacío o irritable, acompañado de cambios somáticos y cognitivos que afectan significativamente la capacidad funcional del individuo. Los pacientes con depresión sufren pérdida de interés en todo e incapacidad para experimentar placer, con sentimientos de infravaloración y culpa, déficits cognitivos, junto con pérdida del apetito, del sueño y del deseo sexual (Sequeira y Fornaguera, 2009). Los síntomas deben tener una duración de, al menos, dos semanas, para hacer el diagnóstico (DSM-V, 2014); sin embargo, el trastorno puede durar varias semanas, meses, o incluso años (Sequeira y Fornaguera, 2009).

Son muchos los autores que han diferido con respecto al origen o factor etiológico externo así como la predisposición genética existente en los pacientes con dicho padecimiento (Goldman, 1996), no obstante, la definición y características de los llamados trastornos depresivos se encuentra claramente conceptualizada por el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales 5° Ed. (DSM-V, 2014), como una trastorno de desregulación del estado de ánimo, el cual puede ser clasificado en los siguientes subtipos:

1. Trastorno de depresión mayor, caracterizado por episodios determinados de al menos dos semanas de duración (aunque la mayoría de los episodios duran bastante más) que implican cambios claros en el afecto, la cognición y las funciones neurovegetativas, y remisiones interepisódicas.
2. Trastorno depresivo persistente (distimia).
3. Trastorno disfórico premenstrual.
4. Trastorno depresivo inducido por una sustancia/medicamento.
5. Trastorno depresivo debido a otra afección médica.

El rasgo característico de todos estos trastornos es la presencia de un ánimo triste, vacío o irritable, acompañado de cambios somáticos y cognitivos que afectan significativamente a la capacidad funcional del individuo. La diferencia entre estos trastornos es la duración, la presentación temporal o la etiología.

La depresión es un trastorno del estado de ánimo frecuente, el cual se calcula que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo y siendo la principal causa mundial de discapacidad que contribuye de forma importante a la carga mundial general de morbilidad (Organización Mundial de la Salud, 2018).

En México, se estima que los trastornos neuropsiquiátricos ocupan el quinto lugar como carga de enfermedad, considerándose como indicadores de muerte prematura y días vividos con discapacidad. La depresión es un trastorno mental frecuente, el cual se calcula que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo y siendo la principal causa mundial de discapacidad que contribuye de forma importante a la carga mundial general de morbilidad (Organización Mundial de la Salud, 2018). En el país, el porcentaje de mujeres que refieren una sintomatología depresiva es de 5.8% y de 2.5% en hombres. Tal porcentaje se incrementa junto con la edad a 4% en las menores de 40 años y alcanzó una cifra de 9.5% entre las mayores de 60 años, en mujeres; y de 1.6% en los menores de 40 años y de 5% en los adultos mayores en hombres (Belló, *et al.*; 2005). Es decir, en cuanto a la frecuencia de depresión, los datos epidemiológicos nacionales muestran una relación de 2:1 entre mujeres y hombres, similar a la reportada en las estadísticas mundiales (Belló, *et al.*; 2005).

Una posible causa para la presencia de síntomas depresivos en mujeres es la disminución de E<sub>2</sub>. Conforme las mujeres avanzan en edad los ovarios son los primeros que envejecer, por ello dejan de responder a las gonadotropinas, y su función desciende de manera paulatina hasta que desaparecen los ciclos menstruales, es decir hasta que ocurre el cese de la función ovárica. La última menstruación es conocida como menopausia y se establece clínicamente de forma retrospectiva después de un periodo de 12 meses sin sangrado menstrual. el E<sub>2</sub> deja de secretarse en cantidades normales, disminuyendo, y como consecuencia se atrofia de forma gradual el útero y la vagina. Conforme disminuye la retroalimentación negativa de los estrógenos y la progesterona, la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) y su



concentración plasmática se eleva de manera considerable, mientras la concentración de hormona luteinizante (LH) permanece moderadamente alta (Barret, *et al.*; 2010).

En la mujer, la menopausia es precedida por una etapa llamada perimenopausia, la cual puede durar hasta 10 años. Durante la perimenopausia, la menstruación es irregular y la concentración de inhibina desciende, casi siempre entre los 45 y 55 años. Esta pérdida de la función ovárica origina síntomas, como sensación de calor que se propaga del tronco a la cara (bochornos) y diaforesis nocturna. Además, el comienzo de la menopausia aumenta el riesgo de padecer algunas enfermedades, como osteoporosis, cardiopatía isquémica y nefropatía (Barret, *et al.*; 2010).

La reducción de las hormonas sexuales, como el E<sub>2</sub>, produce signos y síntomas relacionados con cambios en tejidos estrógeno-dependientes y efectos adversos a nivel metabólico y cardiovascular. Los cambios en las hormonas sexuales en la mujer modifican el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (Morato & Malacara, 2006), por ejemplo, se sabe que los niveles de E<sub>2</sub> incrementan la concentración de cortisol en respuesta a un reto. Es posible que los cambios asociados a la menopausia también estén implicados en las alteraciones del estado de ánimo, y en el incremento en el riesgo de padecer depresión (Flores Ramos y Martínez-Mota, 2012).

## **1. 2 Neurobiología de la depresión**

Se han considerado dos formas básicas de depresión, exógena y endógena. La primera de ellas obedece a una causa externa y bien definida, como lo es la pérdida de un familiar o ser amado, crisis económica y enfermedad invalidante. En cambio, la depresión endógena no tiene causa externa manifiesta siendo considerada como una alteración biológica como ocurre con la psicosis bipolar (Guadarrama, *et al.*,2006).

En la vida diaria las personas se encuentran expuestas a diversos estímulos o factores que pueden generar depresión, éstos pueden ser genéticos, químicos (alteraciones en los neurotransmisores) o psicosociales (experiencias adversas, dificultades cotidianas o eventos indeseables en la vida). Tales estímulos pueden constituirse como estresores para el individuo afectado; por lo que el estrés se ha reconocido como un factor importante para el estado

depresivo, que conlleva a cambios biológicos (fisiológicos y hormonales) asociados al eje HHA (Guadarrama, *et al.*, 2006; Sequeira & Fornaguera, 2009).

Estudios de neuroimagen se han realizado en regiones cerebrales distintas de forma que ofrecen información para el desarrollo de un modelo neuroanatómico hipotético de regulación del ánimo y de la fisiopatología de estos trastornos. El hallazgo en neuroimagen funcional más consistente ha descrito la disfunción de la corteza prefrontal, lo que sugiere una disminución en el flujo sanguíneo y en el metabolismo de la glucosa de esta área. También se sugieren anomalías en los ganglios basales, el lóbulo temporal y estructuras límbicas relacionadas, como el hipocampo donde se ha reportado la pérdida de volumen en sujetos con depresión (Guadarrama, *et al.*; 2006; Pandya, *et al.*; 2012).

Se ha propuesto un modelo neuroanatómico de depresión que comprende la corteza prefrontal, el complejo amígdala-hipocampo, el tálamo, los ganglios basales y las abundantes conexiones entre esas estructuras. Se piensa que los dos principales circuitos neuroanatómicos involucrados en la regulación del ánimo son: el circuito límbico-talámico-cortical, que incluye la amígdala, los núcleos dorsomediales del tálamo, y la corteza prefrontal, tanto la medial como la ventrolateral; así como el circuito límbico-estriado-pálido-talámico-cortical. De acuerdo con este modelo, las alteraciones del estado de ánimo podrían ser el resultado de disfunción o anomalías en diferentes partes de esos circuitos que podrían ser el inicio de este tipo de trastornos, o conferir cierta vulnerabilidad biológica, que, en combinación con factores ambientales, tenga como consecuencia alguno de estos desórdenes (Guadarrama, *et al.*; 2006).

El eje HHA regula la respuesta al estrés y su actividad se ve disparada por la estimulación inflamatoria física o psicosocial. La activación del eje por estrés regula funciones tales como el metabolismo y la inmunidad y, al mismo tiempo, modifica el funcionamiento cerebral regulando la supervivencia neuronal, la neurogénesis, el tamaño de estructuras complejas como el hipocampo, la adquisición de recuerdos y la evaluación emocional de eventos. Según lo anterior, la participación clave que tiene el eje HHA en la respuesta al estrés y otros

procesos relacionados, sugiere que su disfunción podría contribuir significativamente en el desarrollo de trastornos psiquiátricos como la depresión (Sequeira & Fornaguera, 2009).

### **1.3 Modelos animales de depresión y menopausia**

Con el objetivo de estudiar y comprender las bases neurobiológicas de la depresión, se han desarrollado numerosos modelos animales. Aunque el concepto de la depresión implica que es una enfermedad definida por y para los humanos. Sin embargo, en los animales de experimentación se puede modelar o simular algún síntoma de depresión con base en diversos paradigmas de estrés crónico, esto permite la investigación de fármacos con potencial efecto antidepressivo, por ejemplo, nuevas moléculas que afectan a los sistemas de neurotransmisores que participan en la depresión, hormonas de tipo esteroideo, o incluso terapias antidepressivas no farmacológicas como la estimulación magnética transcraneal (Sequeira y Fornaguera, 2009). También gracias a estos modelos se ha constatado la participación de ciertas sustancias clave en el desarrollo de los trastornos depresivos, como es el caso de la serotonina y la dopamina, que tienen un papel en la fisiopatología de la depresión (Guadarrama, et al., 2006).

Los modelos de estrés crónico o agudo generan conductas depresivas tales como la anhedonia o la desesperanza aprendida. Paralelo a esto, tales conductas depresivas en animales podrían generar otras alteraciones en el comportamiento, como la disminución de la motivación, cambios en el ciclo circadiano, alteraciones en el sueño, aumento de la agresividad y ansiedad, disminución de la capacidad sexual e interacción social y un incremento del comportamiento sumiso (Dagnino, 2012).

Existen una serie de modelos que han permitido obtener información sobre los mecanismos de acción de diferentes sustancias utilizadas como antidepressivos, en los cuales se evalúa a su vez las respuestas a situaciones que permiten la simulación de la depresión en animales o que son interpretadas como conductas depresivas. Los modelos animales que se tratarán para fines del presente estudio son:

#### **1.3.1 Prueba de nado forzado**

La Prueba de Nado Forzado (FST, por sus siglas en inglés: *Forced swimming test*). En donde el animal es introducido en un recipiente con agua, el cual lucha por escapar hasta que alcanza un estado de inmovilidad que es considerado como una conducta de desesperanza, similar a la que se presenta durante la depresión. Es uno de los modelos más utilizados debido a que predice muy bien la eficacia de las sustancias antidepresivas que se han empleado hasta hoy en el tratamiento de seres humanos. Estas sustancias disminuyen el tiempo de inmovilidad de los animales que las reciben comparadas con animales control, interpretándose tal cambio como un efecto tipo antidepresivo de los fármacos administrados (Sequeira y Fornaguera, 2009).

En relación con la FST, diversos estudios han mostrado que es sensible a los efectos de hormonas esteroideas, tales como diferentes estrógenos naturales y sintéticos, progestinas, y andrógenos. Estrógenos como el E<sub>2</sub>, el etinil estradiol (EE<sub>2</sub>), y progestinas como la progesterona y la alopregnanolona, producen efecto antidepresivo en hembras OVX (Estrada-Camarena et al., 2003; Lemini et al., 2013). También se sabe que los cambios en los niveles de hormonas sexuales a lo largo del ciclo cambian la conducta de desesperanza: por ejemplo, durante las fases de predominio hormonal las ratas hembra tienen menor conducta tipo depresión (inmovilidad) que en las fases del ciclo estral con menor concentración de hormonas sexuales (Contreras et al., 2000).

### **1.3.2 Modelo animal de menopausia**

Distintos estudios en animales demuestran que la senescencia reproductiva se inicia por un periodo conocido como estropausia, que se caracteriza por ciclos irregulares y un estro constante previo a una etapa de diestro persistente; por lo que esta etapa de estropausia no es necesariamente un análogo de la menopausia en mujeres. Es por esto por lo que la OVX se ha utilizado como una estrategia para inducir una condición endocrina que se asemeja a la menopausia en mujeres, ya que produce una disminución de estrógenos y progesterona junto con un aumento de FSH y LH. (Estrada-Camarena, *et al.*, 2011).

Estudios en modelos animales han demostrado que durante las primeras semanas después de la OVX, aumentan la ansiedad en condiciones experimentales (Estrada-Camarena, *et al.*, 2011; Walf et al., 2009), así como alteraciones en la temperatura corporal, el patrón de sueño

y aumentos en la temperatura de la piel de la cola. Así mismo hay descripciones de comportamientos depresivos en roedores, como consecuencia de la ausencia de estrógenos, también se ha informado, que en la FST y la prueba de suspensión de cola hay un aumento en la conducta de inmovilidad, lo cual se ha traducido como un índice de conducta depresiva, en ratas y ratones con 2 semanas de TPOVX. Sin embargo, otro estudio mostró que la conducta de inmovilidad de las ratas probadas en la FST con 15 meses y 3 semanas post-ovariectomía (POVX) no difirió de los animales sham, (misma manipulación, pero sin llevar a cabo la OVX) (Estrada-Camarena, *et al.*, 2011).

#### **1.4 Estrógenos y su uso en la terapia de reemplazo hormonal**

Los estrógenos, se han empleado en terapias sustitutivas para los estados de deficiencias como la menopausia y postmenopausia y para la anticoncepción combinados con progestágenos (ejemplo de estas combinaciones son los anticonceptivos orales en los que se utilizan clormadinona o gestodeno con EE<sub>2</sub>). También en la prevención de la osteoporosis postmenopáusica y senil, en el tratamiento de otras afecciones climatéricas del aparato genito-urinario y sistémicas, y en la inducción de la pubertad en hipogonadismo femenino, ya sea utilizando estrógenos conjugados o estrógenos combinados con otras sustancias como progestanos, los cuales se utilizan durante un periodo de tiempo corto en el cual no se llegan a presentar efectos adversos (Barret, *et al.* 2010). Recientemente, ha incrementado el uso de la TRE en la cual se hace uso de estrógenos conjugados debido a su capacidad de reducir las complicaciones de sangrado (Águila et al.; 2000). La TRE reduce el riesgo de fracturas osteoporóticas durante la menopausia, pero incrementan el riesgo de tromboembolia, enfermedades cardiovasculares, colecistopatías e incontinencia urinaria. A su vez, esta TRE incrementa el riesgo de cáncer de mama. Actualmente está recomendado el uso de la TRE de corto plazo para síntomas vasomotores, atrofia genital y prevención de la osteoporosis, pero es necesario entender el riesgo de cáncer y la tasa de mortalidad implicadas con la administración de la TRE; aunque existe el riesgo este es modesto y los beneficios son mayores para mejorar la calidad de vida, con menor riesgo de enfermedades cardiacas, cáncer colorrectal, demencia y fracturas osteoporóticas (Vargas-Hernández, 2013).

A mediados de 1970, las mujeres postmenopáusicas que usaron estrógenos tenían mayor riesgo de cáncer de endometrio; la adición de progesterona proporcionó protección y se

convirtió en el tratamiento no sólo de síntomas menopáusicos, sino de protección a largo plazo contra osteoporosis y fracturas relacionadas a la pérdida de hormonas sexuales, enfermedades cardiovasculares, incluso enfermedad de Alzheimer (Vargas-Hernández, 2013). En 2002, la Iniciativa de Salud de la Mujer (Women's Health Initiative), informó que el uso de estrógenos aumentaba el riesgo de enfermedad cerebrovascular, enfermedades cardiovasculares y cáncer de mama. El uso de hormonas bioidénticas o naturales son una alternativa empleada para aquellas mujeres que no toleran la TRE estándar (Vargas-Hernández, 2013).

Los derivados del E<sub>2</sub> se obtienen desde la década de los 60, el uso de fármacos de restitución hormonal ha creado diversos inconvenientes debido a la presencia de efectos adversos presentados en los pacientes que han ingerido este tipo de fármacos tal como se muestra en la Tabla 1; estas reacciones son, por ejemplo, el sangrado intermitente acompañado de dolor abdominal, el cual constituye una cuestión fundamental que afecta al cumplimiento del tratamiento en las mujeres norteamericanas con útero intacto (Águila et al.; 2000).

Estudios en modelos animales han demostrado que la TRE podría estar asociada con efectos antiinflamatorios y vasoprotectores. A su vez, diversos estudios clínicos han demostrado efectos benéficos sobre los parámetros vasculares y metabólicos, pero también sugieren consecuencias desfavorables como la aparición de enfermedades cardiovasculares en pacientes que reciben TRE (Vargas-Hernández, 2013).

Tabla 1. Principales ventajas y desventajas del uso de compuestos estrogénicos en terapias de restitución hormonal (Adaptada de Águila et al.; 2000, American Cancer Society, 2015; Calderón, 2009).

--

Efectos benéficos	Efectos adversos
Es 50% más efectivo en comparación con otros fármacos como progestágenos.	Alta probabilidad de accidentes cardiovasculares en caso de uso prolongado
Disminución de síntomas menopáusicos (sudores, bochornos, disminución de ansiedad, nerviosismo).	Alta probabilidad de desarrollo de cáncer en tejidos reproductivos (de mama, endometrio y útero).
Mayor supervivencia y mejoramiento de la calidad de vida (efecto mínimo o nulo en el riesgo de muerte, enfermedad coronaria, cáncer colorrectal, fracturas de cadera u otras complicaciones de salud graves).	Presentación de efectos adversos en ciertos casos (proporción mínima de mujeres sujetas a TRE): sangrado intermitente, el edema, los cólicos en la parte baja del abdomen y la sensibilidad en las mamas.
Previene atrofia urogenital.	Alta probabilidad de presentar enfermedades cardiovasculares, colecistopatías e incontinencia urinaria.

