



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.
Laboratorio de Neuroendocrinología

Efectos del bloqueo del RE α en el lado izquierdo de POA-AHA en
el día del estro, sobre la ovulación, la concentración de
hormonas esteroides y la expresión del ARNm de la GnRH

T E S I S

Que para obtener el título de

B I Ó L O G A

P r e s e n t a :

SANDRA VERÓNICA REYES ROMÁN



Directora de Tesis:
DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

MÉXICO, D.F.

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

Laboratorio de Neuroendocrinología

UMIEZ

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Efectos del bloqueo del $RE\alpha$ en el lado izquierdo de POA-AHA en el día del
estro, sobre la ovulación, la concentración de hormonas esteroides y la expresión
del ARNm de la GnRH**

Tesis presentada por:

Sandra Verónica Reyes Román

Directora de tesis:

DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

Financiado por CONACyT (convenio 81898) y
DGPA-PAPIIT (IN-214508)

AGRADECIMIENTOS:

A la gran fuerza creadora que nos regala un día más en esta madre tierra, por que solo somos flor y danza en tu jardín.

A mi alma máter la **UNAM**, por que desde que ingrese al CCH-O me diste la oportunidad de conocer un mundo diferente, ver la vida con ojos diferentes, a tener una postura ante todo tema, a ser políticamente incorrecta. Me diste la oportunidad de conocer gente extraordinaria, grandes profesores, grandes amigos. Me diste la oportunidad de tener grandes experiencias, de esas experiencias que forjan a un ser humano. Por hacerme comprender que nunca hay que discriminar la fuente de conocimiento, por que a todas las personas se les puede aprender algo. Y gracias por enseñarme a ser humilde, por que las pretensiones y la arrogancia son para gente que no esperara nada nuevo y sorprendente, que se niega a opiniones diferentes, gente pobre de espíritu.

Portare siempre orgullosa mi escudo universitario.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

GAYA, GOYA!!!

A los miembros de este jurado:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Leticia morales ledezma

M. en I.B.S.H. Angélica Flores Ramírez

Dra. Juana Monroy Moreno

Por su tiempo, aportaciones y colaboración a este trabajo, mi agradecimiento y mi admiración para estas mujeres dedicadas a la ciencia.

En especial a la Dra. **Maria Esther Cruz Beltran**: doctora no existen palabras para agradecerle todo el apoyo y el tiempo que me brindo para terminar este trabajo. Yo se que no soy una alumna modelo, pero en verdad que todos sus consejos y regaños no han sido en vano, todos me ayudan a ser una persona mas responsable. De verdad muchas gracias por creer en este trabajo y a pesar de todo creer en mi, aun cuando ni yo creía en mi misma, usted nunca quito el dedo del renglón.

Gracias por haer de labo 6 una pequeña familia, hacernos sentir como en nuestra casa, por sus enseñanzas, por su esfuerzo, por su compromiso con la investigación, por transmitirnos su conocimiento que es la mejor herencia que se le puede dar a un ser humano. Y gracias por comprarnos cafe♥

Le reitero mi admiración, por que es una mujer extraohordinaria y comprometida con su trabajo, con sus alumnos y con su familia, por que es de las personas más sabias y amorosas que he conocido. Es un orgullo haber trabajado con usted.

Que la vida la llene de bendiciones doc. ¡La quiero mucho!

Y en verdad ¡GRACIAS!

DEDICATORIAS:

A mis padres.

La vida me bendijo al darme unos padres como ustedes, los amo y los admiro. Gracias por todos sus esfuerzos, porque nunca voy a poder pagarles y retribuirles lo que han hecho por mí. Los amo y espero que la vida me los guarde mucho tiempo.

A mi mami vivians. Eres la mujer que más admiro en el mundo ma, gracias a todos tus esfuerzos, he podido llegar a este día, porque sin tí simplemente no hubiera podido. Gracias por ser la mujer que eres de carácter admirable y fuerza de plomo, por ser la mujer que todo lo da por sus hijos. Yo sé que no soy la mejor hija, pero ya verás ma, vendrán tiempos mejores. Y este logro es tuyo para que te sientas orgullosa de tu hija. ¡Te amo mama!

A mi daddy. Eres el único hombre en el mundo que tiene mi amor incondicional, haga lo que haga y diga lo que diga siempre lo voy a amar! A veces pienso que yo soy tu versión en mujer, porque somos igual de irreverentes, divertidos, a veces somos igual de mal humorados, y nos gusta la misma música. Gracias pa por ser el mejor papa del mundo. Este logro daddy también es para tí. ¡Te amo!

A mis hermanos.

A Robert, Rosy, Lupe y Alma. No concibo una vida sin ustedes, siempre van a ser mis hermanos mayores, gracias por su apoyo y esfuerzos hoy estoy en este punto de mi vida, gracias por ayudarme a las tareas, por cuidarme, por soportarme, por llevarme a la escuela. Ahora este logro también es de ustedes. Y aunque siempre nos estemos agarrando del chongo quiero que sepan que los amo y que siempre van a contar conmigo, para todo. ¡LOS AMO!

A Mary y Ángel. Podrán ser muy universitarios, muy independientes y muy maduros, pero siempre van a ser "mis hermanitos". Gracias por todo su apoyo y su complicidad de hermanos desde las travesuras de niños, hasta las faltosidades de la universidad. Sin ustedes mi vida no sería la misma. Gracias por su cariño, complicidad y su amistad. Siempre podrán contar conmigo.

Lagel: venga mano! Si se puede!! Jajaja sigues tu he morrito. Te amo gracias por tu amistad.

Mary: tu más que mi hermana eres mi gran cómplice de la vida, y aunque a veces somos tan diferentes yo siempre busque a poyo y consejo en ti. Aunque ahora parece que tomaremos direcciones diferentes, siempre voy a recordar nuestras bellas épocas de adolescentes. Te deseo lo mejor del mundo en tu nueva etapa como madre, la vida te bendice. ¡Te amo!

A mis sobrinos

A Fer, A Evelyn, A Isis A Víctor y a Vale.

A ustedes por hacerme reír día a día y por ser parte de mi familia, gracias por hacerme ver lo hermoso que es el ciclo de la vida, yo sé que hacer tarea conmigo los fastidia, pero es que yo quisiera enseñarles todo el mundo, ¡¡los amo!! Siempre cuenten con s tía San, siempre estaré ahí para ustedes pequeños diablos.

Al resto de mi familia.

A mis abuelitos, porque siempre les aprendo algo nuevo, a mis tos por hacer esta vida más grata en compañía de la familia, a mis primos por hacer tan divertidas la reuniones familiares.

A mis amigos.

A mi amiga Sara por compartir parte de vida conmigo, desde que éramos unas niñas hasta estos días, te quiero.

A mi gran amiga Mariana Reyes. Porque tu eres como como mi hermana que vive en otra casa, jajaja.

Estoy muy agradecida con la vida por ponerte en mi camino, gracias por tu amistad mi merrys, te llevo en el corazón, y nunca me olvido de ti. Que la vida te llene de bendiciones, y que nos permita seguir siendo amigas hasta que estemos viejitas y arrugaditas, y recordemos nuestras locuras de la juventud jajajaja. Gracias por todo. Te amo mi merrys.

A mis amigas del CCH-O

A mi Navila, me siento muy afortunada de tener gente como tu a mi alrededor, gracias a la vida que te puso en m camino, te adoro amiga siempre voy a estar ahí para tí.

A Hana, Vivís y Gaby. Gracias por su amistad, las quiero mucho mucho, simplemente el CCH hubiera sido lo mismo si ustedes. Gracias por todo lo que vivimos juntas, por nuestras historias, y por compartir sus etapas como madres conmigo. Las adoro!! Que la vida las colme de bendiciones, aunque ya tienen cada una su pedacito de cielo, son niños muy afortunados por tenerlas como madres. Cuando crezcan esos niños les contare de nuestras fiestas del cch jajaja.

A Mariana Robles. Por tu amistad y por todo lo que vivimos juntas amiga muchas gracias, y aunque sea intermitente, siempre podrás contar conmigo.

A mis grandes amigos de la FES-Z

A Blanca. Nena te adoro. Tu siempre serás mi blanshh, porque hemos escrito una linda historia juntas, por tus sabios consejos y tus porras, que sabio es el destino que nos juntó! Te amo.

A Jess. Gracias en primera por tu apoyo en labo sin ti creo que estaría todavía decapitando ratitas. Gracias por tu amistad, por tu confianza, por poder hacerme parte de ocasiones familiares y de tu vida personal, gracias por esa confianza. De verdad espero que me regales tu amistad muchos años más.

A Alex. Gracias amigo por tu apoyo en labo por que sin tu ayuda esto no se hubiera concretado. Por todas nuestras experiencias juntos, y gracias por tu amistad. Te quiero

A Miriam, Karina Pau, Jazz. Las adoro nenas gracias por su amistad y esos ratos de sano esparcimiento y recreación universitaria Jajaja las adoro que la vida las colme de amor y bendiciones. Gracias por brindarme su amistad.

A mis lokas. A Chío, Nauyaka, a Peke, a Aro, A Iran Y a Elizabeth. Simplemente Gracias!! De corazón muchas gracias por hacerme mis tardes tan amenas, por regalarme su confianza, por brindarme su amistad, por apoyarme en una de las etapas más confusas de la vida, por ser cómplices de historias tristes, pero de muchas muy alegres, pero sobre todo gracias por hacerme mi fiesta de cumpleaños con pastel solo para mí!! Jajaja esos momentos con ustedes los tengo atesorados en el corazón y agradezco infinitamente que se hallan cruzado en mi camino. Las amo!!

A ti Aro. Te quiero mucho pinche aro jajaja desde labo de primer semestre jajaja que nos odiábamos aja y terminamos vetadas n un rincón de labo por estar bailando. Gracias por tu hermosa amistad, por todo lo que has compartido conmigo y por tu confianza para hacerme cómplice de tus fechorías jejenes te amo Aro.

A ti Peke. “dios las hizo y ellas se juntan” Te amo peke, que fortuna que el destino te cruzara en mi camino. Estábamos destinadas a cruzar nuestros caminos. Gracias por los sabios consejos, por la paciencia, por el apoyo moral, por creer en mí aun cuando yo no crea en mí misma, gracias por las buenas memorias juntas, por ayudarme a conocer esa parte espiritual que no conocía, y sobre todo gracias por nuestras buenas fiestas jejeje. Tlazocamatí “a tu lado es hermoso dar amor”

A Iran. Amiga te adoro, yo sé que a veces somos muy conflictivas, que estamos en desacuerdo, pero quiero dártelas gracias por permitirme conocer a la mujer sensible y amorosa que vive en ti. Todo el mundo podrá decir misa de nuestra amistad, pero yo agradezco a la vida haberte puesto en mi camino y a ti por hacerme saber que eres una mujer con llena de amor. Te quiero Iran!!

A Elizabeth. Gracias amiga mía por brindarme tu confianza, por que nos hicimos amigas por circunstancias aun desconocidas. Jajaja no es cierto. Gracias Ely porque es maravilloso tener una amiga con un carácter explosivo como el tuyo que explota de alegría o coraje (depende). Por brindarme tu confianza, por hacerme cómplice de tus historias, por abrirme tu corazón! Y gracias por acompañarme a la combi, y por ser mi amiga chichispears! Jejeje te amo nena, cuenta conmigo siempre.

A la gran familia del labo 6 del UMIEZ

*A Min, Marian, Aidé, Mel, Laura, Gaby, Toño, Luis,
Luis nunca olvides los sabios aprendizajes que te herede jajaja*

A Adriana por brindarme su amistad, y prestarme sus cosméticos y dejarme peinarla en los seminarios aja te quiero.

A Rulo te adoro, eres una gran persona y muy inteligente, muchas muchas en verdad muchas gracias por ayudarme en todo. Te quiero mucho Rulo. Que la vida te bendiga

A mi Yayo. Gracias amiga porque aparte de brindarme tus sabios consejos de labo me brindaste tu amistad. Te adoro!!

A Blanca. Mana!! Te quiero mucho gracias por brindarme tu amistad y por tu confianza.

A Jeny. Gracias mi Jeny por tu amistad y por tu ayuda en el labo. Sin ti esto no se hubiera acabado, por ayudarme en las eternas tardes de PCR jajaja. Y gracias por haberme invitado a la danza, eso nunca lo voy a olvidar, por abrir nuevas puertas a mi conocimiento de nuestra hermosa cultura Mexica. Tlazocamatí.

A Sandra Leticia. Por circunstancias que no voy a mencionar en este momento, jajaja no nos dimos la oportunidad de conocernos desde antes, pero los últimos meses que estuviste en labo me dejaste conocer a esa gran persona que eres, te tome un cariño muy especial en poco tiempo. Gracias por brindarme tu amistad y depositar tu confianza en mí para hacerme parte pequeña de tu historia.

A los corazones vibrantes del círculo de danza de la FES-Z

A Alfred, Kika, caro, fany, Ana, Aurora, Fer, andrés, Manu, Santi, Luis.

Porque con ustedes descubrí un mundo espiritual, al cual nunca creí tener acceso, a heredarme su conocimiento y contagiarme de su amor a la danza, esas tardes con ustedes nunca las voy a olvidar. Gracias guerreros por cruzarse en mi camino. Tlazocamatí!!

A Manu y Santi. Gracias por brindarme su amistad y junto con la peke haber formado el grupo de faltosos de la danza jajaja los quiero mucho. Nunca olvidare esos momentos juntos.

A Luis Antonio. Nuestra historia, es una de mis historias favoritas. Tú y yo estábamos destinados a conocernos, y eso me da yuyu jajaja, no se como acabe nuestra historia, pero agradezco a la vida que te halla cruzado en mi camino justo en un momento tan confuso, que logro sorprenderme con tu presencia.

Gracias por todo tu cariño, tu paciencia, tu comprensión, tolerancia, tu tiempo. Porque somos un par de novios que son muy buenos amigos. Gracias por aferrarte a lo nuestro aun a pesar de todo y de todos, robaste mi corazón. Te amo!

“Usted, claro no sabe ya que nunca lo he dicho ni siquiera en esas noches en que usted me descubre con sus manos incrédulas y libres,

usted no sabe cómo yo valoro su sencilló coraje de quererme”- Mario Benedetti

A mi Filíberto. Perdóname fili por no ser una buena dueña, pero te amo. Alegras mis días siempre que jugamos aunque sea un ratito. Te amo wero!!

A todas aquellas personas que la vida ha puesto en mi camino y que me faltan por mencionar, m siento afortunada por tantos amigos.

A todas aquellas personas que han aportado grandes y pequeñas, buenas y malas experiencias. ¡Gracias!

A todas las ratitas que fueron sacrificadas para la elaboración de este trabajo. Gracias por donar su vida para la ciencia

*La única gente que me interesa es la que
está loca, la gente que está loca por
vivir, loca por hablar, loca por salvarse,
con ganas de todo al mismo tiempo, la
gente que nunca bosteza ni habla de
lugares comunes, sino que arde, arde
como fabulosos cohetes amarillos
explotando igual que arañas entre las
estrellas.*

— Jack Kerouac

*"Cerré los ojos y le pedí un favor al viento:
llévate todo lo que no sea necesario. Estoy
cansado de equipajes pesados que no me
dejan avanzar. De ahora en adelante, solo
quiero llevar lo que quepa en mi bolsillo y
en mi corazón."*

"Yo solía pensar que era la persona más extraña en el mundo, pero luego pensé, hay mucha gente así en el mundo, tiene que haber alguien como yo, que se sienta bizarra y dañada de la misma forma en la que yo me siento. Me la imagino, e imagino que ella también debe estar por ahí pensando en mí. Bueno yo espero que si tú estás por ahí y lees esto sepas que, sí, es verdad, yo estoy aquí, soy tan extraña como tu."
-Frida Kahlo.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	4
CICLO ESTRAL	4
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO	6
HIPOTÁLAMO	7
GnRH y neuronas GnRérgicas	9
Estructura de la GnRH	10
Liberación	11
HIPÓFISIS	13
LH y FSH	16
OVARIO	17
Células de la Granulosa	21
Células de la teca	21
Hormonas esteroideas	23
Síntesis de estrógenos	23
Secreción de progesterona y andrógenos	24
RECEPTORES A ESTRÓGENOS	27
El RE α en hipotálamo	30
FEEDBACK POSITIVO Y NEGATIVO	32
ASIMETRÍAS HIPOTALÁMICAS	35
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	37
MATERIAL Y MÉTODO	38
RESULTADOS	47
ANÁLISIS DE RESULTADOS	58
CONCLUSIÓN	59
BIBLIOGRAFÍA	63
BIBLIOGRAFIA ELECTRONICA	74
ANEXO 1-	75
ANEXO 2-	77

RESUMEN

El estradiol es una hormona secretada por el ovario, una de sus muchas funciones es la relacionada con la reproducción.

