

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Identificación de proteínas que se unen a coumestrol en la membrana de enterocitos de yeyuno en ratón adulto CD1

T E S I S

Para obtener el grado de

Maestro en Biología de la Reproducción Animal

Presenta:

Biol. Exp. Pablo León Ortiz

Comité tutorial:

Co-Directores: Dr. Héctor Serrano

Dr. Arturo Salame Méndez

Asesor: Dr. José Bonilla Delgado

México, D.F.

Septiembre, 2014

Comité Tutorial:

Co-DIRECTORES

Dr. Héctor F. Serrano

Profesor titular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Email: hser@xanum.uam.mx

Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Profesor titular

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Email: asam@xanum.uam.mx

Asesor Externo

Dr. José Bonilla Delgado

Secretaría de Salud

Hospital Juárez de México

Investigador en Ciencias Médicas **Nivel “C”**

Email: jose.bonilla@salud.gob.mx

El presente trabajo se realizó con el apoyo del programa de becas para posgrados emergentes de la UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA para el primer año, así como al dado por el Programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la misma institución, que actualmente pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 302758

Miembros del Jurado

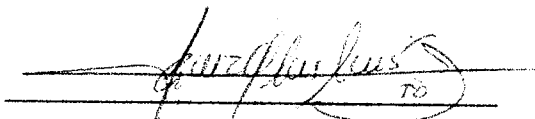
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Identificación de proteínas que se unen a coumestrol en la membrana de enterocitos de yeyuno en ratón adulto CD1" que presentó el Biólogo Experimental Pablo León Ortiz el día 26 de Septiembre de 2014.

Sinodales

Presidente

Dr. José Luis Gómez Olivares
Profesor titular "C"

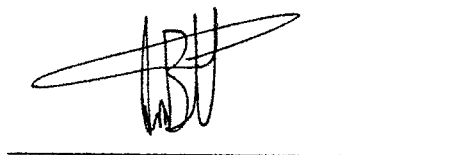
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Email: gool@xanum.uam.mx



Secretario

Dr. José Bonilla Delgado
Investigador en Ciencias Médicas Nivel "C"


Secretaría de Salud
Hospital Juárez de México
Email: jose.bonilla@salud.gob.mx



Vocal

Dra. Marcela Vergara Onofre
Profesor titular "C"

Departamento de sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
Email: mvergara@correo.xoc.uam.mx



Vocal

Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz y Celis
Profesor titular "C"

Departamento de Producción Agrícola
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
Email: jjperez1_1999@yahoo.com



Dedicatorias

A mi madre **Blanca Ortiz Cuevas**, por sus oraciones, formarme y darme la fortaleza necesaria para afrontar los retos que ofrece nuestro camino por este planeta, y que llamamos vida. **Gracias: “Sin ti no estaría hoy en esta etapa de mi vida”**

M.en Biol. Exp. Sheila Irais Peña Corona, por su amistad, honestidad, y a su apoyo en el estudio. **Gracias**

A todos mis profesores, que colaboraron para formarme en el aprendizaje de la Investigación Científica. **¡Muchas gracias!**

A mis compañeros de la Maestría de Biología de la Reproducción Animal y al M. en Biol. Exp. Guillermo Mora Ramiro. Por su apoyo en el proceso académico. **Gracias**

Agradecimientos

A mi maestro el **Dr. Héctor F. Serrano**, por sus consejos, paciencia, por ser mi guía y enseñarme que “**la inteligencia está en la constancia, búsqueda y práctica del conocimiento científico de todos los días**”; pero sobre todo por ser mi **MAESTRO**.
¡Muchas Gracias!

Dr. Arturo Salame Méndez, por su ánimo, su jovialidad, comentarios y apoyo que he recibido. **¡Gracias Profesor!**

Dr. José Bonilla Delgado por su animó, franqueza, apoyo, pero sobre todo por considerarme un amigo. **¡Gracias por tu amistad!**

M. Biol. Exp. Sheila Irais Peña Corona, por tus opiniones, tu apoyo en el estudio, y tu paciencia en esos días de neurosis. **¡Gracias amiga!**

M. Biol. Exp. Enrique Mendieta Márquez, por toda su ayuda, enseñanzas y asesorías en esos momentos y dudas existenciales, que son muchas. **¡Gracias Profesor!**

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. Fitoestrógenos.....	6
3.2. Efectos del Coumestrol en la fisiología reproductiva de animales domésticos	7
3.3. Efectos del Coumestrol en animales silvestres en cautiverio.....	10
3.4. Mecanismo de acción del Coumestrol	12
3.5. Tipos de transporte en las membranas celulares	14
3.6. Proteínas transportadoras de membrana de enterocitos de colesterol y sustancias lipófilicas	17
3.7. Proteínas de transporte en el plasma.....	17
4. ANTECEDENTES	19
5. JUSTIFICACIÓN	22
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
8. HIPOTESIS.....	24
9. OBJETIVO GENERAL	25
10. OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
11. MATERIALES Y METODOS	25
11.1. Obtención de enterocitos.....	26
11.2. Obtención de fracciones membranales de enterocitos	29

11.3. Precipitación de proteínas y cuantificación.....	30
11.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	31
11.5. Detección en gel de poliacrilamida de las proteínas de membrana de enterocitos que se unen a Coumestrol	32
12. RESULTADOS	34
12.1. Precipitación de proteínas: ácido tricloroacético y acetona fría	39
12.2. Separación electroforética de las proteínas aisladas de membranas de enterocitos de yeyuno	42
13. DISCUSIÓN.....	47
14. CONCLUSIONES.....	53
15. CONSIDERACIONES.....	54
16. PERSPECTIVAS	55
17. REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del 17 β -estradiol y Coumestrol.	6
Figura 2. Estrategia experimental de estudio.	26
Figura 3. Dispositivo de inyección de fluidos.....	27
Figura 4. Dispositivo de lavado y disgregación del epitelio intestinal (Caja multipozos).	29
Figura 5. Método de deshidratación y absorción de Coumestrol en proteínas separadas electroforéticamente (gel deshidratado).	33
Figura 6. Microfotografías en contraste de fases de enterocitos con tinción de SUDAN III (400X).....	35
Figura 7. Micrografía de contraste de fases de la desestabilización de membrana de enterocitos con Triton X-100 (400X).	36
Figura 8. Efecto de la concentración de Triton X-100 en la disolución de membranas..	37
Figura 9. Espectro de absorción de absorción del Triton X-100, en amortiguador fosfatos-citrato.....	40
Figura 10. Electroferogramas de proteínas aisladas de diferentes preparaciones de enterocitos de ratón.	44
Figura 11. Incubación de proteínas de membrana de epitelio intestinal en metanol al 50 % con una concentración de COU al 50 μ g/mL.	45
Figura 12. Gel lavado toda la noche con ácido acético al 10%.....	46
Figura 13. Electroferograma con diferentes tinciones.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las metodologías utilizadas para la obtención de los enterocitos de yeyuno de ratón de la cepa CD1.....	38
Tabla 2. Efecto de la precipitación de proteínas utilizando ácido tricloroacético (TCA).	41
Tabla 3. Comparación de la cuantificación de la concentración de proteínas por ácido bicinconínico (BCA).....	43

Abreviaturas

ABC: Proteínas transportadoras de la familia del casete de unión a ATP

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albumina sérica bovina

CBG: Globulina de unión de corticosteroides

COU: Coumestrol

E2: Estradiol

ER: Receptores de estrógenos

EREs: elementos de respuesta a estrógenos

GLUT: Proteínas facilitadoras del transporte de glucosa

HSD: Hidroxiesteroide deshidrogenasa

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SGLT: Transportadores de glucosa acoplados a sodio

SHBG: Globulina de unión a hormonas sexuales

T: Testosterona

T4: Tetrayodotironina

TBG: Globulina unidora de tiroxina

1. RESUMEN

El proceso reproductivo de los animales requiere de la energía que se obtiene de los alimentos. Sin embargo, en ellos también pueden estar presentes compuestos que interfieren potencialmente con la fisiología y control de la reproducción. Tal es el caso de los fitoestrógenos, compuestos de origen vegetal estructuralmente similares a las hormonas esteroides con capacidad de interactuar con los receptores a estrógenos (ERs) y promover o inhibir la respuesta fisiológica a los estrógenos.

Una de las funciones características de las membranas celulares es la permeabilidad selectiva que permite el intercambio controlado de substratos iones y moléculas específicas. En la membrana de las células existen varias proteínas encargadas de transportar y facilitar el movimiento de moléculas lipófilicas, como colesterol, vitaminas A, D o polifenoles. Ejemplos de ellas son, la proteína transportadora NPC1L1, SR-B1, la translocasa de grasas CD36, además de cuatro miembros de la familia de proteínas transportadoras caracterizadas por tener un casete de unión a ATP: ABCA1, ABCG1, ABCG5 y ABCG8. En el suero y líquido intercelular, se presentan otro tipo de proteínas capaces de unir compuestos lipofílicos incluyendo la globulina que une hormonas sexuales estradiol y testosterona (SHBG), la globulina de unión de corticosteroides (CBG) y la globulina unidora de tiroxina (TBG). Además de estos transportadores específicos, algunos otros como, la albúmina son capaces de unir una amplia variedad de compuestos incluyendo esteroides, diferentes fitoquímicos y xenobióticos.

El transporte a través del epitelio intestinal del Coumestrol se ha tomado como un proceso equivalente e incluso similar al de las sustancias lipófilicas como el colesterol. Aunque, no hay evidencias de que esto sea cierto. El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de componentes proteicos aislados de las membranas celulares de los enterocitos de ratón adulto CD1 con capacidad de unirse al coumestrol de manera aislada. Se diseñaron y optimizaron varias metodologías que permitieran obtener e identificar a este tipo de proteínas.

Se utilizaron 20 ratones a los cuales se les extrajo la porción del yeyuno del intestino delgado; después de hacer una inversión del túbulo intestinal para exponer los enterocitos, se separó el material en digestión y el recubrimiento de mucina. La separación mecánica del epitelio se realizó en amortiguador con citrato de sodio. Los enterocitos se obtuvieron por

digestión del epitelio con colagenasa. Las proteínas de membrana se solubilizaron con Triton X100. El detergente se retiró precipitando las proteínas totales con acetona fría. Las proteínas precipitadas se reconstituyeron en micelas de duodecilsulfato de sodio y se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 8%. La detección de las proteínas que se unen al coumestrol, se realizó utilizando una solución metanólica al 50 % con Coumestrol 50 µg/mL. Las proteínas que unen coumestrol con menor afinidad permanecen visibles al retirar el exceso con metanol. Aquellas que lo hacen con mayor eficiencia permanecen visibles, a pesar de emplear ácido acético al 10%. Para establecer la complejidad de la membrana del enterocito, los mismos geles fueron teñidos con azul de Coomassie y con nitrato de plata.

Utilizando esta metodología se detectaron una gran cantidad de proteínas que pueden unir de manera inespecífica al coumestrol. Aún en la preparación comercial de albúmina sérica bovina fracción V del método de Cohn se observan al menos 2 números de componentes una vez que se ha retirado el exceso de coumestrol con el solvente primario. Si se rehidrata el gel con amortiguador o agua, la unión se conserva. Esta unión enmascara la unión más fuerte que tiene una proteína con peso molecular relativo (MWr) de 24,594 Daltones a la que hemos denominado p25. Esta proteína puede visualizarse cuando se deja el gel teñido con coumestrol en una solución de ácido acético al 10%.

La banda de proteínas identificada presenta un peso molecular totalmente distintivas que no permiten asociarlas con aquellas que se han reportado asociadas al transporte de colesterol, vitaminas liposolubles o mediando la saturación lipídica de las lipoproteínas del tipo de las LDL. Mientras que la proteína NPC 1L1 tiene un peso molecular de 146.6 kDa, la CD36 88 kDa y la SR-B1 de 80 kDa. De la misma forma, la diversidad en la localización de los diferentes transportadores no permite una asociación específica; mientras que NPC1 es la principal reguladora de lípidos en la membrana celular de los enterocitos y la membrana canalicular de los hepatocitos, otros transportadores son intracelulares; el enclave de la proteína p25 está restringida a la membrana celular como lo indica el uso de concentraciones importantes de detergente utilizado para su extracción. La identificación de una banda de proteínas abre la posibilidad de realizar estudios específicos de proteómica tanto estructural como funcional.

2. ABSTRACT

Animal reproductive process requires the energy from foodstuff. However, food may also contain compounds that could interfere with the general physiology and especially on the reproductive control as is the case of phytoestrogens, plant derived compounds structurally similar to steroid hormones and capable to interact with the estrogen receptors (ER) to promote or inhibit the physiological response to estrogens.

One characteristic function of cell membrane is their selective permeability allowing the exchange of specific ions and molecules. There are several proteins in the cell membrane endowed to the transport and facilitation of lipophilic molecules as cholesterol, Vitamin A, D or polyphenolic as is the case of the transport NPC1L1 protein, SR-B1, the Fat translocator CD36 along with 4 members of the ATP binding cassette characteristic transport protein: ABCA1, ABCG1, ABCG5 and ABCG8. In sera and intercellular liquid there are also several types of lipophilic binding protein transporters including the sex hormone, estradiol and testosterone, binding globulin (SHBG), the corticosteroid binding globulin (CBG), and the tiroxin binding globulin (TBG). Another unspecific transporter in serum has also been described, like Albumin capable to bind a wide range of compounds including steroids, phytochemicals and xenobióticos.

Coumestrol transport through the intestinal epithelium has been taken as an equivalent process or even similar to those described for structurally similar lipophilic substances like cholesterol, even though there are no clear evidence for this assumption. The goal of the present study was to identify some components from the enterocytes membrane of adult CD1 mice capable to bind coumestrol. Several techniques were developed and standardized that in conjunction allow us to obtain and identify this kind of proteins.

