

Universidad Autónoma Metropolitana  
"Unidad Xochimilco"

División: Ciencias Biológicas Y De La Salud  
Departamento De Sistemas Biológicos

Lic. en Química Farmacéutica Biológica

**Proyecto específico:**  
**Papel de los estrógenos sobre la actividad de la  
descarboxilasa del glutamato**

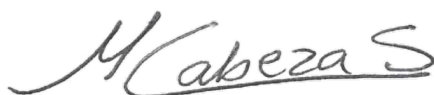
Proyecto genérico:  
Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas:  
Desarrollo de reactivos analíticos y de diagnóstico

Presenta:  
García García de la Cadena Jesús Fernando,  
2163061196

Tutora:  
Dra. Marisa Cabeza Salinas, 2683

Laboratorio de hormonas G-006, UAM Xochimilco  
22 de Marzo - 22 de Octubre del 2022



VoBo Dra. Marisa Cabeza Salinas



## Contenido

1. Introducción	2
2. Marco teórico	2
2.1 GABA y glutamato descarboxilasa	2
2.2 Mecanismo de acción de estrógenos y progesterona	5
2.3 Papel de los estrógenos y de la progesterona sobre la actividad de GAD	5
2.4 Tamoxifeno	6
3. Objetivos	7
3.1 General	7
3.2 Específicos	7
4. Material y metodología utilizada	7
4.1 Tejido biológico	7
4.2 Extracción y purificación del principio activo (Tamoxifeno)	8
4.3 Ensayo enzimático	8
4.4 Cromatografía de capa fina (CCF)	8
4.4.1. Preparación de estándares	8
5. Resultados y discusión	9
5.1 Actividad de las isoenzimas de la L-glutamato descarboxilasa (GADs) en las neuronas GABAérgicas estudiadas	10
5.1.1 Actividad <i>in vitro</i> de las GADs en <i>Sustancia Nigra</i>	10
5.1.2 Actividad <i>in vitro</i> de las GADs en <i>Locus coeruleus</i>	11
5.1.3 Actividad <i>in vitro</i> de las GADs en Sistema de activación reticular ascendente	12
6. Conclusiones	13
7. Bibliografía	14

## 1. Introducción

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido que se encuentra en el sistema nervioso central (SNC), cumpliendo la función como neurotransmisor inhibitorio. Para su síntesis es necesaria la presencia de glutamato y de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), de la cual existen dos isoformas: GAD<sub>65</sub> que depende para su actividad de la presencia de progesterona (P<sub>4</sub>), [Carrasco, 2021] y GAD<sub>67</sub> de la cual se desconoce su mecanismo de acción.

En este estudio se propone determinar la formación *in vitro* de GABA en presencia de P<sub>4</sub> y/o 17 $\beta$ -estradiol, junto con el antagonista del receptor de 17 $\beta$ -estradiol, el tamoxifeno, utilizando la fracción sobrenadante y microsomal de diferentes regiones cerebrales como fuente de GADs.

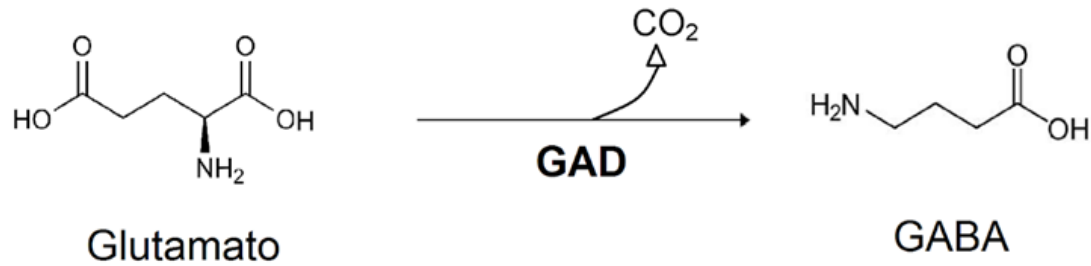
## 2. Marco teórico

### 2.1 GABA y glutamato descarboxilasa

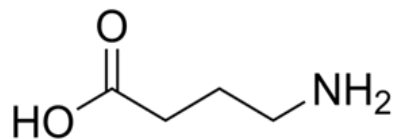
La enzima conocida como glutamato descarboxilasa (GAD) es necesaria para la síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) a partir de glutamato (Figura 1). Se ha demostrado que esta enzima tiene como coenzima al fosfato de piridoxal [Santos, *et. al.*, 2018]. Además, presenta dos isoformas codificadas por genes diferentes: la GAD<sub>65</sub> cuya actividad depende de la presencia de progesterona (P<sub>4</sub>) y la GAD<sub>67</sub> que no depende de este esteroide [Carrasco, 2021]. En mamíferos las dos isoformas de GAD, cuentan con masas moleculares de 65 KDa (GAD<sub>65</sub>) y de 67 KDa (GAD<sub>67</sub>). Se conoce que la GAD<sub>65</sub> predomina en terminales nerviosas, pudiendo estar anclada en la membrana de vesículas que contienen a los neurotransmisores, mientras que GAD<sub>67</sub> es una enzima citosólica, que se distribuye en el soma y dendritas neuronales, pero que de igual forma participa en los procesos axonales [Schousboe y Waagepetersen, 2017].