En la rata, el 17β -estradiol se une tanto al receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$) como al beta ($RE\beta$), a través de ellos regula la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). A su vez, la GnRH regula la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH), las que estimulan en el ovario la secreción de hormonas esteroides (17β -estradiol (E_2) y progesterona (P_4)), la diferenciación y el desarrollo del folículo y la ovulación. El E_2 y la P_4 regulan la secreción de la GnRH, FSH y LH. El hipotálamo, en específico el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) regula de manera asimétrica la ovulación. En la fase del estro, el bloqueo del $RE\alpha$ en la porción izquierda de POA-AHA aumenta el porcentaje de animales que ovulan en el ciclo inmediato (Vázquez 2011).

Con el propósito de estudiar algunos de los mecanismos que conducen a estimular la ovulación en ratas con bloqueo del $RE\alpha$ del lado izquierdo de POA-AHA, en este estudio se analizaron los efectos del bloqueo de los $RE\alpha$ en POA-AHA izquierda en la mañana del estro, sobre la expresión de ARNm de GnRH en ambas porciones de POA-AHA, en la concentración sérica de E_2 y P_4 , la ovulación y en el peso de los ovarios y del útero en horas posteriores al tratamiento.

Para lo cual se utilizaron ratas hembras adultas cíclicas de la cepa CIIZ-V, las cuales fueron mantenidas en condiciones controladas de iluminación con libre acceso a agua y alimento. Estos animales fueron anestesiados entre las 8:30 y 9:30h del estro y micro-inyectados entre las 9:30 y 10:30h, con $25\mu\text{g}/1\mu\text{L}$ de MPP (antagonista $RE\alpha$) o $1\mu\text{L}$ de Tween 20[®] (vehículo) en POA-AHA izquierda. Grupos de ratas con los dos tratamientos fueron sacrificados por decapitación a las 2, 26, 50, 74, 80, y 98 horas post-inyección para cuantificar la concentración de E_2 y P_4 por RIA. En la porción izquierda y derecha de POA AHA se cuantificó la expresión del ARNm de la GnRH.

Con la finalidad de evaluar si el bloqueo del $RE\alpha$ modificó la secreción fásica de GnRH, un grupo de animales micro-inyectados con el antagonista de los $RE\alpha$ fueron inyectadas con $3.7\mu\text{g}/\text{kg}$ peso de LHRH sintética a las 14:00 h del proestro esperado.

El vehículo provocó disminución del número de ovocitos liberados a las dos del tratamiento (9.3 ± 0.7 vs. 12.9 ± 0.7 , $p < 0.01$). A las 96 horas (estro esperado) disminuyó el porcentaje de animales ovulantes (37.5% vs. 100%), así como la concentración de E_2 a las 26 horas del tratamiento (20.57 ± 12.75 vs. 76.20 ± 3 , $p < 0.001$). También la expresión del ARNm de la GnRH disminuyó en ambas porciones de POA-AHA (POA-AHA izquierda: 0.54 ± 0 vs. 1.30 ± 0.06 ; POA-AHA derecha: 0.57 ± 0.02 vs. 1.37 ± 0.04 , $p < 0.001$) a las 50h de inyectar el vehículo, mientras que este efecto se mantiene a las 80 horas del tratamiento, pero solo en la porción izquierda de POA-AHA (1.74 ± 0.04 vs. 0.83 ± 0.05).

El bloqueo del $RE\alpha$ incrementó el porcentaje de animales ovulantes con respecto al vehículo (83% vs. 37.5%, $p < 0.01$), y redujo la expresión del ARNm de GnRH en ambos lados de POA-AHA a las 2 horas (POA-AHA izquierda: 1.38 ± 0 vs. 2.04 ± 0.04 ; POA-AHA derecha: 1.12 ± 0.02 vs. 1.80 ± 0.18 , $p < 0.001$), pero a partir de las 50 h del tratamiento aumentó progresivamente hasta las 80 h en la porción derecha de POA-AHA (26 h: 0.69 ± 0.03 ; 50 h: 0.88 ± 0.046 ; 74 h: 0.95 ± 0.04 ; 80 h: 1.58 ± 0.03 , $p < 0.05$).

Con base en estos resultados sugerimos que en la fase del estro, el bloqueo de los $RE\alpha$ de POA-AHA izquierda estimula los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación, a través de estimular la expresión del ARNm de la GnRH, especialmente en el lado derecho de POA-AHA, lo que se acompaña en un incremento en la secreción de E_2 .

INTRODUCCIÓN

La ovulación es la etapa final de una serie de eventos regulados por señales neuroendocrinas que involucran al sistema nervioso central a la hipófisis y al ovario. El hipotálamo es el “centro nervioso” que inicia con esta cascada de eventos. En la rata este “centro nervioso” lo conforman un tipo de neuronas del área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA), las cuales secretan la neurohormona llamada Hormona Liberadora de las Gonadotropinas o GnRH (por sus siglas en inglés: Gonadotrophin Releasing Hormone), cuya secreción es modulada por neurotransmisores (como la noradrenalina, la serotonina, la acetilcolina, el ácido gama-amino butírico o GABA), hormonas esteroides, péptidos, opioides y aminoácidos. La GnRH al actuar en los gonadotropos, sus células blanco, estimula la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) y de La Hormona Folículo Estimulante (FSH). Estas hormonas actúan en el ovario regulando sus funciones como es el crecimiento folicular y la secreción de hormonas esteroides y la ovulación. (Freeman 2006; Silverman y col, 1998).

El 17β -estradiol ejerce sus efectos sobre la neurona GnRH al unirse a su receptor, el cual puede ser α ó β . En POA-AHA se han identificada ambos, pero las neuronas GnRH expresa el $RE\beta$ y no el $RE\alpha$, sin embargo se ha planteado que este último es necesario para que ocurra el feedback positivo o estimulante en la secreción de LH y por lo tanto que se dé la ovulación (Rissman y col 1997)

El control neuro-endocrino ejercido por el hipotálamo sobre la ovulación es asimétrico. (Gerendai, 2001). Se ha mostrado que el lado derecho del hipotálamo medio basal contiene significativamente más GnRH (Gerendai, 1978), que el lado derecho es más receptivo a estradiol (Roy 1987), que el lado derecho del cerebro tiene más neuronas GnRH que el lado izquierdo (Inase y Machida, 1985).

Recientemente se mostró que el bloqueo de los $RE\alpha$ del lado izquierdo de POA-AHA en la mañana del estro estimula la ovulación (Vázquez, 2011), con el propósito de explicar algunos de los eventos neuroendocrinos que culminan con la ovulación, en este trabajo se decidió analizar el efecto del bloqueo de los $RE\alpha$ sobre la ovulación, el peso de los ovarios, la concentración de hormonas esteroides y la expresión relativa del ARNm para la GnRH.

MARCO TEÓRICO

La ovulación, definida como la salida de un ovocito del ovario en condiciones de ser fecundado, es un fenómeno que ocurre durante parte de la vida del individuo y está regulada por la interacción de múltiples factores neuroendocrinos, muchos de los cuales presentan recurrencias periódicas que se presentan con intervalos diferentes. (Domínguez, 1993)

En la rata, la época reproductiva está caracterizada por cambios periódicos en la secreción de las hormonas secretadas por el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, el resultado final de estos cambios es el crecimiento, la maduración y la liberación de ovocitos fértiles, así como una conducta sexual que asegura la máxima receptividad de la hembra durante la etapa ovulatoria. Esta conducta rítmica que presentan las hembras se le llama ciclo del estro o ciclo estral (Kuiper y col, 1996).

CICLO ESTRAL

El tiempo que transcurre entre dos periodos de celo (estro) se le denomina ciclo estral; la duración de éste depende de la especie y de factores ambientales, en particular de la duración del ciclo luz-obscuridad (Domínguez, 1993).

El término “estro” proviene del latín *oestrus* y éste a su vez del griego “oistros”, que significa frenesí. Este término se ha utilizado para describir el período de deseo sexual de la hembra y distinguirlo del celo del macho.

La rata es un mamífero políciclico, es decir, presenta varios ciclos estrales durante todo el año, cuya duración promedio es de cuatro a cinco días, lo que depende de la especie (Figura 1). El ciclo estral de la rata se ha dividido en cuatro fases: diestro-1, diestro-2, proestro y estro (Hrabovszky y col. 2000).

En la gráfica 1, se muestran las variaciones en la concentración plasmática de P_4 , E_2 , LH y FSH que se producen durante el ciclo estral.

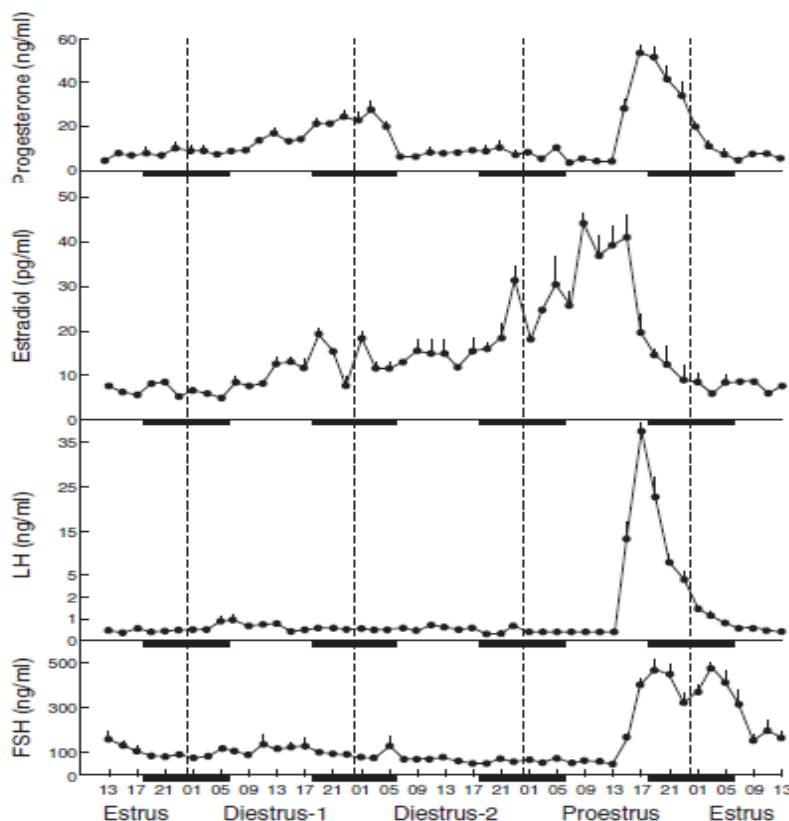
En los días de estro, diestro-1, diestro-2 y la mañana del proestro, las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas (LH y FSH) se mantienen en concentraciones basales, principalmente por el efecto “feedback negativo” o inhibitorio que ejercen los estrógenos y hormonas proteicas, tales como la inhibina. Las concentraciones de LH y FSH circulantes, si bien son bajas, son suficientes para

estimular el crecimiento de los folículos ováricos. Conforme los folículos crecen y maduran, la concentración plasmática de E_2 aumenta hasta alcanzar su concentración máxima en la mañana del proestro, evento también llamado secreción preovulatoria de estrógenos o “pico de estrógenos” (Hrabovszky y col, 2000).

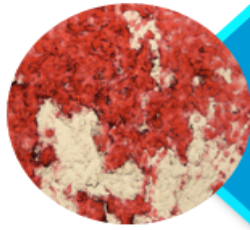
La secreción preovulatoria de E_2 estimula la secreción fásica de ambas gonadotropinas, que horas después (en la mañana del estro) induce la ovulación. Esta secreción masiva de ambas gonadotropinas se conoce como “pico” o secreción preovulatoria de las gonadotropinas (Smith y col, 1975).

En la mañana del estro ocurre un segundo aumento en la concentración de FSH, cuya función es reclutar los folículos ováricos que iniciarán su crecimiento (Smith y col, 1975).

Una vez que se produce la ovulación, el folículo se transforma en el cuerpo lúteo, cuya función principal es la secreción de P_4 , como resultado del efecto luteinizante que la LH ejerce en la estructura de este órgano (Smith y col, 1975).

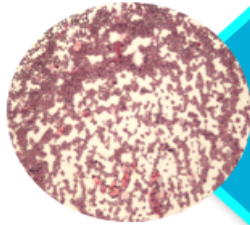


Gráfica 1. Concentración de FSH, LH, estradiol y progesterona obtenida del plasma periférico cada 2 horas, durante cada fase del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la media $\pm$ e.e.m. de la concentración de hormona de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan intervalos de oscuridad (Tomado y modificado de Freeman, 2006).



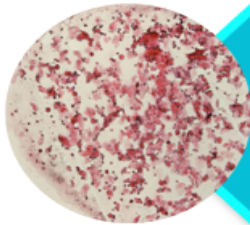
ESTRO

Células cornificadas.
Ovulación.
Concentraciones basales de E_2 , P_4 y LH.
Ocurre un aumento en las concentraciones de FSH.
La concentración de FSH aumenta hacia las primeras horas.



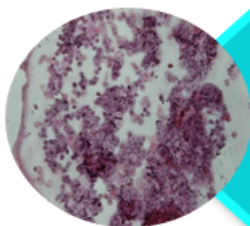
DIESTRO 1

Gran cantidad de leucocitos.
Cuerpo lúteo produce un primer pico en la concentración plasmática de P_4 .
Las concentraciones de FSH, LH y E_2 son basales.



DIESTRO 2

Menos leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas.
La concentración de E_2 empieza a aumentar paulatinamente desde la tarde de este día.



PROESTRO

Células epiteliales nucleadas.
Entre las 9 y las 13:00 hrs la concentración de E_2 en la sangre es máxima.
Aumento de FSH y LH para las 17:00h de éste día.
LH induce la secreción de P_4 que alcanza otro máximo en su concentración a las 19:00 h.

Figura1. Resumen de las características citológicas del frotis vaginal y de las concentraciones hormonales en las diferentes fases del ciclo estral (Freeman, 1994).

EJE HIPOTALÁMO-HIPOPÓFISIS-OVARIO

La función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es regular los procesos reproductivos (Welsh y col. 1998).

La ovulación es la etapa final de esta serie de procesos, que son regulados por señales neuroendocrinas que involucran al sistema nervioso central (SNC), al hipotálamo, a la hipófisis y al ovario. Esta serie de eventos son regulados principalmente por la secreción de la GnRH, de LH, así como de FSH (Figura 2).

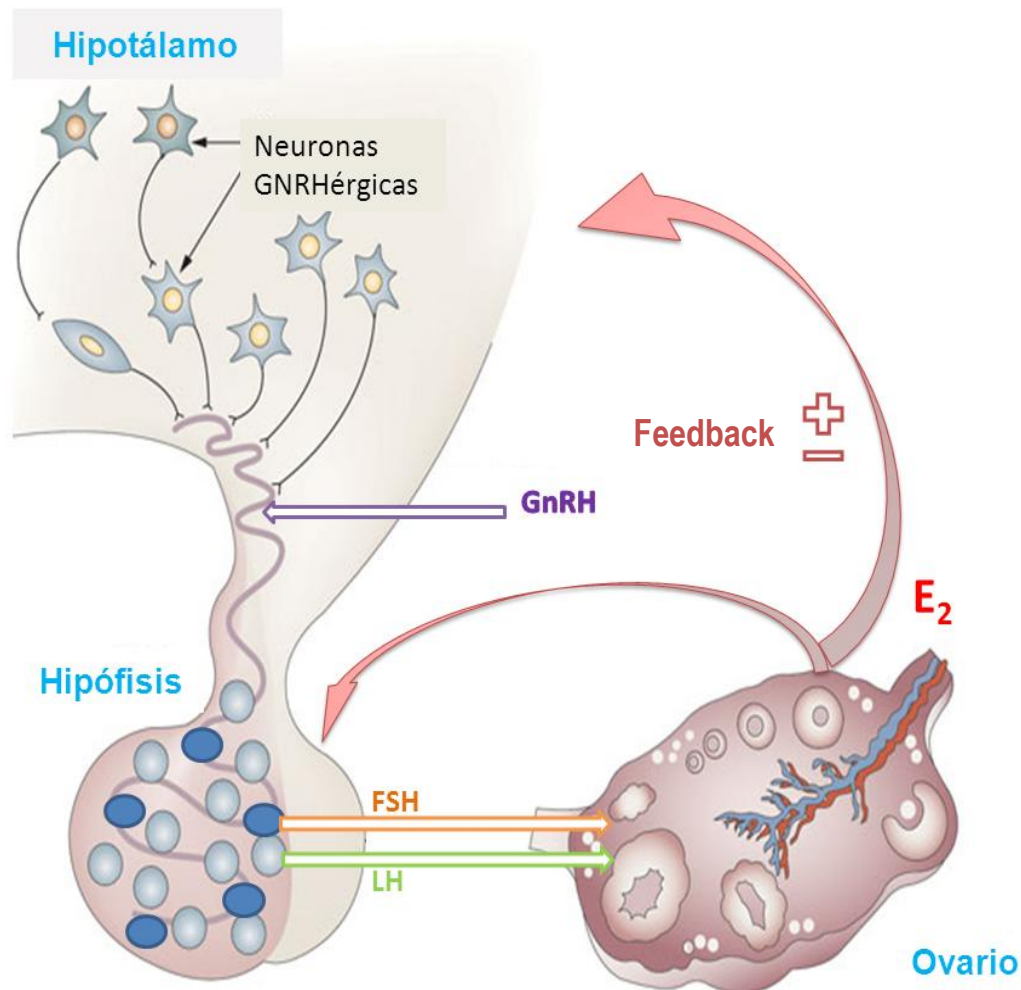


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. En el hipotálamo se libera la GnRH que actúa sobre el lóbulo anterior de la hipófisis estimulando la liberación de la FSH y LH. Ambas hormonas viajan por torrente sanguíneo hasta el ovario, donde la LH estimula la secreción de P₄ y andrógenos, la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo, mientras que la FSH estimula el desarrollo folicular y la secreción de estrógenos. El E₂ y la P₄ actúan en el hipotálamo y la hipófisis inhibiendo o estimulando la secreción de GnRH y las gonadotropinas. A este circuito se le conoce como "Feedback positivo o negativo".