Jejune portion of the small intestine of 20 CD1 adult mice were used. After the jejune tubular inversion to expose the enterocytes layer, content was removed along with the mucin layer by exhaustive washing in saline solution. Mechanical disruption of the epithelia was achieved in citrate containing buffer incubation. Isolated enterocytes were obtained by collagenase digestion of the epithelia. Membrane proteins were extracted by using Triton X100-containing saline. Detergent was removed by cold acetone protein precipitation. Precipitated proteins were renatured into SDS and electrophoretically fractionated in 8% polyacrylamide gels. Coumestrol binding protein detection was made using a methanol Coumestrol solution.

Those low affinity coumestrol binding proteins were still visible after excess coumestrol was removed by methanol incubation. The highly efficient coumestrol binding proteins were detected after a 10% Acetic acid incubation. In order to obtain the protein complexity of the enterocytes membrane proteins, gels were stained with both Coomassie brilliant blue and silver.

Using this methodology, several proteins capable to bind coumestrol were detected. Even in the commercial BSA Cohn's fraction V preparation has least 2 components that can be visualized after excess coumestrol removal. These components are visualized even in hydrated gels no matter if they are incubated in buffer or water. These components do not permit to identify the more stable and possibly higher affinity binding of coumestrol to a 24 594 Da protein that is now nominated as p25. This protein band can be visualized when the coumestrol-stained gel is incubated in 10% acetic acid.

This band has different characteristics to neither those found in the already identified phytochemical and xenobiotic-binding proteins nor those involved in cholesterol transport. While NPC1L1 a 146.6 kDa proteins, CD36 an 88 kDa, and 80 kDa for SR-B1, the proteins that can be identified by coumestrol binding has a lower MW. The diversity in the final location of the cholesterol and lipophilic transporters do not allows a positive association; whereas NPC1L1 is the main cholesterol regulator in the cell membrane of enterocytes and the liver canalicular membrane, some others transporters are intracellular; p25 is apparently restricted to the cell membrane as indicated by the high detergent concentration used for extraction. The identification of a protein band opens the possibility for specific structural and functional proteomic studies.

3. INTRODUCCIÓN

La importancia de la alimentación y sus componentes sobre la fisiología reproductiva es un fenómeno indiscutible. Desde un enfoque simplista, el proceso reproductivo de los animales requiere de la energía que se obtiene de los alimentos. Sin embargo, en los propios alimentos pueden estar presentes compuestos que potencial, o efectivamente, interfieren en la biología reproductiva animal y humana (Caserta *et al.*, 2008). En 1946 Bennetts y colaboradores (en McClain *et al.*, 2006) publicaron su análisis referente a la relación que había en ovejas del Oeste de Australia con el consumo de pastos con elevada presencia de trébol (*Trifolium subterraneum*) y la alteración de su función reproductiva (v. gr. anormalidades en la tasa de fertilidad; crías con malformaciones y en algunos casos, la placenta se retenía por espacios inusuales); siendo una de sus conclusiones que en la pastura consumida por el ganado ovino, hubiese sustancias que provocasen infertilidad y alteraciones en el desarrollo fetal (McClain *et al.*, 2006). Décadas después en ganado bovino se reportaron resultados similares sobre alteraciones en su biología reproductiva debidas al consumo de pasturas conteniendo trébol (revisión Lenis *et al.*, 2010). Siendo a principios de los años 50's la identificación en el trébol de dos isoflavonas con actividad estrogénica: la formononetina y la genisteína lo cual dio pauta al estudio en la ganadería de estas sustancias denominadas fitoestrógenos sobre su biología reproductiva (en Muñoz-Mendoza *et al.*, 2002).

3.1. Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son compuestos de origen vegetal, estructuralmente similares a las hormonas esteroideas de tipo estrogénico (Figura 1), que tienen la capacidad de interactuar con los receptores estrogénicos (ERs) y así promover o inhibir la respuesta a dichas hormonas esteroides (Jefferson *et al.*, 2012). Químicamente, los fitoestrógenos pertenecen a los grupos de las isoflavonas (genisteína, daidzeína, glyceteína, formononetina); flavonas (luteolina), coumestanos (coumestrol), y lignanos (secoisolariciresinol, matairesinol, pinoresinol, lariciresinol); de ellos, los más estudiados son las isoflavonas y coumestanos.

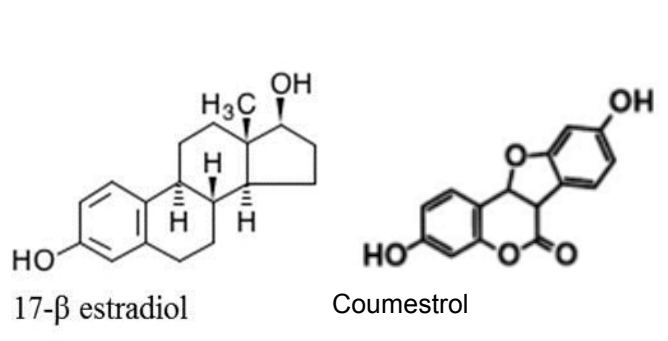


Figura 1. Estructura química del 17β-estradiol y Coumestrol. Resaltando la similitud en el anillo A y la posición del grupo OH en el anillo D del estradiol con los respectivos sitios del coumestano.

Los fitoestrógenos son productos del metabolismo secundario de las plantas que se producen como un mecanismo de defensa ante algunos estresores físicos (cambios en la temperatura, viento, etc.); nutrientes (disponibilidad de minerales y otros compuestos químicos del suelo); microorganismos (invasión de bacterias y

hongos) (Granados-Sánchez *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 1979.). También son producidos por las plantas debido a la depredación que sufren por parte de los herbívoros (insectos, aves, mamíferos, etc.) (Granados-Sánchez *et al.*, 2008). Lo anterior, permite encontrarlos en grupos botánicos muy diversos. Las isoflavonas se encuentran en altas concentraciones en la soya y sus productos derivados; los lignanos forman parte de la fibra de las semillas. Los principales fitoestrógenos del trébol, la alfalfa y las espinacas son los coumestanos, en particular el Coumestrol (Patisaul y Jefferson, 2010).

El metabolismo de estos compuestos es complejo y variable; normalmente se encuentran como glicósidos en las plantas, los cuales son hidrolizados a aglicones y metabolizados por la microflora intestinal para luego ser conjugados con glucoronato o sulfato por el hígado (Barnes, 2010).

3.2. Efectos del Coumestrol en la fisiología reproductiva de animales domésticos

El Coumestrol (COU) es un fitoestrógeno que pertenece a la familia de Coumestanos, se encuentra en la alfalfa, el trébol, EL germen de soya, entre otros. Se han hecho determinaciones tanto *in vivo* como *in vitro* sobre los efectos del COU en los cuales se ha demostrado la capacidad de alterar procesos dependientes de estrógenos. Al comparar la actividad del COU esta es de 1/1000 teniendo como referencia la actividad del 17 β -estradiol y dos veces más afín al ER β que al ER α (Whitten y Patisaul, 2001).

En las hembras, el COU reduce el porcentaje de concepción. En un ensayo con 608 vacas alimentadas con alfalfa contaminada con el hongo *Pseudopeziza medicaginis* se obtuvo menos del 10% de gestaciones a término. A pesar de haber sido inseminadas durante un año (Romero *et al.*, 1997). Dentro del porcentaje de las vacas no gestantes a término, pero que si presentaron gestación, algunas de ellas tuvieron abortos espontáneos. En las vacas restantes que presentaron gestación, se observaron niveles de estrógenos alterados, lo que se conoce como síndrome estrogénico. Se ha reportado que la alfalfa, cuando es atacada por patógenos, como hongos, tiende a producir una mayor cantidad de Coumestrol (Yohan *et al.*, 2010).

En ovejas hembras adultas, la administración de 25 mg/Kg de COU causó una disminución de la tasa de ovulación debido tal vez a una reducción en el suministro de gonadotropinas como la hormona folículo estimulante (FSH), disponible durante el período posterior a la ovulación (Smith *et al.*, 1979). En vacas lecheras alimentadas con alfalfa seca con un contenido de 68.8 mg kg⁻¹ de COU, se presentó un síndrome estrogénico con características similares al descrito en las ovejas (Romero *et al.*, 1997).

En cerdos se ha demostrado que concentraciones de 50 µM de genisteína y daidzeína tienen efectos directos en la síntesis de progesterona en cultivos primarios de células de la granulosa, debido a la inhibición de enzimas que participan en la estroidogénesis, como es el caso de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) (Tiemann *et al.*, 2007).

En diferentes grupos de aves como codornices (Leopold *et al.*, 1976), gansos (Opalka *et al.*, 2012), patos (Zhao *et al.*, 2005) y gallos (Opalka *et al.*, 2004), se han reportado alteraciones en la fisiología reproductiva por fitoestrógenos. Estas aves domésticas al ser alimentadas con dietas compuestas con derivados de plantas en las que pueden estar consumiendo elevadas dosis de fitoestrógenos, principalmente genisteína, daidzeína, equol y COU, se provocaría la inhibición de las enzimas que participan en la esteroidogénesis testicular, y por lo tanto, disminuir la secreción de testosterona por parte de las células de Leydig.

La codorniz de california (*Lophortyx californica*) es otro ejemplo en donde se hizo un estudio del contenido de fitoestrógenos en su dieta y su capacidad reproductiva. Constatándose que en la temporada de extrema sequía se inhibió la ovoposición y el nacimiento de polluelos, por lo que dicho efecto se asoció con el consumo de hojas y semillas con alto contenido de fitoestrógenos (Leopold *et al.*, 1976).

En gansos domésticos al ser alimentados con compuestos derivados de plantas, se asumió que podían estar consumiendo cantidades importantes de fitoestrógenos, lo cual provocaría alteraciones en su reproducción. En estudios *in vitro* en células de Leydig de ganso, se encontró que una concentración de 50 μM de genisteína provocó alteraciones en la esteroidogénesis, inhibiendo enzimas clave como varios de los citocromos; entre los cuales están, P450 scc, la $3\beta\text{-HSD}$, la citocromo P450 $17\alpha\text{-hidroxilasa/17-20}$ liasa y de la $17\beta\text{-hidroxiesteroide}$ deshidrogenasa (Opalka *et al.*, 2012). Del mismo modo, en estudios de microsomas

provenientes de placenta humana, se observó una disminución de la actividad 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa con COU, genisteína, daidzeína, biochanina A y formononetina (Le Bail *et al.*, 2000).

En patos se observó, que la daidzeína tiene efecto en el rendimiento de la puesta de huevos, en su tamaño, peso y contenido de ovoalbúmina, así como promover hipertrofia del oviducto y de los contenidos séricos de triyodotironina (T4) y estradiol (E2). Debido a lo anterior se asume que los fitoestrógenos altera de manera diferente las etapas del ciclo estral y de la ovogénesis (Zhao *et al.*, 2005).

En un estudio realizado, con células de Leydig aisladas de gallo, se observó el efecto de la genisteína sobre la secreción de testosterona (T); con una concentración de 50 μ M, se provocaron alteraciones en la esteroidogénesis testicular, siendo más notorio su efecto sobre el rendimiento reproductivo de estas aves (Opalka *et al.*, 2004).

3.3. Efectos del Coumestrol en animales silvestres en cautiverio

Debido a que muchas especies de vida silvestre se encuentran en peligro de extinción debido a la actividad humana, se ha tenido la necesidad de favorecer su reproducción en cautiverio como estrategia de preservación. Sin embargo, al ser alimentadas de manera inadecuada con fórmulas que se han desarrollado para mascotas, se corre el riesgo de afectar su fisiología reproductiva. Por ejemplo, en un grupo de guepardos en cautiverio que fueron alimentados con una dieta para gatos domésticos (alimento comercial) cuya base de proteína y de carbohidratos es harina

de soya presentaron infertilidad, y una vez que dicha dieta se reemplazó con carne de pollo se restableció su capacidad reproductiva (Jefferson *et al.*, 2012). Por lo que Jefferson y colaboradores (2012) sugirieron que la infertilidad de los guepardos hembra, se debió al efecto de los fitoestrógenos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada al suprimir temporalmente la liberación de gonadotropinas. En un previo estudio sobre el efecto de una dieta rica en fitoestrógenos sobre la fisiología de guepardos, Setchell y colaboradores (1987) constataron que en las hembras guepardo, se presentaban alteraciones en órganos reproductivos como, endometrio con quistes, lesiones en los úteros, fibrosis miometrial y endometrial, y que estas alteraciones estarían interfiriendo con la fertilidad de estos animales, además de que estas patologías pudieran ser permanentes.

Otro ejemplo de la afectación de la capacidad reproductiva y fisiológica en general se reportó para el rinoceronte blanco del sur (*Ceratotherium simum simum*). En esta especie, es común presentar además del descenso en la fertilidad asociada al alimento, una incidencia alta de daños hepáticos y renales. La alimentación de éste rinoceronte de forma natural es herbívora, por lo que resultan contradictorias y sorprendentes las alteraciones. Sin embargo, la asociación que se ha hecho de este fenómeno es con la cantidad y mantenimiento del nivel de los fitoestrógenos en su alimentación (Patisaul, 2012).

El rinoceronte blanco del sur, ha sido otro ejemplo en el que su fertilidad en cautiverio está siendo alterada, por una disrupción endocrina por fitoestrógenos provocada por la alimentación. Lo cual fue demostrado debido a que esta especie fue

más sensible a los estrógenos y fitoestrógenos que su pariente, el gran rinoceronte de un cuerno. Para lo cual se clonaron los ER α y ER β (receptores a estrógenos) de ambas especies y se transfectaron en células embrionarias humanas de riñón, para caracterizar y comparar sus propiedades de unión. Constatándose en el rinoceronte blanco del sur, la existencia de una mayor activación del receptor por el COU, que en el gran rinoceronte de un cuerno. Esto hace suponer que dicho aumento en la sensibilidad de los receptores a estrógenos, puede estar contribuyendo a que exista una baja reproducción de las rinocerontes blanco, además de que existe un bajo número de crías en cautiverio (Tubbs *et al.*, 2012).