El GABA (Figura 2), es un neurotransmisor que se encuentra presente en las neuronas GABAérgicas de diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC), de la misma forma en diferentes regiones cerebrales. Un ejemplo de estas, son las zonas como: sustancia *nigra*, sistema activador reticular ascendente y *locus*

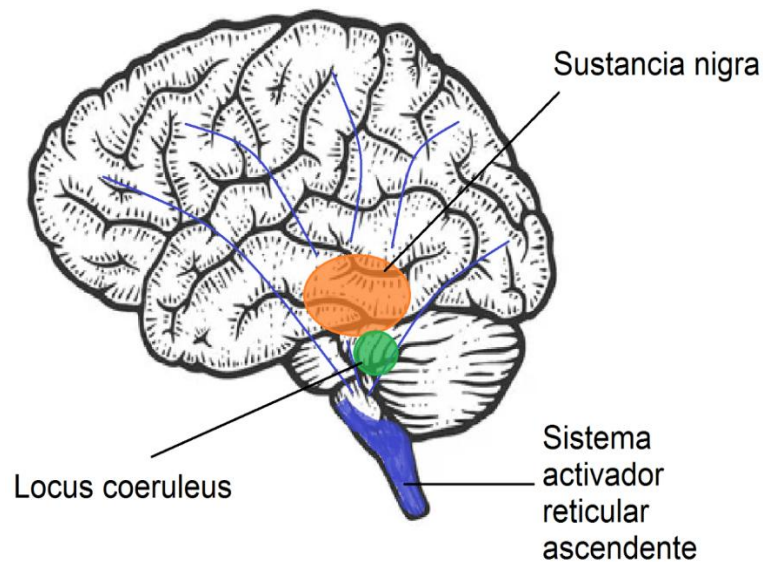
*coeruleus*, (Figura 3). Su molécula posee cuatro carbonos, con un grupo carboxilo y uno amino en los extremos, con un peso molecular de 103.12 g/mol<sup>1</sup>.



**Figura 1.** Síntesis de GABA a partir de glutamato con la enzima GAD.



**Figura 2.** Estructura química de GABA.

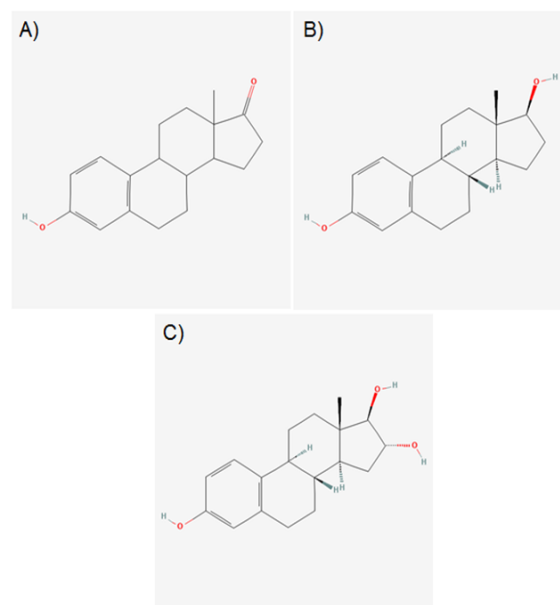


**Figura 3.** Principales tejidos cerebrales donde se lleva a cabo la actividad de GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub>.

<sup>1</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119>

En las mujeres, los ovarios producen la mayor parte de los estrógenos y progesterona presentes en el plasma. Los estrógenos y la progesterona son las hormonas sexuales clave para el desarrollo de las características sexuales secundarias como son el crecimiento y desarrollo mamarios, el crecimiento del vello axilar y púbico, crecimiento de genitales externos e internos, el desarrollo del endometrio entre otras<sup>2</sup>. Tanto la progesterona como los estrógenos poseen receptores intracelulares que pertenecen a la familia de los factores de transcripción, ER $\alpha$ /ER $\beta$  y PR<sub>A</sub>/PR<sub>B</sub> [Camilletti, 2018].

La Figura 4, muestra la estructura de los estrógenos que se producen tanto en el ovario como en la corteza suprarrenal.