## 1.5 Estrógenos

El E<sub>2</sub> es una hormona sexual esteroidea femenina principalmente producida por los ovarios y forma parte del grupo de los estrógenos y en menor cantidad en glándulas adrenales y cerebro. El E<sub>2</sub> forma parte del grupo de los estrógenos naturales producidos por el cuerpo de la mujer, junto con la estrona y el estriol. El E<sub>2</sub> es el tipo más abundante de estrógeno para las mujeres en edad reproductiva, el estriol se encuentra comúnmente en mujeres embarazadas y la estrona en mujeres de mediana edad o adultas mayores (figura 1). El E<sub>2</sub> es el estrógeno más potente para producir efectos en los diferentes órganos y tejidos. Esta hormona sexual esteroidea en la mujer es producida principalmente por los ovarios y en menor cantidad en las glándulas adrenales y el cerebro. Los estrógenos cumplen múltiples funciones reguladoras dentro del organismo, como el desarrollo de características sexuales secundarias femeninas, la maduración de la función fisiológica de los órganos reproductores femeninos, así como del desarrollo de caracteres sexuales secundarios femeninos. Otras de los efectos de los estrógenos son: mantener el colesterol en niveles óptimos, proteger la salud ósea, el corazón, la piel y otros tejidos, así como la modulación del estado de ánimo (Bjornstrom & Sjöberg, 2005).

Para las mujeres, el periodo conocido como perimenopausia comienza entre los últimos 2 y 3 años de la etapa reproductiva; donde en esta etapa de perimenopausia el estrógeno dejará de secretarse en cantidades normales pasando por una fase que se caracteriza por diferencias drásticas en la concentración de E<sub>2</sub>. Debido a estos cambios asociados al envejecimiento ovárico, la adenohipófisis promoverá la producción de hormonas como la FSH, cuyos valores serán mayores a 10 unidades, o LH. Las diferencias en la concentración de estrógenos y la producción creciente de FSH y LH pueden crear síntomas en algunas mujeres, tales como sofocos y sudores por la noche, así como diversas afecciones como son osteoporosis, artritis, alteraciones en el estado de ánimo y calambres (Espinoza, et al., 2013). En conjunto, estos signos y síntomas forman parte de un síndrome menopáusico conocido como menopausia o climaterio.

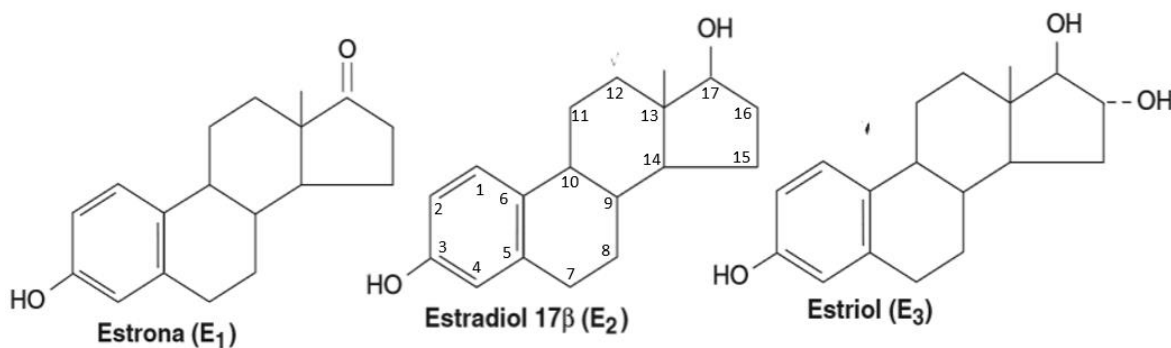


Figura 1. Estructura química de los estrógenos producidos por el cuerpo de la mujer (tomado de Barret, *et al.*, 2010).

Los estrógenos son esteroides con 18 carbonos que carecen de un grupo metil angular adherido en la posición 10 o una configuración  $\Delta^4$ -3-ceto en el anillo A. Son secretados principalmente por las células de la granulosa de los folículos ováricos, el cuerpo lúteo y la placenta.

Tanto el E<sub>2</sub> como la progesterona, fluctúan durante el ciclo menstrual como se ilustra en la figura 2. La mayor parte de los estrógenos proviene del ovario, donde la secreción de E<sub>2</sub> en mujeres alcanza dos picos de valores máximos: uno justo antes de la ovulación y otro a la mitad de la fase lútea. La cantidad secretada de E<sub>2</sub> oscila entre 30-400 pg/ml; es de 36  $\mu$ g/día al principio de la fase folicular; 380  $\mu$ g/día antes de la ovulación, y 250  $\mu$ g/día hacia la mitad de la fase lútea. Después de la menopausia, la secreción de E<sub>2</sub> desciende por debajo de los 30 pg/ml (Barret, *et al.* 2010).



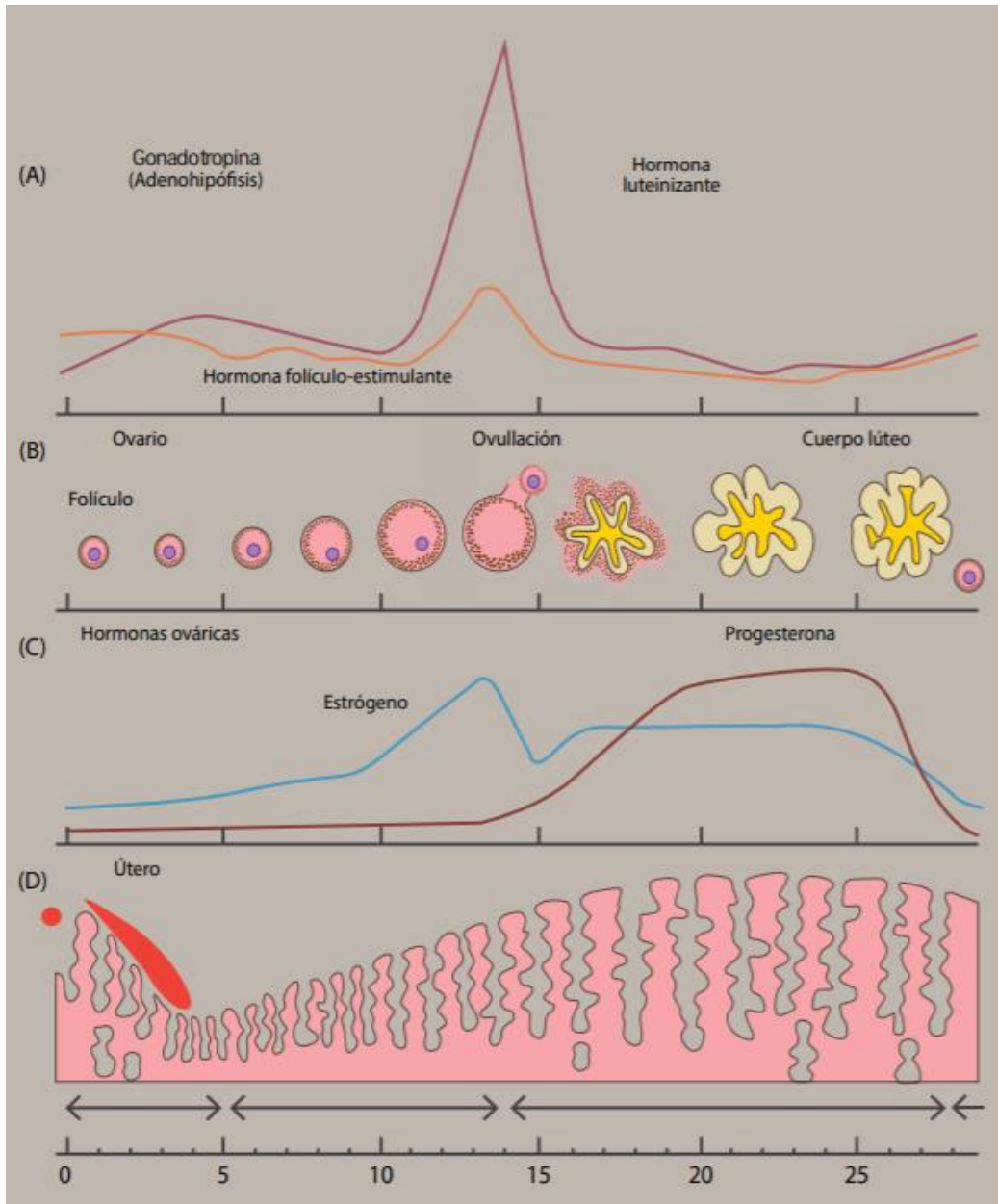


Figura 2. Variaciones en los niveles hormonales en las fases lútea y folicular del ciclo menstrual. A) Niveles hormonales de FSH y LH, producidas por la hipófisis donde se muestra un pico de LH en el día 14 durante la ovulación. B) Crecimiento folicular y su involución al cuerpo lúteo. C) Predominancia de estrógenos durante la fase folicular y de progesterona en la fase lútea. D) Proliferación de las glándulas endometriales (tomado de Barret, *et al.*; 2010).

En cuanto a sus efectos directos sobre el sistema nervioso central (SNC), los estrógenos están implicados en la proliferación celular, remodelación neuronal y plasticidad cerebral (Barret, *et al.* 2010; Koeppen y Stanton, 2009).

## 1.6 Biosíntesis de los estrógenos

La síntesis de estrógenos se lleva a cabo en la placenta y en el ovario, en el ovario principalmente se lleva a cabo esta síntesis en las células de la granulosa ovárica y las células de la teca interna (Figura 3). Las células de la granulosa constituyen el tejido más rico en la enzima aromatasa en la mujer premenopáusica, esta enzima posee un papel fundamental en el proceso de síntesis de los estrógenos, ya que convierte la testosterona en E<sub>2</sub> y la androstenediona en estrona (Figura 4), ésta última reacción también se produce en grasa, hígado, músculo y cerebro.

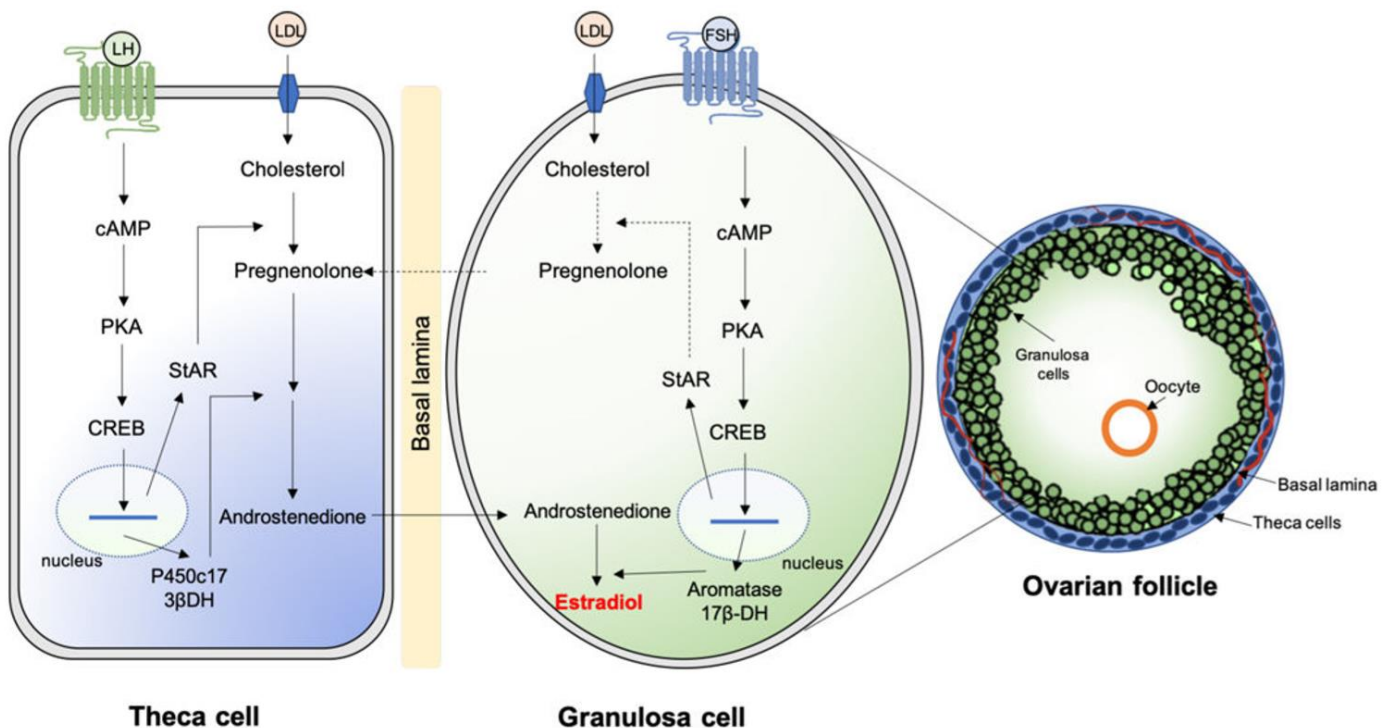


Figura 3. Anatomía del folículo ovárico y la asociación de células teca y granulosa en la síntesis de estrógenos. A) Producción de andrógenos en las células de la teca a partir de LH. B) FSH estimula las células de la granulosa para que se lleve a cabo la aromatización de andrógenos a estrógenos. C) El proceso ocurre en el folículo ovárico, que está compuesto por células de la granulosa, ovocitos, lámina basal y células teca (tomado de Fuentes & Silveyra, 2019).

Las células de la teca interna poseen numerosos receptores de LH y ésta actúa a través del adenosín monofosfato cíclico (cAMP) para incrementar la conversión de colesterol en androstenediona. La LH controla la producción de andrógenos por las células del compartimiento tecal del folículo, mientras que la FSH regula la expresión de la enzima

aromatasa en el compartimiento de la granulosa; tanto LH como FSH actúan sincrónicamente, de modo que las células de la teca interna suministran androstenediona a las células de la granulosa, es decir, que produce los andrógenos que constituyen el sustrato de la aromatasa, mientras que la granulosa produce una enzima que convierte el sustrato en estrógeno, cuando reciben andrógenos. Las células de la granulosa poseen numerosos receptores de FSH; la cual facilita la síntesis de E<sub>2</sub> al actuar a través del cAMP e incrementando la actividad de la aromatasa. Las células maduras de la granulosa también tienen receptores de LH, y esta hormona estimula la síntesis de E<sub>2</sub>; la actividad de ambos tipos celulares incrementa hasta 10 veces el nivel de E<sub>2</sub> circulante justo antes de la ovulación. (Barret, *et al.* 2010).

Cerca de 2% del E<sub>2</sub> circulante se encuentra libre y el resto se enlaza a proteínas: 60% a albúmina y 38% a la globulina fijadora de esteroides gonadales (GBG). En hígado, el E<sub>2</sub>, la estrona y el estriol son convertidos en glucurónidos y conjugados con sulfato; posteriormente estos glucurónidos son eliminados en la orina (Barret, *et al.* 2010).

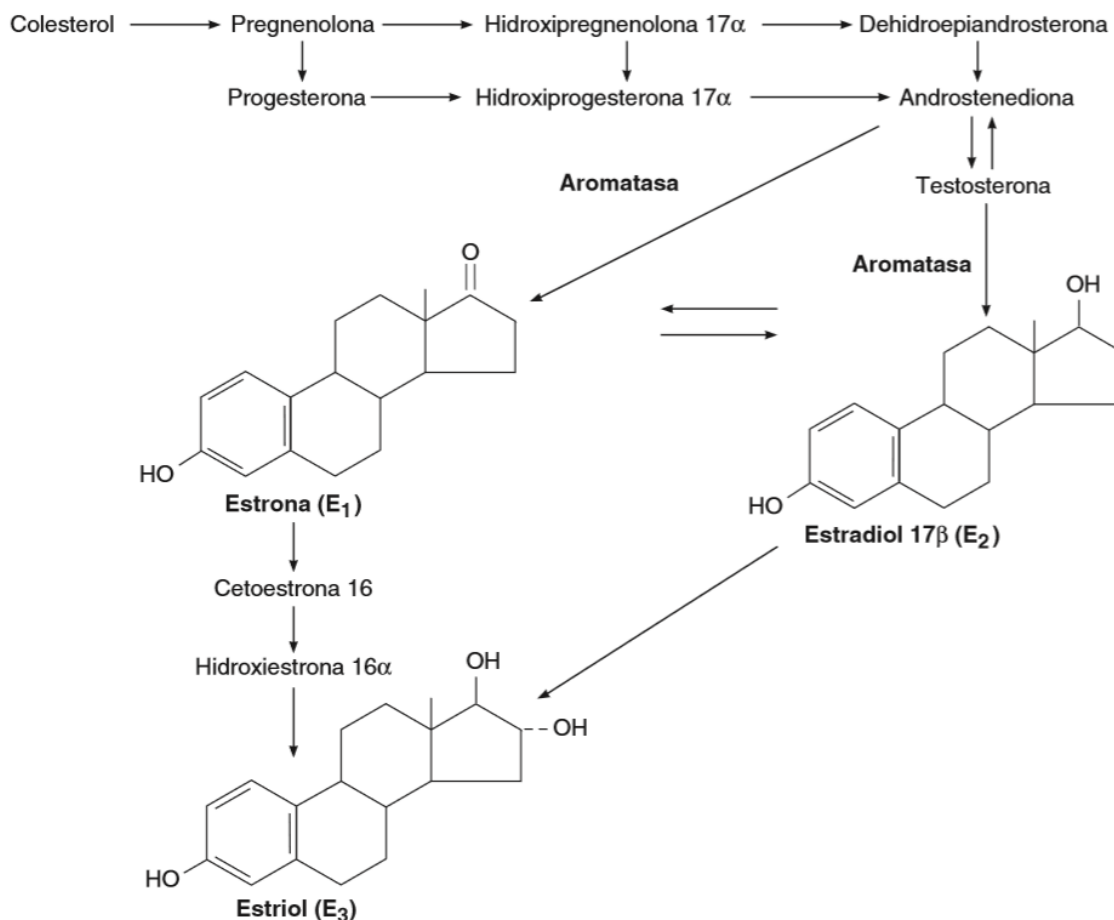


Figura 4. Biosíntesis y metabolismo de los estrógenos (tomado de Barret, *et al.*; 2010).