3.4. Mecanismo de acción del Coumestrol

Aunque hay trabajos que informan el mecanismo de acción de fitoestrógenos como el COU a nivel fisiológico y sus acciones en el sistema reproductor de los mamíferos (WocBawek-Potocka *et al.*, 2013; Zhao y Mu, 2011). Éstos aún no son claros, debido a que los efectos resultantes dependen tanto de la concentración de COU como de la disponibilidad de los receptores a estrógenos (ER) en los órganos blanco. Pero es indiscutible que los fitoestrógenos imitan la acción de los estrógenos.

Los estrógenos son las hormonas esteroides sexuales responsables en las hembras de los signos del estro o receptividad sexual que en conjunto coadyuvan en los procesos de la fertilización sexual femenina. El principal estrógeno natural es el 17 β -estradiol seguido por la estrona, el estriol, la equilina y la equilenina, las dos últimas están presentes exclusivamente en yeguas gestantes. Habiendo estrógenos

sintéticos como lo son el valerato de estradiol y el cipionato de estradiol. Por otro lado, los estrógenos favorecen la diferenciación celular y el crecimiento de glándulas y órganos endocrinos como las glándulas mamarias, útero, vagina, ovarios, testículos, el sistema vascular y sistema nervioso. De tal manera que debido a la amplia acción fisiológica que tienen los estrógenos en la biología reproductiva animal y humana es relevante conocer como los fitoestrógenos como el COU pueden provocar disrupción endocrina (Sanin *et al.*, 2010).

La respuesta estrógenica, principalmente se lleva a cabo a través de ER los cuales se dividen en dos el ER α , y ER β , con 95% de homología a la región de unión al ADN y 55% de homología al dominio de unión a estrógenos (Whitten y Patisaul, 2001). Se conocen dos tipos de respuesta a la estimulación con estrógenos: (a) la genómica y (b) la no genómica (Björnström y Sjöberg, 2005). En la primera, los efectos fisiológicos de los estrógenos son dependientes de la unión con los ER, miembros de una superfamilia de receptores nucleares. El mecanismo de acción clásico involucra la unión a receptores localizados en el citoplasma, en los cuales se induce un cambio conformacional y permiten a proteínas coactivadoras se unan, y de esta manera los receptores formen dímeros y se puedan unir a elementos de respuesta a estrógenos (EREs) localizados en los promotores de genes blanco. Los fitoestrógenos pueden actuar al inicio de la transcripción alterando la interacción de ER nucleares con los EREs, en cualquier tejido que cuente con ellos. Se conocen también efectos epigenéticos, tales como la alteración de las actividades de las ADN metiltransferasas y desacetilasas de histonas (Wilson *et al.*, 2008).

Con respecto a los efectos no genómicos, estos se producen por la unión de fitoestrógenos a ER asociados a la membrana citoplásmica de las células blanco, que suelen implicar respuestas celulares rápidas que conducen a la liberación de óxido nítrico, flujos de calcio, y a la activación de diferentes vías de señalización como la que implica la participación de Adenosín Monofosfato cíclico (AMPc), las proteína cinasas (PKA y PKC), fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) (Ropero *et al.*, 2006), las vías de estrés oxidativo, el factor nuclear kappa B, y cinasas reguladas por señales extracelulares (Watson *et al.*, 2007).

3.5. Tipos de transporte en las membranas celulares

Las membranas celulares no solo son barreras que restringen indiscriminadamente la entrada y salida de sustancias, sino que permiten una permeabilidad selectiva que permite el intercambio controlado de moléculas y iones específicos (Wilson, 1978).

El movimiento de solutos a través de la membrana se realiza mediante tres tipos de mecanismos como son: difusión simple, difusión facilitada y transporte activo.

La difusión simple, es el movimiento de moléculas apolares pequeñas como oxígeno, dióxido de carbono, etanol, a través de la bicapa lipídica, la cual es dictada por una diferencia de concentración de la molécula, entre ambos lados de la membrana (Oxender, 1972).

La difusión facilitada, requiere la asistencia de proteínas transportadoras, a las que también se llama permeasas o transportadores, que facilitan la difusión a favor de un gradiente de moléculas polares o con carga, que de otra forma no pasarían; estas captan una o más moléculas en un lado de la membrana, y sufren un cambio conformacional, que permite la transferencia del soluto hacia el otro lado de la membrana (Henderson, 1993). Un ejemplo de este transporte es el que se lleva a cabo con la glucosa a través de la membrana celular se lleva a cabo por dos familias de proteínas de membrana: los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT) y las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT). Los primeros se expresan principalmente en epitelios que se encargan de la absorción y de la reabsorción de nutrientes, esto es, el epitelio del intestino delgado y el epitelio tubular renal respectivamente (Castrejón *et al.*, 2007). Otros son los canales proteicos, que son canales hidrófilicos que atraviesan la membrana y que permiten el paso de moléculas sin grandes modificaciones conformacionales, son relativamente grandes e inespecíficos, tales como los poros membranas externas de las bacterias mitocondrias y cloroplastos y se conocen como porinas. Un ejemplo de estas son las acuaporinas, se trata de pequeñas proteínas muy hidrofóbicas de la membrana celular. Estas proteínas en los mamíferos son monómeros que van 26-34 kDa. Dentro de la familia acuaporinas en mamíferos, se han definido dos subgrupos: "acuaporinas" y "acuagliceroporinas," (Verkman y Mitra, 2000).

El transporte activo es un proceso que a diferencia de la difusión facilitada, posibilita el movimiento de moléculas en contra del equilibrio termodinámico (es

decir, contra un gradiente de concentración o potencial electroquímico) por lo que requiere aporte de energía. Un ejemplo de proteínas que requieren la hidrólisis de ATP, para translocar a otras moléculas son las de la familia del casete de unión a ATP (ABC) (Hassan *et al.*, 2007). Estas proteínas se encuentran en todas las especies, y utilizan la energía producida por la hidrólisis de ATP, para translocar moléculas específicas a través de las membranas celulares (Higgins y Linton, 2001). La naturaleza química de estas moléculas es muy diversa, desde iones inorgánicos, carbohidratos y polipéptidos de gran tamaño y sustancias lipídicas como el colesterol (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2003).

La absorción de la glucosa en el intestino delgado es dependiente del proceso de transporte mediado por SGLT1, mientras que el de fructosa es específicamente facilitado por GLUT5 en humanos, rata y ratón. Estas proteínas principalmente se localizan en la membrana apical (ribete en cepillo) de los enterocitos (Gouyon *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha reportado que la absorción intestinal de carotenoides es un proceso facilitado, por transportadores como son: el receptor basurero (scavenger) de clase B tipo I (SR-BI), Niemann-Pick Like 1 (NPC1L1) y ABCA1, localizados en la región del ribete en cepillo de los enterocitos (During y Harrison, 2007).

3.6. Proteínas transportadoras de membrana de enterocitos de colesterol y sustancias lipófilicas

Existen varias proteínas encargadas de transportar o translocar sustancias lipófilicas (colesterol, Vitaminas A, D y polifenoles) como son: la proteína transportadora Niemann-Pick C1 tipo 1 (NPC1L1) (Altmann *et al.*, 2004); el receptor scavenger clase B, tipo I (SR-B1) (Acton *et al.*, 1996; Hauser *et al.*, 1998); “Cluster Determinante” 36 (CD36) (Werder *et al.*, 2001). Además, se han identificado cuatro proteínas transportadoras de la familia del casete de unión a ATP (ABC), ABCA1, ABCG1 (Hassan *et al.*, 2007), ABCG5 y ABCG8, estas cumplen con la función de modular el colesterol y metabolismo de las lipoproteínas. En donde ABCG5 y ABCG8, desempeñan un papel fundamental en la regulación del colesterol intestinal (Brewer *et al.*, 2003).

3.7. Proteínas de transporte en el plasma

Los protocordados y los vertebrados tienen un sistema circulatorio cerrado en el que las hormonas que se sintetizan en alguna de las glándulas endocrinas son transportadas a través del torrente circulatorio hasta los tejidos u órganos blanco. Es decir, que tienen el receptor para dicha hormona la cual podrá, por ejemplo, regular la transcripción de genes que provocan una respuesta fisiológica. Las proteínas transportadoras en la sangre son importantes para unir moléculas lipófilicas como lo son las hormonas esteroides hacia las células blanco. Estas proteínas transportadoras incluyen la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), que se une a estradiol y testosterona entre otras; la globulina de unión de corticosteroides

(CBG) y la globulina unidora de tiroxina (TBG). Ninguna de las globulinas de unión SHBG, CBG y TBG es homóloga a la albúmina. Sin embargo, TBG y CBG son homólogos distantes que son descendientes de un inhibidor de la proteasa que es familia de las serpinas (Baker, 2002).

La albúmina es la proteína principal del suero, une una amplia variedad de compuestos lipófilicos incluyendo esteroides, ácidos grasos, retinoides, hormonas tiroideas, prostaglandinas, antibióticos, diferentes fitoquímicos y xenobióticos. La concentración de albúmina en suero humano es de aproximadamente 45 mg/mL (0.67 mM) (Kragh-Hansen *et al.*, 1990).

Desde el descubrimiento de la TBG por Gordon y colaboradores (1952), mediante experimentos con tiroxina radioactiva, se pudo ver, que además de la albúmina que se encontraba marcada, existían algunas fracciones de α -globulinas, que presentaban la marca de iodo radioactivo. La unión de los corticosteroides 17-OH (17-OHCS) y 17-OH glucurónidos corticosteroides (17-OH corticoesteroides-Gluc) por proteínas del plasma (globulinas de unión a corticosteroides (CBG)) se determinó mediante diálisis de equilibrio en hombres adultos por Daughaday (1956). La existencia de SHBG fue sugerida por experimentos de Daughaday (1958), pero fue demostrada por Mercier-Bordac y colaboradores (1970), comprobando la unión con testosterona; y en estudios posteriores se fue descubriendo su interacción con otras hormonas como progesterona, en estudios realizados con cerdos hembra de guinea preñadas y en ratas hembra estradiol (Raynaud *et al.*, 1971).

La SHBG transporta los andrógenos y los estrógenos en la sangre y regula su acceso a tejidos blanco. La producción hepática de SHBG fluctúa a lo largo del ciclo de vida y se ve influenciada principalmente por factores hormonales. Las diferencias genéticas también contribuyen a variaciones en los niveles de SHBG en plasma. Además de controlar la distribución plasmática, y la biodisponibilidad de esteroides sexuales, la SHBG se acumula en los compartimientos extravasculares de algunos tejidos. En los mamíferos, el gen que codifica SHBG se expresa principalmente en el hígado, pero también en niveles bajos en otros tejidos, incluyendo el testículo (Hammond, 2011).

4. ANTECEDENTES

En el grupo de investigación del Dr. Héctor Serrano se ha demostrado que la administración oral de coumestrol afecta la capacidad reproductiva de animales tanto de vida libre como de laboratorio e incluso mascotas. El vampiro hematófago, es uno de los vectores de la transmisión de rabia al ganado bovino y es considerado como fauna nociva. Se han diseñado diversas estrategias para el control de su reproducción. Una de ellas ha sido la administración oral de Coumestrol, y se pudo observar que cuando se administra una dosis de 3 µg/mL en sangre de bovino a animales adultos de *Desmodus rotundus*, los testículos muestran menor cantidad de espermatozoides con una alteración importante de la citoarquitectura de la gónada (Serrano *et al.*, 2007).

En las grandes ciudades, la sobrepoblación de perros callejeros, es un problema de salud pública, por las agresiones por parte de estos animales hacia las personas, por ser transmisores de enfermedades como la rabia, además de que defecan al aire libre. Nuestro grupo ha propuesto y mostrado que la administración oral de Coumestrol muestra eficiencia, reflejándose como una alternativa real para el control de la sobrepoblación (Pérez-Rivero *et al.*, 2008). En perros adultos, la administración oral de 40 mg/kg peso/semana durante un periodo de 4 semanas disminuyó el número de espermatozoides eyaculados, con un porcentaje de anomalías superior al control, y una disminución y alteración estructural de los testículos (Serrano *et al.*, 2007). Una diferencia importante es, que a pesar de las alteraciones gonadales en los quirópteros, no se alteran las concentraciones sistémicas de hormonas esteroides (Serrano *et al.*, 2009).

En dos especies de roedores silvestres se ha demostrado en machos de *Peromyscus melanotis* y *Peromyscus difficilis* que el consumo de pellets conteniendo coumestrol durante cinco días indujo disminución en el contenido de espermatozoides, siendo este mayor en *P. melanotis*. Al hacer la disección de diferentes tejidos tanto de individuos de ambas especies de *Peromyscus*, como de ratones *Mus musculus* de la cepa CD1, y posteriormente analizados en un microscopio confocal, fue posible detectar la presencia de complejos receptores-fitoestrógeno por el aumento en la fluorescencia en hígado, cerebro, testículo e intestino (A. Salame y H. Serrano, comunicación personal).

En el caso de las gónadas de los perros, la fluorescencia co-localiza al Coumestrol con un anticuerpo dirigido contra receptores estrogénicos. Una diferencia importante entre este tipo de muestras es que mientras en las células de Leydig y Sertoli del testículo de roedores la fluorescencia debida a la unión de fitoestrógenos se localiza en el citoplasma y región nuclear, en las células que delinean el intestino, la fluorescencia se detecta básicamente en la región luminal de los enterocitos (Serrano *et al.*, 2008).

En síntesis, las alteraciones en la disminución de la tasa de fertilidad y otras patologías, han sido provocadas por el consumo vía oral de fitoestrógenos. Este hecho ha llamado la atención de organismos internacionales y de diversos grupos de investigación que han reevaluado la inocuidad del consumo de alimentos cuya base sea la soya, tanto en animales como en humanos por los potenciales efectos negativos que la exposición a estos compuestos produce en la salud reproductiva.

A pesar de que los efectos de los fitoestrógenos y particularmente del Coumestrol están bien documentados, el mecanismo por el cual puede ser incorporado en el organismo, ya sea por una exposición alimentaria o por administración farmacológica vía oral, no ha sido determinado. Por lo que es necesario, es necesario explorar los posibles mecanismos por los cuales se podría llevar a cabo la absorción de estos compuestos en la región del epitelio intestinal.