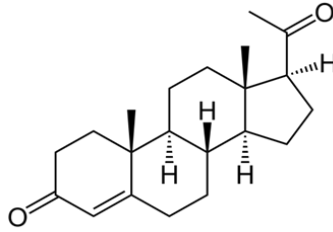


**Figura 4.** Estructura molecular de los estrógenos

A) Corresponde a la estructura de la estrona; B) al estradiol C) al estriol.

Por otro lado, la progesterona (P<sub>4</sub>) (Figura 5), es un intermediario de la síntesis de los esteroides sexuales pero que tiene gran actividad en sus tejidos diana con un importante papel en el desarrollo de caracteres sexuales secundarios como se indicó más arriba y en el embarazo [Buitrón, *et. al.* 2017; Resnik, 2019; Melmed, *et.al.*, 2020].

<sup>2</sup> <https://my.clevelandclinic.org/health/body/22353-estrogen>.



**Figura 5.** Estructura molecular de la progesterona.

## 2.2 Mecanismo de acción de estrógenos y progesterona

El complejo ER $\alpha$  ó ER $\beta$  unidos al 17 $\beta$ -estradiol se forma en el núcleo de las células diana, activando a genes específicos, presentes en los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el dominio del ADN. Los genes activados se transcriben después, dando lugar a la formación del ARNm que sale del núcleo. Este ARNm se transcribe en los ribosomas para formar la proteína de interés.

Por otro lado, la P<sub>4</sub> forma el complejo PR-P<sub>4</sub> (receptor de progesterona-hormona) y se dimeriza en el citoplasma. Este dímero, se transloca al núcleo celular e interactúa con los elementos de respuesta a P<sub>4</sub> (ERP) que se encuentran en el ADN. Con la unión dímero-coactivadores en la región AF-2 del ligando PR, existe un ensamble de la ARN polimerasa para formar ARNm, codificando la proteína específica [Brandão, *et. al.* 2020].

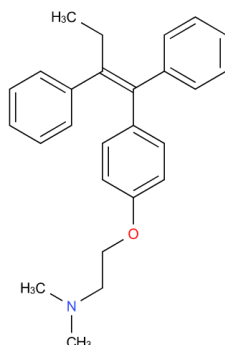
## 2.3 Papel de los estrógenos y de la progesterona sobre la actividad de GAD

Recientemente se ha demostrado que la P<sub>4</sub> juega un papel preponderante sobre la activación de la GAD<sub>65</sub> [Carrasco, 2021]; sin embargo, el mecanismo de acción de este esteroide sobre la actividad de GAD aún no se ha demostrado. Recientemente se ha evidenciado que el tratamiento con estradiol + P<sub>4</sub> aumenta la actividad de la GAD<sub>65</sub>; pero no cuando se aplica solamente estradiol. Los datos también indican que en ausencia del estradiol la P<sub>4</sub> no aumenta la actividad de esta isoenzima.

Un antagonista de los estrógenos utilizados en el estudio, es el tamoxifeno.

## 2.4 Tamoxifeno

El tamoxifeno (TMX) (Figura 6), es un antiestrógeno no esteroideo que comúnmente se usa para tratar el cáncer de mama que expresan receptores de estrógenos y a su vez para prevenir la incidencia del cáncer<sup>3</sup>.



**Figura 6.** Estructura química del TMX

Las características de mayor importancia para el desarrollo de este estudio, se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Características de TMX

Especificación	Valores
Punto de fusión	96°C a 98°C
Solubilidad	Metanol (50 mg/ml) y Etanol
Mecanismo de acción	Es un antagonista del receptor de estrógenos [DrugBank <sup>4</sup> y PubChem <sup>5</sup> .]

<sup>3</sup> <https://go.drugbank.com/drugs/DB00675>

<sup>4</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tamoxifen>

<sup>5</sup> <https://go.drugbank.com/drugs/DB00675>

### 3. Objetivos

#### 3.1 General

- Bloquear el receptor de  $17\beta$ -estradiol con un antagonista (TMX), con la finalidad de determinar la acción de los estrógenos sobre la actividad de GAD<sub>67</sub>.

#### 3.2 Específicos

- Extraer y purificar el fármaco TMX a partir de tabletas.
- Identificar y separar los tejidos cerebrales de ratas tratadas durante cinco semanas con estradiol y/o progesterona en zonas cerebrales como: sustancia *nigra*, sistema activador reticular ascendente y *locus coeruleus*.
- Determinar el efecto *in vitro* del  $17\beta$ -estradiol sobre la actividad de GAD<sub>67</sub> en presencia y ausencia del citrato de TMX en extractos de diferentes regiones cerebrales obtenidas de ratas tratadas por 5 semanas con  $17\beta$ -estradiol y progesterona.