HIPOTÁLAMO

El hipotálamo está constituido por células nerviosas, prolongaciones nerviosas (axones o dendritas) de neuronas intra y extra-hipotalámicas, células gliales o de sostén y de una rica red vascular (Norris 1996).

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y está dividido por el tercer ventrículo en el hipotálamo izquierdo y derecho (McGeer y col. 1987).

El hipotálamo está constituido por núcleos y áreas. Los núcleos son zonas donde las neuronas están apiñadas; mientras que en las áreas, las neuronas están menos agrupadas y no tan bien demarcadas dentro del hipotálamo (Yen y col. 2001). Según Palkovits (2000), se divide en cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente: el área preóptica (POA), el hipotálamo anterior, el medio y el posterior (Figura 3).

☉ **Área Preóptica:** Desde el punto de vista funcional se le considera parte del hipotálamo aunque su origen embriológico es diferente. En la rata esta área ocupa una cuarta parte del total del hipotálamo e incluye el núcleo preóptico medial, el núcleo preóptico periventricular y el órgano vasculoso de la lámina terminal.

☉ **Hipotálamo:**

- **Anterior:** Es una continuación del área preóptica. La parte medial está formada por los núcleos periventricular, supraquiasmático, hipotálamo anterior y paraventricular; la parte lateral contiene el núcleo supraóptico
- **Medio:** En el hipotálamo medio se reconocen tres zonas: media basal, dorsal y lateral. La zona media basal incluye la eminencia media y los núcleos arcuato y ventromedial; la zona dorsal es ocupada completamente por el núcleo dorsomedial; el borde de la zona medial y lateral se localiza el núcleo perifornical.
- **Posterior:** Representa una pequeña parte del hipotálamo y también se le conoce como región premamilar. Incluye los núcleos: Premamilar dorsal y ventral, tuberomamilar, supramamilar, hipotálamo posterior y núcleo arcuato (Silveran, 1998; Palkovits, 2000).

El hipotálamo secreta diferentes péptidos y alguno de los cuales son liberados a la circulación local o actúan sobre sus células blanco a distancia. Otros péptidos son liberados en el sistema sináptico, donde actúan como neurotransmisores. La mayoría de las neuronas peptidérgicas del hipotálamo proyectan axones al sistema límbico y otras estructuras relacionadas con el sistema nervioso autónomo (Yamashita y col, 1983; kupfermann, 1985).

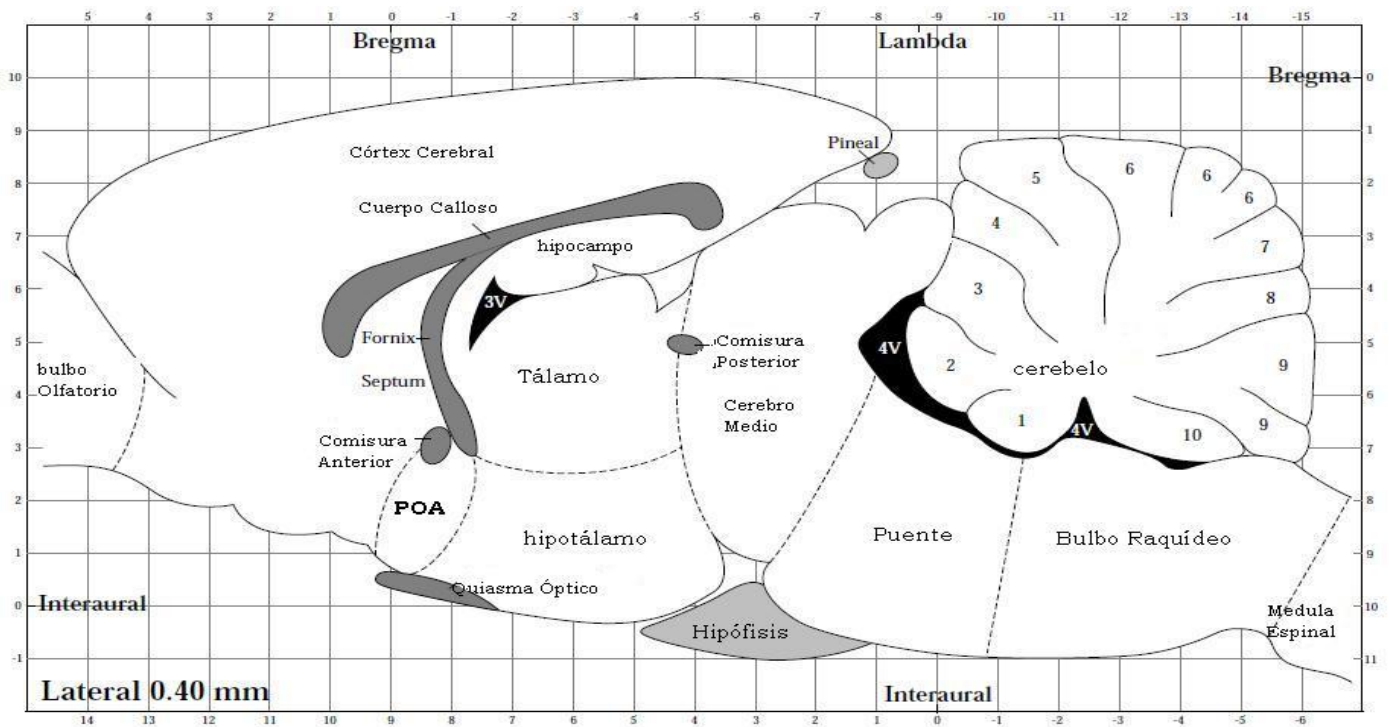


Figura 3. Corte sagital del cerebro de la rata donde se muestra la ubicación del hipotálamo y el área Preóptica (POA), con respecto a las otras zonas del cerebro (tomada y modificada de Paxinos 2007).

GnRH Y NEURONAS GnRHÉRGICAS

Una de las neurohormonas liberadas por las neuronas del Área Preóptica Hipotalámica Anterior (POA-AHA) es la GnRH (Arimura, 2000; Brown, 1994; Halász, 2000). Esta hormona hipotalámica es transportada a lo largo de los axones de las neuronas que la sintetizan y es liberada dentro del plexo primario de los capilares del sistema de vasos porta-hipofisarios (Arimura, 2000). Estos capilares sanguíneos se conocen como sistema porta-hipotalámico-hipofisario, y derivan de las arterias hipofisarias superiores, que al unirse forman las venas portales hipofisarias, que se distribuyen a través del tallo hipofisario, hasta llegar a la parte distal de la adenohipófisis, donde forman un plexo secundario de vasos, llamado sinusoides-hipofisarios (Fink, 2000).

Una vez que la neurohormona alcanza la parte distal de la adenohipófisis interactúa con sus receptores presentes en los gonadotropos (Arimura, 2000).

Las neuronas GnRHérgicas tienen su origen embrionario en la placoda olfatoria; dichas neuronas migran hacia el hipotálamo junto con o como parte del nervio terminal (este forma parte de las conexiones nerviosas del órgano vomeronasal y el SNC) a través de la lámina cribiforme (Prieto y Velázquez, 2002).

Las neuronas GnRHérgicas no forman agregados neuronales compactos, sino redes laxas y difusas. La principal red, por su participación directa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, conocida como la red septo-preóptica-infundibular, se extiende desde la banda diagonal de Broca hasta el área septal, atravesando el núcleo de la estría terminal y las áreas preóptica medial y lateral, el área hipotalámica anterior, el núcleo periventricular y el área retroquiasmática del diencefalo. También forman parte de este continuo las neuronas secretoras de GnRH ubicadas en el hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico (Silverman y col. 1998).

El principal sitio de proyección de las neuronas GnRH es la zona externa de la eminencia media. Estudios de marcaje retrogrado, revelan que entre el 50% y 70% de todas las neuronas GnRH proyectan hacia la eminencia media. (Goldsmith y Col, 1990; Silverman y col, 1987; Merchenthaler y col, 1989). En la rata más del 90% de las neuronas GnRH envían sus proyecciones fuera de la barrera hematoencefálica ya que se asocian con neuronas GnRH del órgano vasculoso de la estría terminal (OVTL) (King y col, 1982; Witkin, 1990).

A nivel microscópico se ha observado que la neurona GnRH puede presentar un contorno "liso" o "rugoso" (figura 4) (Witkin y col, 1982; King y col, 1982; Wray & Hoffman, 1986; Krisch, 1980; Witkin, 1996). Cada cuerpo celular de la neurona GnRH puede tener entre 2 y 12 sinapsis (Witkin y col, 1995). También se ha descrito que la neurona GnRH posee una dendrita larga que mide más de 1000µm de longitud, con múltiples espinas a lo largo de esta dendrita.

Por lo tanto aunque la neurona GnRH recibe pocas aferencias ó "inputs", se compensa con su extensa dendrita que cada una recibe muchos cientos de sinapsis (Herbison, 2006).

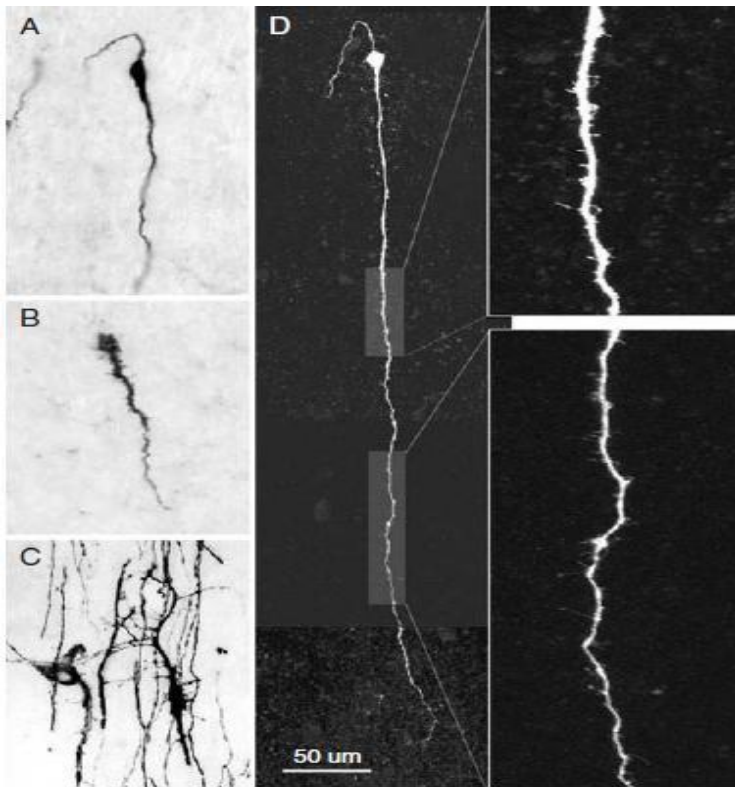


Figura 4. Morfología de las neuronas GnRH en el ratón y en la oveja.

A: neurona GnRHérgica con contorno liso.

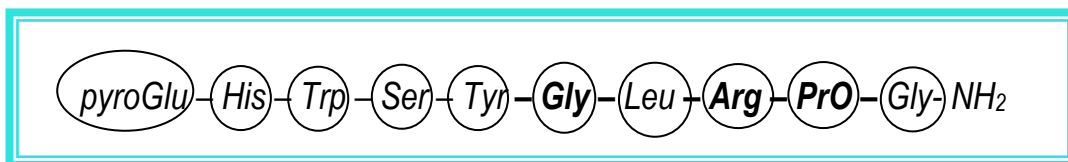
B: neurona GnRHérgica de contorno espinoso o rugoso.

C: células GnRHérgicas de la oveja, se puede observar su morfología compleja y variable.

D: montaje fotográfico de neuronas GnRHérgicas de ratón adulto, se observa todo el cuerpo de la neurona y su estructura dendrítica. Observe la longitud de la dendrita principal (más de 500 μm) y la alta densidad de espinas a lo largo de la misma en los recuadros en fondo oscuro. (Tomado de Herbison, 2006)

Estructura de la GnRH

La GnRH es un péptido pequeño constituido de 10 aminoácidos (aa). La secuencia lineal de la GnRH en mamíferos es la siguiente:



En la rata adulta, el decapeptido GnRH es producido por un número relativamente pequeño de neuronas (Jannes y col, 1985). Se ha descrito que la población de neuronas GnRHérgicas se encuentra en un espectro de 1,000 a 3,000 neuronas (Barry, 1979).

El gene que codifica para la GnRH ha sido aislado de la rata, el ratón y el humano, en este último se localiza en el brazo corto del cromosoma 8. La información obtenida de las cadenas complementarias de Acido Desoxirribonucleico (cDNAs) clonados del hipotálamo y de la placenta indica que tiene 4 exones. La secuencia de codificación transcribe una proteína precursora de 92 aminoácidos que

dará origen a la GnRH, y otro de 56 aminoácidos que corresponderá al péptido asociado a la GnRH (GAP).

El primer exón consiste en una región 5' no transcrita. El segundo exón codifica para el péptido señal, GnRH (10 aa) y los primeros 11 residuos de aminoácidos del GAP. El tercer exón codifica para los residuos 12-43 del GAP. El cuarto exón codifica para los 13 residuos de los aminoácidos terminales del GAP, y el resto de ARNm no se traduce (Kronenberg y col, 2009).

Diversas especies contienen 2 o más formas de GnRH. Una forma hipotalámica (GnRH-I), la cual varía en estructura de las diferentes especies. Y una forma altamente conservada que se encuentra en el tejido celular extra hipotalámico, sitio en el que se propone actúa como neuromodulador y se le conoce como GnRH-II (Flanagan y col, 1997).

Síntesis

La molécula de la GnRH, sufre cambios conformacionales que le permiten ir desde una forma completamente extendida hasta una forma altamente enrollada. El análisis tridimensional de la hormona en solución, ha permitido identificar que tiene un giro B en la posición 6, que aproxima al carboxilo con el amino terminal, dicha configuración tiene una alta afinidad por los receptores a GnRH.

La síntesis de la GnRH (Figura 5) se inicia con la transcripción del ARNm en los ribosomas adosados al retículo endoplásmico rugoso, dicha transcripción forma un péptido precursor (pre-pro-GnRH) de aproximadamente 10,000 daltones. El precursor de la GnRH se corta por acción enzimática en el retículo endoplásmico y da origen a la pro-GnRH, que se transfiere al aparato de Golgi, donde se produce la ruptura proteolítica de la cadena y la eliminación del par de aminoácidos básicos. Posteriormente se activa la enzima glutamina N-terminal para inducir la ruptura del enlace gly¹¹ – gly¹⁰ y la amidación de la glicina en el carbono terminal (Busby y col 1987; Charli y col 1991). Finalmente la GnRH y su péptido asociado (GAP) son almacenadas en vesículas de secreción.

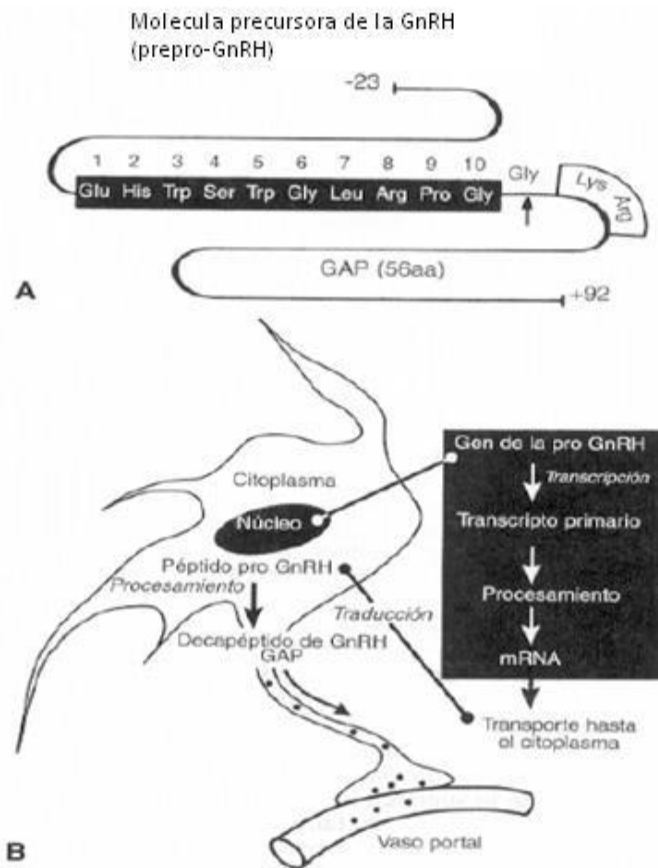


Figura 5. Gen de la GnRH y procesamiento de la pre-pro-GnRH.