5. JUSTIFICACIÓN

En el caso de los fitoestrógenos, se conocen los efectos que producen tanto su ingestión como la administración parenteral. En el primer caso, aún quedan preguntas que respondan a la forma en la cual este tipo de compuestos ingresan al organismo una vez que están en contacto con el epitelio intestinal y dado que su efecto se realiza en órganos tan distantes y separados por barreras como la hemato-encefálica y hemato-testicular, es necesario conocer los mecanismos involucradas en su absorción, ya que una primera barrera que deben traspasar es la formada por las uniones estrechas del epitelio intestinal. Por lo tanto, aislar y conocer la estructura de las proteínas que llevan a cabo este transporte permitirá no sólo conocer su funcionamiento, sino eventualmente, determinar las formas en que está regulado y permitir el desarrollo de métodos preventivos a una exposición no deseada a este tipo de compuestos.

El desarrollo de estrategias de control reproductivo de la fauna nociva en nuestro país requiere de una investigación que permita evaluar los riesgos potenciales no sólo de la población sujeta a control, sino de aquella cuya exposición sea accidental. Por lo tanto, conocer la forma en la cual los fitoestrógenos como el Coumestrol provocan alteraciones en órganos reproductivos permitirá diseñar, una estrategia eficiente y específica para ser utilizados como reguladores temporales de la fisiología reproductiva de fauna nociva.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo de fitoestrógenos como el Coumestrol por vía oral, provoca alteraciones tanto en la estructura como en la fisiología de órganos internos como cerebro, hígado y gónadas de animales silvestres, de laboratorio, domésticos y aún en humanos. En las gónadas, su efecto es la disminución en la diferenciación de los gametos, por lo que, en estados patológicos las alteraciones pueden causar, en algunos casos, la infertilidad. La ingesta de éstos compuestos que alteran la función endocrina del organismo podría tener un impacto en algunas industrias como la ganadera, por los cambios en los ciclos reproductivos de los animales.

Estos efectos mostrados en estudios con fitoestrógenos parten de una premisa simple, que es la introducción fortuita o deliberada de los disruptores endócrinos por medio del alimento y a través del tubo digestivo. Sin embargo, no se ha descrito el proceso por el cual se permite a los fitoestrógenos y en particular al Coumestrol su internalización al organismo. Es decir, la forma en la cual es transportado desde el tubo digestivo al torrente sanguíneo para finalmente, llegar al tejido que afecta. Este tipo de conocimiento permitirá el desarrollo de estrategias eficientes y con sustancias naturales para el caso del control reproductivo, o que puedan ser intervenidas para evitar los efectos negativos de los fitoestrógenos. En primera instancia, la absorción de los fitoestrógenos en el tubo digestivo podría explicarse por difusión simple, transporte vesiculado o transcitosis que son las vías características de esta región. Sin embargo, a la fecha ninguna de estas vías ha sido

estudiada para explicar los efectos que pueden inducirse con los fitoestrógenos administrados oralmente.

Por otro lado, en la actualidad existe una fuerte tendencia en el desarrollo de estrategias adicionales para el control reproductivo de especies nocivas. Una de ellas es mediante compuestos de origen natural que no contaminen al ambiente, que sean de administración simple y cuyos riesgos para la salud reproductiva de la población humana, sean reducidos. Este tipo de estrategias puede disminuir problemas de salud pública contribuyendo al bienestar humano y sin tener un impacto tanto en el nicho ecológico, como en el ambiente.

7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál(es) son la(s) proteína(s) de la membrana apical del epitelio intestinal, que están involucradas en la absorción de coumestrol, y que permiten explicar las alteraciones en la reproducción que induce éste compuesto?

8. HIPOTESIS

Si la administración oral de Coumestrol inicialmente puede ser localizado en la membrana del epitelio intestinal y esta ejerce una función regulatoria en órganos internos; entonces, el transporte al interior del organismo puede deberse a la intervención de proteínas presentes en el ribete en cepillo de la membrana de enterocitos de los animales.

9. OBJETIVO GENERAL

Identificar las proteínas responsables de la unión a Coumestrol en los enterocitos del yeyuno de ratón.

10. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener la(s) proteína(s) capaces de unirse al Coumestrol en las membranas del ribete en cepillo de los enterocitos del yeyuno de los animales.
- Identificar el patrón electroforético de las proteínas en geles de SDS-PAGE.

11. MATERIALES Y METODOS

Como se muestra en la figura 2, la estrategia experimental del presente estudio estuvo constituida por las etapas siguientes: 1) la obtención del tejido, 2) disrupción de las membranas celulares, 3) precipitación de proteínas de las membranas y 4) la detección de proteínas de membrana capaces de unirse al Coumestrol separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

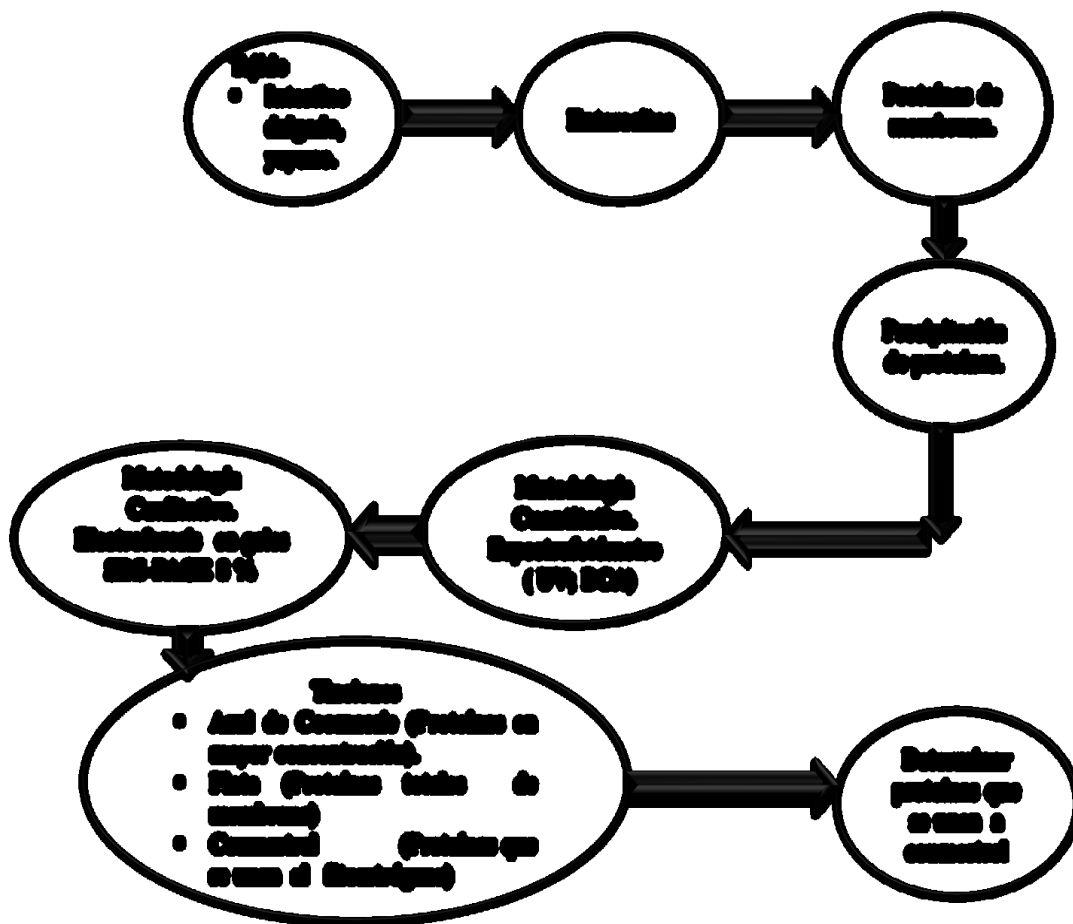


Figura 2. Estrategia experimental de estudio.

11.1. Obtención de enterocitos

Se realizó utilizando la metodología de Moussavi y Carlson (2013) con modificaciones. Se obtuvo la porción del yeyuno del intestino delgado de 20 ratones macho de la cepa CD1 de 2 meses de edad, con una alimentación de pellets para roedor (Harlam) y agua *ad libitum*, con fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad. El contenido intestinal se retiró con lavados extensivos utilizando un dispositivo de

inyección de fluidos (Figura 3). Con la ayuda de una jeringa de 20 mL, montada en un soporte universal y que tenía una llave de 2 vías, adaptadas con tubo de Tygon; una era la entrada y suministro de una solución de PBS ($\text{Na}^+\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.005 M; y NaCl 0.15 M a pH 8). Otra la salida, por la que se introdujo el tubo de Tygon en el extremo proximal del intestino delgado.



Figura 3. Dispositivo de inyección de fluidos.

El yeyuno se hizo pasar completamente sobre el tubo de Tygon aplicando al mismo tiempo solución de PBS para desalojar la materia en digestión (quimo). Una vez que toda la sección se sobrepuso a la superficie del tubo, con hilo de sutura se anudó en la parte distal del intestino delgado. Posteriormente un segmento de 5 cm de hilo se introdujo en el lumen del tubo. El intestino se hizo pasar por sobre la sutura de tal manera que sus superficies se invirtieron.

Con la superficie del ribete en cepillo expuesta, se lavó en una placa multipozos, colocando en doce pozos solución de PBS para retirar por completo el “quimo” y mucinas que contenían. Posteriormente en otros dos pozos de la misma placa se colocó en cada pozo otra solución de PBS que contenía citrato de sodio 22 mM a pH: 7.0, a 4 °C (Figura 4). En uno de los pozos que contenía esta solución se incubó el yeyuno con el epitelio expuesto por 2 min, para después en el otro pozo con la ayuda de una pinza de disección con la punta roma, separar mecánicamente el epitelio de la lámina basal del yeyuno. El tejido se colectó, y se pasó a un nuevo pozo que contenía 100 µL de colagenasa de 1mg/mL, por 5 min con resuspensión de las células intestinales durante este tiempo. La inactivación enzimática se hizo agregando de 3 a 4 volúmenes de PBS citrato.

El seguimiento de la obtención de enterocitos, se hizo en un microscopio; mediante la tinción con Sudan III para visualizar las vesículas lipídicas que se tiñen en rojo, que con este colorante son teñidas y que son abundantes en este tipo celular, por llevar a cabo el transporte de lípidos hacia el interior y exterior de los enterocitos.

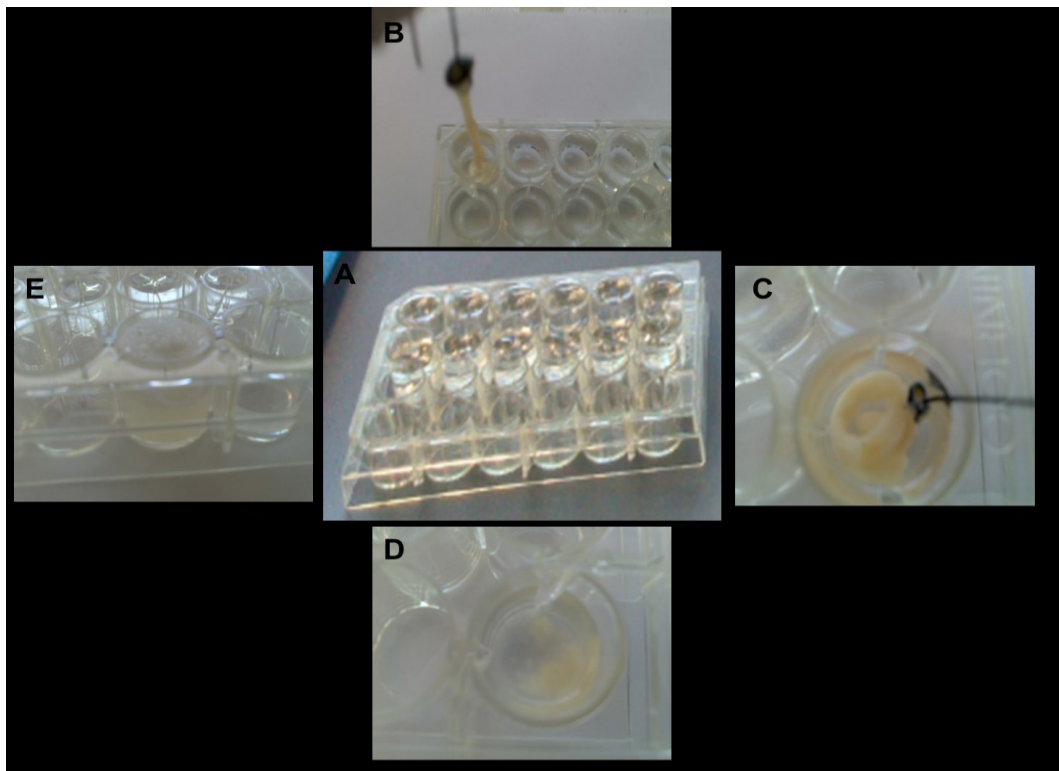


Figura 4. Dispositivo de lavado y disgregación del epitelio intestinal (Caja multipozos).

11.2. Obtención de fracciones membranales de enterocitos

La obtención de las fracciones membranales de los enterocitos se realizó a temperatura ambiente, agregando 12.5 μL Triton X-100 por cada 200 μL de células a una concentración 0.25 % (V/V) en PBS con 0.022 M de citrato de sodio. A esta fracción se le denominó como “fantasmas de enterocitos”, ya que solo contiene las membranas de estas células. La obtención de estos fantasmas se siguió por observación directa a través de microscopio de contraste de fases. La ausencia de vesículas lipídicas y la apariencia densa de las células se tomó como indicador de la liberación de contenido citoplásmico. La incubación con Triton X-100 para obtener los

fantasmas se realizó a temperatura ambiente por 7 min. La separación de las proteínas de membrana se hizo por centrifugación a 12 000 rpm por 20 min, 4 °C y se colectó el sobrenadante en que se encuentran las proteínas de membrana.