## 1.7 Compuestos derivados de estrógeno

El uso principal de los análogos de los estrógenos naturales en la clínica es como formulación anticonceptiva y como TRE. Existen diversos compuestos derivados de los estrógenos, como el EE<sub>2</sub>, el cual es un estrógeno potente y, a diferencia de los estrógenos naturales, es relativamente activo cuando se ingiere porque es resistente al metabolismo hepático; o el valerato de E<sub>2</sub>, que se usa en inyectables. Otras formulaciones contienen combinaciones de estrógenos y progestágenos, e incluso se ha hecho el uso de otros compuestos como los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs), que se comportan como agonistas o antagonistas dependiendo del tejido y de la dosificación.

Los estrógenos naturales y sintéticos poseen efectos tanto deseables como indeseables (por ejemplo, disminuyen el riesgo de osteoporosis, pero se asocian a un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer uterino y mamario), por ello, se buscan alternativas que presenten mayores

efectos benéficos que adversos (Barret, *et al.* 2010). Con el fin de crear compuestos efectivos, pero con menos efectos adversos, se han sintetizado compuestos conocidos como aminoestrógenos, los cuales poseen características y propiedades similares a los estrógenos naturales, pero se diferencian de ellos en su estructura química por su sustituyente en el carbono 17 donde presentan un grupo amino terminal, así como en sus efectos sobre la coagulación sanguínea.

Prolame (Figura 5), es un compuesto esteroideo derivado del E<sub>2</sub>, un aminoestrógeno con efectos estrogénicos, anticoagulantes y antiplaquetarios (Jaimez, *et al.*;2000). Además, se ha comprobado que, al ser administrado en ratas OVX, éste compuesto inhibe los niveles séricos de LH e invierte el efecto sobre el útero de la reducción de peso debido a la extracción de los ovarios (González, *et al.*; 2009 y Lemini, *et al.*; 1985). Prolame activa principalmente el RE $\alpha$ , aunque también produce una activación mínima del RE $\beta$ , sin que se muestre ningún tipo de propiedades como antagonista de los subtipos de RE (Jaimez, *et al.*; 2000).

Así mismo, se ha comparado la especificidad en la unión de prolame y E<sub>2</sub> con ambos RE, se ha encontrado que prolame es capaz de competir con E<sub>2</sub> por el sitio de unión con el receptor, mostrando cierta capacidad de desplazar a E<sub>2</sub> de su sitio de unión. También se ha establecido que prolame es capaz de interactuar y modular la transcripción a través de los RE, aunque de forma significativamente menor a como lo hace E<sub>2</sub>; esta diferencia en la actividad transcripcional de prolame está probablemente determinada por la composición de la cadena lateral de amino-alcohol en el C-17 (Jaimez, *et al.*; 2000).

Se ha descrito también que prolame, al igual que el E<sub>2</sub>, tiene efectos antidepresivos mediados por los RE (Lemini, *et al.*, 2013; 2016), lo que abre la posibilidad de que pueda ser usado como una alternativa de TRE, más aún si se considera que prolame tiene efectos anticoagulantes que podrían disminuir los efectos tromboembólicos en pacientes.

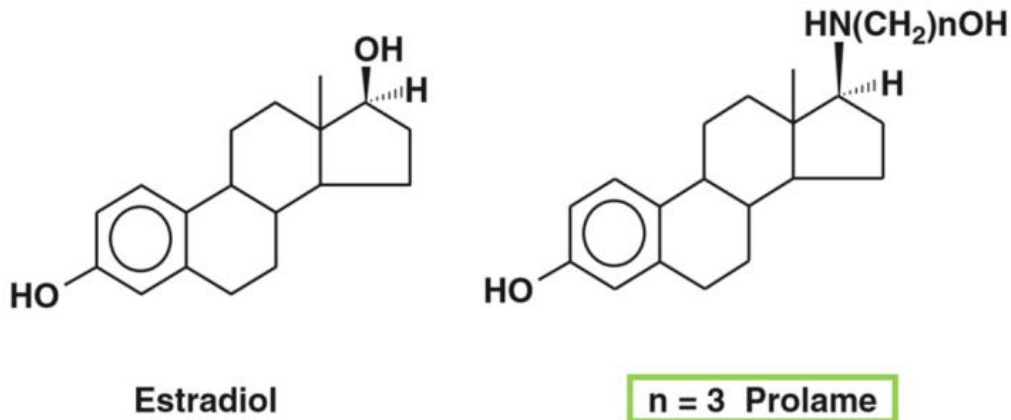


Figura 5. Estructura química de E<sub>2</sub> y el 17β-aminoestrogeno prolame (modificado de Lemini, *et al.*;2013)

### 1.8 Regulación endócrina del estrógeno

El eje HHA es un conjunto complejo de interacciones directas que funcionan por medio de sistemas de retroalimentación coordinadas principalmente por el hipotálamo, la glándula hipófisis, una estructura localizada debajo el hipotálamo y la glándula adrenal o suprarrenal, una glándula pequeña, pareada y que se ubica en la parte superior de los riñones. Las interacciones entre estos tres órganos constituyen el eje HHA, una parte esencial del sistema neuroendocrino que controla diversos procesos como: las reacciones al estrés, el sistema inmune, los estados de ánimo y la conducta sexual (Tortora & Derrickson, 2006).

El hipotálamo ocupa una posición clave en la regulación de la secreción de gonadotropinas; esto se lleva a cabo por medio de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) secretada en los vasos del sistema porta hipofisario. La GnRH es secretada por el hipotálamo y es la encargada de estimular la liberación de FSH y LH por parte de la adenohipófisis, y controlar los ciclos ovárico y uterino (Barret, *et al.* 2010).

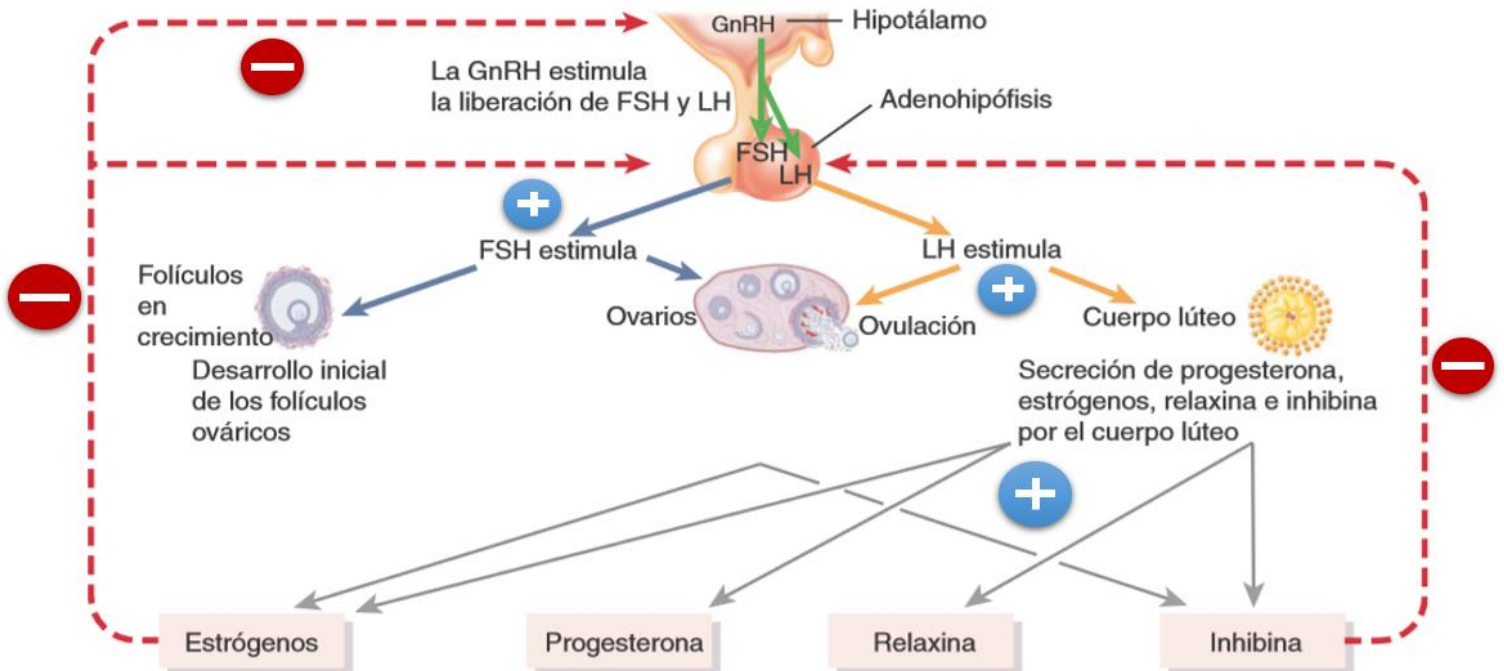


Figura 6. Secreción de estrógenos, progesterona, relaxina e inhibina en el eje HHA del ciclo reproductor femenino. GnRH= Hormona liberadora de gonadotropina, LH=Hormona luteinizante, FSH= Hormona folículo estimulante (modificado de Tórtora & Derrickson, 2006).

La FSH y LH regulan el crecimiento y maduración de los folículos, ambas hormonas estimulan los folículos ováricos para secretar estrógenos. La LH promueve en las células de la teca del folículo, la producción de andrógenos. A mitad del ciclo menstrual, la LH provoca la ovulación y luego contribuye con la formación del cuerpo lúteo, razón por la cual recibe su nombre, LH. A su vez, el cuerpo lúteo, estimulado por la LH, produce y secreta estrógenos, progesterona, relaxina e inhibina (Figura 6). Los estrógenos secretados por los folículos ováricos cumplen diversas funciones fisiológicas importantes en el cuerpo como el desarrollo de características sexuales femeninas, tales como el crecimiento de mamas, carencia de vello facial, el ensanchamiento de las caderas, entre otras (Tórtora y Derrickson, 2006).

Los cambios en la concentración plasmática de las hormonas responden a relaciones de retroalimentación tanto positiva como negativa. Ejemplo de ello es la secreción de LH que es contenida por la retroalimentación negativa que ejerce la concentración plasmática ascendente de estrógenos. Las células de la teca interna aportan andrógenos a las células de la granulosa que producen estrógenos circulantes que inhiben la secreción de GnRH, LH y

FSH. Entre 36 y 48 h antes de la ovulación, la retroalimentación estrogénica se vuelve positiva, iniciando la secreción de LH (Barret, *et al.* 2010).

La concentración moderada y constante de estrógenos circulantes ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de LH, mientras que, durante el ciclo menstrual, la concentración elevada de estrógenos genera una retroalimentación positiva que estimula la secreción de LH. Estas asas de retroalimentación pueden observarse también en la figura 7.

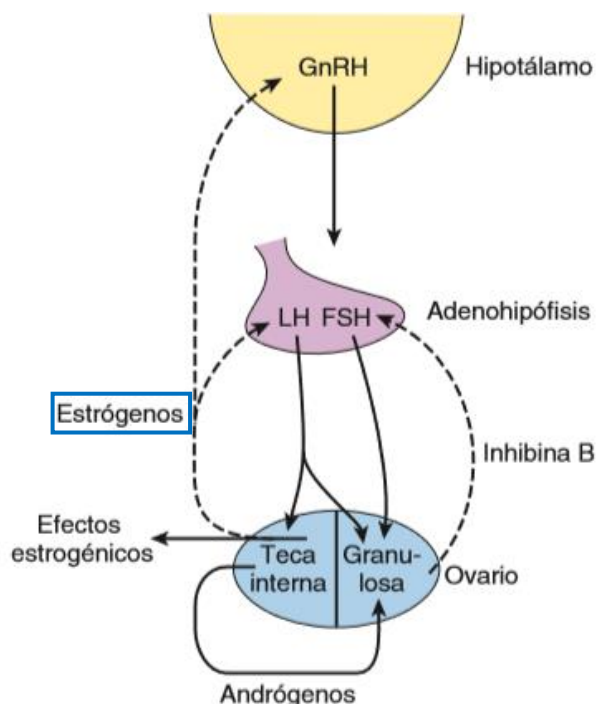


Figura 7. Sistema de retroalimentación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, donde las flechas punteadas representan los efectos inhibidores sobre otras hormonas y las flechas sólidas los efectos estimulantes (Tomado de Barret, *et al.* 2010).

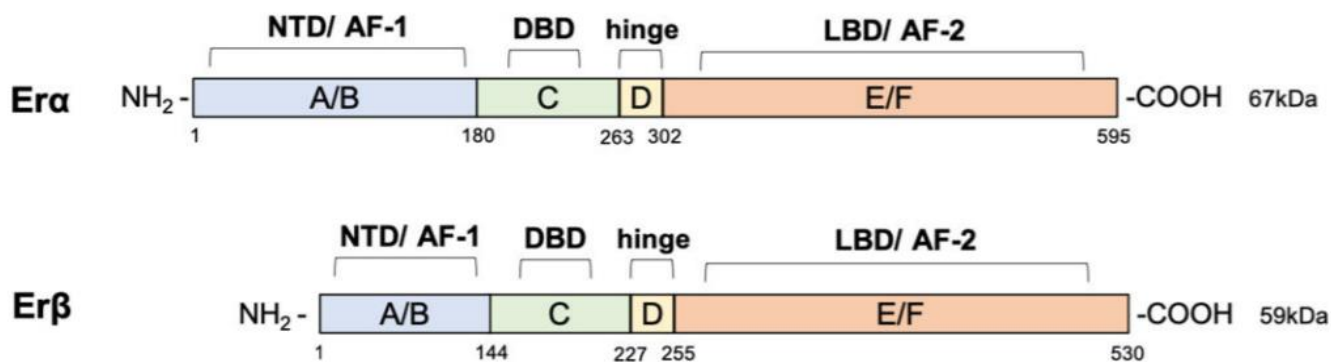
## 1.9 Receptores de estrógeno

Los efectos biológicos de los estrógenos están mediados por los RE  $\alpha$  y  $\beta$ , que son miembros de una gran superfamilia de receptores nucleares (Figura 8). Los cuales se han observado en distintos tipos celulares como células endoteliales, del estroma ovárico y regiones cerebrales como hipocampo e hipotálamo; así como en diversos tejidos, como, por ejemplo, en roedores, los tejidos con los niveles de expresión más altos de RE $\beta$  son la próstata, el ovario y los pulmones, así como en glándulas mamarias, hueso, útero, SNC, y sistema cardiovascular, donde estos tejidos también muestran expresión del RE $\alpha$  (Nilsson, *et al.*; 2001)



Estos receptores también son clasificados como factores de transcripción que actúan por medio de la unión a ligando, es decir, que requieren la unión del estrógeno para ejercer su acción. El E<sub>2</sub> ejerce su actividad estrogénica mediante el mecanismo de acción clásico (genómico) o no clásico (no genómico), estos mecanismos de acción pueden verse esquematizadas en la figura 9.

Figura 8. Organización estructural de los RE  $\alpha$  y  $\beta$ . Los RE consisten de la región N-terminal involucrada en la



transactivación (dominios A/B AF-1), el dominio de unión al ADN (DBD, dominio C), la región C-terminal que contiene el dominio de unión al ligando (BLD, dominio E/F, AF-2) y la función de transactivación-2 (AF-2) (tomado de Fuentes & Silveyra, 2019).

El mecanismo de acción no clásico se lleva a cabo de forma más rápida que el mecanismo de acción clásico, ya que el primero involucra acciones que se producen en algunos segundos o minutos mientras que la vía clásica involucra efectos que pueden tardar desde horas a días. El mecanismo de acción no clásico comienza en la membrana celular con la unión del E<sub>2</sub> con los RE membranales, los cuales pueden estar acoplados a proteínas G, lo cual activa una vía de señalización en cascada de cinasas o segundos mensajeros, desencadenando un mecanismo de señalización intracelular induciendo múltiples acciones como la transcripción de genes blanco o la alteración en la actividad neuronal del SNC (Xian & Hafei, 2015).

Por otra parte, el mecanismo de acción clásico inicia con la unión del ligando a los RE intracelulares, que provoca que los RE experimenten cambios conformacionales que inducen su disociación con las proteínas de choque térmico, se fosforilan, se dimerizan y son translocados al interior del núcleo, posteriormente los dímeros se unen a secuencias del ADN conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) presentes en las regiones

promotoras de genes blanco, el RE funciona como factores de transcripción nuclear; una vez unidos al ERE se lleva a cabo el reclutamiento de la maquinaria de transcripción basal lo que podría también reclutar proteínas llamadas correguladores, ya sean coactivadores o correpresores, las cuales promueven o inhiben, respectivamente, la transcripción de genes blanco y en consecuencia la expresión de la proteína (Xian & Hafei, 2015; Malikov, *et al.*; 2012; Ortega-Domínguez, *et al.*; 2015).