### 4. Material y metodología utilizada

#### 4.1 Tejido biológico

Los tejidos estudiados ya se encontraban en el REVCO del laboratorio de hormonas, ubicado en el edificio G-006 de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Estos tejidos fueron previamente separados de sus zonas, de acuerdo a las coordenadas de Paxinos 2009 y homogeneizados en una proporción 1:10 peso/volumen, utilizando solución A: solución amortiguadora de fosfatos 50mM, pH 7.2, 0.2 mM de fosfato de piridoxal (PLP) y 1 mM Ditioneitol (DTT). Los homogeneizados se centrifugaron a 14,000x g durante 2 horas. Se separaron las fracciones del sobrenadante y la microsomal para su posterior congelación en el REVCO a -78°C.



## 4.2 Extracción y purificación del principio activo (TMX)

- Se pesaron 5 tabletas de la patente Taxus<sup>®</sup>, equivalente a 100 mg de citrato de TMX. Los comprimidos se trituraron y agitaron durante 1 hora con 10 mL de NaOH 1M.
- El producto se extrajo con cloroformo y el solvente se evaporó a sequedad. Se agregaron 5 mL de MetOH para cristalizar el TMX extraído.
- A los cristales formados se les tomó el punto de fusión.

## 4.3 Ensayo enzimático

- Se prepararon 5 tubos de ensayo conteniendo:  $3.7 \times 10^{-3}$  mM de 17 $\beta$ -estradiol y/o  $3.2 \times 10^{-3}$  mM de P<sub>4</sub> obtenidos de Sigma Aldrich ó  $3.7 \times 10^{-3}$  mM de TMX. Además, se añadió una concentración 2.64  $\mu$ M de glutamato radioactivo, Perkin Elmer (Ae = 51.1 Ci/mmol), 1 mM DTT, 0.2 mM de PLP obtenidos de Sigma Aldrich, y 240  $\mu$ g de proteína/ml de la fracción del sobrenadante y microsomal. Se agregaron 6.42  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) 1 mM y la solución se mantuvo a un pH de 7.2.  
Las combinaciones se detallan en la tabla 2.
- los tubos se incubaron con una incubadora Julabo SW22, por tres horas en baño maría a 37 °C con agitación constante.

**Tabla 2.** Combinación de hormonas-TMX, en tubos de ensayo

Tubo	Combinación
1	10 $\mu$ L P <sub>4</sub>
2	10 $\mu$ L 17 $\beta$ -estradiol
3	10 $\mu$ L 17 $\beta$ -estradiol + 6.42 $\mu$ L TMX
4	10 $\mu$ L P <sub>4</sub> + 10 $\mu$ L 17 $\beta$ -estradiol
5	10 $\mu$ L P <sub>4</sub> + 10 $\mu$ L 17 $\beta$ -estradiol + 6.42 $\mu$ L TMX

## 4.4 Cromatografía de capa fina (CCF)

### 4.4.1. Preparación de estándares

- Se prepararon tres soluciones estándar diferentes conteniendo 210  $\mu$ M de ácido L-glutámico, GABA y la combinación de ambos, en un volumen de 150

$\mu\text{L}$  de agua destilada. A cada solución se añadió PLP  $210 \mu\text{M}$  y se calentaron a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . Cada solución se aplicó en un volumen de un microlitro a los lados de una CCF como estándares de referencia, utilizando un aplicador semiautomático Analtech, a una velocidad de 5 rpm, a temperatura ambiente, manteniéndolas en ausencia de luz.

- Cada uno de los productos obtenidos después de la reacción de incubación (tanto del precipitado como del sobrenadante), se aplicó en la CCF. La placa cromatográfica se dejó secar por 12 horas a temperatura ambiente, envuelta con papel kraft. Las placas se desarrollaron después en un sistema de solventes de n-butanol, ácido acético (J.T. Baker, México) y agua = 5:3:2, conteniendo ninhidrina al 0.4% (Merck) en una cámara CAMAG saturada previamente con la fase móvil.
- Cada placa se dejó eluir por un lapso de 24 horas, cubriéndola de la luz. Al término de la elución, se visualizaron las manchas fluorescentes, en la placa, en el medio húmedo, con una lámpara UV (UVP), a una longitud de onda de 302 nm. Posteriormente se calculó el factor de retención ( $R_f$ ) del compuesto formado en cada fracción.
- Los estándares se revelaron en un horno de convección (American) a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 min, y se determinó el valor de  $R_f$  de cada uno.
- Finalmente, se cuantificó el contenido de radiactividad en la fracción correspondiente a la base de Schiff y GABA en un Contador de Centelleo Líquido Packard.

## 5. Resultados y discusión

Los cristales obtenidos de TMX, mostraron una apariencia blanca cristalina y un punto de fusión de  $96\text{-}97 \text{ }^\circ\text{C}$ .