A. Representación esquemática de la estructura y la secuencia de 92 aa de la pre-pro-GnRH. El decapeptido (aa 1-10) ocupa el lugar intermedio entre el péptido señal y la secuencia de Gly-Lys-Arg. La flecha indica el sitio de procesamiento proteolítico y la amidación C-terminal de la molécula GnRH.

B. Procesamiento molecular del decapeptido GnRH. En el núcleo el gen de la pro-GnRH es procesado a ARNm después de la transcripción; el ARNm es transportado hasta el citoplasma del cuerpo celular (soma), donde se genera el péptido pro-GnRH después de la traducción. Un mayor procesamiento conduce a la generación del decapeptido GnRH y del péptido asociado a la GnRH (GAP). Después, tanto la GnRH como el GAP son empaquetados y transportados hasta la terminal nerviosa y liberados en la circulación portal de la adenohipófisis (Tomado de Yen y col, 2001).

Liberación

La liberación de esta hormona se realiza por exocitosis en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de los canales de Ca^{+2} , se activan las enzimas proteolíticas que degradan la membrana plasmática, de tal forma que el péptido es liberado (Charli y col, 1991).

Al llegar a la eminencia media las fibras de las neuronas GnRH forman una estrecha asociación con los tanacitos, que son células gliales especializadas del tercer ventrículo, las terminales neurovasculares de la neurona GnRH a menudo son encapsuladas por los "pies" de los tanacitos. Esta disposición sugiere que el acceso del decapeptido al sistema portal, después de la liberación en la terminal de la GnRH, no es directo. (Kozlowski, 1985; King y Rubin, 1995; Prevot y col, 1998; Ugrumov y col, 1989).

Los efectos de la GnRH son mediados por los mecanismos asociados a la proteína G. Al activarse la subunidad α de esta proteína se desencadena una cascada

de eventos en los que participan la activación de varias enzimas y la movilización de iones como se muestra en la figura 6.

Los receptores a la GnRH (RGnRH) se encuentran en la membrana citoplasmática del gonadotrofo de la adenohipófisis, sin embargo estos receptores se han encontrado en gónadas de rata y de humano, en la placenta, en el tejido adrenal, algunos tejidos cancerígenos de mama y otras aéreas del sistema nervioso central (Kronenberg y col, 2009).

El RGnRH es un receptor de siete dominios transmembranales acoplado a la proteína G (Cheng y Lung, 2005). El número de RGnRH presentes en la superficie celular de los gonadotrofos está regulado por variaciones de la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH (Katt y col, 1985).

La GnRH al unirse a su receptor, activa a la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C. Como resultado de la activación de estos sistemas enzimáticos, se forman moléculas que actúan como segundos mensajeros, entre los que se encuentran la adenosina mono-fosfatada cíclica (AMPc), el fosfatidil inositol (IP), el diacil glicerol (DAG), así como la movilización de calcio extra e intracelular. Estos mensajeros activan el sistema de proteínas cinas C, lo que se traduce como el estímulo de la secreción de la FSH y la LH. (Conn, 1994; Fink, 1998); (Figura 6).

En la rata el número de RGnRH cambia durante el ciclo estral, estos son menores en el estro y diestro-1 pero aumentan gradualmente en el diestro-2 y son máximos en la tarde del proestro, es decir, durante el periodo previo al “pico” preovulatorio de LH. Después de esto, el número de receptores decrece y se pueden requerir de varios días para alcanzar las concentraciones del proestro (Conn 1994).

En una serie de experimentos llevados a cabo en el mono *Rhesus*, Knobil (1980) estableció que en el hipotálamo medio basal, la neurona GnRH, se comporta de manera rítmica con pulsos agudos y breves de actividad eléctrica.

El conjunto de neuronas GnRHérgicas envían sus axones al sistema portal de la eminencia media, descargan el decapeptido de manera coordinada, repetitiva y episódica, por lo que en la circulación sanguínea portal-hipofisaria aparecen pulsos diferenciados de GnRH (Carmel y col, 1976). El carácter pulsátil de la GnRH ocasiona en la hipófisis, la liberación de la LH en pulsos. Animales de experimentación, en los que es posible recoger muestras de sangre portal y periférica simultáneamente, se ha demostrado que la velocidad de secreción entre los pulsos de GnRH y de LH son 1:1 (Phelps y Hurley, 1999). Tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, se demostró que a

frecuencias de pulsos de secreción la GnRH cada 30 min se estimula preferentemente la biosíntesis y secreción de la LH, mientras que pulsos de menor frecuencia cada 2 h se estimula la secreción de la FSH (Dalkin y col, 1989).

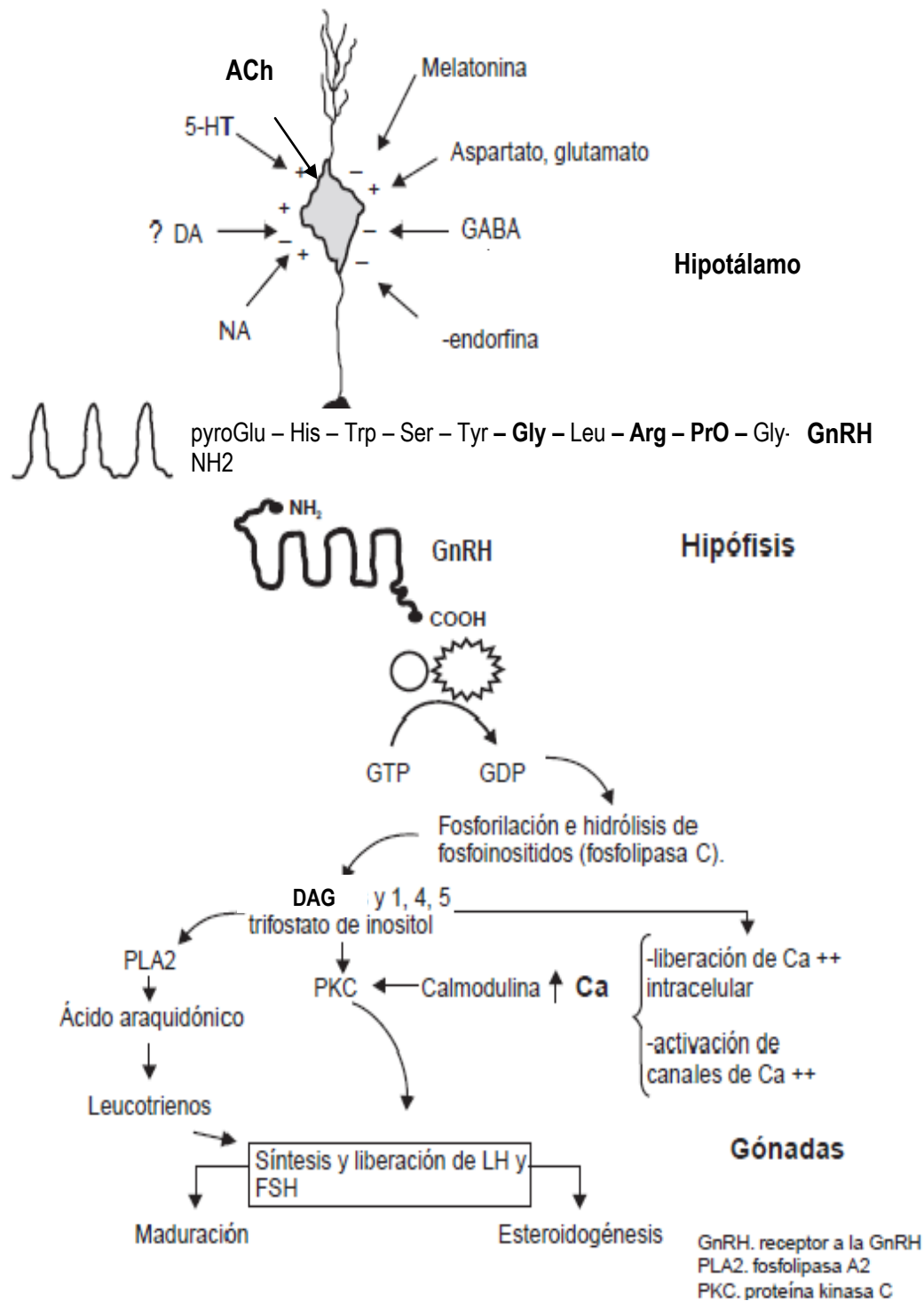


Figura 6. Mecanismo de acción de GnRH. ACh: acetil colina; 5-HT: serotonina; NA: noradrenalina; DA: dopamina; GABA: ácido gamma-amino butírico; GTP: Guanosín trifosfato; GDP: guanosín difosfato; DAG: Diacilglicerol PKC: Proteína quinasa D, PLA2: fosfolipasa A2. (Tomado y modificado de Prieto y Velázquez, 2002).

HIPÓFISIS

La hipófisis se encuentra en la base del cerebro, alojada en el hueso esfenoides y cubierta por la duramadre (Fink, 2000). Esta unida al hipotálamo por el tallo hipofisario, el cual contiene el sistema portahipofisario de vasos sanguíneos; es un órgano complejo dividido en tres partes: el lóbulo anterior, el lóbulo intermedio y el lóbulo posterior. El lóbulo anterior y el intermedio forman una glándula endocrina

verdadera llamada adenohipófisis.

El lóbulo posterior también llamado neurohipófisis es una extensión del hipotálamo (Figura 7) (Arimura, 2000).

La neurohipófisis deriva del ectodermo neural, se desarrolla como una prolongación que crece hacia la parte ventral del diencéfalo (Fanjul, 1995). Está compuesta por axones de neuronas cuyos cuerpos celulares se localizan en el hipotálamo y secretan oxitócina (OXT) y vasopresina (ADH) (Brown, 1994; Fanjul, 1995).

En el embrión la adenohipófisis se origina como

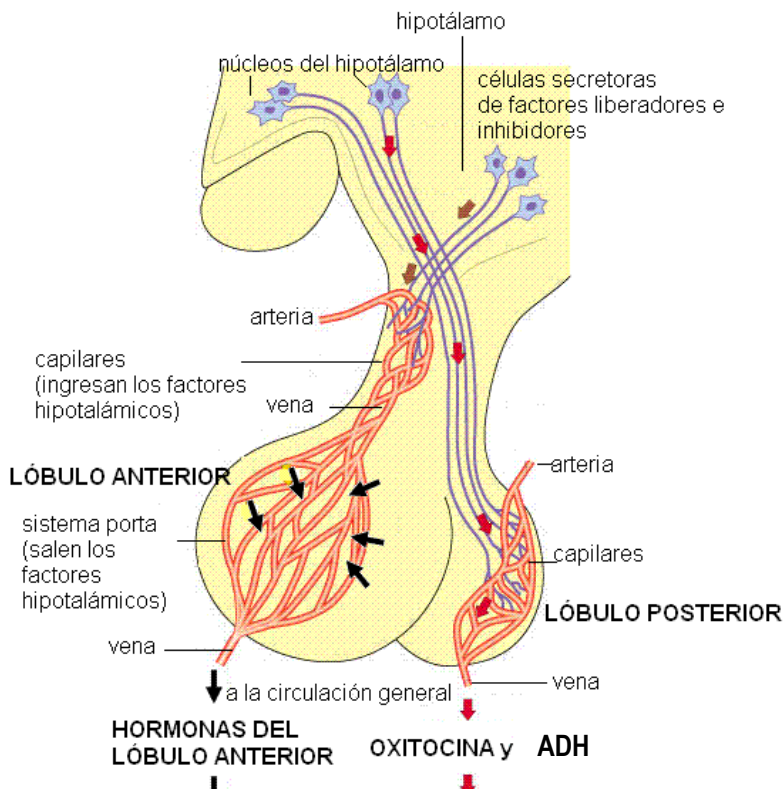


Figura 7. Partes de la glándula hipofisiaria. (tomado de <http://www.genomasur.com>)

una evaginación dorsal del techo de la faringe y se une al hipotálamo por medio del tallo hipofisario llamado *pars tuberalis*, el cual contiene al sistema porta hipofisario (Fanjul, 1995). La hipófisis anterior es un tejido muy vascularizado. El drenaje venoso de la hipófisis permite que las hormonas alcancen la circulación sistémica. Este sistema proporciona una conexión corta y directa entre el hipotálamo y la hipófisis anterior (Larrea y col, 1991). Por lo tanto el tallo hipofisario contiene axones nerviosos y vasos sanguíneos que conectan al hipotálamo con la adenohipófisis.

La adenohipófisis se divide en *pars intermedia*, *pars infundibularis* o *tuberalis* y *pars distalis* o lóbulo anterior (Fanjul, 1995). Produce y secreta diferentes hormonas: la hormona del crecimiento (GH), la hormona adenocorticotropa (ACTH),

FSH, LH, prolactina (PRL), la hormona estimulante de los melanocitos ó melanotropina (MSH) (Brown, 1994)

LH y FSH

La LH y la FSH son el estímulo principal que mantiene la estructura y funcionamiento de la gónada en ambos sexos (Domínguez y col, 1991).

La regulación de la liberación de las gonadotropinas sucede de manera secuencial y sincrónica durante toda la vida reproductiva del animal. En los mamíferos, la secreción de las gonadotropinas es regulada por factores del medio ambiente como la temperatura, los ciclos de luz/obscuridad, la disponibilidad del alimento o por factores conductuales (Ronnekleiv y Kelly 2005).

El evento inicial en el mecanismo de acción de las gonadotropinas es la unión a sus respectivos receptores altamente específicos, localizados en las membranas de las células blanco. Estos receptores pertenecen a una super familia de receptores acoplados a la proteína G, cuya característica es la de presentar siete regiones transmembranales. La estructura particular del receptor, y los cambios conformacionales que se generan cuando este reconoce a los carbohidratos de la subunidad beta de la hormona, permiten activar al receptor (Ulloa-Aguirre y Timossi 1998; Ulloa-Aguirre y col, 1999; Zambrano y col, 1995). Una vez que la hormona se une con su receptor, altamente específicos, se lleva a cabo la activación de una o más proteínas asociadas al nucleótido guanina (proteína G), que realiza el proceso de transducción de señales. Se ha descrito que la glicosilación de la subunidad alfa es esencial para inducir la transducción de señales de las moléculas de FSH y de LH (Ulloa-Aguirre y col, 1999).

Las gonadotropinas pueden ser producidas, no solo por distintos gonadotropos, sino también por el mismo tipo de células. Estas cumplen diferentes funciones biológicas y su síntesis y secreción están reguladas diferencialmente. Esto se debe en gran medida a las diferencias en los mecanismos de regulación transcripcional, post-transcripcional y post-translacional de sus subunidades beta, que son únicas y diferentes para cada gonadotropina. Es decir, que ambas hormonas son glicoproteínas dimericas y comparten una subunidad alfa común. Sus subunidades beta se derivan de diferentes genes que codifican proteínas diferentes, la subunidad β es específica para cada hormona (Bernard y col. 2010).

La secreción de ambas gonadotropinas está bajo el control de la GnRH, sin embargo se ha planteado la existencia de una hormona liberadora de la hormona leuteinizante (LHRH) y de un factor liberador de la hormona folículo estimulante (FSH-RF). Los esteroides gonadales actúan en el hipotálamo al modificar la secreción de la GnRH, y sobre la hipófisis, al inhibir o estimular la liberación de LH y FSH. La liberación de la FSH también es modulada por la inhibina y la activina secretadas por las gónadas, así como por los diferentes neuro-moduladores ya mencionados que regulan la secreción de FSH y de la LH al actuar directamente sobre la secreción de la GnRH (Arimura, 2000; Brown, 1994; Guyton y Hal, 2001; Halasz, 2000; Herbison, 2008; Turi y col, 2008)

Las concentraciones séricas de LH alcanzan su concentración más baja en la mañana del estro (poco después de la ovulación), el diestro-1, el diestro-2 y medio día del proestro (Smith y col, 1975; Butcher y col, 1974; Nequin y col, 1979; Barraclough y col, 1971; Goldman, 1969). Aunque se ha reportado que durante este periodo las concentraciones basales de LH presentan una ligera variación diurna durante todo el ciclo, ocurre una pequeña elevación en las concentraciones séricas de LH cada día, esto a la mitad del periodo de luz y después disminuye a los más bajos alrededor de la media noche de cada día del ciclo (Gay y col 1970) (Figura 8).