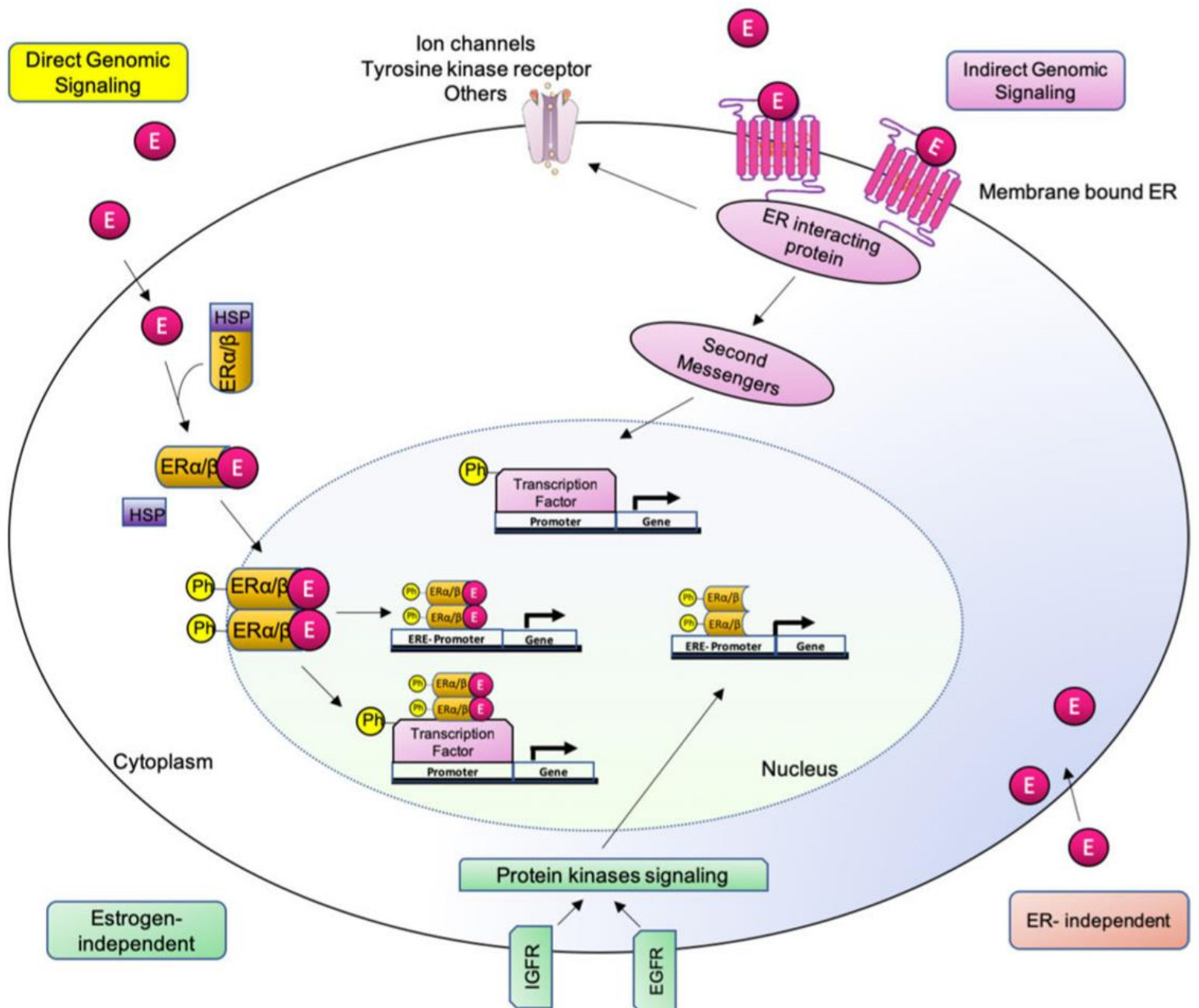


Figura 9. Vías de señalización clásica y no clásica mediada por la unión del  $E_2$  a los RE nucleares y los RE membranales que pueden estar acoplados a proteínas G. En el mecanismo clásico el receptor intracelular activado y dimerizado se une a una región promotora del ADN que contiene un ERE desencadenando la transcripción de genes específicos. Mientras que en el mecanismo no clásico se desencadena una cascada de señalización de cinasas, donde finalmente estos eventos de señalización intracelular inducen múltiples acciones estrogénicas y de regulación transcripcional. (tomado de Fuentes & Siveyra, 2019).

## 1.10 Regulación de los RE por E<sub>2</sub> en el sistema nervioso

Estudios en modelos animales y cultivos neuronales han demostrado que el E<sub>2</sub> es capaz de regular la expresión de los RE. Ejemplo de esto son estudios *in vitro* donde Devidze et al. (2005) reportaron en cultivos neuronales del hipotálamo de ratas jóvenes OVX, que el número de células RE $\alpha$  positivas para ARNm aumenta luego de ser expuestos a E<sub>2</sub> durante 2 días. Otro estudio mostró que el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 h aumentó la cantidad promedio de proteína RE $\alpha$  (163% en comparación con las células no tratadas) en cultivos neuronales primarios de células del núcleo ventromedial hipotalámico de ratas Wistar adultas jóvenes, gonadalmente intactas. Debido a que ambos RE se encuentran presentes en el hipotálamo, ha demostrado, mediante agonistas selectivos de los RE, que ambos RE fueron capaces de mediar la acción del E<sub>2</sub> (Malikov, *et al.*; 2013). Estos dos estudios sugieren que, en las neuronas hipotalámicas, el E<sub>2</sub> regula positivamente la expresión de RE $\alpha$  y el incremento del RNAm.

Estudios en donde se emplearon ratas OVX y gonadalmente intactas de mediana edad (13 meses) que fueron analizadas 5 semanas después de la cirugía. Los análisis demostraron que en estos animales se presentaron cambios en la expresión de genes blanco para E<sub>2</sub>, modulados por factores como la edad y posiblemente también por el TPOVX, donde se identificaron 252 genes cuya expresión fue alterada por la ausencia de las hormonas ováricas; entre los cuales se observó una disminución en la transcripción del gen *Esr1*, el cual codifica para el RE $\alpha$ , reflejándose en una disminución del ARNm, que coincide con la disminución en la expresión de la proteína (Sarvarí, *et al.*;2017).

Existen pocos estudios acerca de la regulación del RE $\beta$  en el SNC. Al respecto, un estudio mostró una disminución en el ARNm del RE $\beta$  en la corteza cerebral de ratas jóvenes de la cepa Fischer 344, con 3 meses POVX y tratadas con E<sub>2</sub> (10 $\mu$ g/rata) (Blurton-Jones & Tuszynski, 2006).

Los estudios en conjunto muestran que cambios en el ambiente hormonal modifican la expresión del RE. Se desconoce si estos cambios en la regulación por condiciones como la OVX o el tratamiento con E<sub>2</sub>, también se producen por estrógenos como el prolam.

### 1.11 Efecto antidepresivo de E<sub>2</sub> y prolame

Se ha descrito en varios estudios el efecto tipo antidepresivo de E<sub>2</sub> en ratas adultas jóvenes OVX con 3 semanas de POVX sometidas a FST, donde se ha observado una disminución de la inmovilidad significativa al compararlo con los grupos control (Estrada-Camarena, *et al.*; 2003, Lemini, *et al.*; 2013, Lemini, *et al.*; 2016, Vega-Rivera, *et al.*; 2016). Sin embargo, en estudios realizados en ratas jóvenes con TPOVX 1 y 3 semanas y tratadas con E<sub>2</sub> se ha observado que el tratamiento promueve una disminución en la conducta de inmovilidad, pero este efecto dado por E<sub>2</sub> se pierde en ratas con 12 semanas POVX (Estrada-Camarena, *et al.*, 2011).

Está determinado que E<sub>2</sub> presenta un efecto tipo antidepresivo en modelos animales, donde se mostró que su eficacia es comparable con la de antidepresivos como fluoxetina (FLX) y desipramina (DMI) en ratas Wistar hembras adultas jóvenes OVX y sometidas a FST.) (Estrada-Camarena, *et al.*; 2003).

Por otra parte, tanto E<sub>2</sub> como su análogo sintético EE<sub>2</sub> produjeron una disminución de la inmovilidad y un aumento en la conducta de nado, un patrón conductual característico de fármacos que inhiben selectivamente la recaptura de serotonina, lo que sugiere que los estrógenos tienen una acción similar a los antidepresivos que actúan por la vía serotoninérgica, disminuyendo el número de cuentas de inmovilidad por parte de E<sub>2</sub> al utilizarse las dosis de 5 y 10 µg/rata. Así mismo se demostró que E<sub>2</sub> (10 mg / rata) y EE<sub>2</sub> (5 mg / rata) indujeron un efecto similar al antidepresivo observado 1 hora después de su inyección, efecto que duró 2-3 días (Estrada-Camarena, *et al.*; 2003).

En la FST se han evaluado otros compuestos estrogénicos que pudieran tener un efecto tipo antidepresivo similar al del E<sub>2</sub>, un ejemplo de ello son los 17β-aminoestrógenos: prolame, butolame y pentolame, los cuales simulan algunos efectos estrogénicos como el comportamiento sexual de roedores hembras (Lemini, *et al.*; 2016), activación de la transcripción mediada por los RE α y β (Jaimez, *et al.*; 2000) y en contraste al E<sub>2</sub> presentan también propiedades anticoagulantes (Lemini, *et al.*; 1985).

Lemini *et al.* (2013) han demostrado que el efecto tipo antidepresivo de E<sub>2</sub> y prolame presentado en ratas Wistar adultas jóvenes OVX con 3 semanas y sometidas a FST mediado por los RE, ya que con el tratamiento conjunto de E<sub>2</sub> o prolame y tamoxifeno (antagonista de los RE, dosis de 15 mg/kg) se bloquea el efecto de las hormonas. Así mismo se ha observado que la eficacia del efecto antidepresivo mostrado por E<sub>2</sub> puede ser modificado por varios factores como son: la edad, el tipo de estrógeno empleado en la restitución y el periodo de inicio de la TRE (durante la perimenopausia o postmenopausia en humanos o el TPOVX en modelos animales) (Estrada-Camarena, *et al.*; 2011).

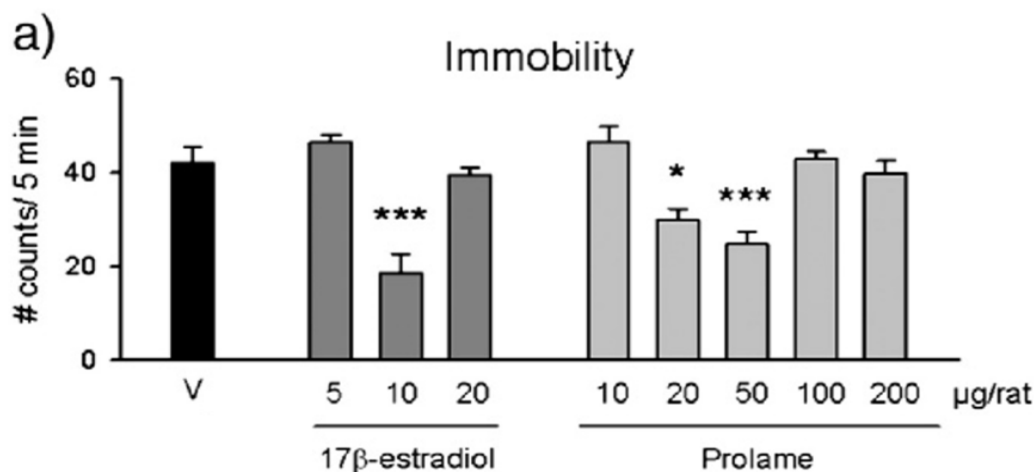


Figura 10. Efecto tipo antidepresivo de E<sub>2</sub> (10 μg/rata) y prolame (20 y 50 μg/rata) en ratas hembra adultas jóvenes 3 semanas POVX sometidas al FST, los resultados muestran la media y error estándar (n=9).

\* p<0.05, \*\* p<0.01 versus grupo control (Lemini, *et al.*, 2013).

Estrada-Camarena *et al.* (2011) determinaron la influencia del TPOVX en la eficacia antidepresiva del E<sub>2</sub>, FLX y DMI; donde se observó que, en ratas Wistar hembra adultas jóvenes sometidas a FST con 1, 3 y 12 semanas de OVX, el efecto antidepresivo de la hormona se pierde mientras el TPOVX sea mayor. En este estudio se observó que el efecto antidepresivo de FLX y DMI persiste hasta las 12 semanas POVX, sin embargo, el tratamiento con E<sub>2</sub> únicamente muestra un efecto antidepresivo a 1 y 3 semanas POVX, mientras que EE<sub>2</sub> mantuvo su efecto antidepresivo en todos los TPOVX.

Reportes de Lemini, *et al.* (2013) demuestran que el efecto tipo antidepresivo presentado en

modelos animales por E<sub>2</sub> y prolame es mediado por los RE, ya que su acción antidepresiva fue anulada por un antagonista de los RE (tamoxifeno a 15 mg/kg).

Resultados de laboratorio aún no publicados (Hernández-Hernández et al, en preparación), han demostrado que el TPOVX tiene una influencia en la eficacia antidepresiva de E<sub>2</sub> y prolame. El estudio se realizó con ratas hembra Wistar adultas jóvenes, con 3, 8, 16 y 24 semanas POVX, que fueron tratadas con vehículo, E<sub>2</sub> o prolame), en un esquema de tratamiento subcrónico (idéntico al reportado en Lemini et al 2013). Tres administraciones 30 minutos, 24 y 43 horas después de la pre-prueba de FST, ver Anexo 3). La evaluación de la conducta en la FST mostró que el efecto antidepresivo de E<sub>2</sub> y prolame se produjo a las 3 y 8 semanas POVX. Dado que la expresión del RE se regula con el tratamiento de E<sub>2</sub> y que existe similitud con reportes previos sobre el efecto antidepresivo a diferentes TPOVX, es posible que este efecto de E<sub>2</sub> y prolame esté correlacionado con un incremento en la expresión de los subtipos del RE en ciertas áreas del cerebro que tienen un papel importante en la modulación del estado de ánimo, como son hipocampo y corteza prefrontal (Barker y Galea, 2009; Jin, et al. 2005). Hasta el momento se desconoce si prolame puede regular la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$ , y si tiene relación con el efecto antidepresivo reportados para prolame.

Otra coincidencia en los datos previos es que tanto E<sub>2</sub> como prolame perdieron su efecto en los TPOVX de 16 y 24 semanas. Esto sugiere que el efecto antidepresivo de estos estrógenos se limita a un periodo posterior a la extracción de los ovarios, por lo que es necesario conocer si el TPOVX modifica la regulación de las densidades de los RE por el tratamiento estrogénico. Sin embargo, no se conoce la regulación del RE por parte de E<sub>2</sub> y prolame en ratas con diferentes TPOVX, por lo que en este estudio se analizó dicha regulación.

Dado que los RE están implicados en la regulación del efecto antidepresivo de E<sub>2</sub>, es posible que al estar presente este efecto se correlacione con un incremento en la expresión de los RE en ciertas áreas del cerebro que tienen un papel importante en la modulación del estado de ánimo, como son hipocampo y corteza prefrontal (Barker y Galea, 2009; Jin, et al. 2005)

## **2. Planteamiento del problema**

E<sub>2</sub> y prolame producen efectos antidepresivos similares en ratas adultas jóvenes sometidas a la FST, mostrando una disminución en el tiempo de inmovilidad a TPOVX de 3 y 8 semanas. De igual forma es conocido que los RE participan en el efecto antidepresivo de E<sub>2</sub> y prolame, y es probable que los RE se encuentren en regiones cerebrales asociadas a depresión, tales como hipocampo y corteza prefrontal. A su vez, se sabe que E<sub>2</sub> modula la expresión de estos receptores en diferentes tejidos, entre ellos, los núcleos hipotalámicos. Sin embargo, se desconoce si prolame también posee dicha capacidad. Por lo que en el presente trabajo se determinará si la expresión de los RE en corteza prefrontal e hipocampo es regulada por E<sub>2</sub> y prolame, y si tal regulación se presenta a diferentes TPOVX (desde 3 semanas hasta 24 semanas).

### **3. Justificación**

Actualmente, la TRE implementada en mujeres adultas tiene efectos benéficos (disminución de bochornos, protección contra riesgo de osteoporosis) como adversos (trombosis, cáncer de mama o endometrio). Dado lo anterior, investigaciones recientes han buscado eliminar o disminuir tales efectos adversos con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes que reciben el tratamiento.

Una alternativa de la TRE es prolame, el cual se ha visto que muestra efecto antidepresivo al igual que E<sub>2</sub> y propiedades anticoagulantes en ratones con dosis altas (1.21 µg y 12.1 µg) que E<sub>2</sub> no presenta, lo cual supondría una ventaja para disminuir los eventos tromboembólicos. Por lo tanto, es importante analizar en un modelo animal de depresión la regulación que presenta prolame sobre algunos de sus sitios blanco, como son los receptores a estrógenos, para determinar si su mecanismo de acción es similar al de E<sub>2</sub>.

### **4. Hipótesis**

Se sabe que E<sub>2</sub> y prolame ejercen su efecto antidepresivo mediante los RE, por lo que se espera observar una modulación de su expresión a causa de la acción de los estrógenos; por otra parte, prolame, al ser un aminoestrógeno que presenta una actividad estrogénica muy similar a la de E<sub>2</sub> debería incrementar la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  a las 3 y 8 semanas después de la cirugía, ya que en pruebas conductuales previas se observó un efecto antidepresivo por



parte de las hormonas en éstos tiempos, lo cual no ocurriría a las 16 y 24 semanas POVX.

## **5. Objetivos**

### **Objetivo general**

Estudiar el efecto de E<sub>2</sub> y prolame en la regulación de la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  en un modelo animal de menopausia y depresión.

### **Objetivos particulares**

1. Evaluar la regulación de la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  por prolame y E<sub>2</sub> en hipocampo y corteza prefrontal de ratas con diferentes TPOVX (3, 8, 16 y 24 semanas) y sometidas a FST.
2. Evaluar si la regulación de la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  en ratas sometidas a FST se modifica de acuerdo con los TPOVX de 3, 8, 16 y 24 semanas
3. Comparar las tasas de expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  en hipocampo y corteza prefrontal que resulten de los tratamientos de E<sub>2</sub> y de prolame, administrados en ratas con diferentes TPOVX.

## **6. Materiales y Método**

### **6.1 Animales**

Se utilizaron ratas Wistar hembras adultas jóvenes (tres meses de edad, aproximadamente 250 g de peso corporal al inicio del experimento) obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”. Los animales se alojaron en grupos que se encontraban en alojamientos de 5 ratas por caja, con ciclos de luz/oscuridad invertidos, temperatura controlada y acceso a comida y agua *ad libitum*, en el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética del INPRFM, No. de aprobación CEI/C/047/2017. El manejo de los animales fue realizado de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

## 6.2 Grupos experimentales

Las ratas fueron OVX bajo anestesia con 2, 2, 2 – Tribromoethanol a 0.2 gr/kg de rata, mediante administración intraperitoneal siguiendo un procedimiento standard para la extracción de los ovarios (Lemini, *et al.*;2013). Los animales fueron tratados con E<sub>2</sub> y prolame, y sometidos a FST para analizar del efecto de E<sub>2</sub> y prolame sobre la conducta de inmovilidad.