En la placa, apareció una mancha fluorescente mostrando un  $R_f = 0.38$ , que correspondió con la formación de una base de Schiff obtenida por la descarboxilación del glutamato, en presencia del PLP [Vázquez, 1991]. Cuando la placa se secó, la mancha fluorescente desapareció. En las placas también se determinó una espiga radiactiva con un valor de  $R_f$  similar al del estándar de GABA (0.30). En ellas, se identificó también una mancha fluorescente con un valor de  $R_f = 0.54$ ; correspondiente al estándar de TMX. Estos datos indican la presencia de la descarboxilasa del glutamato en las fracciones biológicas estudiadas.

## 5.1 Actividad de las isoenzimas de la L-glutamato descarboxilasa (GADs) en las neuronas GABAérgicas estudiadas

### 5.1.1 Actividad *in vitro* de las GADs en *Sustancia Nigra*

#### *Fracción de sobrenadante (Isoforma 67 de la GAD)*

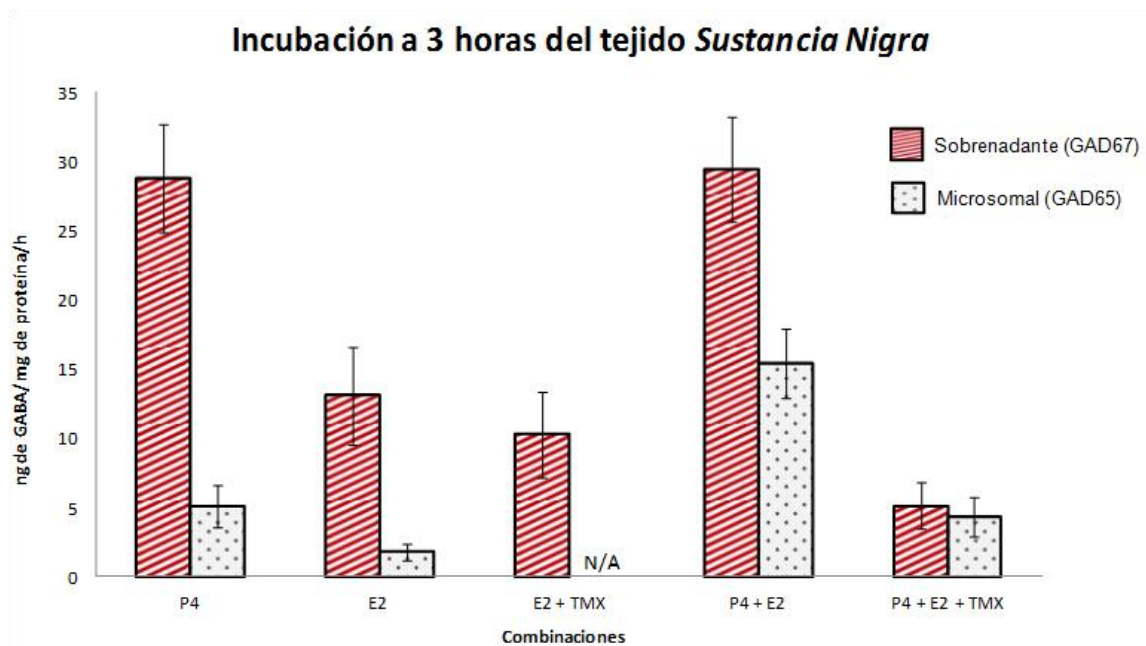
Los resultados mostraron que la presencia de P<sub>4</sub> en el medio de incubación, incrementó la transformación de glutamato a GABA (28.82 ± 3.9 ng/mg de proteína/h), Fig. 7; en comparación con el estradiol (13.09 ± 3.5 ng/mg de proteína/h), Fig. 7.

En presencia de P<sub>4</sub> + E<sub>2</sub>, la cantidad formada de GABA fue similar que con la P<sub>4</sub> en el medio de incubación, 29.44 ± 3.8 ng/mg de proteína/h, Fig 7; pero cuando se agrega TMX a esta mezcla, la formación de GABA disminuye hasta 5.11 ± 1.7 ng/mg de proteína/h, Fig 7. Estos datos podrían explicarse con base en los publicados anteriormente, que indican que 17β-estradiol induce a la formación de RNAm que codifica para la síntesis de PR [Romano, *et. al.*, 1989]. González, *et. al.*, 2011 demostraron que las isoformas de PR juegan un papel diferencial en la regulación de las GADs, en el hipotálamo de la rata.

El TMX como antagonista de los receptores de estrógenos [Ariza, *et. al.*, 2016], bloquea la unión 17β-estradiol, impidiendo la transcripción a PR.