En la tarde del proestro entre las 14:00-15:00 hrs las concentraciones séricas de LH aumentan rápidamente hasta alcanzar las concentraciones máximas entre las 17:00-19:00 hrs. Este incremento de la concentración plasmática de la LH induce la ruptura folículo ovárico y la expulsión del ovocito (la ovulación), aproximadamente 10 horas después. A partir de entonces las concentraciones séricas comienzan a disminuir hasta alcanzar concentraciones basales en la mañana del estro.

Cuando se toman muestras de sangre con intervalos de 10 minutos, durante cada día del ciclo estral, es posible observar el patrón de secreción ultradiano de la LH (Fox y Smith, 1985; Gallo, 1981; Higuchi y Kawakami, 1982).

Específicamente los pulsos se producen en un lapso de 55 a 60 minutos, y amplitudes (expresadas de acuerdo a la norma NIAMDD-LH-RP-1) de 15 a 40 ng/ml, esto en diestro 2 y por la mañana del proestro. En la tarde del proestro durante el pico preovulatorio de LH se presenta de forma constante y casi invariable: pulsos con una amplitud de 600 ng/ml (Gallo, 1981).

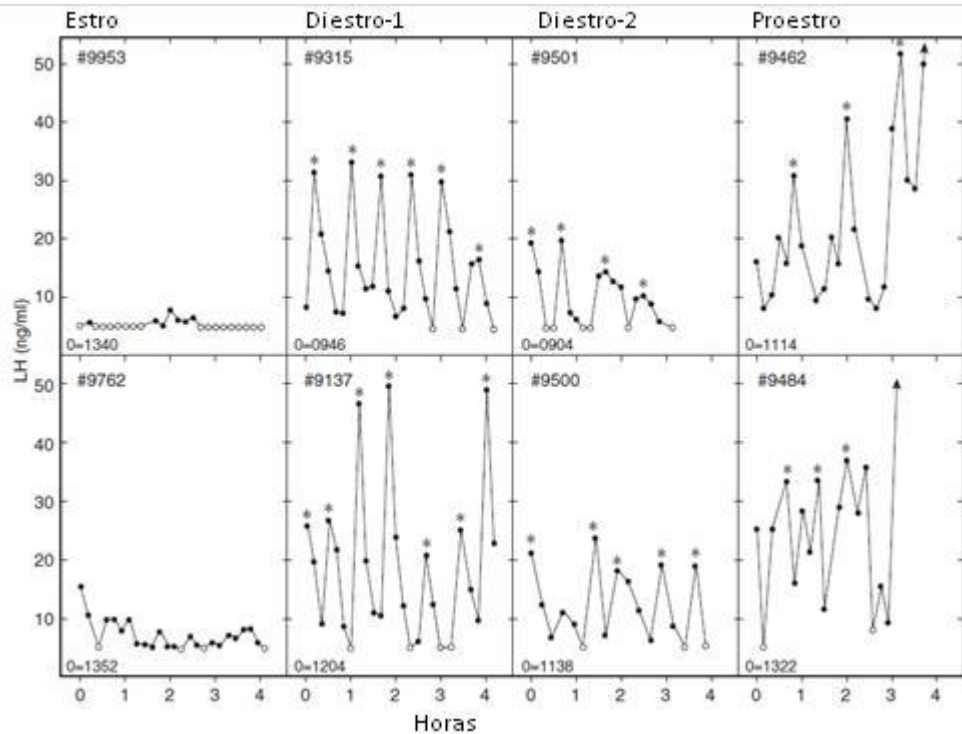


Figura 8. Concentraciones de LH en plasma periférico medido por intervalos de 10 minutos durante 4 horas, en los días del ciclo estral (Gay y col, 1970).

El patrón de secreción de la FSH durante el ciclo estral, es similar al de la LH (Smith y col, 1975; Butcher y col, 1974; Daane & Parlow, 1971; Gay y col, 1970). Las concentraciones basales de la FSH se secretan desde la noche del estro, hasta el mediodía del proestro. Entre las 14:00-15:00 hrs del día del proestro las concentraciones de FSH comienzan a aumentar rápidamente para alcanzar su concentración máxima alrededor de las 17:00 - 19:00 horas del proestro.

Esta concentración de FSH decrece a concentraciones basales, pero otro aumento ocurre en la mañana del estro. Por lo que se considera que la secreción de FSH está bajo controles diferentes a los de la LH (Smith y col, 1975; Butcher y col, 1974; Daane & Parlow, 1971; Gay y col, 1970).

La FSH y la LH están formadas por dos cadenas polipeptídicas (subunidad α y β) cuya síntesis es codificada por genes diferentes. La cadena α es idéntica en ambas gonadotropinas, mientras la. (Haisenleder y col, 1994; Pierce & Parsins, 1981).

La expresión de genes en la adenohipófisis para la subunidad α , la subunidad β de la LH (β -LH) y de la FSH (β -FSH) se han descrito durante el ciclo estral (Zmeili y col, 1986; Ortolano y col, 1988). El ARNm de la subunidad α aumenta desde las 8:00

horas del diestro-2 hasta alcanzar un máximo a las 20:00 horas, la que disminuye abruptamente hacia las 24:00 horas de este día (Zmeili y col, 1986). El contenido de ARNm de la subunidad α se mantiene bajo durante el proestro, el estro y el diestro-1. El ARNm para la subunidad β -LH es baja durante el estro y el diestro-1, muestra un aumento a las 8:00 horas del diestro-2, para caer rápidamente y permanecer así durante la mañana del proestro. A las 14:00 horas del proestro comienza a aumentar hasta las 17:00 horas, alcanzando así un segundo pico de expresión. Lo que corresponde a la secreción preovulatoria de la LH (Zmeili y col, 1986) (Figura 9).

EL ARNm para la subunidad β -FSH comienza a aumentar a las 22:00 horas del proestro, alcanza un máximo a las 02:00 horas del estro y regresa a sus concentraciones bajas a las 08:00 horas, manteniéndose así hasta las 20:00 horas. Este aumento corresponde con el pico de concentración de FSH en el proestro. Existe un segundo incremento desde las 23:00 horas del estro hasta la tarde del diestro-1 (Ortolano y col, 1988).

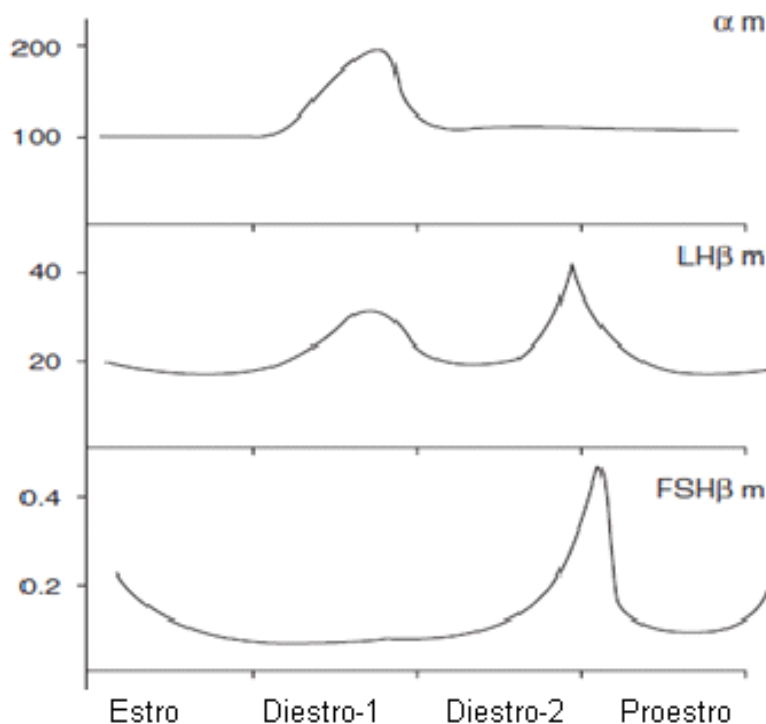


Figura 9. Contenido de ARNm de las subunidades α , β -LH y FSH- β en la adenohipófisis, medido durante el ciclo estral de la rata (tomado y modificado de Freeman 2006).

OVARIO

El ovario está organizado en tres compartimentos: el intersticial, el luteal y el folicular. Los folículos, que son la unidad anatómica y funcional de dicho órgano, se clasifican estructuralmente en primordiales, primarios, secundarios terciarios o antrales y preovulatorios. El folículo está formado por el ovocito I, una o varias capas de células de la granulosa, una membrana basal que aísla a estos componentes, una o más capas de células de la teca (que se dividen en interna y externa). Este compartimiento tecal está formado por fibras colágeno, células del tejido conjuntivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas (Domínguez y col 1991) (Figura 10).

Células de la granulosa

Las células de la granulosa forman una capa continua que rodea completamente al ovocito y lo aísla del resto del ovario. En el folículo en crecimiento, las células de la granulosa proliferan rápidamente por estímulo de la FSH, fenómeno en el cual los estrógenos actúan de manera sinérgica (efecto mitogénico) (Richards, 1980).

Una vez que las células de la granulosa forman siete u ocho capas alrededor del ovocito, comienza a observarse la presencia del licor folicular, que se origina de la extravasación de componentes plasmáticos y por la secreción de células foliculares. En el licor folicular se encuentran proteínas, polipéptidos, FSH, LH, prolactina, estrógenos, progesterona, gonadotropinas y noradrenalina, cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral. (Domínguez, 1991) (Figura 10).

Durante la mayor parte del desarrollo de los folículos, las células de la granulosa solo poseen receptores a FSH, cuyo número es constante durante el ciclo estral, mientras que los de LH en la rata aparecen en el diestro-1 y aumentan en la tarde del diestro-2 y alcanzan su máximo antes del pico de LH y no a consecuencia de este (Goff y col, 1970; Hsueh y col, 1983; Jia y col, 1985; Jonassen y col, 1982; Schwall y Erickson, 1984).

OVARIO

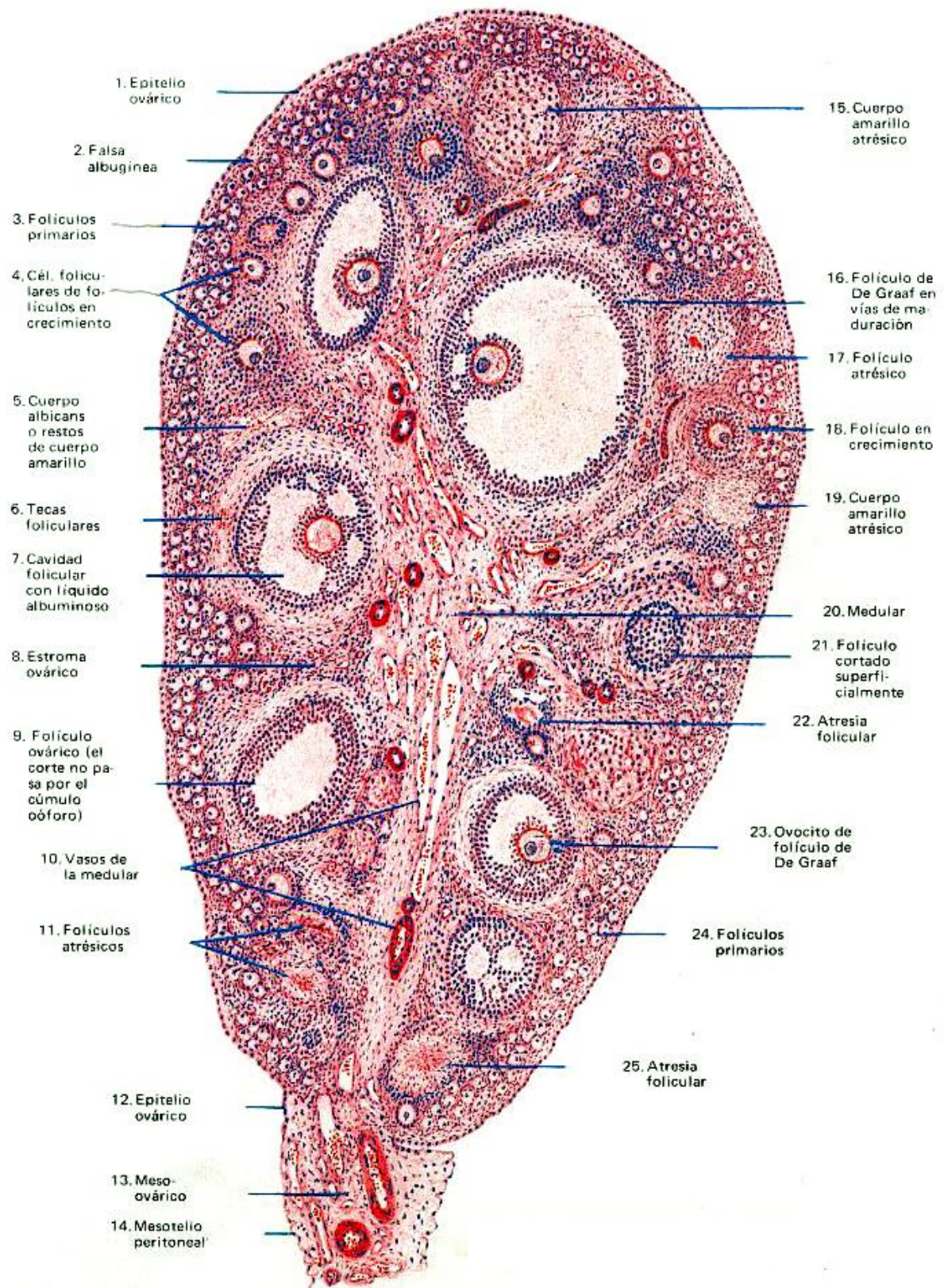


Figura 10. Ovario de mamífero donde se observa el compartimento folicular, luteal e intersticial (Tomado de: <http://personal.us.es/salles/OMA/docencia/practicas/difiore/imagenesdifiore/Ovario01.jpg>)

Células de la teca

Desde el punto de vista ultra estructural las células tecales maduras presentan todas las características de las células secretoras de hormonas esteroideas (abundante retículo endoplasmico liso y mitocondrias con crestas tubulares); las que están cerca de la membrana basal presentan nexos (Bjersing, 1978). Normalmente las células tecales están en estrecha vecindad con los capilares que riegan la teca interna, en la cual existen numerosas terminaciones nerviosas tanto colinérgicas como adrenérgicas (Burden, 1978).

Las células teco-intersticiales tienen receptores a LH, PRL, ACTH, noradrenalina, GnRH y estrógenos. Los estrógenos que son el sustrato de las células de la granulosa en la síntesis de estrógenos. En el folículo preovulatorio las células tecales pierden la capacidad de síntesis de andrógenos y secretan progesterona (Burden, 1978; Dekel y col, 1983; Dunaif y col, 1982; Erickson y Magoffin, 1983).

Hormonas esteroideas

El ovario produce estradiol, progesterona, estrona, androsterona, testosterona, 17 α -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como la inhibina, la relaxina, la activina, la folistatina y factores de crecimiento locales. De todas estas las que se cuantifican en concentraciones más elevadas respecto a sus moléculas hermanas son el estradiol y la progesterona. Todos los esteroides ováricos se producen fundamentalmente en los folículos en dos tipos de células (la célula de la teca interna y las de la granulosa) y en el cuerpo lúteo; se forman a partir del colesterol que se obtiene de tres fuentes principales: el colesterol que circula en la sangre, el que se sintetiza *de novo* dentro del ovario a partir de la acetilcoenzima-A y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas (Tresguerras y Castillo, 1999).

Síntesis de estrógenos

La fuente principal de colesterol utilizado por el ovario deriva de la captación de colesterol unido a lipo-proteínas de baja densidad (LDL) que entra a la célula por endocitosis, formando gotitas lipídicas de ésteres de colesterol que se hidrolizan

formando colesterol libre, el cual es transportado de la membrana mitocondrial externa a la interna. La etapa inicial en la biosíntesis de los esteroides es la transferencia del colesterol al interior de la mitocondria, que es realizada por la StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda). En las membranas mitocondriales, el colesterol es convertido en pregnenolona por la enzima citocromo P₄₅₀ (20, 22 desmolasa) (Botella, 1995; Yen y col, 2001). Una vez en el retículo endoplasmico, la pregnenolona puede ser transformada a progesterona por dos rutas, la $\Delta 4$ ó $\Delta 5$. En la ruta $\Delta 4$ (Figura. 11), la pregnenolona es transformada a progesterona por la enzima 3- β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD). La progesterona es convertida a 17 α -hidroxi-progesterona P₄₅₀ aromatasas. La desmolasa (17, 20- esteroide liasa) la convierte a androstenediona. Este metabolito es transformado en testosterona por la enzima 17- β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17 β -HSD). Las células teco-intersticiales de los folículos son la primera fuente de andrógenos ováricos.