Las hembras OVX se dividieron en 4 grupos independientes correspondientes a un TPOVX, 3, 8, 16 o 24 semanas. A partir de cada grupo se formaron 3 subgrupos de 6 ratas, que recibieron alguno de los siguientes tratamientos:

1. Vehículo: Ratas tratadas con aceite de maíz (1ml/kg).
2. E<sub>2</sub>: Ratas tratadas con E<sub>2</sub> a 30 µg/kg.
3. Prolame: Ratas tratadas con prolame a 60 µg/kg.

La administración de los tratamientos fue realizada vía s.c. siguiendo un esquema de administración similar al previamente reportado (Lemini, *et al.*; 2013), ver Anexo 3.

## 6.3 Obtención de muestras

Para la presente tesis se tomaron los cerebros de las ratas eutanizadas por decapitación, los cuales fueron almacenados a -80°C en un ultracongelador (REVCO Ultra-Low Temperature Freezer, Thermo Fisher Scientific). Los cerebros fueron diseccionados empleando hielo seco para evitar la desnaturalización de las proteínas y realizando los cortes de las regiones cerebrales conforme a lo establecido en el Atlas *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, George Paxinos & Charles Watson (1986), se obtuvo el hipocampo y la corteza prefrontal para su posterior procesamiento.

## 6.4 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales se utilizó un *buffer* de lisis conocido como *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (*Buffer* RIPA que contiene Tris HCl 1M pH 7.2, EDTA, Tritón, Deoxicolato pH 11), al cual se disolvió una pastilla de inhibidores de

proteasas (cOmplete Tablets mini EASY pack, ROCHE 1/10ml de *buffer*, ver Anexo 5) para mantener la integridad de las proteínas. Se utilizó un equipo homogeneizador ultrasónico OMNI SONIC ruptor 400, el cual mediante vibraciones de alta frecuencia (40 pulsaciones de 1 minuto para hipocampo y 25 pulsaciones de 1 minuto para corteza prefrontal con un 30% de potencia) permitió la desintegración del tejido, liberando así las proteínas totales en la muestra. Posteriormente las muestras permanecieron en reposo dentro del hielo durante 30 minutos aproximadamente para luego centrifugarlas a una temperatura de 4°C y 14000rpm durante 25 minutos (Eppendorf Centrifuge 5424 R). De las muestras se obtuvo el sobrenadante y se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -4°C para su posterior cuantificación.

## **6.5 Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación se empleó un espectrofotómetro de microplacas (Epoch Biotek Instruments Inc. USA) que utiliza del programa Gen 5 2.05 para la lectura de las proteínas a una longitud de onda de 280 nm, después se realizaron los cálculos para conocer el volumen de muestra que correspondiera a 100 µg de proteína, el cual fue depositado en un gel de acrilamida con el que se realizó la electroforesis.

## **6.6 Western Blot**

### **Electroforesis**

Para poder detectar el RE  $\alpha$  y  $\beta$  a nivel de la proteína en las muestras de hipocampo o corteza prefrontal, las proteínas totales se separaron de acuerdo con su peso molecular (RE $\alpha$ =54kDa y RE $\beta$ =56kDa) por medio de electroforesis (Figura 11)

A la muestra de proteína, se le añadió *buffer* laemmli en una relación de 1:1, cargando en total por cada carril 7µl de cada una de las muestras.

Utilizando un gel de poliacrilamida al 12% (ver Anexo 5) y aplicando un campo eléctrico con un voltaje de entre 80-100V durante 2 horas se provocó que las proteínas migraran hacia el polo positivo de acuerdo con su movilidad electroforética y mostrándose a lo largo del gel como bandas (Figura 11); empleando un marcador de peso molecular para identificar las

bandas que mostraban la posición en el gel de las proteínas de interés (Precision Plus Protein Dual Color Standards, ver Anexo 5).

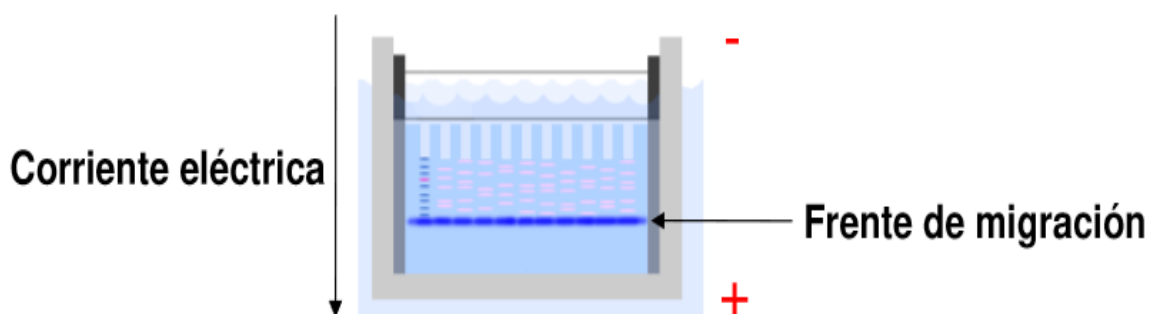


Figura 11. Electroforesis. Esquema representativo de la separación de las proteínas de interés, las cuales migran a lo largo del gel de poliacrilamida en función de su peso molecular y carga eléctrica.

## 6.7 Transferencia del gel a la membrana

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). El gel fue intercalado entre una membrana y papeles filtro a los extremos, tal como se muestra en la figura 12, los cuales estaban empapados de *buffer* de transferencia 1x (Tris Base 25mM, Glicina 192mM, Metanol). Posteriormente fueron sometidos al efecto de un campo eléctrico de 15V durante 1 hora y media en una cámara de transferencia semi-húmeda (Trans-Blot, SD, BIORAD, USA) lo cual provocó que las proteínas de la muestra que se encontraban en el gel cargadas negativamente migraran hacia el polo positivo hacia la membrana.

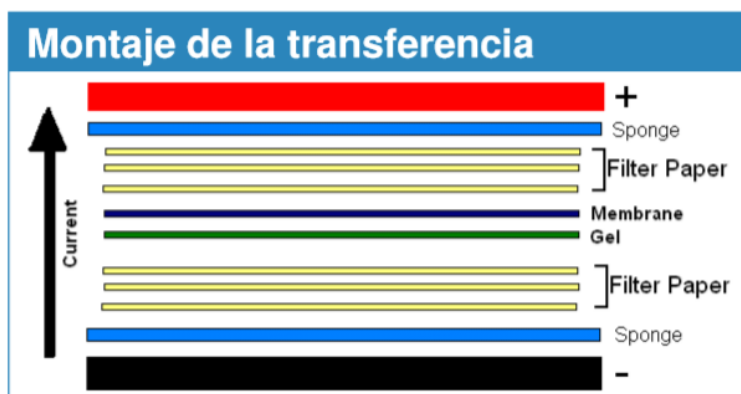


Figura 12. Esquema del correcto montaje del gel de poliacrilamida y la membrana de PVDF dentro de la cámara de transferencia.

## 6.8 Inmunodetección

Para la identificación de las proteínas de interés en la membrana se realizó una inmunodetección indirecta.

Las membranas de PVDF fueron incubadas con una solución de bloqueo preparada con solución salina con *buffer* de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate-Buffered Saline*; que contiene NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4) 1X y leche descremada 1.2g/10ml, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos con los poros de la membrana que no contienen proteína unida. A continuación, se incubó durante 24h un anticuerpo primario monoclonal anti-mouse específico para RE $\alpha$  (0.4 $\mu$ g/ml) y otro diferente para RE $\beta$  (0.4 $\mu$ g/ml), (ver Anexo 5), los cuales detectaron ambas proteínas en la membrana; posterior a ello se realizaron 3 lavados de 7 minutos c/u con PBS más Tween al 0.1% para poder quitar el exceso de anticuerpo de la membrana y posteriormente se incubó durante 1 hora con un anticuerpo secundario goat anti-mouse (0.04 $\mu$ g/ml) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), el cual reconoce al anticuerpo primario acoplándose a él.

Por último, las membranas fueron incubadas durante 1 minuto con luminol (Inmuno Cruz Westering Blotting Luminol Reagent, USA. Ver Anexo 5) y colocadas en un fotodocumentador (Molecular Imager Gel Doc XR+, Imaging System BIORAD) con lo que las proteínas de interés unidas a los anticuerpos emitieron una señal quimioluminiscente, la cual fue capturada mediante la toma de fotografías.

El mismo procedimiento de inmunodetección se realizó para la proteína  $\alpha$ -Tubulina que se utilizó como control de carga, utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-mouse específico para esta proteína (ver Anexo 5) y un anticuerpo secundario goat anti-mouse (0.04 $\mu$ g/ml), ver Anexo 5.

## 6.9 Análisis densitométrico

Una vez obtenido el registro fotográfico de la inmunodetección se utilizó el programa Image Lab 5.0 para realizar la selección de la banda que correspondía al RE $\alpha$  (54 kDa), RE $\beta$  (56 kDa) y  $\alpha$ -Tubulina (50 kDa) y realizar un análisis densitométrico.

## **6. 10 Análisis estadístico**

Una vez obtenidos los datos densitométricos se realizó una normalización del valor densitométrico del RE/ $\alpha$ -Tubulina; posteriormente los datos se emplearon para realizar un análisis de varianzas de dos vías (ANOVA) con una prueba post-hoc de Holm-Sidak para realizar las comparaciones entre todos los grupos obtenidos, entre los tratamientos y los TPOVX utilizados. Posteriormente se realizaron ANOVAs de 1 vía para encontrar diferencias significativas entre los grupos tratados con E<sub>2</sub> y prolame en función del TPOVX, así como la expresión de los RE en los TPOVX. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ .

## 7. Resultados

El ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas en la expresión a nivel de la proteína del RE $\alpha$  en hipocampo, con el factor de tratamiento (F 2, 63=6.187; p=0.004) y con el factor de TPOVX (F 3, 63=6.505; p<0.001), pero no en la interacción de ambos factores (F 6, 63=2.205; p=0.054). El análisis post-hoc indicó que la expresión de RE $\alpha$  fue menor en los TPOVX de 8 y 16 semanas (p=0.002 y p=0.007, respectivamente) en comparación con el TPOVX 3 semanas, también Prolame redujo significativamente la expresión del RE $\alpha$  comparado con el grupo tratado con vehículo a las 3 semanas después de la cirugía, mientras que con E<sub>2</sub> solo se observó un incremento en la expresión del receptor a las 8 semanas comparado con el grupo de vehículo. Mientras que en el caso de la expresión a nivel de la proteína de RE $\beta$  en el hipocampo, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas con el factor de tratamiento (F 2, 59=4.785; p=0.012) y con el factor de TPOVX (F 3, 59=15.949; p<0.001), pero no en la interacción de los factores (F 6,59=0.795; p=0.578). El análisis post-hoc mostró que la expresión del RE $\beta$  disminuyó significativamente a las 8 y 24 semanas al compararlo con el TPOVX de 3 semanas y a las 16 semanas se mostró un incremento vs 8 semanas POVX.

Por otra parte, el análisis de ANOVA de 2 vías de la expresión de la proteína de RE $\alpha$  en la corteza prefrontal, mostró diferencias significativas determinadas por el factor de TPOVX (F 3, 59=2.922; p=0.041) pero no por el factor de tratamiento (F 2, 59=1.199; p=0.309) ni por la interacción entre los factores (F 6,59=0.785; p=0.586). El análisis post-hoc mostró que la expresión del RE $\alpha$  incrementó a las 24 semanas al compararlo con el TPOVX de 8 semanas. Mientras que el ANOVA de 2 vías mostró diferencias en la expresión de la proteína del RE $\beta$  determinadas por el factor de TPOVX (F 3,58=20.752; p<0.001), pero no por el tratamiento (F 2, 58=0.444; p=0.644) ni la interacción (F 6, 58=0.796; p=0.577) La prueba post-hoc mostró un incremento en la expresión del RE $\beta$  a las 8 semanas POVX al compararlo con la expresión mostrada a los demás TPOVX.

Debido a que la interacción entre los factores no muestra diferencias estadísticamente significativas, y para poder determinar si E<sub>2</sub> y prolame modificaron la expresión de los RE en los distintos TPOVX en el hipocampo, se realizó un ANOVA de 1 vía para tratar ambos factores como independientes.

## **7.1 Cambios en la expresión del RE $\alpha$ en el hipocampo**

En la figura 13 se observa una imagen representativa de los datos obtenidos a partir de la inmunodetección del RE $\alpha$  en hipocampo y su respectivo control de carga.

### **Variaciones de acuerdo con el TPOVX**

El TPOVX influye en la modulación de la expresión del RE $\alpha$  en el grupo tratado con vehículo (F 3,20=6.848; p=0.002), ya que al TPOVX de 8 semanas (p=0.004) y 16 (0.014) disminuyó significativamente la expresión de este receptor, respecto al tiempo de 3 semanas; sin que se observaran cambios significativos a las 24 semanas. Se encontró una disminución del 58% y 32% en los tiempos de 8 y 16 semanas, respecto a las 3 semanas.

### **Regulación por tratamiento**

El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía mostró que el E<sub>2</sub> solamente incrementó la expresión del RE $\alpha$  a las 8 semanas después de la cirugía (F 2,17=5.936; p=0.011), donde se observa un incremento del 105% de expresión al compararlo con el grupo tratado con vehículo, mientras que prolame no produjo tal efecto (figura 14).



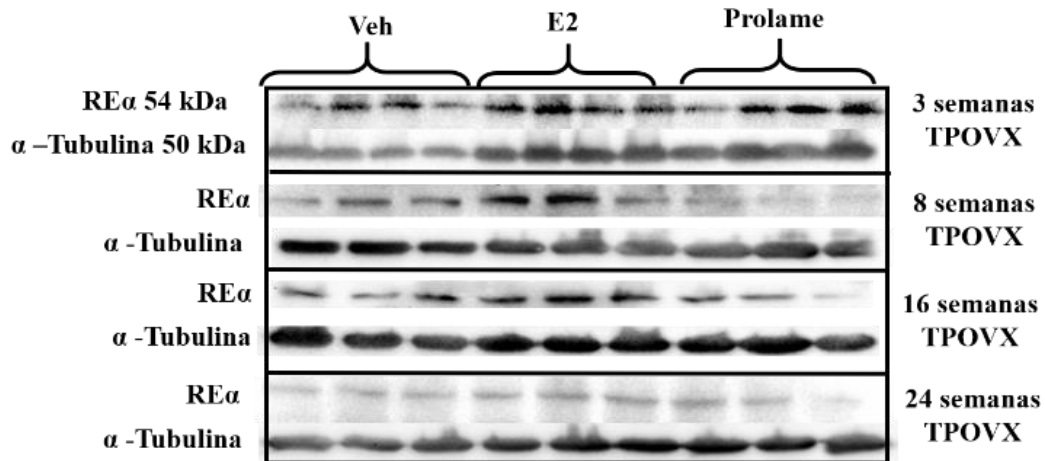


Figura 13. Contenido de la proteína del RE $\alpha$  en hipocampo. Se muestra una imagen representativa de la expresión del RE $\alpha$  del hipocampo de ratas adultas jóvenes tratadas con vehículo, E $_2$  y prolame (n=6), así como la expresión de  $\alpha$ -Tubulina, la cual fue utilizada como control de carga.

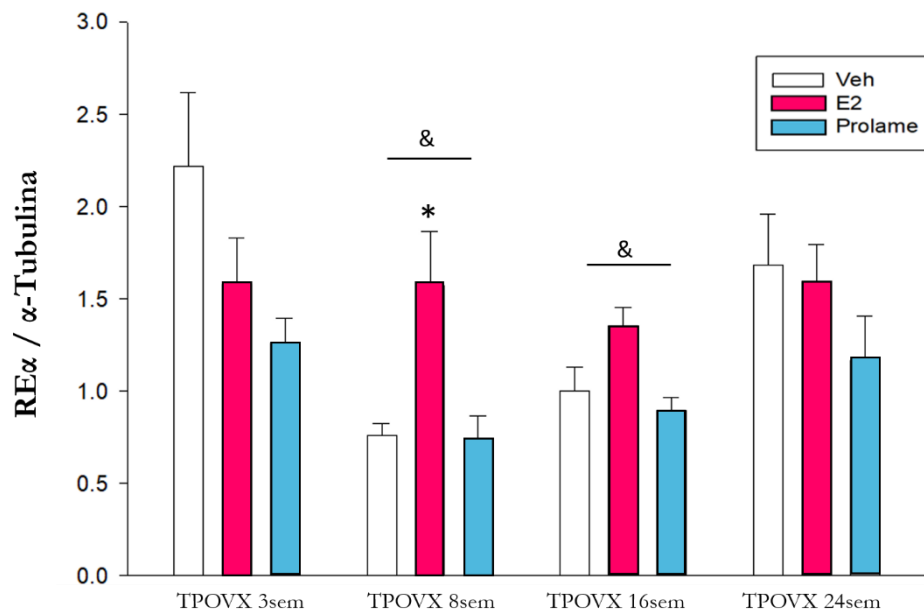


Figura 14. Efecto de E $_2$  y prolame sobre la expresión del RE $\alpha$  en el hipocampo de ratas hembra AJ con 3, 8, 16 y 24 semanas POVX (n=6) y sometidas a FST, los resultados muestran la media y el error estándar. \*diferencias significativas vs su respectivo grupo tratado con vehículo; &diferencias significativas vs TPOVX 3sem, p<0.05. Otras diferencias significativas se encontraron entre a las 8 y 16 semanas entre E $_2$  y prolame, p<0.05.

## 7.2 Cambios en la expresión del RE $\beta$ en hipocampo

En la figura 15 observamos una imagen representativa de los blots obtenidos por medio de la técnica de Western Blot a partir de la inmunodetección del RE $\beta$  de hipocampo, mostrando su respectivo control de carga.

### Variaciones de acuerdo con el TPOVX

Se observó en los resultados obtenidos para el RE $\beta$  que el TPOVX influye en la expresión del receptor en los grupos tratados con vehículo (F 3,20=3.376; p=0.039), donde se muestra una disminución de la expresión a las 8 semanas (p=0.029), respecto a las 3 semanas después de la cirugía. Sin mostrar diferencias significativas respecto a los demás TPOVX.

El patrón de la curva presentada por el RE $\beta$  es similar al presentado por el RE $\alpha$  anteriormente, sin embargo, la expresión total del RE $\beta$  fue menor que la mostrada por el RE $\alpha$ .