#### *Fracción microsomal (Isoforma 65 de la GAD)*

En presencia de la P<sub>4</sub> en el medio de incubación, se formó una cantidad 5.7 veces menor de GABA (5.07 ± 1.5 ng /mg de proteína/h), Fig. 7, que en el sobrenadante. En presencia de E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>, la cantidad formada de GABA fue 10 veces mayor que con la P<sub>4</sub> en el medio (15.45 ± 2.5 ng /mg de proteína/h), Fig. 7. De igual forma, que en el caso de la GAD<sub>67</sub>, los resultados indican la presencia de GAD<sub>65</sub> en la fracción microsomal, cuya síntesis podría estar estimulada por la presencia de P<sub>4</sub>. Este hecho se demuestra cuando se agrega TMX al medio y se encuentra que la actividad microsomal se deprime hasta formar solamente 4.35 ± 1.4 ng /mg de proteína/h. Fig. 7.



**Figura 7.** Efecto del TMX en la actividad *in vitro* de la GAD en *sustancia nigra* a tres horas de incubación. Se observa la actividad enzimática en la fracción microsomal (GAD<sub>65</sub>) y sobrenadante (GAD<sub>67</sub>).

### 5.1.2 Actividad *in vitro* de las GADs en *Locus coeruleus*

#### *Fracción de sobrenadante*

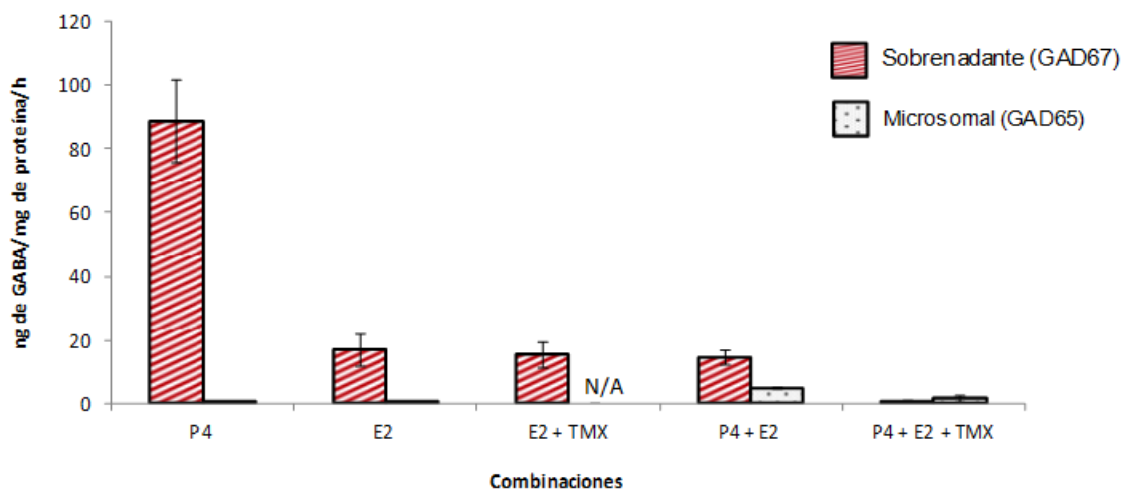
Los resultados mostraron que la presencia de P<sub>4</sub> en el medio de incubación, incrementó la transformación de glutamato a GABA (88.77 ± 13 ng/mg de proteína/h), Fig. 8; en comparación con el estradiol (17.18 ± 5 ng/mg de proteína/h), Fig. 8. Con la mezcla P<sub>4</sub> + E<sub>2</sub>, la cantidad formada de GABA disminuyó considerablemente en comparación con solo la P<sub>4</sub> en el medio de incubación, 14.58 ± 2.2 ng/mg de proteína/h, Fig 8; pero cuando se le agrega TMX a esta mezcla, la formación de GABA disminuye hasta 0.9 ± 0.4 ng/mg de proteína/h, Fig 8.

#### *Fracción microsomal*

En presencia de la P<sub>4</sub> en el medio de incubación, se formó una cantidad 88.24 veces menor de GABA (0.53 ± 0.16 ng /mg de proteína/h), que, en el sobrenadante, Fig. 8. En presencia de P<sub>4</sub> + E<sub>2</sub>, la cantidad formada de GABA fue 9 veces menor (5 ± 0.4 ng /mg de proteína/h), que, en el sobrenadante, Fig. 8. La presencia de TMX agregado a esta mezcla, disminuye la formación de GABA a 1.7 ± 0.97 ng/mg de proteína/h, Fig 8.