Tanto la androstenediona como la testosterona pueden ser transformados en las células de la granulosa a estrógenos por la enzima P₄₅₀. En el sistema nervioso central algunas células poseen al complejo enzimático de aromatización, por lo que convierte a los andrógenos en estrógenos (Yao y Bahr, 1990; Liteack y Schmidt, 2000).

En la ruta $\Delta 5$ (Figura 11) la pregnenolona es transformada a 17 α -hidroxi-pregnenolona por la enzima 17 α -hidrolasa. Después, la C17, 20- liasa transforma 17 α -hidroxi-pregnenolona en dehidro-epiandrosterona (DHEA), está a su vez es transformada a androstenediona por la enzima 17 β -HSD. A partir de aquí la androsteniona sigue la ruta $\Delta 4$ (Yao y Bahr, 1990).

Los estrógenos son hormonas que estimulan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación celular del tejido de mama, útero, vagina, ovarios, testículos, epidídimo y próstata, cumpliendo una función vital en la fisiología reproductiva tanto femenina como masculina estimulando el crecimiento (Korach, 1994).

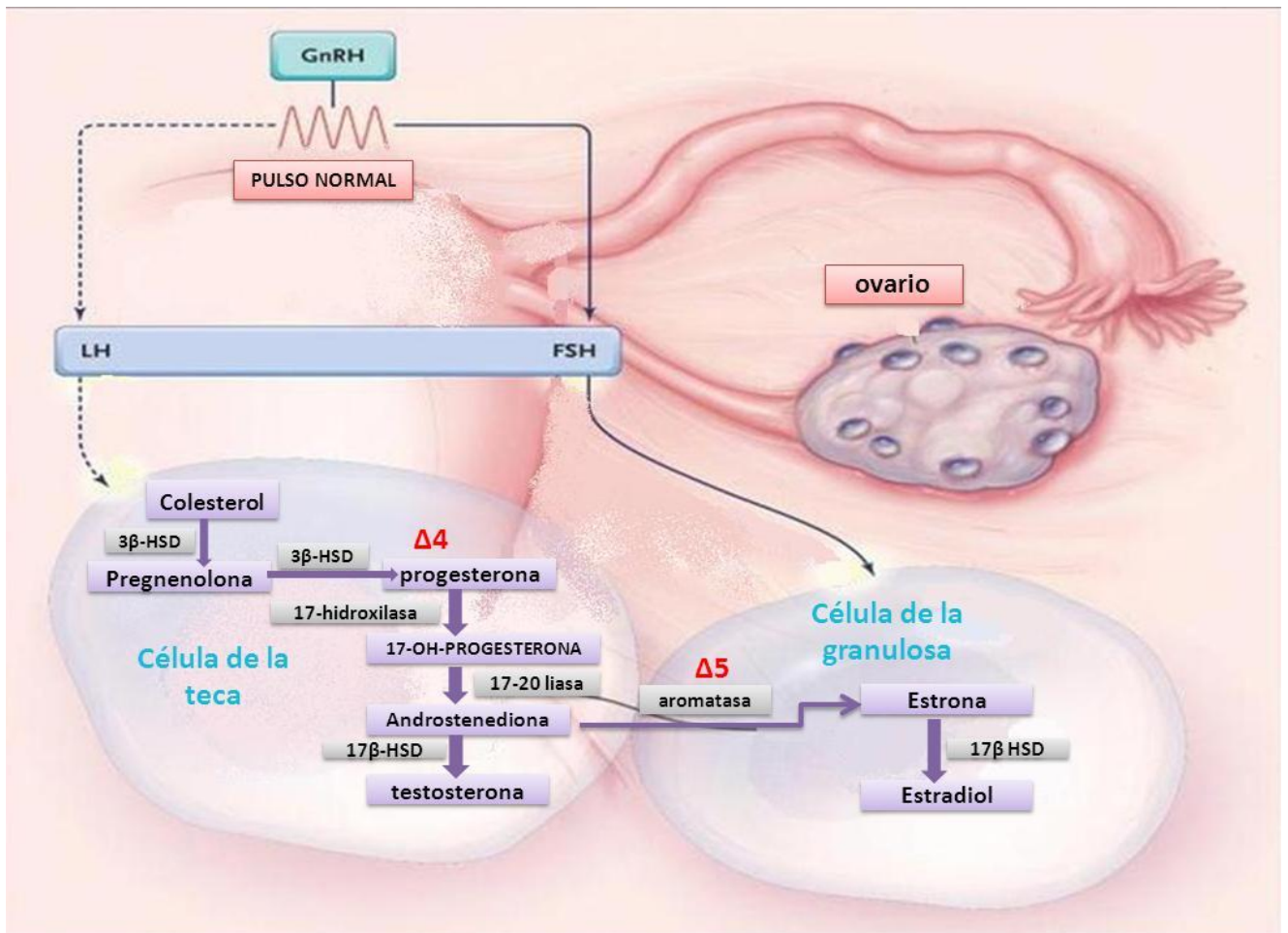


Figura 11. Ruta Biosintética de hormonas esteroides sintetizadas por el ovario. (Tomado y modificado de: <http://brhvenezuela.galeon.com>)

La FSH estimula la síntesis de estrógenos al actuar en las células de la granulosa, mediante la unión a su receptor en la membrana celular. El complejo hormona-receptor actúa sobre el complejo adenilato ciclasa, lo que provoca el aumento del AMPc y estimula la síntesis y la actividad de la aromatasa. Esto explica que los efectos de la FSH sobre la síntesis de estrógenos sean mimetizados por el AMPc (Dominguez, 1991).

La LH regula la síntesis de estrógenos por sus efectos sobre la producción de andrógenos por las células tecales y por la estimulación de la síntesis y la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa (Hsueh y col, 1983).

La LH estimula selectivamente el complejo enzimático que separa la cadena colateral del colesterol y las actividades de la 17α hidroxilasa y la C17-20 desmolasa, las que provocan la conversión de colesterol a pregnenolona, paso limitante en la

síntesis de progesterona y por lo tanto de andrógenos (Erickson, 1982; Erickson & Magoffin 1983; Magoffin y Erickson, 1981).

Los efectos de la LH sobre la síntesis de estrógenos son amplificados por su liberación pulsátil, ya que la respuesta secretora es controlada tanto por la amplitud como por la frecuencia de los pulsos de LH (Domínguez, 1991).

La LH estimula la actividad de la aromatasa en aquellas células de la granulosa que fueron previamente estimuladas por la FSH. En el caso de la rata adulta, esto ocurre en la tarde del diestro-2. En los folículos preantrales las células de la granulosa carecen de receptores a LH y FSH, y su síntesis es estimulada por la FSH y los estrógenos (Hsueh y col, 1983)

Según Hsueh y colaboradores (Hsueh y col, 1983) en un folículo preantral la LH es la hormona más importante en la regulación de la producción de estrógenos, ya que estimula la síntesis de andrógenos, de sus propios receptores en las células de la teca (regulación estimuladora o “up-regulation”) y la actividad aromatásica de las células de la granulosa. Después del “pico de LH”, esta hormona inhibe sus propios receptores en las células de la granulosa (regulación inhibitoria o “down regulation”), lo que resulta en la disminución de la síntesis de estrógenos (Pelusso y col, 1984; Schwall y Erickson, 1984). En el folículo antral y preovulatorio, la FSH, previo al pico de LH, estimularía la síntesis de receptores a la LH y mantendría en cierto grado la producción de estrógenos (Hsueh y col, 1983).

Secreción de progesterona y de andrógenos

La progesterona y los andrógenos son sintetizados por las células tecales. La progesterona también es secretada por las células de la granulosa, esto depende del momento del ciclo estral en el que son estudiados (Domínguez, 1991).

En las células de la granulosa de los folículos antrales medianos y preovulatorios, la FSH estimula la síntesis de progesterona, efecto que es reforzado de manera sinérgica por la prolactina y los andrógenos e inhibidos por la PGF2 α (prostaglandina F2 α) (Hsueh y col, 1983; Zsolnai y col, 1982).

En el folículo preovulatorio, la síntesis de progesterona por las células de la teca y de la granulosa es estimulada por la LH, la prolactina, la noradrenalina, cuyos efectos son mediados por el AMPc (Hsueh y col, 1983; Zsolnai y col, 1982).

La regulación de la síntesis de andrógenos es paralela a la de los estrógenos (Erickson y Magoffin, 1983).

En la hembra, la principal fuente de estrógenos son los ovarios, también la placenta secreta esta hormona. Otras estructuras como la piel, el hígado, la médula ósea, los tejidos adiposo, nervioso, óseo, muscular y las glándulas adrenales pueden aromatizar andrógenos en estrógenos.

El estriol es un estrógeno débil con respecto al 17β -estradiol y la estrona. La potencia estrogénica se valora por el aumento del peso del útero de ratas castradas, y dado que la concentración plasmática 17β -estradiol es mayor que la de la estrona y estriol (12 y 80 veces respectivamente), se considera el principal estrógeno (Guyton y col. 2001, Simth 1999) por su mayor actividad biológica con respecto al estriol y la estrona (Figura 12).

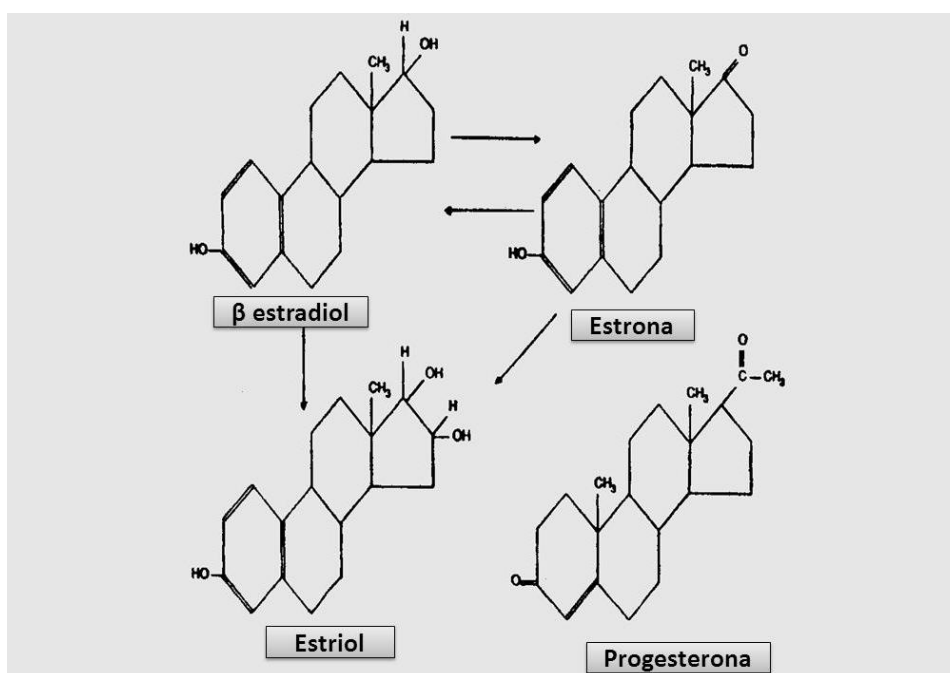


Figura 12. Estructura química de los estrógenos (tomado y modificado de Guyton y col. 2001).

RECEPTORES A ESTROGENOS

Los receptores a estrógenos (REs) son mediadores de los efectos fisiológicos de los estrógenos en el sistema cardiovascular, el tejido óseo, la hematopoyesis, el SNC y el sistema reproductor (Osborne y col, 2005).

Los REs son ligandos activadores de receptores nucleares, con una amplia gama de efectos biológicos (Nilsson y col, 2002). Son proteínas activadoras dependientes del ligando, con una configuración química específica para fijar a la hormona, y son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de transcripción (Anstead y col, 1996; Mangelsdorf y col. 1995).

El RE es una proteína soluble termolábil, que es destruida fácilmente por proteasas, (Jensen y DeSombre. 1972), que se degrada a una velocidad de rotación (cada 4 horas), tanto en el útero y células humanas de la línea MCF-7 de cáncer de mama (Nardulli y col., 1986)

La transcripción del RE es iniciada por tres diferentes promotores que dan lugar a tres diferentes isoformas de ARNm (A, B, C) con un único codón 5' no transcrito (Grandien y col, 1993).

En los humanos el gen que codifica para el RE se localiza en el cromosoma 6q sub banda 25.1 (Menasce y Inove, 1993); en el ratón este gen es localizado en el cromosoma 10 (Sluyster y col, 1988).

EL RE muestra 6 dominios el A/B, C, D, E y F (Figura 13), que tienen cuatro importantes funciones: unión al ligando, dimerización unión al ADN y la activación de la transcripción (Grandien y col, 1997).

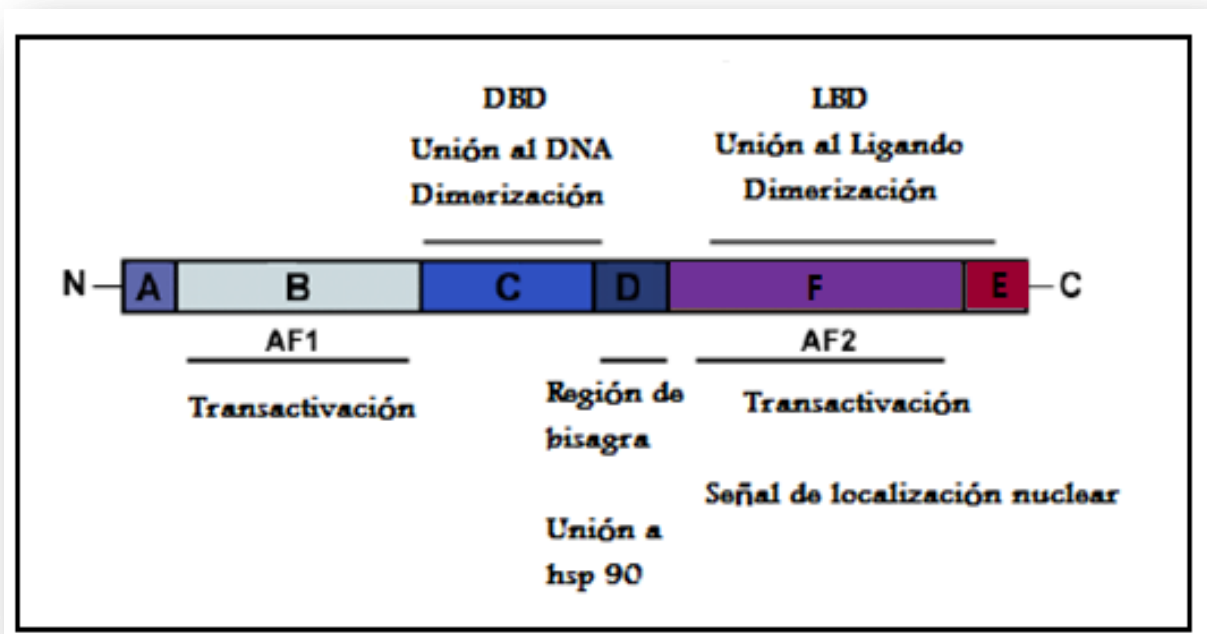


Figura 13. *Dominios Funcionales del RE* (Tomada y modificada <http://vitae.ucv.ve>).

El dominio A/B se encuentra en la parte amino-terminal de la proteína y es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares.

Este dominio contiene una función de activación de la transcripción genética (activación función 1 o AF-1), (Horwitz y col, 1996) y varios sitios de fosforilación, que son importantes en el proceso de activación de la proteína, especialmente en los procesos donde el receptor es activado en presencia de la hormona (Kobayashi y col, 2000).

Adyacente a este dominio se encuentra una región de unión al ADN o dominio C, es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares; está compuesta por nueve residuos de cisteínas que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroides, de los cuáles, ocho están ubicados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar dos dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el DNA está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de Zinc, conocida como la caja P "P-box" (Freeman, 1992). En la segundo dedo de Zinc, la secuencia de 5 a 6 aminoácidos de cisteínas conforma la llamada caja distal (D- box), la cual discrimina entre los REs con secuencias similares (Enmark y col, 1999; Rollerova y col, 2006).

Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F, se encuentra la región D o región de bisagra ("finge") que permite al receptor flexibilidad para alterar su composición. Se ha demostrado que una sección del dominio D es necesaria para unir un ligando con máxima afinidad. De igual manera se ha demostrado que participa en la unión de proteínas de choque térmico (hsp 90 y hsp 70); las cuales permanecen unidas al receptor mientras se encuentre en estado inactivo (Enmark y col, 1999; Rollerova y col, 2000).

Finalmente en el extremo carboxilo terminal se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando esteroide, el cual consiste en una cadena de aproximadamente 250 aminoácidos, que forman una sección hidrofóbica, que determina la alta especificidad de la unión de la hormona al receptor. Lo que quiere decir que el receptor de estrógeno une a los estrógenos con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroides (Nilsson y col. 2001; Enmark y col. 1999; Rollerova y col, 2000).