11.3. Precipitación de proteínas y cuantificación

Para retirar el Triton X-100 y poder realizar las metodologías subsecuentes, las proteínas se precipitaron en acetona fría (Arnold y Linke, 2008). Se mezcló 1 parte de la muestra con las proteínas/Tritón con 9 volúmenes de acetona fría al 100 %, después se resuspendió con ayuda de una micropipeta por 30 segundos y se incubó en hielo, esto se hizo dos veces. Posteriormente se dejó en el congelador por 30 min y se precipito en la centrifuga durante 15 min a 15 000 rpm a 4 °C. El precipitado se resuspendió en acetona fría y se centrífugo de nuevo.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la reacción con el ácido bicinonínico (BCA) de acuerdo a la técnica de Smith y colaboradores (1985). Se mezclaron 50 µL de las muestras problema con 1mL de reactivo BCA, se incubó por 30 min a 37 °C, y se determinó la absorbancia de la reacción a 562 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro PERKIN ELMER. La curva patrón de la determinación se realizó con Albumina Sérica Bovina (BSA) fracción V (Sigma Chem. Co. USA).

11.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés), probablemente es la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia. En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. Los complejos proteína-SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa (Laemmli, 1970).

La separación de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 8% de acuerdo a la metodología de Hedrick y Smith (1968), utilizando amortiguador de corrimiento Tris-glicina-SDS pH 8.3. Los geles se prepararon con amortiguadores con Tris 1.5 M pH 8.8 para el gel de separación y el de compactación, con Tris 0.25 M pH 6.8. Para separar las proteínas se pre-corrió a 80 volts por 30 min y se corrió a 80 volts por 2 horas 15 min. Los electroferogramas se visualizaron mediante la tinción de dos pasos de Fairbanks y colaboradores (1971) con Azul de Coomassie para los componentes mayores y mediante la técnica de formación de complejos

argénticos de Oakley y colaboradores (1980) con nitrato de plata para detectar los componentes menores.

Las imágenes fueron capturadas con ayuda de equipos de fotodocumentación Gel LOGIC 200, IMAGEN SYSTEM KODAK y GDS7600 de UV.

11.5. Detección en gel de poliacrilamida de las proteínas de membrana de enterocitos que se unen a Coumestrol

Para la detección de las proteínas capaces de unir al coumestrol, se desarrolló una metodología que implica la incubación del gel de poliacrilamida en el que se separaron las proteínas totales de la membrana de enterocitos con coumestrol. El gel se colocó en 10 mL de metanol al 50 % con 50 µg/mL de Coumestrol (Sigma Chemical Co, San Luis, MO), durante 3 min (Figura 5). El exceso de coumestrol en el gel se retiró colocándolo en 100 ml de una solución de metanol al 50 %, por 15 min seguido por un lavado con 2 litros agua destilada por 1 hora y 30 minutos. Para una mejor definición de las proteínas que unieron coumestrol, se fijó el gel por toda la noche en 100 mL de ácido acético al 10 %. La visualización y captura de las imágenes se realizó en equipos de fotodocumentación Gel LOGIC 200, IMAGEN SYSTEM KODAK y TRANSILLUMINATOR GDS7600 con la lámpara de UV.

La fluorescencia de las proteínas fue comparada con las imágenes de los geles teñidos con Azul de Coomassie y argénticos. Esta metodología comparativa se realizó con 3 repeticiones de extracciones distintas, y se determinó la ME; la movilidad electroforética relativa es inversamente proporcional al logaritmo del peso

molecular (PM). Trazando un gráfico con estándares de PM conocido (marcadores de peso molecular MW por sus siglas en inglés), se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El ME se calculó dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol o del frente de corrimiento (Fairbanks *et al.*, 1971).

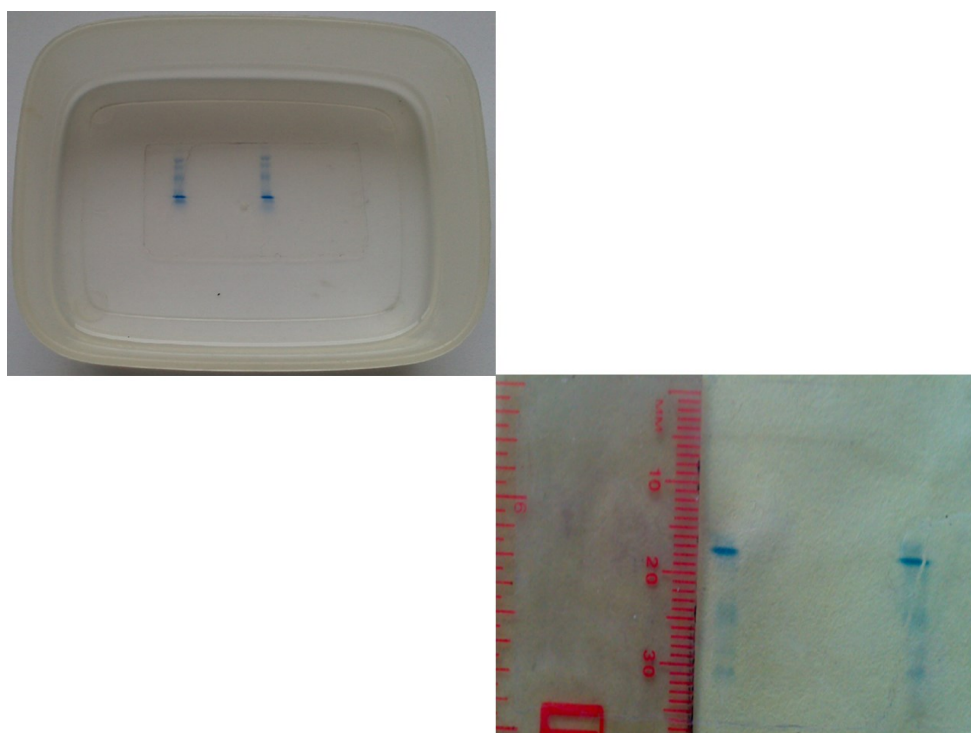


Figura 5. Método de deshidratación y absorción de Coumestrol en proteínas separadas electroforéticamente (gel deshidratado).

12. RESULTADOS

Para la obtención de enterocitos se optó por la metodología de Moussavi y Carlsoon (2013) en la cual se obtiene la porción del yeyuno del intestino delgado. El material en digestión se retira con lavados extensivos con PBS y esto se hizo, desde el extremo proximal del intestino, en el cual se introdujo un tubo de Tygon. El yeyuno se hizo pasar completamente sobre el tubo de Tygon aplicando al mismo tiempo solución de PBS para desalojar la materia en digestión. Se introdujo hilo de sutura en el lumen del tubo y se fijó en el extremo distal del intestino delgado. Con este dispositivo, se invirtieron las caras del intestino.

Con la superficie del ribete en cepillo expuesta, se lavó en una placa multipozos que tenía PBS para retirar los restos de “quimo” y mucinas. El epitelio intestinal se obtuvo mecánicamente en una solución salina amortiguada de citratos. La obtención de los enterocitos se visualizó mediante tinción con Sudan III en un microscopio de contraste de fases ya que este tipo celular tiene abundantes vesículas lipídicas (Figura 6), y con éste colorante se tiñeron en rojo. En la Tabla 1 se muestran las características de ambas metodologías.

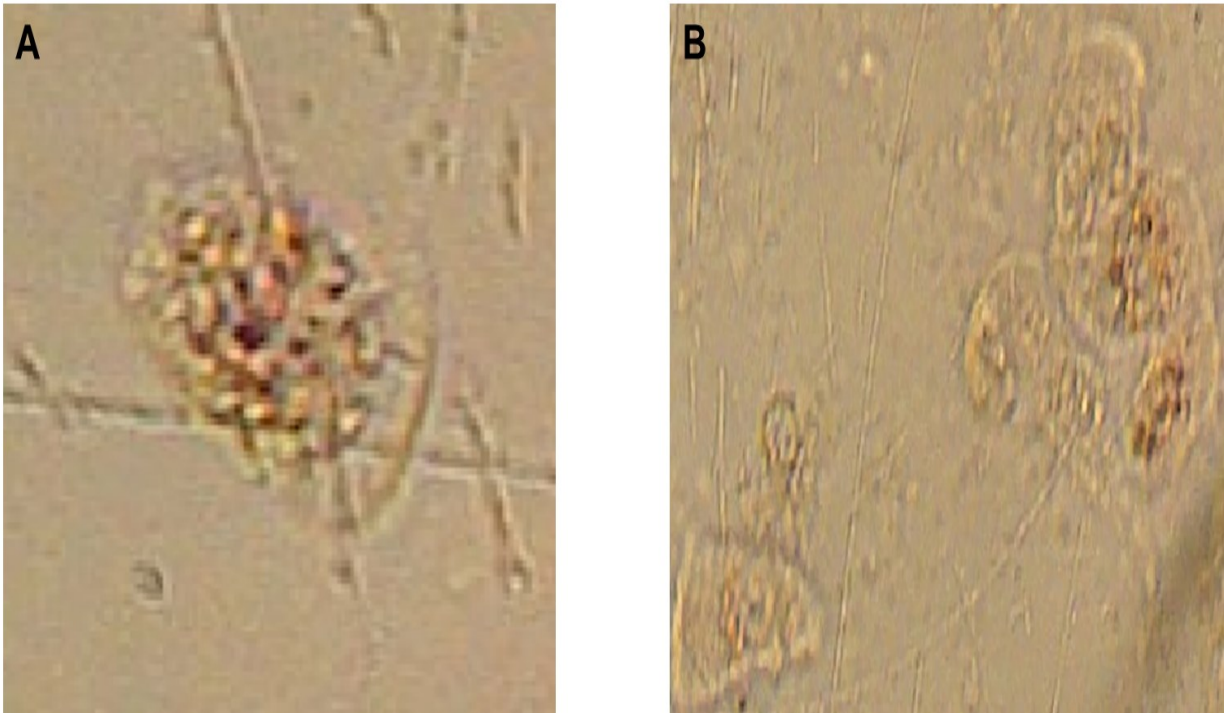


Figura 6. Microfotografías en contraste de fases de enterocitos con tinción de SUDAN III (400X). (A) Se aprecia un enterocito, con el ribete en cepillo y vesículas con lípidos teñidos en rojo. (B) Células en grupo, formando acinos, teñidos con SUDAN III.

La obtención de las fracciones de membranas de los enterocitos se realizó agregando a las células Triton X-100 a una concentración 0.25 % (V/V) en PBS con 0.022 M citrato. Esta fracción estuvo formada únicamente por las membranas de éstas células. Para determinar la concentración de Triton X-100 y el tiempo en el cual se deberían incubar las células, se utilizaron diferentes concentraciones del detergente (Figura 8). Este procedimiento se siguió por observación directa a través de un microscopio de contraste de fases y una tinción posterior con Sudan III. La ausencia de vesículas lipídicas y la apariencia densa de las células (Figura 7) se tomó como indicador de la liberación de contenido citoplásmico.

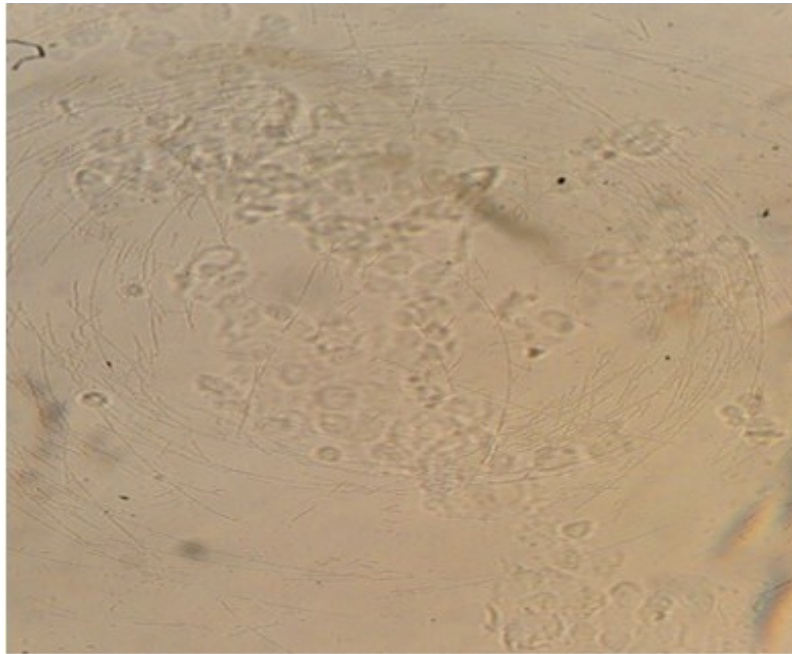


Figura 7. Micrografía de contraste de fases de la desestabilización de membrana de enterocitos con Tritón X-100 (400X). Se muestra solo las membranas de los enterocitos, no hay presencia de vesículas teñidas con el SUDAN III.