Estos datos podrían explicarse con base en los publicados anteriormente por el grupo de Fenalti, *et. al.*, 2007 que indica que la actividad de GAD<sub>67</sub> es la responsable de la producción de GABA basal. La estructura que presenta GAD<sub>67</sub>, muestra un bucle atado que cubre el sitio activo, proporcionando un entorno catalítico que va a sostener la producción de GABA. Este ciclo catalítico es inherentemente móvil en GAD<sub>65</sub>, lo cual promueve movilidad en el ciclo, provocando una reacción secundaria que da como resultado, la liberación de cofactores y la auto-inactivación de GAD<sub>65</sub>.

### Incubación a 3 horas del tejido *Locus coeruleus*



**Figura 8.** Efecto del TMX en la actividad *in vitro* de la GAD en *locus coeruleus* a tres horas de incubación. Se observa la actividad enzimática en la fracción microsomal (GAD<sub>65</sub>) y sobrenadante (GAD<sub>67</sub>).

#### 5.1.3 Actividad *in vitro* de las GADs en Sistema de activación reticular ascendente

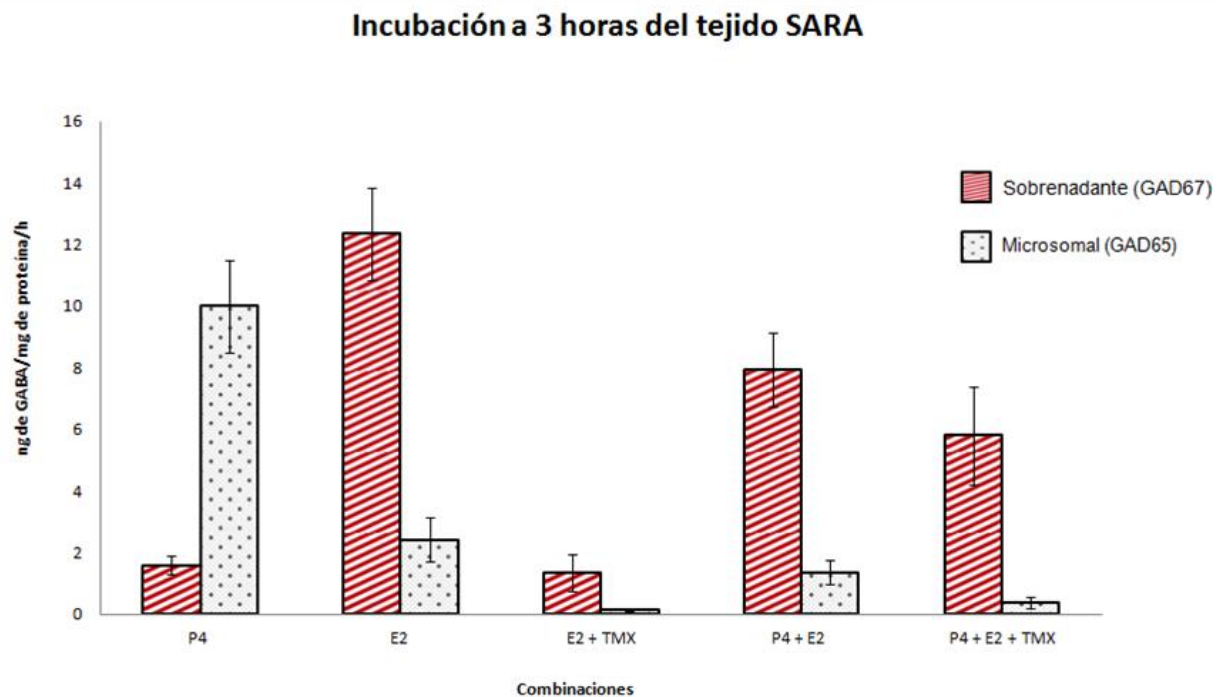
##### *Fracción de sobrenadante*

En presencia de P<sub>4</sub> en el medio de incubación, se observó una formación menor de GABA ( $1.59 \pm 0.3$  ng/mg de proteína/h), que en la fracción microsomal, Fig. 9. En presencia de estradiol, la formación de GABA aumentó ( $12.35 \pm 1.5$  ng/mg de proteína/h) en comparación con la acción de P<sub>4</sub>, Fig. 9. Con la mezcla P<sub>4</sub> + E<sub>2</sub> en el medio, la cantidad formada de GABA  $7.94 \pm 1.2$  ng/mg de proteína/h, disminuyó, en comparación con la presencia de estradiol en el medio, Fig 9. Independientemente,

cuando se agrega TMX al medio de P<sub>4</sub> + E<sub>2</sub>, la cantidad de GABA producida se mantiene de forma similar ( $5.79 \pm 1.6$  ng/mg de proteína/h), Fig 9.