Se han descrito dos tipos de sitios nucleares de unión específica para REs. (Eriksson y col, 1978). El tipo I, sitio clásico representante de REs con alta afinidad al

estradiol en concentraciones relativamente bajas. El tipo II, presente en grandes cantidades, con baja afinidad por el estradiol (Markaverich y col, 1981; Gray y col, 1994).

El receptor esteroide se activa al unírsele su ligando, en este caso al 17 β -estradiol, y actúa como un factor de transcripción al asociarse con ADN, ya que estimula la transcripción de ciertos genes, de ahí el nombre de receptores nucleares, por ejercer su acción en el núcleo (Evans y col, 1998; Beato y col, 1996).

Después de que el ligando atraviesa la membrana nuclear, ocurre la homo o heterodimerización (dos RE α o un RE α se heterodimeriza con un RE β) y el complejo hormona receptor reconoce una secuencia específica en el ADN o elemento de respuesta al estrógeno.

Además del ligando natural (17 β -estrógeno), el RE puede ser ocupado por una gama de moduladores sintéticos, selectivos del receptor de estrógeno, tales como el tamoxifeno modulador del RE α y del RE β ; el propil-pirazol-triol (PPT) y el metil piperidino pirazol (MPP), ligandos específicos del RE α (Anexo 1), (Heldring y col, 2000).

Existen tres tipos de receptores al 17 β -estradiol: RE α , RE β y el RE γ ; presentes en vertebrados (Xia y col, 1999). De estos los más caracterizados y los más estudiados son el α y el β .

Ambos receptores se expresan en gónadas, hueso, musculo esquelético, hígado tejido adiposo, SNC, en el endotelio vascular, y en la medula ósea y en los órganos del sistema reproductor (Matthews y Gustafsson. 2003) (Merchenthaler y col 2004).

EL RECEPTOR A ESTRÓGENOS α (RE α) EN EL HIPOTÁLAMO

En general, el RE α está expresado en la mayoría de los órganos femeninos como el ovario, útero, vagina glándula mamaria y ciertas áreas del SNC, especialmente en el hipotálamo (Muuramatsu y Inove, 2000).

El RE α , fue el primero en ser caracterizado e identificado en el útero de la rata, mientras que el RE β se clono e identifico en la próstata de rata (Kuiper y col, 1996)

Los estudios llevado a cabo en ratones *knock-out* (KO) específicos para RE α ; pusieron de manifiesto que la ausencia o la alteración genética de este receptor modifica el efecto de retroalimentación del E₂ en el hipotálamo y la hipófisis (Scully y col, 1997; Lindzey y col, 1998).

Mediante la detección del ARNm (por hibridación *in situ*) y la cuantificación de los receptores a estrógenos (por la técnica de unión con estrógeno tritiado) en neuronas GnRHérgicas (identificadas por inmunohistoquímica) (Shughrue y col, 1998), se mostró que las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE β y no el RE α . Sin embargo Hrabovszky y colaboradores (2000) mostraron que en las áreas rostrales del cerebro anterior (estria terminal, núcleo medial de la amígdala y el núcleo preóptico peri-ventricular), hay neuronas que co-expresan el ARNm para ambos tipos de receptores, pero también se han identificado neuronas que expresan sólo el ARNm para el RE α o para el RE β (Hrabovszky y col, 2000).

En POA de ratón hembra adulto, el 45% de las neuronas identificadas como GnRHérgicas expresan el ARNm para el RE α y el 11% expresa el RE β ; algunas otras co-expresan el ARNm para ambos receptores. Esta proporción de neuronas que expresan uno u otro receptor cambia durante el ciclo estral: el RE α se expresa en el 46% de las neuronas GnRHérgicas en el día del diestro-2, en el proestro el 18% y el 75% en el estro; para el RE β , los porcentajes respectivos son 6%, 0% y 19% (Skinner y col, 1999).

Por inmuno-histoquímica se ha mostrado que el número de células inmuno-reactivas (ir) al RE α en POA-AHA es mayor a las 09:00 y 17:00 horas y menor a las 13:00 horas del día, independientemente de la etapa del ciclo que se considere. En cambio, el máximo número de células ir-RE β se observa a las 13:00 horas del proestro y del estro (Mendoza y col, 2007).

Herbison (2006) ha propuesto que tanto el RE α como el RE β están involucrados en los efectos “feedback” inhibitorios de los estrógenos sobre las neuronas GnRHérgicas. Dicha función del estradiol ocurriría por medio de mecanismos transinápticos indirectos, dependientes de las células gliales o de otras neuronas, las cuales expresan el RE α .

Por medio del uso de ratones “knock-out”, en los que el RE α o el RE β se desactivan, se ha mostrado que el RE α pero no el RE β es necesario para que ocurra el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH. En este modelo experimental y mediante el uso de un ligando selectivo para el RE α se mostró que este receptor no sólo es necesario, sino que es suficiente para estimular la secreción preovulatoria de LH (Rissman y col, 1997). Aunque lo propuesto por Wintermantel y col. (2006), parece contundente, hay que recordar que en su modelo

experimental la desactivación genética de uno u otro receptor está presente en todos los órganos blancos del 17β estradiol.

Feed-back positivo y negativo de los estrógenos

En la rata hembra la secreción de LH desde la tarde del estro al medio día del proestro es regulada de manera inhibitoria (retro alimentación negativa del inglés: feedback) por el 17β estradiol y la progesterona secretadas por los ovarios. Este efecto inhibitorio sobre la LH se observa en animales a los que se les extirpa ambos ovarios (ovariectomizados). Entre las 14 y las 24 horas posteriores al tratamiento, ocurre el primer aumento significativo en la concentración de LH en la sangre (Herbison, 2006).

La administración de progesterona a ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos disminuye las concentraciones de LH por debajo de las observadas en animales tratados solamente con estrógenos. Además, la simulación de las concentraciones basales de estradiol y progesterona durante el Diestro-1 impide el aumento de LH en los animales ovariectomizados. De estos datos se infirió que las concentraciones de estradiol y progesterona secretadas en estro hasta el Diestro-1 son capaces de disminuir la actividad del eje hipotálamo-hipófisis y conduce a la secreción basal de LH durante este tiempo (Herbison, 2006).

Los estrógenos pueden tanto inhibir como estimular la secreción de GnRH. Así durante la fase preovulatoria ocurre un efecto transitorio de retroalimentación positiva, que implica la potenciación de la secreción de LH por las elevadas concentraciones de estrógenos según Herbison (2006). La retro-alimentación negativa por estrógenos no se ejerce directamente sobre neuronas GnRHérgicas, sino sobre otros grupos de neuronas.

Se ha sugerido que el efecto de retro-alimentación positivo que ejercen los estrógenos es a través de modificaciones en las conexiones sinápticas de las neuronas GnRHérgicas que expresan receptores a estradiol. El estradiol también regula la expresión de receptores a GnRH, pero también modula la síntesis de GABA en células que sintetizan glutamato, las mismas que expresa $RE\alpha$ (Figura 14), (Herbison, 2006).

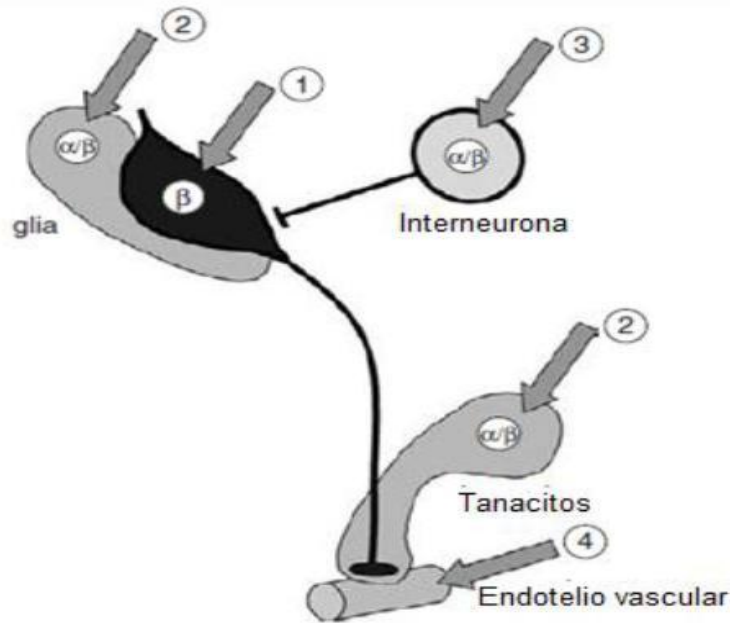


Figura 14. Diagrama que muestra 4 posibles y diferentes maneras en las que el estradiol puede ejercer su acción sobre la neurona GnRH:

1. De manera directa, a través de regular la transcripción de ARNm del decapeptido por medio del REβ.
2. De manera indirecta, a través de su efecto en diferentes tipos de células o estructuras del hipotálamo: células de la glia que interactúan con el soma o con las terminales de la GnRH (en la eminencia media).
3. Neuronas que tienen o no contactos sinápticos con la neurona GnRH, denominadas interneuronas.
4. A través de las células vasculares endoteliales que actúan de manera paracrina en la terminal de la neurona GnRH.

(Tomada y modificada de Herbison, 2006)

Los estrógenos ejercen su efecto “feedback” estimulante en la secreción de GnRH y LH al actuar en las células del núcleo anteroventral-periventricular (AVPV). Estudios realizados en ratas muestran que los estrógenos inducen su efecto “feedback” positivo sobre la neurona GnRH (Figura 15) a través de aferencias primarias que expresan el RE α , cuyos cuerpos celulares se sitúan en el AVPV (Figura 15). Entre dichas aferencia primarias destacan las derivadas de neuronas que sintetizan Kissepeptina (Wolf y Wu, 2012), GABA, noradrelina, glutamato, endorfinas, encefalinas, sustancia P, galanina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y neurotensina. Estudios en ovejas sugieren que las células dentro del Hipotálamo medio basal (MBH) tienen el mismo papel. En cambio el efecto feedback negativo ocurre por medio de los 3 tipos celulares que interactúan de manera indirecta con la neurona GnRH (Herbison, 2006; Wolfe y Wu, 2012).

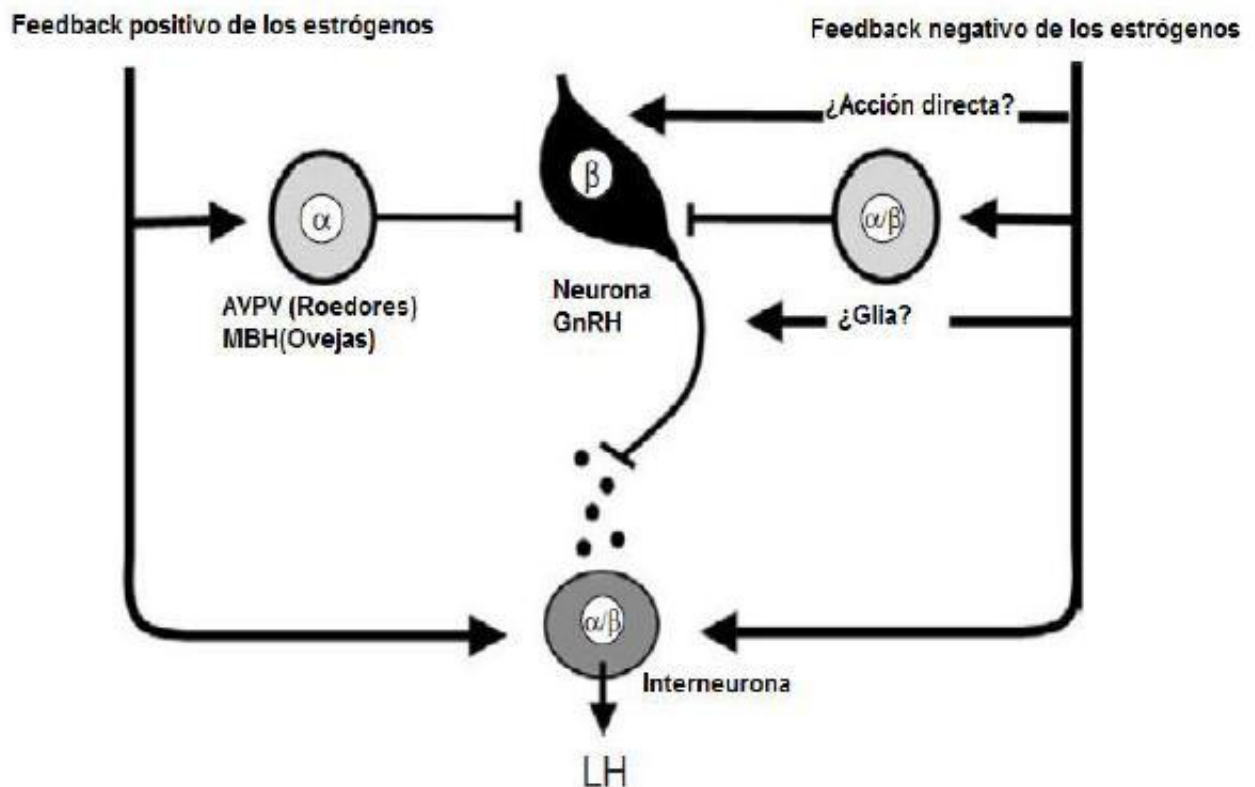


Figura 15. Diagrama que muestra los mecanismos propuestos del feedback positivo y del feedback negativo de los estrógenos (Tomado y modificado de Herbison, 2006)

ASIMETRÍAS HIPOTALÁMICAS

El hipotálamo anterior y medio esta dividido por el tercer ventrículo en dos porciones laterales: la izquierda y la derecha. Las estructuras del hipotálamo derecho del, juegan un papel predominante en la reproducción de la rata hembra. (Gerendai, 2001).

En el ratón se han reportado un mayor número de neuronas GnRH en el lado derecho del cerebro (Inase y Machida, 1992).

También la cantidad de GnRH en el hipotálamo medio basal es asimétrica, ya que hay más GnRH en el lado derecho que en el izquierdo (Gerendai y col. 1978). De la misma manera, hay más ARNm para la GnRH en el lado derecho de POA-AHA que en lado izquierdo a las 13:00 h del diestro-2 (Arteaga y col, 2005).

Se ha mostrado que los genes que codifican para el $RE\alpha$ o para el $RE\beta$ alcanzan su expresión máxima en días diferentes del ciclo estral y son asimétricos entre la porción izquierda y derecha de POA-AHA. La expresión del ARNm del $RE\alpha$ presenta su máxima expresión en el lado derecho de POA-AHA en el día del estro a las 17:00 horas; mientras que la del $RE\beta$ ocurre de las 09:00 a las 13:00 horas del diestro-2 (Arteaga y col, 2005).

Previamente, se mostró que el bloqueo de los $RE\alpha$ del lado izquierdo de POA-AHA, llevado a cabo en la mañana del estro provoca el aumento del porcentaje de animales ovulantes en el día del estro esperado, cuando se compara con su grupo control. En estos animales no se altera el ciclo estral, lo que implica que todos presentaron citología vaginal del estro. Con base en estos hechos, se sugirió que el E_2 al unirse a los $RE\alpha$ en la mañana del estro regula de manera inhibitoria la ovulación, como resultado del efecto "feed-back" inhibitorio del estradiol sobre la secreción preovulatoria de LH. (Vázquez, 2011).

JUSTIFICACIÓN

En la rata, el 17β -estradiol es una de las señales que regulan la función del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. En el hipotálamo las neuronas expresan dos tipos de receptores a estradiol: el $RE\alpha$ y el $RE\beta$. En POA-AHA se han identificado ambos receptores; sin embargo sólo el $RE\beta$ ha sido identificado en las neuronas GnRHérgicas y se ha sugerido que tanto el $RE\alpha$ como el $RE\beta$ están involucrados en los mecanismos de “feed-back” inhibitorios de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH y las gonadotropinas. Por medio del uso de ratones “knockout”, se ha sugerido que el $RE\alpha$ pero no el $RE\beta$ es necesario y suficiente para que se manifieste el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH y en consecuencia estimular la secreción preovulatoria de LH.

También se ha mostrado que la expresión del ARNm del $RE\alpha$ es diferente entre el lado izquierdo y el derecho de POA-AHA, el cual se expresa en mayor cantidad en la tarde del estro. En la mañana del estro, el bloqueo de este receptor en el lado izquierdo de POA-AHA incrementa el número de animales que ovulan con respecto al vehículo utilizado, mientras que este tratamiento en el lado derecho de POA-AHA lo disminuye.

Con el propósito de estudiar algunos de los mecanismos que conducen a estimular la ovulación en ratas con bloqueo del $RE\alpha$ del lado izquierdo de POA-AHA, en este estudio se analizaron los efectos del bloqueo de los $RE\alpha$ en POA-AHA izquierda en la mañana del estro, sobre la expresión de ARNm de GnRH en ambas porciones de POA-AHA, en la concentración sérica de estradiol y de progesterona, la ovulación y en el peso de los ovarios y del útero en horas posteriores al tratamiento.