### Regulación por tratamiento

El análisis estadístico, mediante ANOVA de una vía, permitió determinar el efecto de los tratamientos sobre la expresión del RE $\beta$  a los distintos TPOVX, mostrando que el tratamiento con E<sub>2</sub> solamente incrementó la expresión del receptor a las 16 semanas POVX (F 2,15=5.086; p=0.021) en un 50.7% de expresión comparado con el grupo tratado con vehículo, sin observarse diferencias significativas en el grupo tratado con prolame (figura 16).

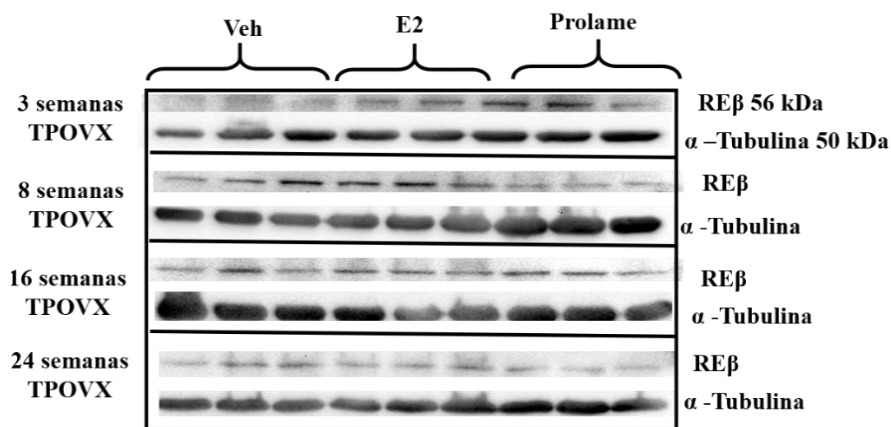


Figura 15. Contenido de la proteína del RE $\beta$  en hipocampo. Se muestra una imagen representativa de la expresión del RE $\beta$  del hipocampo de ratas adultas jóvenes tratadas con vehículo, E<sub>2</sub> y prolame (n=6), así como la expresión de  $\alpha$ -Tubulina, la cual fue utilizada como control de carga.

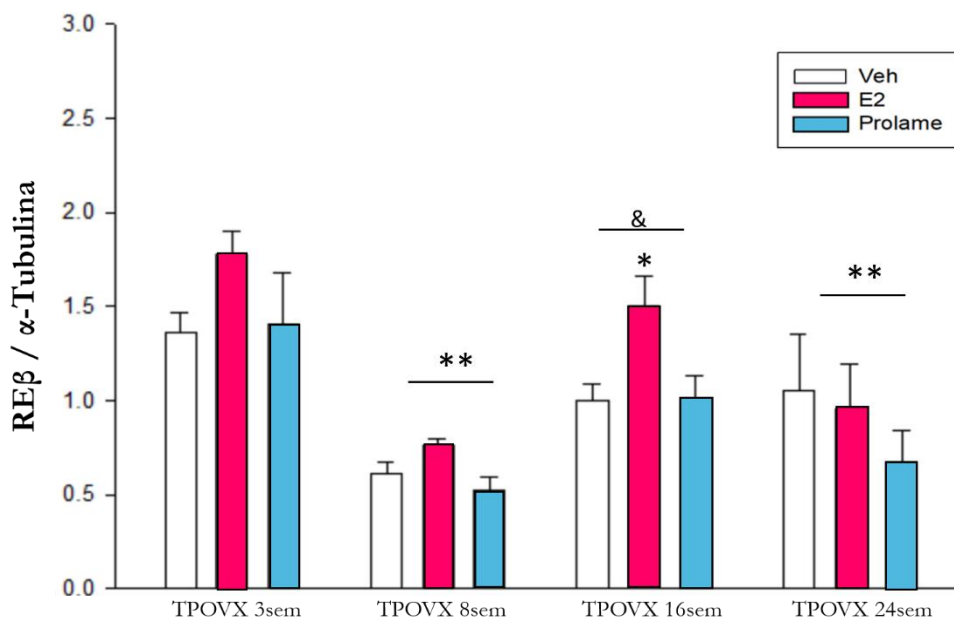


Figura 16. Efecto de E<sub>2</sub> y prolame sobre la expresión del RE $\beta$  en el hipocampo de ratas hembra AJ con 3, 8, 16 y 24 semanas POVX (n=6) y sometidas a FST, los resultados muestran la media y el error estándar. \*diferencias vs grupo tratado con vehículo; \*\* diferencias vs TPOVX 3sem POVX; &diferencias significativas vs TPOVX 8sem, p<0.05. Otras diferencias significativas se encontraron entre a las 8 semanas entre E<sub>2</sub> y prolame, p<0.05.

### 7.3 Cambios en la expresión del RE $\alpha$ en corteza prefrontal

La figura 17 muestra una imagen representativa de los blots obtenidos por medio de la técnica de Western Blot a partir de la inmunodetección del RE $\alpha$  y  $\alpha$ -Tubulina en corteza prefrontal.

#### Variaciones de acuerdo con el TPOVX

El ANOVA de una vía mostró que el TPOVX no influye en la modulación de la expresión del RE $\alpha$  en la región de corteza prefrontal. Sin embargo, es posible observar que los niveles de expresión del RE $\alpha$  en corteza prefrontal son menores a los observados para el mismo receptor en la región de hipocampo (Figura 18).

## Variaciones por tratamiento

El ANOVA de una vía no mostró un efecto de los tratamientos sobre la expresión del RE $\alpha$  en corteza prefrontal en los diferentes TPOVX. se encontró una oscilación de la expresión del RE $\alpha$  de entre el 76.77 al 152.73%, sin mostrar significancia entre los tratamientos al compararlos con el grupo vehículo (Figura 18).

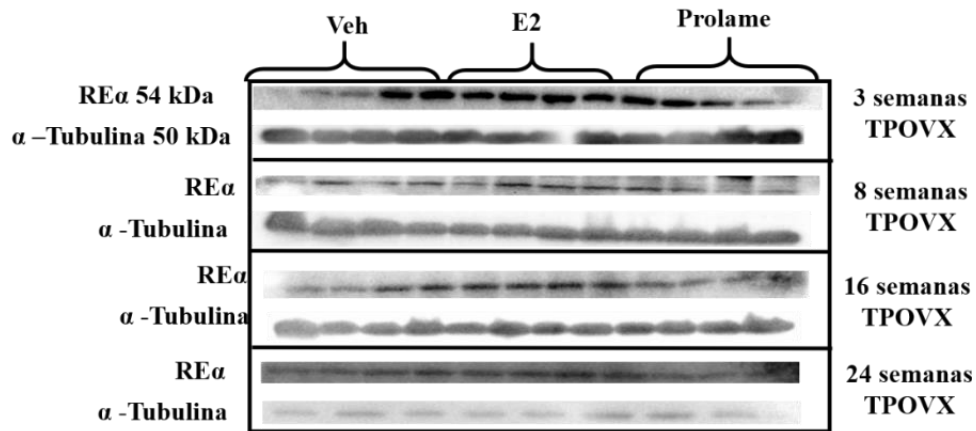


Figura 17. Contenido de la proteína del RE $\alpha$  en corteza prefrontal. Se muestra una imagen representativa de la expresión del RE $\alpha$  de la corteza prefrontal de ratas adultas jóvenes tratadas con vehículo, E<sub>2</sub> y prolame (n=6), así como la expresión de  $\alpha$ -Tubulina, la cual fue utilizada como control de carga.

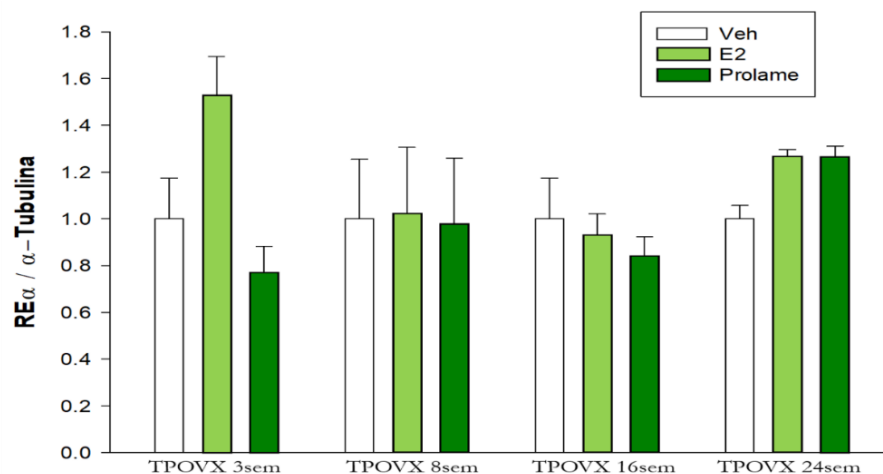


Figura 18. Efecto de E<sub>2</sub> y prolame sobre la expresión del RE $\alpha$  en corteza prefrontal de ratas hembra AJ a 3, 8, 16 y 24 POVX (n=6) y sometidas a FST, los resultados muestran la media y el error estándar.

## 7.4 Cambios en la expresión del RE $\beta$ en corteza prefrontal.

La figura 19 muestra una imagen representativa de los blots obtenidos por medio de la técnica de Western Blot a partir de la inmunodetección del RE $\beta$  y  $\alpha$ -Tubulina en corteza prefrontal.

### Variaciones de acuerdo con el TPOVX

Se observó en los resultados obtenidos para el RE $\beta$  que el TPOVX influye en la expresión del receptor en los grupos tratados con vehículo (F 3,19=11.399; p<0.001), mostrando un incremento de la expresión a las 8 semanas, respecto a los TPOVX de 3 (p<0.001), 16 (p<0.001) y 24 (p=0.002) semanas.

Por otra parte, es posible observar una mayor tasa de expresión por parte del RE $\beta$  que del RE $\alpha$  en esta región de corteza prefrontal.

### Variaciones por tratamiento

El ANOVA de una vía no mostró un efecto de los tratamientos sobre la expresión del RE $\beta$  de corteza prefrontal en los diferentes TPOVX, se observó una oscilación de la expresión del RE $\alpha$  de entre el 59.19-148.36%, sin mostrar significancia entre los tratamientos al compararlos con el grupo vehículo (Figura 20).

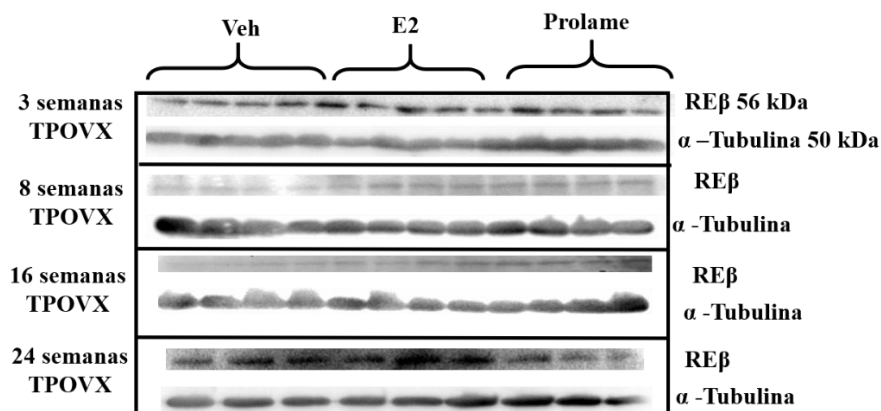


Figura 19. Contenido de la proteína del RE $\beta$  en corteza prefrontal. Se muestra una imagen representativa de la expresión del RE $\beta$  de la corteza prefrontal de ratas adultas jóvenes tratadas con vehículo, E<sub>2</sub> y prolame (n=6), así como la expresión de  $\alpha$ -Tubulina, la cual fue utilizada como control de carga.

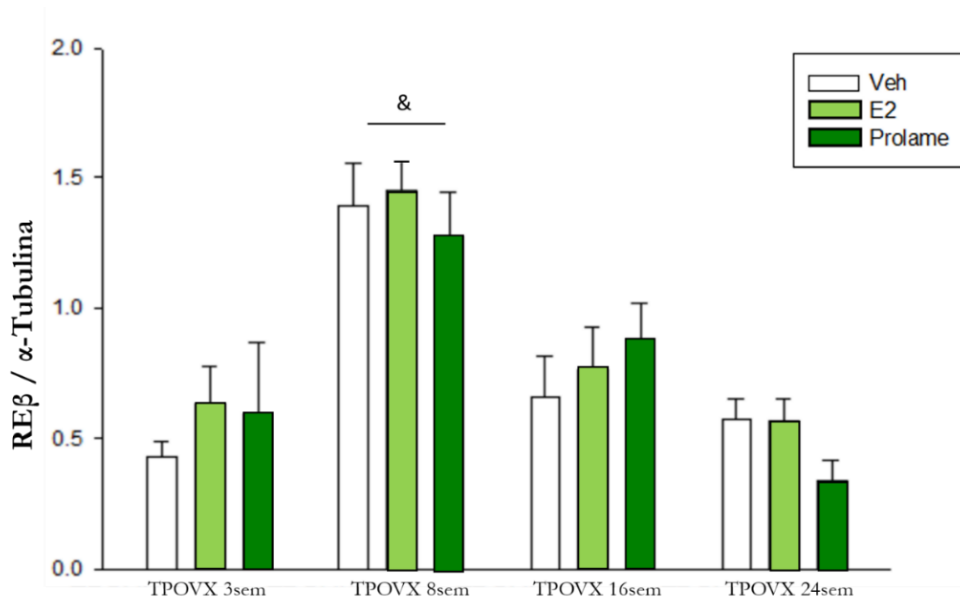


Figura 20. Efecto de E<sub>2</sub> y prolame sobre la expresión del REβ en corteza prefrontal de ratas hembra AJ a 3, 8, 16 y 24 POVX (n=6) y sometidas a FST, los resultados muestran la media y el error estándar; & muestra diferencias significativas vs 3, 16 y 24 semanas POVX, p<0.05.

## 7.5 Comparación en las tasas de expresión de los receptores respecto a la región disectada

Se realizó una estimación del coeficiente de expresión expresado en porcentaje (%), por parte de los receptores a los distintos TPOVX (3, 8, 16 y 24 semanas), así como en los distintos tratamientos utilizados de vehículo, E<sub>2</sub> y prolame. Se observó una mayor tasa de expresión total de ambos receptores (REα + REβ) en la región de hipocampo en comparación con la tasa de expresión mostrada en la región de corteza prefrontal.

Por otra parte, la tasa de expresión mostrada por el REα es mayor a la mostrada por el REβ en esta misma región de hipocampo; mientras que en la región de corteza prefrontal ambos receptores presentan una tasa de expresión muy similar (Tabla 2).

**Tabla 2. Tasa de expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  en hipocampo y corteza prefrontal con respecto a su tratamiento.**

TPOVX	Hipocampo (%)				Corteza prefrontal (%)				
	3s	8s	16s	24s	3s	8s	16s	24s	
RE $\alpha$ (%)	23.03	6.89	10.41	17.45	9.01	17.3	13.5	8.87	V e h
RE $\beta$ (%)	14.13	7.01	10.31	10.9	6.07	23.7	11.2	9.7	
Expresión total	RE $\alpha$ = 57.67%, RE $\beta$ = 42.32%				RE $\alpha$ = 49.01%, RE $\beta$ = 50.98%				
	2.41				1.53				
RE $\alpha$ (%)	15.34	14.75	11.94	13.7	16.7	15.6	10.9	10.04	E <sub>2</sub>
RE $\beta$ (%)	15.71	6.64	13.25	8.44	7.4	19	13.1	5.06	
Expresión total	RE $\alpha$ = 55.8%, RE $\beta$ = 44.16%				RE $\alpha$ = 53.2%, RE $\beta$ = 46.7%				
	2.83				1.67				
RE $\alpha$ (%)	16.79	7.06	13.08	16	9.77	17.2	11.5	11.54	P r o
RE $\beta$ (%)	17.15	6.72	14.73	8.77	8.6	22.1	15.3	5.88	
Expresión total	RE $\alpha$ = 52.8%, RE $\beta$ = 47.2%				RE $\alpha$ = 48%, RE $\beta$ = 52%				
	1.78				1.5				

Por otra parte, la influencia del TPOVX sobre el incremento/decremento de la expresión de los RE que fueron regulados por E<sub>2</sub> y prolame se resumen en la siguiente tabla donde se resumen los cambios significativos de los resultados con cada factor en hipocampo y corteza prefrontal:

**Tabla 3. Influencia del TPOVX sobre la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  de hipocampo y corteza prefrontal regulados por E<sub>2</sub> y prolame.**

Región	Factores		Expresión del RE $\alpha$	Expresión del RE $\beta$
Hipocampo	TPOVX	3	-	-
		8	↓	↓
		16	↓	↑ vs 8 sem

	(diferencias significativas vs 3 semanas)	24	sin cambios	↓
	Tratamiento (diferencias vs vehículo)	E <sub>2</sub>	↑ a las 8sem POVX	↑ a las 16sem POVX
		Prolame	Sin diferencias	Sin diferencias
	Corteza prefrontal	TPOVX (diferencias significativas vs 3 semanas)	3	-
8			sin cambios	↑
16				sin cambios
24				sin cambios
Tratamiento (diferencias vs vehículo)		E <sub>2</sub>	Sin diferencias	Sin diferencias
		Prolame		

## 8. Discusión

En el presente estudio se realizó un análisis del contenido de la proteína de los RE $\alpha$  y  $\beta$  en corteza prefrontal e hipocampo de ratas con TPOVX de 3, 8, 16 y 24 semanas para determinar si E<sub>2</sub> y prolame, administradas de maneja subcrónica, presentan un efecto sobre la regulación de la expresión de ambos receptores, y si esta regulación se mantiene a TPOVX más largos.