### Fracción microsomal

En presencia de la P<sub>4</sub> en el medio de incubación, se formó una cantidad 8.41 veces mayor de GABA que en el sobrenadante ( $10 \pm 1.5$  ng /mg de proteína/h), Fig. 9; y en presencia de P<sub>4</sub> + E<sub>2</sub>, la cantidad formada de GABA fue 6.59 veces menor ( $1.35 \pm 0.4$  ng /mg de proteína/h), que, en el sobrenadante, Fig. 9. Una vez que se agregó TMX a la mezcla, la formación de GABA disminuyó hasta  $0.38 \pm 0.1$  ng/mg de proteína/h, Fig 9, dando una formación de hasta 5.41 menos que la fracción sobrenadante.



**Figura 9.** Efecto del TMX en la actividad *in vitro* de la GAD en el sistema de activación reticular ascendente a tres horas de incubación. Se observa la actividad enzimática en la fracción microsomal (GAD<sub>65</sub>) y sobrenadante (GAD<sub>67</sub>).

## 6. Conclusiones

Por el método descrito se obtuvieron cristales blancos, con un punto de fusión idéntico el reportado para el TMX.

El Atlas de Paxinos, permite la clara identificación de las estructuras cerebrales de interés para este trabajo.

La región cerebral correspondiente al *Locus Coeruleus* mostró la mayor producción de GABA de las tres regiones estudiadas, en presencia de P<sub>4</sub>.

El TMX se une a los receptores ER $\alpha$  ó ER $\beta$ , bloqueando la unión del 17 $\beta$ -estradiol, sin embargo, en las tres regiones estudiadas, la actividad de GAD<sub>67</sub> no se vio afectada, lo que demuestra que la actividad de esta isoenzima podría ser independiente de la presencia del 17 $\beta$ -estradiol. Mientras que la actividad de la GAD<sub>65</sub> disminuyó en presencia del TMX, lo que indica que podría ser dependiente de estrógenos.

## 7. Bibliografía

Ariza, Y., Briceño, I. & Ancízar, F. (2016). Treatment of breast cancer and pharmacogenetics. *Colombiana Biotecnología*, 18, 121-134.

Brandão, M. (2020). Biología molecular del cáncer de mama. En P. Aftimos, H. Azim, & C. Sotiriou (Eds.), *Essential Concepts in Molecular Pathology* (2.a ed., pp. 449–459). Academic Press.

Buitrón, F. R., Bailón, R., Santoyo, S., & Díaz, V. (2017). Evidence in progesterone prescription. *Ginecología y obstetricia de México*, 85(8).

Camilletti, M. (2018) Participación de los receptores no clásicos de estrógenos y progesterona en la función lactotropa normal y patológica. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Carrasco, N. (2021). Efecto del 17 $\beta$ -estradiol y/o progesterona sobre los despertares intermitentes de ratas ovariectomizadas y la síntesis de GABA. Universidad Autónoma Metropolitana. CDMX.

Fenalti, G., Law, P., Buckle, M., Langendorf, C., Tuck, K., Rosado, J., Faux, G., Mahmood, K., Hampe, S., Banga, P., Wilce, M., Schmidberger, J., Rossjohn, J., El-Kabbani, O., Pike, N., Smith, I., Mackay, R., Rowley, J. & Whisstock, C. (2007). GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(4), 280-286.

- González, F., Gómora, P., García, M., Miranda, A., Armengual, A., Camacho, I. & Guerra, C. (2011). Progesterone receptor isoforms differentially regulate the expression of tryptophan and tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in the rat hypothalamus. *Neurochemistry International*, 59(5), 671-676.
- Melmed, S., Koenig, R., Rosen, C., Auchus, R., & Goldfine, A. (2020). *Williams Textbook of Endocrinology* (14.a ed.). Elsevier.
- Paxinos G, Watson, C. (2009). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. USA. Elsevier.
- Resnik, R. (2018). *Creasy and Resnik's Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice* (8.a ed.). Elsevier.
- Romano, J., Krust, A. & Pfaff, W. (1989). Expression and Estrogen Regulation of Progesterone Receptor mRNA in Neurons of the Mediobasal Hypothalamus: *An in Situ* Hybridization Study. *Molecular Endocrinology*, 3(8), 1295-1300.
- Santos, A., Guadalupe, C., Hernández, A., Vallejo, B., & González, A. (2018).  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) produced by lactic acid bacteria in fermented foods. *Interciencia*, 43(3), 175–181.
- Schousboe A, Waagepetersen H. (2017). Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology: 511-515.
- Vázquez, M., Muñoz, F., Donoso, J. & García, J. (1991). Spectroscopic study of the Schiff bases of dodecylamine with pyridoxal 5'-phosphate and 5'-deoxypyridoxal. A model for the Schiff bases of pyridoxal 5'-phosphate in biological systems. *Biochem J.*, 279, 759-767.