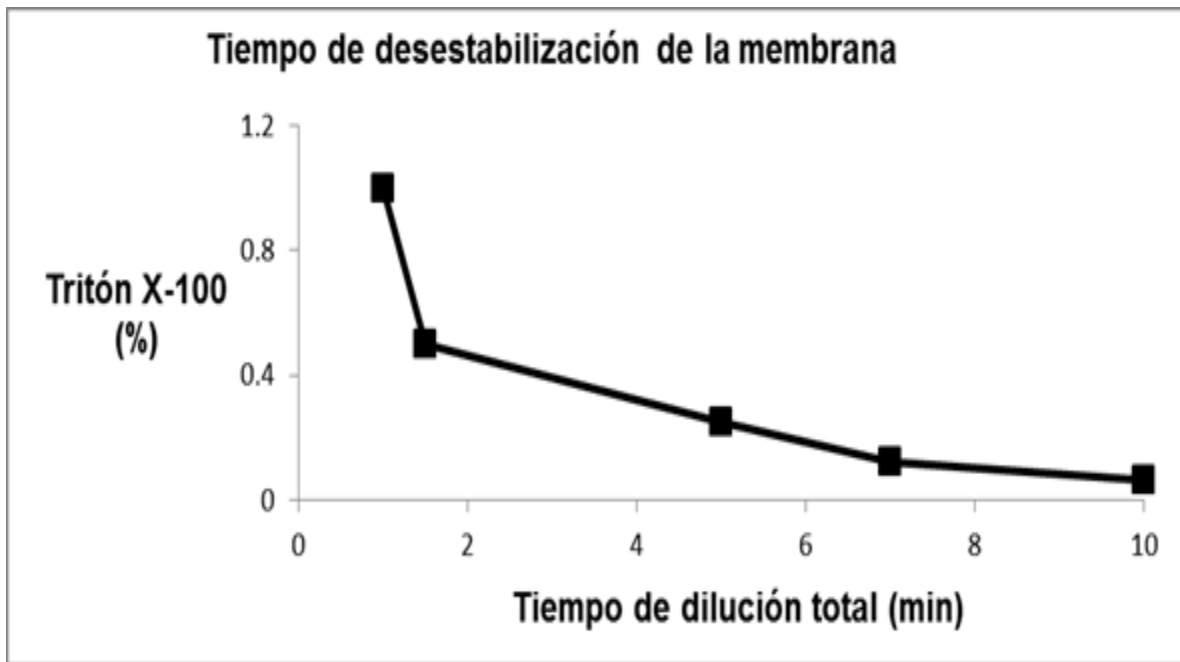


Figura 8. Efecto de la concentración de Triton X-100 en la disolución de membranas. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de detergente. Se siguieron al microscopio de contraste de fases hasta la obtención de cuerpos oscuros o desaparición de las células.

Tabla 1. Comparación de las metodologías utilizadas para la obtención de los enterocitos de yeyuno de ratón de la cepa CD1.

	Incubación con EDTA n= 5	Inversión del intestino en PBS Citrato n=4
<i>Tiempo</i>	>25 minutos	2 minutos
<i>Rendimiento del epitelio</i>	No se puede realizar conteo, porque se encuentran formando grupos.	1.338X10 ⁶ ± 0.49células por yeyuno de animal.
<i>Pureza</i>	Epitelio, materia de digestión, bacterias y otras células intestinales.	Epitelio intestinal puro; acinos de enterocitos e individuales.
<i>Características morfológicas de las células.</i>	Células formando grupos	Células individuales mostrando el “ribete en cepillo” típico y vesículas con lípidos (Tinción con Sudan III).

Usualmente, después de la obtención ya sea homogenización, precipitación o solubilización de una muestra conteniendo proteínas, se hace una evaluación o cuantificación de proteínas. La metodología más simple es la determinación de la concentración de una mezcla proteínica por absorción en la zona ultravioleta del espectro. En nuestro caso, esta cuantificación no se puede realizar directamente debido que el espectro de absorción del Triton presenta un pico máximo que va de 280 a 285 nm, al igual que las proteínas (Figura 9).

12.1. Precipitación de proteínas: ácido tricloroacético y acetona fría

Para hacer una remoción del detergente Triton X100, se probaron dos metodologías de precipitación de proteínas y se compararon sus eficiencias y posibles usos en las determinaciones cuantitativas y cualitativas posteriores. Las metodologías que se compararon fueron la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y acetona fría. En el primer caso, se utilizó el protocolo de Chaykin (1977), y el de (Arnold y Linke, 2008) para la precipitación cetónica.

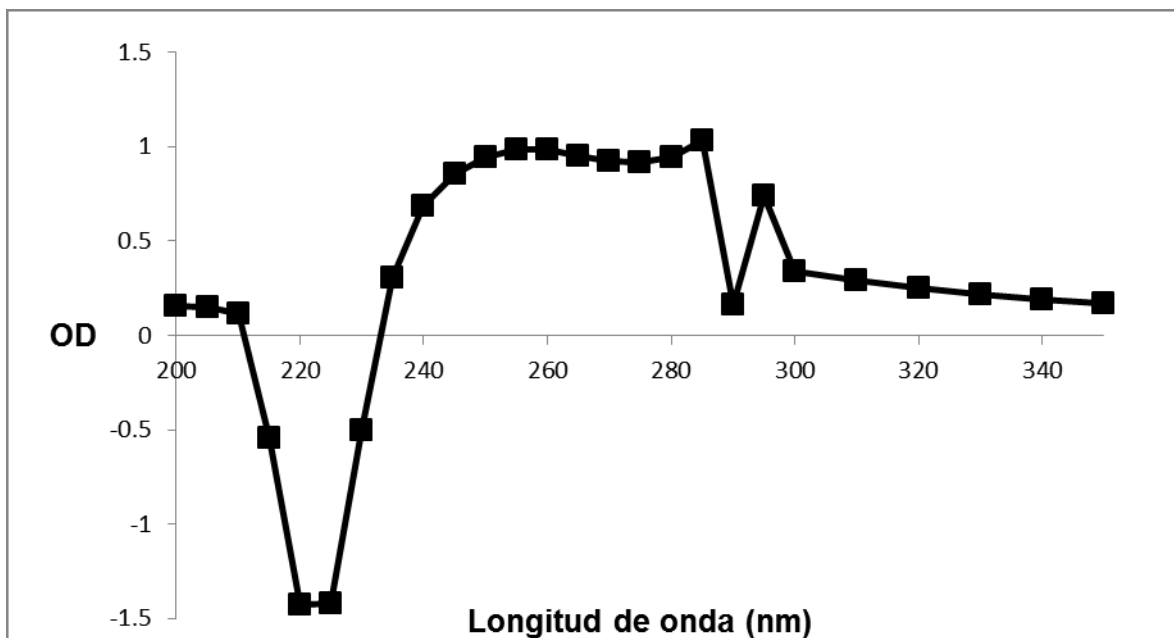


Figura 9. Espectro de absorción de absorción del Triton X-100, en amortiguador fosfatos-citrato. Una muestra de Tritón X-100 0.25% (V/V) se irradió a las diferentes longitudes de onda.

Con el fin de determinar la posible pérdida de las proteínas por precipitación con TCA, se hizo un experimento utilizando como estándar de albumina sérica bovina (BSA). Tomando 1 mL de solución 1mg/mL de BSA se hicieron extracciones consecutivas de la misma utilizando TCA al 1 %. Entre cada una de las precipitaciones se determinó la absorbancia en ultravioleta de la proteína (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la precipitación de proteínas utilizando ácido tricloroacético (TCA).

Extracción de BSA con citrato de sodio y TCA 1 %	Absorbancia ($\lambda = 280\text{nm}$)	Concentración ajustada (mg/ml)	Pérdida (%)
Primera	0.777	0.7333	26.6
Segunda	0.749	0.6850	6.5

Con este experimento se pudo constatar que hubo una pérdida de BSA, haciendo la extracción con TCA.

De manera análoga, era importante determinar el efecto que tendría la metodología de precipitación con las reacciones posteriores, principalmente con la cuantificación de proteínas. Se determinó la concentración de proteínas aisladas de las membranas de enterocitos precipitadas, ya sea con TCA o acetona. Se tomaron los mismos volúmenes de diferentes extracciones y se sometieron a precipitación. Después de la colecta por centrifugación y solubilización en amortiguador, se tomaron 100 μL y se cuantificó de acuerdo al protocolo "micro" descrito por Smith y colaboradores (1985) utilizando BSA como proteína para la curva patrón. El coeficiente de correlación (R^2) entre la determinación experimental y teórica de la curva patrón fue de 0.98. Los resultados de la cuantificación en las dos metodologías de precipitación se muestran en la Tabla 3.

12.2. Separación electroforética de las proteínas aisladas de membranas de enterocitos de yeyuno

La separación de proteínas se hizo en geles SDS-PAGE al 8 %, durante 2 horas 10 minutos siguiendo la metodología de Hedrick y Smith utilizando amortiguador Tris-glicina-SDS (1968). La detección de las proteínas más abundantes, a las cuales se les denominó componentes principales, se realizó utilizando el sistema de dos etapas de (Steck *et al.*, 1971). Utilizando los mismos geles, se hizo la detección de las proteínas presentes en cantidades no detectables con el Azul de Coomassie utilizando la capacidad de unión de plata a las proteínas mediante la técnica de (Oakley *et al.*, 1980), En la figura 9 se muestra la separación adecuada de las proteínas de la membrana de enterocitos por esta metodología.

Tabla 3. Comparación de la cuantificación de la concentración de proteínas por ácido bicinónico (BCA). Se tomaron volúmenes similares de proteínas de membrana de enterocitos y se precipitaron con TCA y acetona. Las muestras colectadas y resuspendidas en amortiguador se cuantificaron por el método de Smith y col. (1985).

Muestras	TCA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Acetona ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	275.44	773.7
2	134.64	666.66
3	104.24	729.35
4	136.24	814.83
5	88.24	300.30
6	49.84	168.02
7	128.24	199.50
8	85.84	166.40
9	37.84	92.20
10	112.24	217.20

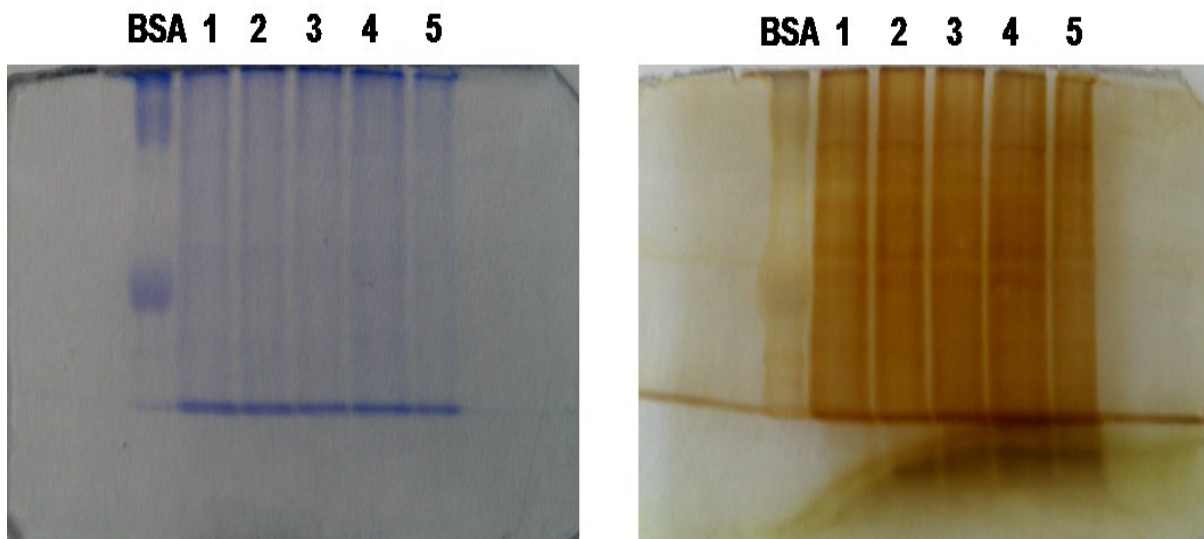


Figura 10. Electroferogramas de proteínas aisladas de diferentes preparaciones de enterocitos de ratón. Los números sobre la línea superior del gel corresponden a preparaciones individuales de enterocitos aislados. El carril marcado BSA corresponde a una muestra comercial de BSA fracción V.

Una vez separadas las proteínas de membrana de enterocitos se, realizo la incubación con Coumestrol, que consistió en poner los geles a deshidratar en metanol al 50 % con una concentración de COU 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; esto ayudo a que las proteínas estuvieran en mayor contacto con el COU, al disminuir el volumen del gel, debido a la deshidratación con el metanol. Provocando que se unieran un mayor número de moléculas de este compuesto a las proteínas, que se encontraba en el gel. Se retiró el exceso de COU con un lavado de agua destilada por 1 hora 30 minutos. En la figura 11, se muestra la (s) proteína(s) que se unen a COU.

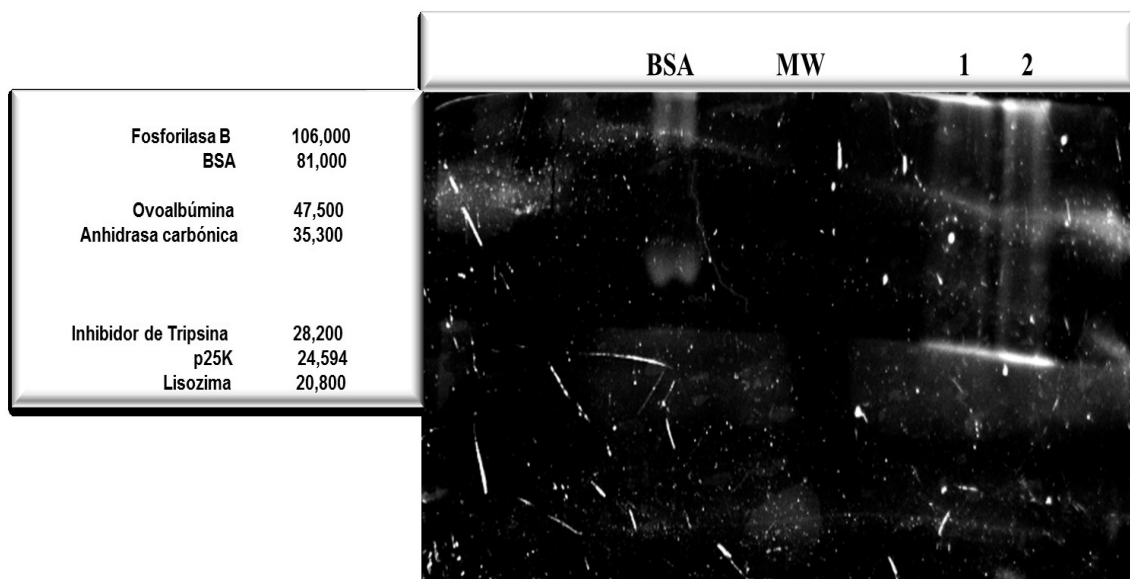


Figura 11. Incubación de proteínas de membrana de epitelio intestinal en metanol al 50 % con una concentración de COU al 50 $\mu\text{g/mL}$. Utilizando como proteína estándar, albumina sérica bovina (BSA), y marcadores de peso molecular (MW), con Fosforilasa B (106 000 Dalton), Albumina Sérica Bovina (81 000 Dalton), Ovoalbúmina (47 500 Dalton), Anhidrasa Carbónica (35 300 Dalton), Inhibidor de Tripsina de Soya (28 200 Dalton) y Lisozima (20 800 Dalton). Las muestras 1 y 2 son proteínas de membrana de enterocitos, de dos intestinos, de individuos distintos.