En años recientes ha cobrado importancia el estudio del papel que tiene el periodo en el que se inicia la TRE en relación con el tiempo de inicio de la menopausia sobre el efecto



antidepresivo de los estrógenos. En este sentido, algunos estudios clínicos muestran que el estado endocrino de las pacientes e incluso el tipo de estrógenos utilizados, es crucial para observar el efecto benéfico de la TRE sobre los síntomas depresivos. El objetivo de estos estudios fue determinar una “ventana de oportunidad terapéutica” para el inicio del tratamiento con estrógenos en relación al periodo perimenopaúsico, proponiéndose que la TRE es más efectiva si se administra en la fase de inicio de la perimenopausia que cuando se prescribe varios años después de la postmenopausia. En la rata se ha observado que el envejecimiento reproductivo, alrededor de los 9-15 meses de edad, se inicia con una etapa denominada estropausia, caracterizada por ciclos irregulares y niveles plasmáticos elevados de estradiol, lo que conduce a los animales a “estacionarse” en la etapa de estro durante un periodo largo. Y posteriormente entran en un periodo de diestro constante en el que los niveles hormonales disminuyen definitivamente (Estrada-Camarena, 2012). Tomando en cuenta lo anterior, los animales utilizados con los TPOVX de 3 y 8 corresponderían a hembras jóvenes, mientras que el de 16 y 24 semanas corresponderían a animales que iniciaron la etapa de periropausia. Debido a lo anterior mencionado sería importante estudiar la influencia de la edad sobre el efecto tipo antidepresivo de E<sub>2</sub> y prolame en animales de mediana edad, los cuales se encontrarían en la etapa de estropausia. Por lo cual, es importante realizar estudios en modelos animales que presenten una condición análoga al periodo de la perimenopausia en mujeres, como es el caso del modelo de menopausia simulado en el presente trabajo con la OVX realizada a las ratas. Además, la FST es útil para evaluar el posible efecto antidepresivo de los estrógenos, ya que induce una conducta conocida como “desesperanza aprendida”, la cual es una condición análoga a la depresión en humanos.

Existe evidencia de que en TPOVX cortos ocurre una regulación de la expresión de RE $\alpha$  y RE $\beta$ : después de 3 semanas POVX se ha observado una disminución de la expresión de los RE situados en la corteza y el hipocampo de las ratas (Jin, *et al.*; 2005). De manera similar Malikov y colaboradores (2013) encontraron una regulación positiva de la expresión del RE $\alpha$  y  $\beta$  por E<sub>2</sub> en células cultivadas *in vitro* tomadas del hipotálamo de ratas adultas jóvenes.

## **8.1 Influencia del tratamiento en la expresión de los RE**

Con respecto a los análisis realizados en hipocampo, fue posible observar una disminución en la expresión de la proteína del RE $\alpha$  y  $\beta$  tratados con vehículo a los diferentes intervalos de TPOVX, se observó una disminución significativa en la expresión del RE $\alpha$  a las 8 y 16 semanas POVX vs 3 semanas; mientras que por parte del RE $\beta$  únicamente se mostró una disminución significativa a las 8 semanas vs 3 semanas POVX. Lo cual demuestra que a mayor intervalo de TPOVX ocurre una regulación negativa de los RE, esto se relaciona con reportes que muestran una disminución en la transcripción de los genes que codifican para los RE como consecuencia de la OVX (Sarvarí, *et al.*, 2017). Opuesto a lo mostrado en hipocampo, los RE en los grupos control de corteza prefrontal muestran un incremento en la expresión de los RE en el tiempo subsecuente a las 3 semanas POVX, mostrando un incremento significativo en la expresión del RE $\beta$  a las 8 semanas vs 3, 16 y 24 semanas. Mientras que en el RE $\alpha$  la expresión del receptor disminuyó progresivamente sin llegar a mostrar valores significativos.

En relación al efecto de E<sub>2</sub>, se observó un incremento en la expresión del RE $\alpha$  en el hipocampo de ratas con TPOVX de 8 semanas; lo que coincide con estudios en modelos animales que describen un incremento de la regulación de la expresión del RE $\alpha$  en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratas hembra tratadas con E<sub>2</sub> y/o progesterona (Xin Liu & Haifei Shi, 2015). En otro estudio, se determinó el efecto de E<sub>2</sub>, utilizando concentraciones suprafisiológicas como fisiológicas, sobre la expresión del RE $\alpha$  en cultivos neuronales de células obtenidas del núcleo ventromedial hipotalámico de ratas hembra Wistar adultas jóvenes gonadalmente intactas, donde se encontró que las mediciones de la inmunofluorescencia del RE $\alpha$  muestran un incremento en la expresión del receptor (Malikov, *et al.*; 2013). También, se ha reportado una regulación positiva de E<sub>2</sub> sobre los niveles del ARNm del RE $\alpha$  en cultivos primarios neuronales provenientes de ratas Sprague Dawley adultas con 3 semanas de TPOVX (Devidze, *et al.*; 2005).

Malikov *et al.*; (2013) mencionó que el gen que codifica para el RE $\alpha$  posee en su región promotora dos ERE, en los cuales el complejo del receptor activado por su ligando se puede unir de manera directa para regular la transcripción de genes blanco, incluyendo su propio receptor. Dado lo anteriormente mencionado, es posible explicar que la modulación positiva que se observa en el RE $\alpha$  por E<sub>2</sub> puede implicar una regulación a nivel de la transcripción del

gen que posteriormente se refleje en un incremento en la expresión de la proteína. La regulación del RE $\beta$  en hipocampo por E<sub>2</sub> mostró diferencias significativas en cuanto a sus niveles de expresión únicamente a las 16 semanas POVX. Contrario a lo propuesto en la hipótesis, en ambos RE sólo se observó esta regulación significativa a uno de los TPOVX, ya que se esperaba un incremento en la expresión de ambos receptores con ambos tratamientos y en TPOVX cortos, es decir, de 3 y 8 semanas; sin embargo, la falta de diferencias significativas en la expresión del RE $\beta$  a las 3 y 8 semanas POVX, podría indicar que este receptor participa en la regulación de otras funciones en el hipocampo como son el proceso de diferenciación celular dependiente de estrógenos o en procesos antiproliferativos (Rozenbaum, 2008). Por otra parte, Jin *et al.* (2005), encontraron que en las ratas Sprague-Dawley adultas jóvenes tratadas con valerato de E<sub>2</sub> (0.03 mg/día) luego de 48 días POVX se observó un incremento en la expresión del RE $\beta$  tanto en hipocampo como en corteza prefrontal.

Nuestros datos indican que el grupo con 8 y 16 semanas POVX tratado con prolame muestra una disminución significativa en el RE $\alpha$  y RE $\beta$  en hipocampo vs el grupo tratado con E<sub>2</sub>; así también es posible observar una tendencia por parte de la expresión de los RE tratados con prolame, a disminuir su expresión con respecto al grupo control sin llegar a presentar valores significativos (Tabla 2); esto coincide parcialmente con una regulación a la baja en la expresión del RE $\alpha$  observado en ratas adultas jóvenes OVX y tratadas con estrógenos conjugados (Jin, *et al.*; 2005).

La función del RE también está regulada por la fosforilación, una vez que se une con el E<sub>2</sub>, siendo que esta fosforilación permite la activación de los RE y que a su vez promueve el inicio de la actividad transcripcional, lo que se ve reflejado en un incremento del nivel de la proteína. La fosforilación del RE ocurre por la acción de varias cinasas para modular la función del RE, incluyendo su interacción con la cromatina, el reclutamiento de los corre reguladores y la expresión génica (Anbalagan & Rowan, 2015). En nuestros resultados se observa una regulación positiva de la expresión del RE $\alpha$  y RE $\beta$  por E<sub>2</sub>, es probable que como parte del mecanismo de acción clásico del RE se lleve a cabo el reclutamiento de moléculas coactivadoras que promueven la transcripción de genes blanco, lo cual se vería reflejado en el incremento del nivel de expresión de la proteína (Xin Liu & Haifei Shi, 2015), es decir, el

mismo receptor. Como se ha descrito con anterioridad la unión de los RE con su ligando desencadena una serie de eventos intracelulares que finalizan en la inhibición o el favorecimiento de la transcripción, en el caso de E<sub>2</sub> se observa un incremento en la expresión de la proteína del RE $\alpha$  lo que podría indicarnos la interacción con coactivadores que promuevan la transcripción.

Es por esto, que sería importante el realizar un estudio que analice la actividad de corre reguladores que estén participando en estas condiciones experimentales, como podrían ser el coactivador SRC-1 y del correpresor N-CoR1 los cuales se ha reportado con anterioridad que participan en la transcripción de genes blanco interactuando con la regulación de ambos RE por parte de las hormonas. Estudios previos sobre la regulación de los corre reguladores implicados en la transcripción de genes asociados a los RE, respaldan el mecanismo molecular mediante el cual se inhibe la transcripción del gen RE $\alpha$  mediante la interacción entre un promotor y los correpresores N-CoR1 y HDAC1, que ejercen un efecto represivo sobre la cromatina (Amicis, *et al.*;2013); también se ha observado que la fosforilación del RE $\alpha$ , mediada por el grupo de proteínas AKT, incrementa la unión del receptor con el ADN y a su vez, incrementa su interacción con los coactivadores SRC1 y SRC3 en presencia de E<sub>2</sub>, promoviendo la transcripción (Anbalagan & Rowan, 2015).

El efecto de E<sub>2</sub> y prolame sobre la regulación de la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  no se observa a las 24 semanas POVX, lo que sugeriría que el efecto sobre la expresión del receptor únicamente se presenta durante un periodo muy breve de tiempo en estas condiciones experimentales de un tratamiento subcrónico de 3 inyecciones; lo cual coincide con estudios realizados en modelos animales por Jin *et al.* (2005) donde se muestra una regulación de los receptores en corteza prefrontal e hipocampo en TPOVX cortos (3 semanas POVX), donde también se sugiere que luego de un tiempo prolongado de supresión hormonal es probable que el organismo ya se encuentra adaptado a esta falta de estrógenos provocando cambios en la sensibilidad de los RE y provocando la disminución de la actividad transcripcional. Regiones cerebrales como corteza prefrontal e hipocampo son el blanco de tratamientos antidepresivos, incluyendo a los estrógenos, siendo los RE un factor importante para que se establezca este tipo de efecto; por lo que si la actividad transcripcional de los RE se ve afectada esto podría explicar la pérdida del efecto (Jin *et al.*; 2005; Estrada-Camarena, 2012).

De igual forma, es posible que como mencionan Jin *et al.* (2005) los diferentes estrógenos utilizados en la TRE podrían tener diferentes efectos reguladores en la expresión de los subtipos del RE, lo que en parte podría explicar, por qué se ha observado clínicamente que diferentes compuestos estrogénicos presentan efectos distintos dependiendo del órgano blanco, es por esto que para poder evitar un sesgo en los resultados, en estudios posteriores sería necesario realizar grupos control en una región donde ya se hayan observado antes una regulación positiva con E<sub>2</sub>, como por ejemplo el núcleo ventromedial hipotalámico.

Los resultados obtenidos con respecto a la regulación de los RE por los tratamientos hormonales no fueron los esperados, ya que no se observó una regulación secuencial de los RE, donde en la figura 14, por ejemplo, se observa una regulación positiva por E<sub>2</sub> del RE $\alpha$  a las 8 semanas pero no a las 3 semanas, así como en el caso del RE $\beta$  donde también se observa un incremento en la expresión a las 16 semanas en el grupo tratado con E<sub>2</sub>, pero este efecto no se muestra a las 3 y 8 semanas POVX (figura 16). Existe cierta tendencia mostrada en la regulación de los RE mostrada en ambas regiones cerebrales, sin embargo, estas no muestran valores significativos por lo que podría ser pertinente realizar alguna prueba empleando la técnica de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para poder detectar la presencia de ambos RE en las muestras de tejido.

## **8.2 Influencia del TPOVX en la expresión de los RE**

Al observar los resultados obtenidos de los diferentes TPOVX independientes del tratamiento, fue posible observar tanto en hipocampo como en corteza prefrontal que existe una influencia de la OVX sobre la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$ . Se tiene evidencia de que en ratas de mediana edad, analizadas 5 semanas después de la ovariectomía presentan una disminución en la transcripción del gen *Esr1*, el cual codifica para el RE $\alpha$  y se refleja en una disminución del ARNm del propio receptor (Sarvarí, *et al.*;2017).

La OVX es un modelo que pretende simular la condición endócrina que se presenta durante la menopausia en mujeres, donde la disminución de estrógenos se ve reflejada en el contenido de la proteína de los RE (Estrada-Camarena *et al.*; 2011), lo cual podemos observarlo en el

grupo tratado con vehículo donde se observa una disminución de los niveles de expresión del RE $\alpha$  a las 16 semanas comparado con el TPOVX inicial de 3 semanas en hipocampo.

Reportes anteriores también indican que la OVX provoca la disminución de la expresión de los RE $\alpha$  y RE $\beta$  en corteza e hipocampo con 48 días POVX (Jin *et al.*; 2005); por lo que es probable que la regulación de las hormonas E<sub>2</sub> y prolame por los receptores se vea afectada por el factor de la OVX, lo cual disminuiría la expresión de los receptores, hasta llegar a un punto donde la expresión será similar a la del control o un poco menor a esta.

Los resultados obtenidos de corteza prefrontal podemos observar un incremento significativo del RE $\beta$  a las 8 semanas posteriores a la cirugía, esto podría haber sido resultado de la activación de algunos mecanismos de regulación que intentaran compensar la falta de hormona por la OVX, otra posible explicación es la regulación del receptor por medio de una vía de señalización alterna, como un mecanismo de señalización no clásico o no genómico, donde estos mecanismos se basan en la activación de la expresión génica por RE que no se unen directamente al ADN.

Otra vía potencialmente importante de la acción del estrógeno está constituida por los llamados efectos no genómicos muy rápidos de ciertos ligandos. Como, por ejemplo, en las células endoteliales, donde los efectos de membrana mediados por E<sub>2</sub> conducen a la activación secuencial de moléculas como ras, raf, y otras cinasas desencadenando la activación de la vía de señalización de las MAP cinasas. Se ha sugerido que esto conduce a la activación de la sintetasa de óxido nítrico endotelial y a la liberación de óxido nítrico. En las neuronas, los efectos de la membrana del estrógeno conducen a la estimulación de src, ras, MEK y MAPK, lo que resulta en un incremento de la neuroprotección, a su vez los efectos del estrógeno pueden estar involucrados en el control de la apoptosis, la proliferación celular y la diferenciación (Nilsson, *et al.*, 2001)

Los complejos RE actúan a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción y elementos de respuesta (Fuentes & Silveyra, 2019). De manera que la

señalización indirecta de estrógenos influye en la activación o supresión de la expresión génica diana como la unión del RE con factores de transcripción (Sp1 o AP1) que promuevan la transcripción de genes blanco o la inhibición de la misma por medio de la unión con proteínas como NFkB (Nilsson, *et al.*;2001).

Existen reportes clínicos que indican la existencia de mecanismos compensatorios asociados a la edad, los cuales se han observado durante la etapa del envejecimiento cerebral que conlleva la pérdida de funciones en los distintos ejes de modulación y la falta de estrógeno, en el caso de las hembras (Shin-Lei, *et al.*; 2014); la presencia de estos mecanismos de compensación podría ser una posible explicación para el incremento observado en el RE $\beta$  en corteza prefrontal a las 8 semanas POVX, ya que, como también se ha mencionado, existen periodos de acoplamiento a la falta de estrógeno durante la etapa de supresión hormonal (Estrada-Camarena, 2012). Es posible que como consecuencia de estos mecanismos de compensación se haya promovido la sobreexpresión de los RE con la finalidad de captar toda la hormona disponible en ese momento.

### **8.3 Diferencias en la regulación de los RE, respecto a la región cerebral analizada**

Tal como se observa en la Tabla 2 en el grupo tratado con vehículo, el RE $\alpha$  presenta un coeficiente de expresión más alto que el del RE $\beta$  en hipocampo, es probable que el RE $\alpha$  presente un mayor protagonismo en la regulación de funciones en esta región que el RE $\beta$ ; contrario a lo que ocurre en corteza prefrontal donde ambos receptores tienen un coeficiente de expresión similar.

Mientras que en el grupo tratado con E<sub>2</sub> se observó un mayor coeficiente de expresión por parte del RE $\alpha$  que el mostrado por el RE $\beta$ , esto contrasta con lo demostrado anteriormente por Jin, *et al.*; (2005) donde se indica que la regulación de los RE por E<sub>2</sub> está mediada mayormente por el RE $\beta$ . Otras investigaciones han afirmado que E<sub>2</sub> interviene en la regulación transcripcional de ambos RE en cultivos neuronales de hipotálamo (Malikov, *et al.*; 2013), pero esta regulación podría ser dependiente de la región.

La aseveración anterior podría verse reforzada al observar en la Tabla 2 los resultados obtenidos del grupo tratado con prolame, donde se aprecia en hipocampo una mayor tasa de expresión por parte del RE $\alpha$ , mientras que en corteza prefrontal se muestra una tasa de expresión muy similar en ambos RE. Dado lo anterior podríamos concluir que, tal como afirma Malikov, *et al.*; (2013), la regulación particular de las funciones establecidas en las distintas regiones cerebrales y dadas por los RE dependen del nivel de expresión de estos y del contexto hormonal.

Por último, los datos conductuales del laboratorio demuestran un cese del efecto tipo antidepressivo presentado por E<sub>2</sub> a las 16 y 24 semanas POVX, coincidiendo parcialmente con los resultados obtenidos ya que en el RE $\alpha$  se muestra una regulación significativa de la expresión a las 8 semanas y en el RE $\beta$  a las 16 semanas POVX; sin llegar a observarse esta regulación significativa a las 24 semanas en ninguno de los dos RE en hipocampo y corteza prefrontal. De igual forma, concuerda con lo reportado por Estrada-Camarena *et al.* (2011) donde los resultados de dicho estudio mostraron una variación en la conducta dependiente del compuesto estrogénico empleado y el TPOVX al cual se probaron, ya que el cese del efecto tipo antidepressivo por parte de E<sub>2</sub> en ratas adultas jóvenes sometidas a la FST se mostró al emplear cualquiera de las dosis de la hormona a las 12 semanas POVX, dado lo cual se planteó la posibilidad de que luego de una disminución de E<sub>2</sub> a largo plazo inducida por la OVX, haya cambios en los RE cerebrales que podrían influir en el efecto tipo antidepressivo de E<sub>2</sub>. Este estudio también mostró que las ratas con TPOVX largos no muestran una respuesta antidepressiva ante los tratamientos con E<sub>2</sub> ya sean de forma aguda o crónica.