Para obtener una mejor resolución de las proteínas que se unen al coumestrol, y retirar el exceso de este compuesto del gel. Se optó por dejar toda la noche en ácido acético al 10 %. Y el resultado se muestra en la figura 12, cuyo gel es el mismo de la figura 11.

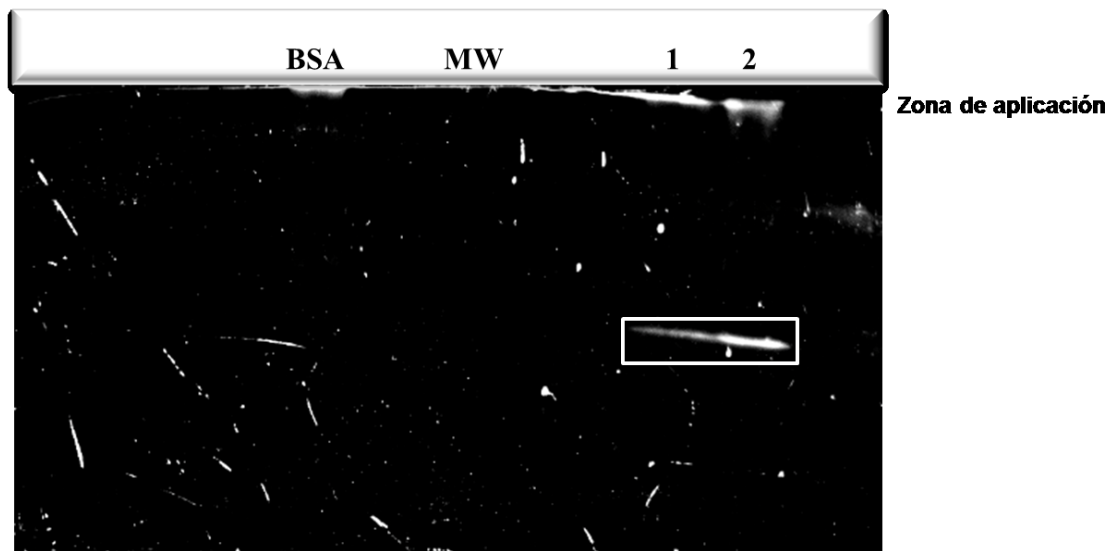


Figura 12. Gel lavado toda la noche con ácido acético al 10%. Este gel es el mismo que se presenta en la figura 11. El rectángulo en blanco, marca la zona en donde se encuentran las proteínas de la membrana de enterocitos que se unen a Coumestrol. Aquí se retiró por completo el Coumestrol que aún tenía el gel, y el BSA; está por ser una proteína que, se conoce como acarreadora inespecífica de sustancias se unió al Coumestrol, pero al tener una interacción débil fue separado.

13. DISCUSIÓN

Durante mucho tiempo se asumió que algunas moléculas como el colesterol, eran absorbidos de forma pasiva a través de la membrana de todas las células, incluyendo los enterocitos, por sus características lipófilicas, además de ser constituyentes estructurales de las membranas biológicas (Jia *et al.*, 2011). La misma forma de pensar se ha propuesto para los fitoestrógenos. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la posibilidad de que un componente proteico de la membrana de las células que delinear el intestino pueda ser el responsable de la absorción de este tipo de compuestos, particularmente de los coumestanos. La separación electroforética y la posterior detección con soluciones alcohólicas conteniendo Coumestrol (Figura 11), permite establecer la presencia de este tipo de componentes membranales en los enterocitos.

La visión de la incorporación de compuestos como el colesterol, o vitaminas liposolubles ha cambiado con la identificación, aislamiento y caracterización de varias proteínas localizadas funcionalmente en la membrana apical de las células del epitelio intestinal que están implicadas en su transporte (During y Harrison, 2007; Moussa *et al.*, 2008; Reboul *et al.*, 2011).

Al igual que el colesterol, los fitoestrógenos tienen características estructurales y químicas de liposolubilidad que harían suponer que pasarían a través de membranas celulares por difusión simple, por no presentar resistencia de sus cargas parciales.

La identificación y caracterización de NPC1 L1, una proteína importante en el metabolismo del colesterol intracelular, y cuya deficiencia produce lipidosis, enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por la acumulación de colesterol no esterificado en los lisosomas. El gen NPC1L1, se encuentra en el cromosoma 7 del humano, la estructura primaria de la proteína consta de 1332 residuos de aminoácidos, con un peso 146.5 kDa (Davies *et al.*, 2000).

Como se mencionó en la introducción, otros componentes importantes asociados al transporte y que interactúan con moléculas lipófilicas son las SR-Bs, pertenecen a la familia de proteínas CD 36 una glicoproteína de la membrana plasmática, de células como plaquetas, monocitos, eritrocitos, algunos endotelios, células de epitelios como el intestinal; constituidas por 590 residuos de aminoácidos que brindarían una proteína de 65 kDa que al ser glucosilada y en estado maduro, presenta un peso de 88 kDa (Tandon *et al.*, 1989.). Esta proteína se aisló de membranas de las plaquetas y se hizo mediante los siguientes pasos: a) Disolución de las membranas con Triton X-114; b) cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa; c) cromatografía de afinidad a la lectina de germen de trigo de aglutinina-Sepharosa, y d) la cromatografía de exclusión por tamaño en Ultrogel AcA-44 (Tandon *et al.*, 1989; Calvo y Vega, 1993). Si se compara la manera en la cual se extrajo esta proteína con la que se utilizó en este estudio, es evidente que el método simple de obtención de fantasmas de enterocitos presenta ventajas sobre el reportado para CD36. El requerimiento básico es la fuente del epitelio. En nuestro caso, la inversión y posterior exposición del epitelio intestinal permite un acceso

directo para poder retirar sustancia y microorganismos contaminantes. Además de las bacterias, una barrera importante es la capa de mucina. En nuestro caso, el uso de un medio en el cual se encontrara citratos permitió desensamblar la cubierta mucilaginosa que cubre y protege al intestino permitiendo el acceso a la colagenasa que disgrega el epitelio.

La obtención de células íntegras aisladas y sin contaminantes (Figura 6), es el equivalente a la obtención de células de la sangre. La identidad de los enterocitos se determinó tanto por sus características morfológicas como por la presencia característica de las vesículas lipídicas en las cuales se acumula Sudan III (Usubuchi *et al.*, 1981). Aunque no en todas las células es posible apreciarlo, en una cantidad importante de ellas es evidente la presencia de los estereocilios que conforman el ribete en cepillo que permite evaluar entonces el rendimiento de enterocitos que tiene la preparación.

En este trabajo se realizó la identificación de una proteína aislada de las membranas de los enterocitos del yeyuno del ratón adulto de la cepa CD1 con un peso molecular relativo (MW_r) de 24 594 daltones a la que se le ha denominado momentáneamente como p25 capaz de unirse al COU directamente en geles de poliacrilamida. Dada su localización, es probable que el ingreso al organismo por vía oral del Coumestrol se lleve a cabo de forma similar al que tienen moléculas anfipáticas como las que utilizan los acarreadores NPC1L1.

La unión del Coumestrol a p25 directamente en el gel permite su identificación de manera simple. A diferencia de la metodología utilizada en la caracterización de NPC1 L1, SR-B1 y CD 36 que requieren de métodos inmunoquímicos y de desnaturalización (Acton *et al.*, 1996; Hauser *et al.*, 1998; Altmann *et al.*, 2004; Werder *et al.*, 2001), p25 puede ser detectada en geles mediante el aumento en la fluorescencia del complejo proteína-coumestrol dando una imagen fluorescente simple (Figura 13).

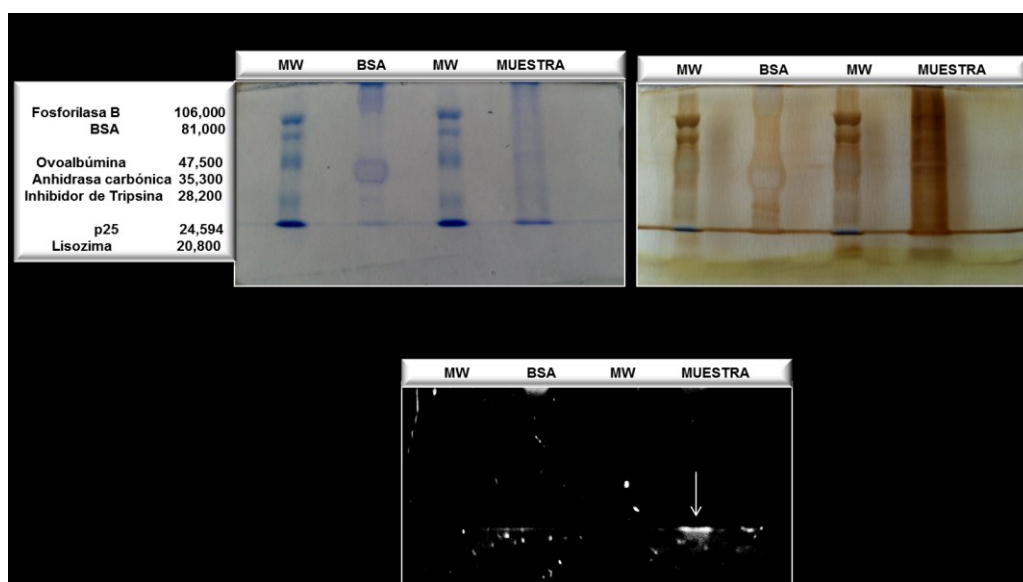


Figura 13. Electroferograma con diferentes tinciones. Muestras de diferentes proteínas se separaron electroforéticamente y el gel se tiñó con diferentes metodologías para mostrar los componentes. En la figura A se muestra el gel teñido con azul de Coomassie mostrando los componentes de mayor concentración, la figura B muestra la composición incluyendo los componentes que están en menor concentración mediante la tinción con Plata amoniacal; la figura C muestra la detección de proteínas capaces de unir al coumestrol con mayor avidez, después de la incubación con Ac COOH. En todas las figura, los carriles 1y 3 tienen los estándares de proteínas conocidas (MW),

carril 2 BSA (fracción V) y en el carril 4, las proteínas aisladas de la membrana de enterocitos de ratón; la flecha en blanco muestra la posición de p25.

Uno de los hallazgos colaterales del presente estudio fue la identificación de las proteínas que se unen al Coumestrol y que forman parte del complejo comercial conocido como BSA fracción V (Figura 11). Es conocida la capacidad que tiene la albúmina para transportar pequeñas moléculas hidrofóbicas de manera inespecífica a través del torrente circulatorio (Levedahl y Bernstein, 1954). Sin embargo, la detección inicial de varias proteínas asociadas a esta fracción del suero de bovino tiene características diferentes a la de p25. Estas diferencias se hacen evidentes cuando el gel se incuba en agua o ácido acético. En ambos sistemas, después de una incubación por períodos superiores a las 8 h, la fluorescencia asociada del Coumestrol a estas proteínas se pierde, mostrando entonces una menor capacidad de interacción si se compara con la estabilidad de los complejos Coumestrol-p25 (Figura 12).

Una posible explicación funcional de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, es que el Coumestrol y otras moléculas con características anfipáticas pudieran compartir mecanismos de incorporación a la circulación. Por consiguiente, y al igual que el colesterol reesterificado en el retículo endoplasmico, sería transportado a la membrana basolateral del enterocito a través de vesículas recubiertas de COPII (Mansbach y Gorelick, 2007) y de esta forma ser transportado al sistema linfático; posteriormente al sistema vascular a través del conducto torácico (Xiao y Lewis, 2012).

Una vez en circulación el Coumestrol puede unirse a la albumina sérica que es abundante en la circulación representando alrededor del 50 % de todas las proteínas en la circulación sanguínea (Schellman *et al.*, 1951). Esta proteína transporta un gran número de moléculas hidrofóbicas pequeñas como hormonas esteroides y otras como el coumestrol facilitando la transferencia desde la circulación sanguínea a todos los órganos, como el hígado, el riñón, el intestino, el cerebro, órganos reproductivos, entre otros (Baker, 1998; Bickoff *et al.*, 1958). La albúmina solo interactúa con estas moléculas mediante uniones muy débiles debida a sus cargas parciales o sus características lipófilicas (Kragh-Hansen *et al.*, 1990).

Algunos autores consideran que la albúmina tiene un papel en el proceso de detoxificación de fitoquímicos, micotoxinas, compuestos fenólicos y otros xenoestrógenos al retardar la unión de estos a los receptores a estrógenos (Soto *et al.*, 1991; Vom-Saal *et al.*, 1995), proteínas transportadoras de hormonas como globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), globulinas de unión a corticosteroides (CBG) y la globulina unidora de tiroxina (TBG) y enzimas, lo que permite la inactivación y posterior excreción de los xenoestrógenos sin que se presenten efectos que provoquen una disrupción endocrina (Baker, 1998)

14. CONCLUSIONES

- Se diseñó una metodología de obtención de células epiteliales del yeyuno de ratón de la cepa CD1, que brinda células aisladas con características morfológicas y estructurales características.
- Se obtuvieron proteínas membranales que permiten la interacción con compuestos de características hidrofóbicas (Coumestrol) en un medio sin la interferencia de los reactivos de extracción (detergente Tritón X-100) que permiten su análisis (micelas reversas).
- La separación electroforética de las proteínas de membrana de enterocitos muestra su complejidad y diversidad.
- Se obtuvo una metodología de detección de proteínas que unen al Coumestrol directamente en geles de poliacrilamida.
- Se identificó una proteína de la membrana de enterocitos que se une al Coumestrol; MW_r de 24 594 Daltones.
- Esta proteína al encontrarse en la membrana celular de enterocitos, puede tener la función de internalizar al Coumestrol.
- La unión que se observó del Coumestrol a la albumina sérica bovina, comprueba la unión inespecífica de esta proteína a diversos compuestos entre ellas colesterol, vitaminas y hormonas esteroideas, que tienen una estructura química parecida al Coumestrol.