Los resultados obtenidos en cuanto a la regulación de los RE en ambas regiones cerebrales de corteza prefrontal e hipocampo fueron realizados como una posible aproximación para poder confirmar si esta regulación de los receptores por las hormonas explicaba el efecto antidepressivo mostrado por anterioridad (Hernández-Hernández, en proceso de publicación). Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, ya que la regulación observada no puede atribuirse a un patrón o direccionalidad del efecto de las hormonas debido a que las pruebas estadísticas no muestran una significancia a pesar de que en algunas de los grupos se observa una regulación por parte de los tratamientos. Ya que en términos generales, si se observa una regulación positiva, pero esta no se observa probablemente por algunos factores que



interfieren con la claridad de los resultados, esto puede deberse a que se muestran errores estándar muy grandes y habría que limpiar más los resultados así como tener otros duplicados que nos confirmen que las proteínas no se degradaron durante el procedimiento o que no hubo contaminación de algún tipo, también sería importante realizar controles sin nado para poder descartar el que los resultados se vean alterados por la presencia de glucocorticoides o estrés en las ratas. También, es necesario realizar experimentos con otras muestras para lograr identificar la regulación positiva de los RE, la cual ya se ha observado en el hipotálamo por lo que sería ideal el realizar un grupo control en estructuras como el núcleo ventromedial del hipotálamo, donde ya se ha observado el incremento de la expresión de los RE por E<sub>2</sub> la cual también debería observarse en corteza prefrontal e hipocampo.

## 9. Conclusiones

1. El TPOVX ejerce un efecto negativo sobre la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$ , ya que su expresión disminuirá conforme el TPOVX sea mayor, alcanzando un nivel de expresión similar al del control.
2. E<sub>2</sub> regula positivamente, en el hipocampo, la expresión del RE $\alpha$  a las 8 semanas y del RE $\beta$  a las 16 semanas POVX, esta regulación no es observable a las 3 y 24 semanas POVX.
3. Prolame no regula la expresión de los RE  $\alpha$  y  $\beta$ .

4. Existe una regulación diferencial de los RE entre las regiones cerebrales por parte de  $E_2$ , donde la mayor tasa de expresión de ambos RE se observa en el hipocampo de ratas OVX.
5. El RE $\alpha$  presenta una tasa de expresión mayor a la del RE $\beta$  en hipocampo.

## 10. Perspectivas

- Es necesario considerar grupos controles que no sean sometidos a la FST, de forma que el factor del estrés provocado por la prueba sea eliminado como una variable no controlada.
- Una de las limitantes de este trabajo fue la edad de las ratas empleadas, donde el envejecimiento de los órganos no fue un factor a considerar; es por esto que sería importante el realizar un estudio con hembras de mediana edad para poder identificar la influencia de la edad en estas condiciones experimentales.
- Determinar si algunos de los correguladores están implicados en la regulación de lo RE, así como algunos factores como el Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

- Analizar la expresión de los RE en una región cerebral, como el núcleo ventromedial hipotalámico, donde ya se ha establecido una regulación positiva de la expresión de los RE por E<sub>2</sub>.

## 11. Anexos

### 1) Índice de abreviaturas

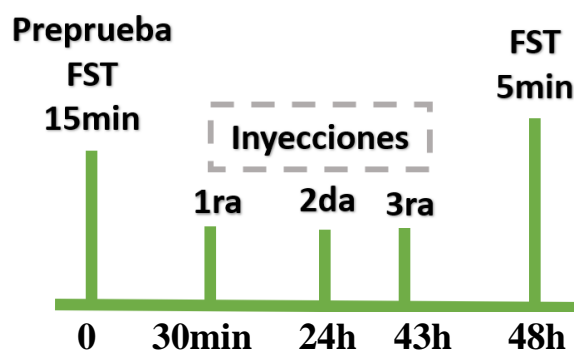
Factor neurotrófico derivado del cerebro	BDNF
Dexametasona	Dex
Desipramina	DMI
17 $\beta$ -estradiol o Estradiol	E <sub>2</sub>
Etinil estradiol	EE <sub>2</sub>
Fluoxetina	FLX
Hormona folículo estimulante	FSH
Prueba de nado forzado	FST
Hormona reguladora de gonadotropinas	GnRH
Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	HHA
Peroxidasa de rábano	HRP
Hormona Luteinizante	LH
Ovariectomía	OVX
Post-ovariectomía	POVX
Receptor de estrógenos $\alpha$ y $\beta$	RE $\alpha$ y $\beta$
Tiempo post-ovariectomía	TPOVX
Terapia de reemplazo estrogénico	TRE

## 2) Relación entre PM de la proteína de interés con % de gel

Tamaño de proteína (kDa)	Porcentaje de acrilamida del gel
4-40	20%
12-45	15%
10-70	12%
15-100	10%
25-200	8%

## 3) Metodología: Esquema de tratamiento

### Esquema de administración de tratamiento



Esquema de administración de tratamiento de acuerdo con su respectivo grupo Vehículo, E<sub>2</sub> o prolame; los cuales fueron administrados por medio de 3 inyecciones a los 30 minutos, 24 y 43 horas después de la pre-prueba de FST.

## 4) Soluciones

### ***Phosphate-Buffered saline (PBS 1X)***

NaCl = 8gr

KCl = 0.2gr

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 1.44gr

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0.24gr

Ajustar pH 7.4 y aforar con agua miliQ a 1L

### **Solución de bloqueo**

Leche en polvo descremada (Svelty) = 1.2gr

Disolver en 12ml de PBS 1X

\* 12ml de solución de bloqueo para cada membrana

### ***Buffer de Corrida 1X***

Tris Base = 3.03gr

Glicina = 14.4gr

SDS = 1gr

Ajustar pH 8.3 y aforar a 1L

### ***Radioimmunoprecipitation assay buffer (Buffer RIPA)***

Tris HCl 1M pH 7.2 tomar 0.75ml

EDTA 0.5M pH 8 tomar 0.15ml

Tritón 100x tomar 0.15ml

Deoxicolato pH 11 tomar 3ml

Agua miliQ tomar 5.5 ml

1 pastilla de inhibidores de proteasas por cada 10ml de Buffer

### **Buffer de Transferencia**

Tris Base 25mM tomar 3.03g

Glicina 192mM tomar 14.4g

Metanol tomar 200ml

Aforar a 1L con agua destilada

### **5) Reactivos**

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>	<b>Descripción</b>	<b>No. Lote</b>	<b>No. de catálogo</b>
Anticuerpo RE $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	monoclonal anti-mouse,	A0318	sc-71064
Anticuerpo RE $\beta$			J1217	sc-53494
Anticuerpo $\alpha$ -Tubulina	SIGMA Company	monoclonal anti-mouse	083M4847V	T6074
Anticuerpo 2°	Santa Cruz Biotechnology	goat anti- mouse	H0415	sc-2005
Luminol	Santa Cruz Biotechnology	Western blotting luminol reagent	D0512	sc- 2048
cOplete Tablets mini EASY pack	Hoffmann-La Roche	Pastilla que contiene cóctel de inhibidores de proteasas (pronasa, thermolysina,	11914200	REF 04693124001

		quimiotripsina, papaína)		
Precision Plus Protein Dual Color Standars	BIORAD	Marcador de peso molecular	350002463	161-0394

## 11. Referencias

1. Águila, B. Verdecia, F. Cué, M. 1999. Estriol y sus derivados. Comportamiento de la tecnología en el mundo. *Revista Cubana Farmacológica* 33 (3):195-200pp
2. American Cancer Society. 2015. Terapia hormonal en la menopausia y el riesgo de padecer cáncer. Recuperado del sitio web: <https://bit.ly/2UnYPMr>
3. American Psychiatric Association. 2014. Trastornos depresivos (155- 189). En: *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, DSM-V*. 5ta Ed. Editorial Médica Panamericana. Arlington, Texas. EUA.
4. Amicio, F. Russo, A. Avena, P. Santoro, M. Vivacqua, A. Bonofiglio, D. Mauro, L. Aquila, S. Tramontano, D. Fuqua, S. Andò, S. 2013. In vitro mechanism for down-regulation of ERalpha expression by epigallocatechin gallate in ER+/PR+ human breast cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 57 (5): 840-853pp.

5. Anbalagan, M. Rowan, B. 2015. Estrogen receptor Alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 418: 264-272pp.
6. Barret, E. K. Barman, M. S. Boitano, S. Brooks, L. H. 2010. Capítulo 25. Gónadas: Desarrollo y función del aparato reproductor (391-429pp). En *Ganong Fisiología médica*. 23ª ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana, S.A. de C.V. 689pp.
7. Barker, M. J. Galea, A. M. 2009. Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *General and Comparative Endocrinology*. 164 (1), 77-84pp.
8. Belló, M. Puentes-Rosas, E. Medina-Mora, M. E. Lozano, R. 2005. Prevalencia y diagnóstico de la depresión en población adulta en México. *Salud pública de México*. 47 sup1: S4-S11. México.
9. Björnström, L., & Sjöberg, M. 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, 19 (4), 833–842.
10. Blurton-Jones, M. Tuszynski, M. H. 2006. Estradiol-induced modulation of estrogen receptor- $\beta$  and GABA within the adult neocortex: a potential transsynaptic mechanism for estrogen modulation of BDNF. *The Journal of Comparative Neurology*. 499: 603-612pp. USA
11. Cummings, J. L. 1993. The neuroanatomy of depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 54 (11, Suppl), 14-20
12. Dagnino, A. 2012. Modelos animales para el estudio del estrés y las conductas depresivas. *Revista Farmacológica de Chile*. (Artículo de Revisión). 5 (1): 19-26pp.
13. Devidze, N. Mong, J. A. Jasnow, A. M. Kow, L. Pfaff, W. 2005. Sex and estrogenic effects on coexpression of mRNAs in single ventromedial hypothalamic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (40): 14446-14451pp.
14. Espinoza, J. Hernández, M. Aranda, G. Rojas, F. Manzo, J. Coria, G. Aguilar, Y. Soto, A. 2013. Artículo de Revisión. El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática (2-23pp). En: *Revista electrónica de Neurobiología*. 4 (8). México.



15. Estrada-Camarena, E. Fernández-Guasti, A. López-Ruvalcaba, C. 2003. Antidepressant-Like Effect of Different Estrogenic Compounds in the Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology*. 28:830-838pp.
16. Estrada-Camarena, E., López-Ruvalcaba, C., Hernández-Aragón, A., Mejía-Mauries, S., & Picazo, O. 2011. Long-term ovariectomy modulates the antidepressant-like action of estrogens, but not of antidepressants. *Journal of Psychopharmacology*, 25(10), 1365–1377pp.
17. Estrada-Camarena, E. 2012. Factores que modifican el efecto antidepresivo de los estrógenos: evidencia preclínica. *Salud Mental*. 35 (5). 419-426pp.
18. Flores Ramos, M. Martínez-Mota, L. 2012. Perimenopausia y trastornos afectivos: aspectos básicos y clínicos. *Salud Mental*. 35:231-240pp.
19. Fuentes, N. Silveyra, P. 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 116: 135-170pp.
20. Goldman, H. Howard. 1996. Trastornos del estado de ánimo: Depresión Mayor (327-330pp). En *Psiquiatría General*. 4ta ed. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. Bolivia. 665pp.
21. González, G. Alvarado-Vázquez, N. Fernández, J.M. Cruz-Robles, D. del Valle, L. Pinzón, E. Torres, I. Rodríguez, E. Zapata, E. Gómez-Vidales, V. Montaña, L. F. de la Peña, A. 2010. The antithrombotic effect of the aminoestrogen prolame (N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17B-YL)-3-hydroxypropylamine) is linked to an increase in nitric oxide production by platelets and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 208 (1): 62-68pp.
22. Guadarrama, L. Escobar, A. Zhang, L. 2006. Bases neuquímicas y neuroanatómicas de la depresión. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 49 (2): 66-72pp.
23. Jaimez, R. Cooney, A. Jackson, K. Lemus, A. E. Lemini, C. Cárdenas, M. García, R. Silve, G. Larrea, F. 2000. In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17b-aminoestrogens. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 73: 59-66pp.
24. Jin, M. Jin, F. Zhang, L. Chen, Z. Huang, H. 2005. Two estrogen replacement therapies differentially regulate expression of estrogen receptors alpha and beta in the hippocampus and cortex of ovariectomized rat. *Molecular Brain Research*. 142 (1): 107-114pp.

25. Koeppen, M. B. Stanton, A. B. 2009. Capítulo 43. Los aparatos reproductores masculino y femenino (758-798pp.) En *Berne y Levi Fisiología*. 6ta ed. Editorial ELSEVIER. España. 800pp.
26. Lemini, C. Rubio-Po C, Mandoki JJ, Mendoza-Patiio N, de la Pena A, Cruz F, Zavala E, Silva G, MondragónGarcía J, Fernandez-G JM. Soriano-García M. Toscano AR. 1985. The anticoagulant effect of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5 (10)estra- trien-17@-yl)-3-hydroxypropylamine, a novel amino-estrogen. *Steroids* 45 (2): 159-170pp.
27. Lemini, C. Cruz-López, B. Martínez-Mota, L. 2013. Participation of estrogen receptors in the antidepressant-like effect of prolame on the forced swimming test. *Pharmacobiology, Biochemistry and Behavior*. 103: 659-665pp. México.
28. Lemini, C. García-Albor, E. Cruz-López, B. Matamoros-Trejo, G. Martínez-Mota, L. 2016. Differential effect of 17 $\beta$ -aminoestrogens prolame, butolame and pentolame in anxiety and depression models in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 64: 102–108pp. México.
29. Malikov, V. Madeira, M. D. 2013. Regulation of ERA Protein Expression by 17 $\beta$ -Estradiol in Cultured Neurons of Hypothalamic Ventromedial Nucleus. *Neurochemical Research*. 38: 82-89pp.
30. Morato, L. Malacara, J. M. 2006. Condiciones metabólicas y hormonales en la menopausia. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 14 (3): 149-155pp.
31. Nilsson, S. Mäkelä, S. Treuter, E. Tujague, M. Thomsen, J. Andersson, G. Enmarck, E. Pettersson, K. Warner, M. Gustafsson, J. 2001. Mechanism of Estrogen Action. *Physiological Reviews*. 81 (4):1535-1565pp.
32. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. Estatus actual de la depresión. Recuperado del sitio web: <https://bit.ly/2Jb4u2i>
33. Ortega-Domínguez, B. Herrera-Ramírez, M. Tecalco-Cruz, A. 2015. Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 18 (2): 131-143pp.
34. Pandya, M. Altinay, M. Donald, A. Malone, M. D. Anand, A. 2012. Where in the Brain Is Depression? *Current Psychiatry Report*. 14 (6): 634-642pp.
35. Paxinos, G. Watson, C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6ta ed. Academic Press. 456pp.USA.

36. Rozenbaum, H. 2008. Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM). *EMC Ginecología y Obstetricia*. 44 (2): 1-8pp.
37. Sárvari, M. Kalló, I. Hrabovszky, E. Solymosi, N. Liposits, Z. 2017. Ovariectomy alters gene expression of Hippocampal formation in middle-aged rats. *Endocrinology*. 158 (1): 69–83pp. USA.
38. Sequeira, A. C., & Fornaguera, J. T. 2009. Neurobiología de la depresión. *Revista mexicana de neurociencia*. 10 (6): 462–478pp. México.
39. Tortora, G. Derrickson, B. 2006. Cap. 28.3 El ciclo reproductor femenino (160-162pp). En: *Principios de Anatomía y Fisiología*. 13va ed. Editorial médica Panamericana. 1340pp.
40. Shin-Lei, P. Dumas, J. Park, D. Peiyang, L. Francesca, M. Filbey, C. McAdams, J. Pinkham, A. Adinoff, B. Zhang, R. Lu, H. 2014. Age-related increase of resting metabolic rate in the human brain. *Neuroimage*. 98: 176-183pp.
41. Vargas-Hernández, V. M. Acosta-Altamirano, G. Moreno-Eutemio, M. A. Vargas-Aguilar, V. M. Flores, Barrios, K. Tovar-Rodríguez, J. M. 2013. Terapia hormonal de reemplazo durante la menopausia. Del riesgo al beneficio. *Revista del Hospital Juárez de México*. 80 (4): 251-261pp.
42. Vega-Rivera, N. Gallardo-Tenorio, A. Fernández-Guasti, A. Estrada-Camarena, E. 2016. The Post-Ovariectomy Interval Affects the Antidepressant-Like Action of Citalopram Combined with Ethynyl-Estradiol in the Forced Swim Test in Middle Aged Rats. *Pharmaceuticals*. 9 (21): 1-12pp. México.
43. Walf, A. Paris, J. J. Frye, C. 2009. Chronic Estradiol Replacement to Aged Female Rats Reduces Anxiety-like and Depression-like Behavior and Enhances Cognitive Performance. *Psychoneuroendocrinology*. 34 (6): 909-916pp.
44. Xian Liu & Hafei Shi. 2015. Regulation of Estrogen Receptor  $\alpha$  Expression in the Hypothalamus by Sex Steroids: Implication in the Regulation of Energy Homeostasis. *International Journal of Endocrinology*. 17pp
45. Yamada, S. Noguchi, D. Ito, H. Yamanouchi, K. 2009. Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor -immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain. *Neuroscience Letters* 463 (2): 135–139pp.

46. Yang, F. Ma, Q. Liu, Z. Li, W. Tan, Y. Jin, C. Ma, W. Hu, Y. Shen, J. Ohgi, A. Telese, F. Rosenfeld, M. 2017. Glucocorticoid Receptor:MegaTrans Switching Mediates Repression of an ER $\alpha$ -Regulated Transcriptional Program. *Molecular Cell*. 66 (3): 321-331pp.