15. CONSIDERACIONES

- Es necesario hacer una detección *in situ* de la proteína identificada.
- Se requiere hacer una caracterización cinética de las propiedades de unión a Coumestrol y otros compuestos, incluidos hormonas esteroides y otros fitoestrógenos.
- Es necesario hacer una caracterización detallada de esta proteína.

16. PERSPECTIVAS

La identificación en geles de poliacrilamida de la proteína p25K de la membrana de enterocitos de yeyuno de ratón CD1 a la que se une el Coumestrol, fue gracias al diseño de una metodología rápida, relativamente fácil y económica. Lo cual permitirá explorar, por ejemplo, si esta proteína se encuentra en enterocitos de otras especies animales y si une otros fitoestrógenos. Dando pauta también a realizar su purificación y caracterización utilizando metodologías de alta resolución, por ejemplo, haciendo uso de cromatografía por exclusión de tamaño en una columna de sílica porosa (HPLC). Además de secuenciar la estructura primaria (aminoácidos) de la proteína purificada, y de los péptidos resultantes de la digestión con tripsina; y si fuera el caso, por medio de espectrometría de masas (MS) acoplando la ionización por láser sobre una matriz desionizada (MALDI) para dilucidar los sitios y tipo de glicosilación (O-glicósilados serina, treonina y hidroxilisina, o N-glicósilados asparagina).

17. REFERENCIAS

- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs, HH, Krieger M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518–520.
- Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 303:1201-1204.
- Arnold T, Linke D. 2008. The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins. *Curr. Protocols Protein Sci.* 53:4.8.1-4.8.30.
- Baker ME. 1998. Albumin's role in steroid hormone action and the origins of vertebrates: is albumin an essential protein? *FEBS Lett.* 439:9–12.
- Baker ME. 2002. Beyond carrier proteins. Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates, *J Endocrinol.* 175:121–127.
- Bickoff EM, Lyman RL, Livingston AL, Booth AN. 1958. Characterization of Coumestrol, a Naturally Occurring Plant Estrogen. *J American Chem Soc.* 80:3969-3971.
- Björnström L, Sjöberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 19:833–842.

- Brewer HB, Santamarina-Fojo S. 2003. New insights into the role of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport. *American J. Cardiol.* 91:3E–11E.
- Calvo D, Vega MA. 1993. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem.*;268:18929-18935.
- Castrejón V, Carbó R, Martínez M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *REB* 26: 49-57.
- Chaykin S. 1977. Oxidative Phosphorylation. In: *Biochemistry Laboratory Techniques*. Robert. E Kreiger Publishing. (New York). 111-121.
- Daughaday WH. 1956. Binding of corticosteroids by plasma proteins. I. Dialysis equilibrium and renal clearance studies. *J Clin Invest.* 35:1428-1433.
- Daughaday WH. 1958. Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis. *J Clin Invest.* 37:511-518.
- Davies JP, Levy B, Ioannou Ya. 2000. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics.* 65:137–145.

- During A, Harrison EH. 2007. Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells. *J Lipid Res.*48:2283-2294.
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF. 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* 10:2606-2617.
- Gordon H, Gross J, O'Connor D, Pitt-Rivers R. 1952. Nature of the circulating thyroid hormone-plasma protein complex. *Nature.* 169:19-20.
- Gouyon F, Caillaud L, Carriere V, Klein C, Dalet V, Citadelle D, Kellett GL, Thorens B, Leturque A, Brot-Laroche E. 2003. Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J Physiol.*552:823-832. .
- Granados-Sánchez, D., P. Ruíz-Puga y H. Barrera-Escorcia. 2008. Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo* 14:51-64.
- Hammond GL. 2011. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol Reprod.* 85:431-441.
- Hassan HH, Denis M, Lee DY, Iatan I, Nyholt D, Ruel I, Krimbou L, Genest J. 2007. Identification of an ABCA1-dependent phospholipid-rich plasma membrane apolipoprotein A-I binding site for nascent HDL formation: implications for current models of HDL biogenesis. *J. Lipid Res.* 48:2428-2442.

- Hauser H, Dyer JH, Nandy A, Vega MA, Werder M, Bieliauskaite E, Weber FE, Compassi S, Gemperli A, Boffelli D, Wehrli E, Schulthess G, Phillips MC. 1998. Identification of a Receptor Mediating Absorption of Dietary Cholesterol in the Intestine. *Biochemistry* 37:17843–17850.
- Hedrick JL, Smith AJ. 1968. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126:155-164.
- Henderson JFP. 1993. The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:708-721.
- Higgins FC, Linton JK. 2001. The xyz of ABC transporters. *Science.* 293:1782-1784.
- Jefferson WN, Patisaul HB, Williams CJ. 2012. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction.* 143:247–260.
- Jia L, Betters JL. and Yu L. 2011. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Protein in Intestinal and Hepatic Cholesterol Transport. *Annu. Rev. Physiol.* 73:239–259.
- Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgacs M. 2003 Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett.* 2003. 545:76-85.
- Kragh-Hansen U, Minchiotti L, Brennan SO, Sugita O. 1990. Hormone binding to natural mutants of human serum albumin. *Eur J Biochem.*, 193:169–174.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest*. 98:984-995.
- Le Bail JC, Champavier Y, Chulia a J, Habrioux G. 2000. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci*. 66:1281-1291.
- Lenis SYY, Gutiérrez GMT, Tarazona MAM. 2010. Efectos de los Fitoestrógenos en la Reproducción Animal. *Rev. Fac. Nal. Agr*. 63:5555-5565 .
- Leopold S, Erwin M, Oh J, Browning B. 1976. Phytoestrogens: Adverse Effects on Reproduction in California Quail. *Science* 191: 98–100.
- Levedahl BH, Bernstein H. 1954. Testosterone binding by modified bovine serum albumin. *Arch Biochem Biophys*. 52:353-357.
- Mansbach CM, Gorelick F. 2007. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *American J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293:G645-G450.

- McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Edwards JA, Bausch J. 2006. Acute subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. *Food Chem. Toxicol.* 44:56-80.
- Mercier-Bodarc, Lfsena DA, Baulieu E-E. 1970. Sex-steroid binding plasma protein (SBP).. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 147:204-224.
- Moussa M, Landrier J-F, Reboul E, Ghiringhelli O, Coméra C, Collet X, Fröhlich K, Böhm V, Borel P. 2008. Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *J Nutr.*138:1432-1436.
- Moussavi NA, Carlsoon P. 2013. Separation of intact intestinal epithelium from mesenchyme. *BioTechniques.* 55:42-44.
- Muñoz-Mendoza, R., A. L. Murillo-Medina, J. F. Pérez-Gutiérrez y A. Córdoba-Izquierdo. 2002. Parámetros reproductivos en vacas Holstein alimentadas con alfalfa alta en coumestrol. *Archivos de Zootecnia* 51:373-376.
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 105:361-363.
- Opalka M, Kamińska B, Ciereszko R, Dusza L. 2004. Genistein Affects Testosterone Secretion by Leydig Cells in Roosters (*Gallus gallus domesticus*). *Reproductive Biol.* 4:185–193.

- Opalka M, Kaminska B, Leska A, Dusza L. 2012. Mechanism of Phytoestrogen Action in Leydig Cells of Ganders (*Anser anser domesticus*): Interaction with Estrogen Receptors and Steroidogenic Enzymes. *J. Environm. Sci. Health. Part A*, 47: 1335–1339.
- Oxender LD. 1972. Membrane Transport. *Ann. Rev. Biochem.* 41: 777-814.
- Patisaul HB. 2012. Infertility in the Southern White Rhino: Is Diet the Source of the Problem? *Endocrinology* 153:1568–1571.
- Patisaul HB, Jefferson W. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Front. Neuroendocrinol.* 31:400–419.
- Pérez-Rivero JJ, Martínez-Maya JJ, Pérez-Martínez M, Aguilar-Setién A, Serrano H. 2008. Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados por moco vaginal estral. *Vet. Méx.* 40:9-16.
- Raynaud JP, Mercier-Board C, Baulieu EE. 1971. Rat estradiol binding plasma protein (EBP). *Steroids* 18:767-788.
- Reboul E, Goncalves A, Comera C, Bott R, Nowicki M, Landrier J-F, Jourdeuil-Rahmani D, Dufour C, Collet X, Borel P. 2011. Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters. *Mol Nutr Food Res.* 55:691–702.

- Romero-R C, Tarragó R, Mendoza R, Arista R, Rosado A. 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Vet.Méx.*, 28:25-30.
- Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. 2006. Rapid endocrine disruption: Environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 102:163–169.
- Sanin YYL, Gómez MTG, Morales AMT. 2010. Efectos de los Fitoestrógenos en la Reproducción Animal. *Rev Facult Nac de Agron – Medellín.* 63:5555–5565.
- Serrano H, Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setién A, de Paz O, Villa-Godoy A. 2007. Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. *Reprod. Fertil. Develop.* 19:470-472.
- Serrano H, Pérez-Rivero JJ, Martínez-Maya JJ, Aguilar-Setién A, Pérez-Martínez M, García-Suárez MD. 2008. Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptors in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. *Neuro Endocrinol. Lett.* 26: 101-104
- Serrano H, Pérez-Rivero JJ, García-Suárez MD, Castro-Campillo A, Aguilar-Setién A, Salame-Méndez A, Ramírez-Pulido J. 2009. Exogenous steroids do not affect reproductive capabilities in *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). En: *Avances en el estudio de los Mamíferos de México*, vol II (C. Lorenzo, E. Espinoza y J. Ortega, eds). Asociación Mex. de Mastozoología (México).

- Setchell KD, Gosselin SJ, Welsh MB, Johnston JO, Balistreri WF, Kramer LW, Dresser BL and Tarr MJ. 1987. Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*. 93:225–233.
- Schellman JA, Lumry R, Samuels LT. 1951. The Binding of Uncharged Molecules to Proteins. 11. Testosterone and Bovine Serum Albumin. *J. American Chem. Soc.* 76:2808-2813
- Smith JF, Jagusch KT, Brunswick LFC, Kelly RW. 1979. Coumestans in lucerne and ovulation in ewes. *New Zealand J. Agricult. Res.* 22:411–416.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. 1991. p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92:167–173.
- Steck TL, Fairbanks G, Wallach DF. 1971. Disposition of the major proteins in the isolated erythrocyte membrane. Proteolytic dissection. *Biochemistry.* 10:2617-2624.
- Tiemann U, Schneider F, Vanselow J, Tomek W. 2007. In Vitro Exposure of Porcine Granulosa Cells to the Phytoestrogens Genistein and Daidzein: Effects on the

- Biosynthesis of Reproductive Steroid Hormones. *Reproductive Toxicol.* 24: 317–325.
- Tandon NN, Kralisz U. and Jamieson GA. 1989. Isolation and Characterization of Platelet Glycoprotein IV (CD36). *J. Biol. Chem.* 264: 7573-7586.
- Tubbs C, Phillip H, Mary C, Nicole V, Matthew M. 2012. Activation of Southern White Rhinoceros (*Ceratotherium Simum Simum*) Estrogen Receptors by Phytoestrogens: Potential Role in the Reproductive Failure of Captive-Born Females? *Endocrinology* 153:1444–1452.
- Usubuchi I, Sato T, Kudo H. 1981. Significance of Sudan III staining in macrophages. *Tohoku J Exp Med.* 134:79-85.
- Verkman AS, Mitra KA. 2000. Structure and function of aquaporin water channels. *Amer. J. Physiol.* 278:F13- F28.
- Vom-Saal FS, Nagel SC, Palanza P, Boechler M, Parmigiani S, Welshons WV.1995. Estrogenic pesticides: binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. *Toxicol Lett.* 77:343–350.
- Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. 2007. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 274:1-7.

- Werder M, Han CH, Wehrli E, Bimmler D. 2001. Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry*. 40:1643–11650.
- Whitten PL, Patisaul HB. 2001. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect* 109:5–20.
- Wilson ME, Westberry JM, Prewitt AK. 2008. Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha gene expression in the brain: A role for promoter methylation? *Front Neuroendocrinol*. 29:375-385.
- Wilson BD. 1978. Cellular Transport Mechanisms. *Ann. Rev. Biochem.* 47:933-965.
- Wocławek-Potocka I, Mannelli C, Boruszewska D, Kowalczyk-Zieba I, Waśniewski T, Skarżyński DJ. 2013. Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: Cow as a model. *Int J Endocrinol*. 2013:1-15
- Xiao C, Lewis GF. 2012. Regulation of chylomicron production in humans. *Biochim Biophys Acta*. 1821:736-746.
- Yohan Y, Sanin L, Teresa M, Gómez G, Marcel A, Morales T. 2010. Efectos de los Fitoestrógenos en la Reproducción Animal. *Rev Fac Nac de Agron de Medellín*. 63:5555-5565.
- Zhao E, Mu Q. 2011. Phytoestrogen biological actions on Mammalian reproductive system and cancer growth *Sci Pharm*. 79:1–20.

Zhao RQ, Zhou YC, Ni YD, Lu LZ, Tao ZR, Chen WH, Chen J. 2005. Effect of daidzein on egg-laying performance in Shaoxing duck breeders during different stages of the egg production cycle. *Br Poult Sci.*46:175–181.