HIPÓTESIS:

Dado que el bloqueo del RE α del lado izquierdo de POA-AHA, en la mañana del estro estimula la ovulación, entonces este tratamiento incrementará la expresión del ARNm de la GnRH, lo que se acompañará del aumento en la concentración de estradiol en la mañana del proestro.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos del bloqueo de los RE α del lado izquierdo de POA-AHA, llevado a cabo en la mañana del estro, sobre la expresión del ARNm de la GnRH en ambas porciones de POA-AHA, la concentración de estradiol y progesterona, del peso de los ovarios y del útero, en horas subsecuentes al bloqueo.

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembras adultas (3-4 meses de edad) de la cepa CIIZ-V, mantenidas en grupos de seis animales por caja, en cubículo con ciclos de luz-oscuridad controlados (luces encendidas de 5:00-19:00 horas) y con libre acceso al agua y al alimento.

Para conocer la duración del ciclo, diariamente entre las 9:30 y 10:00 h a todos los animales se les tomó una muestra de epitelio vaginal. La laminilla con los frotis vaginales fue teñida con hematoxilina y eosina, mediante la siguiente metodología: hematoxilina durante ocho minutos, después se colocó en agua de la llave durante diez minutos e inmediatamente se tiñeron con eosina por espacio de dos minutos, finalmente se quitó el exceso de eosina con alcohol al 70%.

Sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días.

Entre las 8:30 y 9:30 horas del día del estro, grupos de 9 a 10 animales fueron anestesiados con 25mg/Kg de pentobarbital sódico por vía intra-peritoneal.

► Micro-inyección en el lado izquierdo de POA-AHA

Una vez anestesiados, los animales se colocaron en un aparato estereotáxico (figura 16) (Kopf Instruments, modelo 900, Sweeden), se limpió la cabeza con jabón anti-bacterial y se les rasuró la parte expuesta de la cabeza, y en el cuero cabelludo se les realizó un corte en sentido vertical a la línea media de la cabeza, que abarcó 0.5 cm detrás de las orejas y hasta 0.5 cm por delante de las orejas. El área del cráneo expuesto se limpió con agua oxigenada para deshidratar el hueso y visualizar claramente las comisuras que unen los diferentes huesos del cráneo y de esta forma, ubicar el punto Bregma o punto cero, punto donde se unen los dos huesos parietales con el frontal (figura 16). Las coordenadas utilizadas para llegar a POA-AHA de acuerdo al Atlas del Cerebro de la Rata (König y Klippel, 1963) fueron: antero-posterior (AP= 0.06), medial-lateral (ML= 0.04) y ventral (V= 0.086). Una vez en el punto cero, se marcó con un lapicero el punto de entrada a POA-AHA y con ayuda de una fresa odontológica insertada en un micromotor (Micromotor handpiece SDE

modelo H-35 LSP) se perforó el cráneo, con una aguja de acero inoxidable estéril se rompieron las meninges y de esta forma se introdujo en el cerebro una aguja de acero inoxidable 25G(x16mm), la cual estaba conectada a una jeringa Hamilton de 20 μ l, que a la vez estuvo colocada en una bomba de micro-diálisis (Microinjection pump modelo CMA/100 Carnegie Medicin).

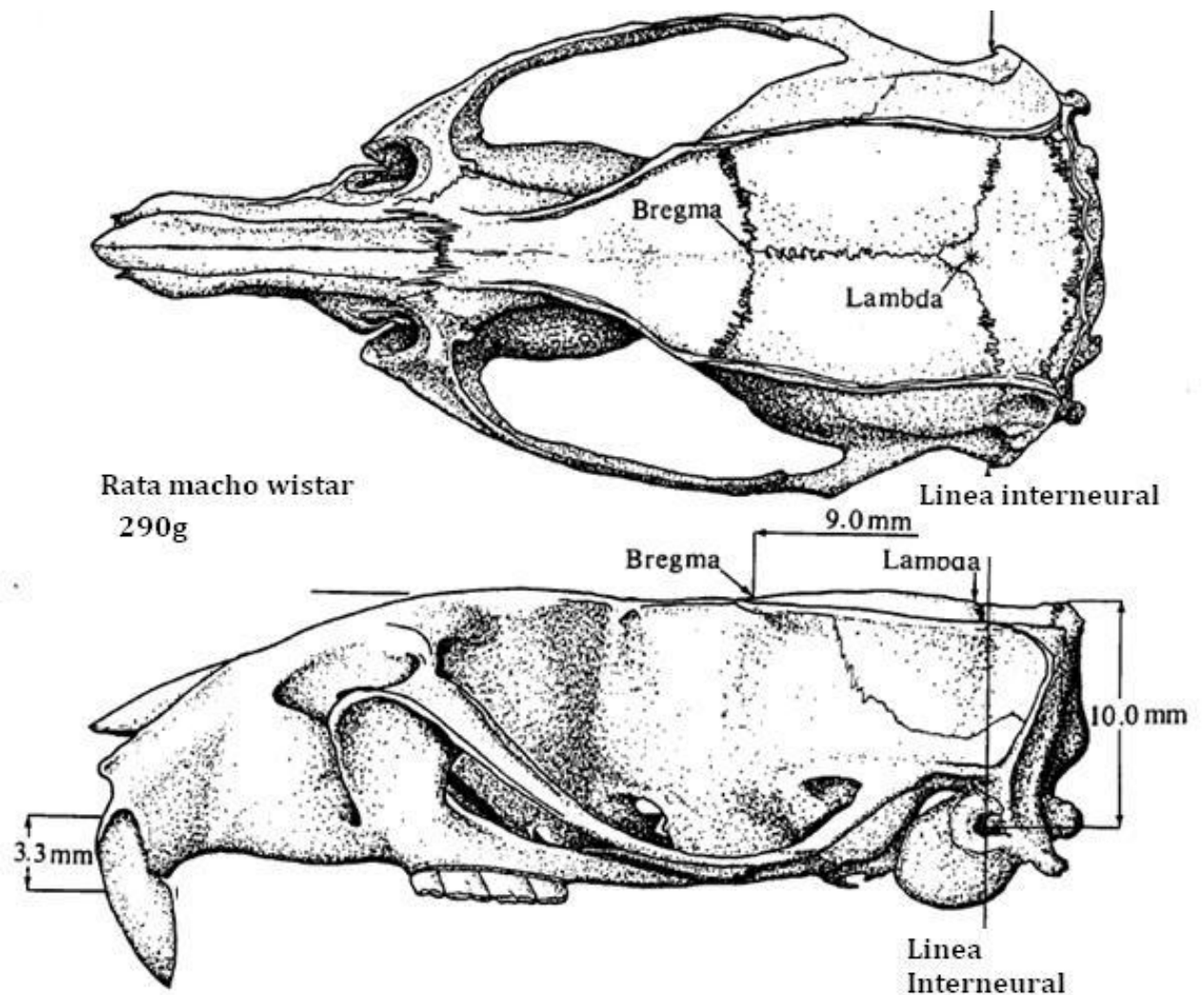


Figura 15. Vista dorsal y lateral del cráneo de una rata, se muestran los puntos Bregma, lambda y la línea interaural (Tomado Paxinos, 2007).

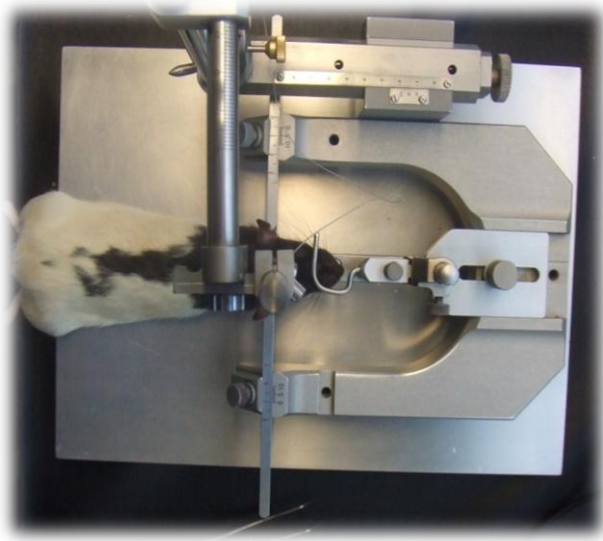


Figura 16. Se muestra la posición de la rata en el Estereotáxico antes de ser microinyectada.

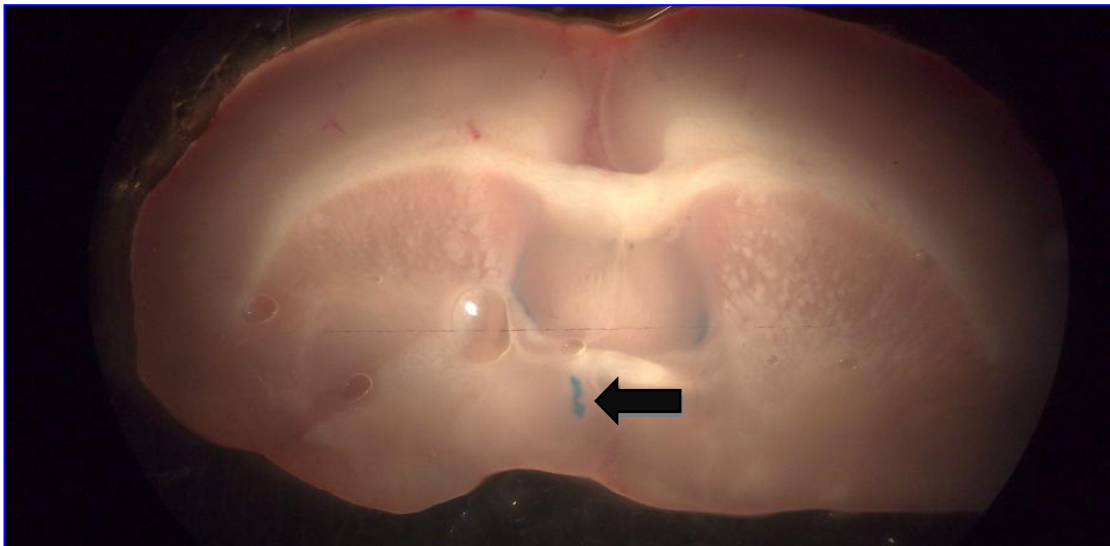


Figura 17. Corte coronal del cerebro de la rata. La flecha muestra la ubicación donde se localizó la punta de la aguja de micro-inyección en el área de estudio (POA-AHA izquierda).

Una vez en la zona de estudio (figura 17), las ratas fueron micro-inyectadas durante un minuto en el lado izquierdo de POA-AHA con 1µL de MPP a una concentración 25µg/µl (Sigma Aldrich, México). Como grupo control se utilizaron animales inyectados con tween 20 (un 1µL durante un minuto). Animales intactos fueron utilizados como grupo control absoluto.

► Autopsia

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación, en los tiempos indicados en la tabla 1

Micro-inyección (Día y hora)	Sacrificio (Día y hora)	Horas Post-inyección
E 8:30-9:30	E 11:00 am	2 h
E 8:30-9:30	D1 11:00 am	26 h
E 8:30-9:30	D2 11:00 am	50 h
E 8:30-9:30	P 11:00am	74 h
E 8:30-9:30	P 17:00 pm.	80 h
E 8:30-9:30	E-e 11:00 am	96 h

Tabla 1. Cronograma de sacrificio de animales de los grupos absolutos, vehículo y antagonista al REα.

Se colectó la sangre del tronco y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante (suero) se colectó y distribuyó en alícuotas de 300 µL, las cuales se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Después estos tubos se almacenaron a -20°C, hasta su procesamiento para cuantificar las concentraciones de estradiol y progesterona por el método de radioinmunoanálisis (RIA).

También se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados (cuando los animales fueron sacrificados en el estro esperado), y los ovarios y el útero para pesarlos en una balanza analítica (T/LEXUS ESJ - 200 - 4).

► Cuantificación de hormonas

Las concentraciones séricas de P_4 y E_2 fueron cuantificados con un estuche comercial marca Coat-A-Count (Diagnostic Product, Los Angeles, CA, USA), que contiene tubos de polipropileno impregnados con anticuerpo de coneja, viales de hormona marcada (125 I-Progesterona ó 125 I-Estradiol) y calibradores para establecer la curva patrón para cada hormona (P_4 : 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.00, 20.0, y 40 ng/mL; E_2 : 0.0, 10.0, 20.00, 50.0, 150.0, 250.0, 500.0, y 900.0 pg/mL). A cada tubo se le adicionaron 100 μ L del suero problema más 100 μ L de la hormona marcada (125 I-Progesterona o 125 I-Estradiol). Los tubos se agitaron durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se decantaron y se limpiaron por la parte externa del tubo, finalmente con la ayuda de un contador de centello Gama (modelo Cobra 5005, PackardTM), se cuantificó la cantidad de hormona problema. Los datos de la concentración de P_4 se expresaron en ng/mL y los de E_2 en pg/mL.

► Extracción de ARN total

El cerebro fue extraído de la cavidad craneal, enjuagado con solución salina estéril fría, posteriormente se disectó POA-AHA por la técnica de Palkovits (1973), para lo cual se utilizó material de disección limpio y estéril.

A tubos eppendorf estériles, se le agrego 500 μ L de trizol, y una vez que se extrajo POA-AHA se procedió a dividirla en la parte derecha e izquierda. Las porciones izquierdas de tres ratas se colocaron en un tubo y sus correspondientes porciones derechas en otro tubo. En total se procesó el cerebro 9 animales, haciendo un total de tres tubos con tejido de POA-AHA de la porción derecha o izquierda. Todas la muestras de tejido se homogenizaron en un Politron, modelo PT -MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza).

Al tejido homogenizado se le agregaron 250 μ L de cloroformo y se agitó por 30 segundos, con la finalidad de extraer el ARNm.

Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 30 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: una fase inferior orgánica de color rosa y la fase superior acuosa incolora. El ARN quedo en esta última fase, mientras que el ADN y las proteínas se precipitaron en la interfase y en la fase orgánica.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se le agregó un volumen igual de isopropanol (250 µL), con la finalidad de precipitar el ARN. La muestra se conservó a 4° C durante máximo 72 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm, por 30 minutos, a 4° C. Al ARN precipitado (pastilla blanca amarillenta), le fue removido el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80 %. La pastilla de ARN se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después de una segunda decantación del sobrenadante, los tubos se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril para que la pastilla se secase a temperatura ambiente y evitar así la insolubilidad de la misma. A la pastilla de ARN se le agregó 30 µL de H₂O inyectable y se conservó a -70° C.

Por último se disolvió la pastilla de ARN en 50 µL de H₂O-DEPEC. Se hicieron alícuotas de 2µL de la muestra diluida en 98 µL de H₂O inyectable.

► Lectura de la muestra

En un espectrofotómetro (BOECO Germany ModeloS-30 Spectrophotometro) Se leyó la absorbancia de estas muestras, a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La concentración de ARN se determinó conociendo que una unidad de absorbancia de 260nm equivale a 40mg de ARN ml⁻¹.

$$x = \frac{A (40\text{mg ARN/ml de}) (B)/1000\text{ml}}{C}$$

A= Densidad óptica de la muestra a 260 nanómetros

B= Cantidad de agua en la que se diluyó la muestra (98 µl)

C= Cantidad de la muestra que se diluyó (2 µl)

► RT-PCR

Para la realización del RT, en un tubo eppendorf se disolvieron 2 µg del ARN total, en 7µL de la mezcla de retrotranscripción (Tabla 2) y agua estéril, cada muestra se colocó en un termociclador de gradientes (marca Eppendorf Scientific Inc, Alemania). Después de la retro transcripción a las muestras obtenidas se les agregó 6.5 µL de un coctel de reactivos (Tabla 3), para realizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A través de la cual se amplificó un fragmento de 250 pares de

bases (pb) del gen de la GnRH, se utilizó un fragmento de 200 (pb) de GAPDH (Glyceraldehyde, 3-phosphato, Dehydrogenasa), como gen control interno.

El PCR se realizó en un termociclador de gradientes (marca Eppendorf Scientific Inc., Alemania), a las temperaturas y ciclos que se muestran en la Tabla 4 (Arteaga y col. 2005).

Reactivo	Concentración	Volumen/1 RX
ARN total	2 µg	2 µl
Buffer RT	5x	2 µl
DTT	0.2 mN	1 µl
dATP	10 mN	0.5 µl
dCTP	10 mN	0.5 µl
dGTP	10 mN	0.5 µl
dTTP	10 mN	0.5 µl
RT-M-MLV	100 u	0.5 µl + 0.5 µl H ₂ O
Oligo dt	0.025 µ	0.5 µl
H ₂ O		Aforado a 10 µl

Tabla 2. Tabla de reactivos que conforman la mezcla de "mix" para retro-transcripción.

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen/1 RX</i>
<i>Buffer 10x</i>	<i>0.5 µl</i>
<i>MgCl₂</i>	<i>2.5 µl</i>
<i>d ATP</i>	<i>0.5 µl</i>
<i>d CTP</i>	<i>0.5 µl</i>
<i>d GTP</i>	<i>0.5 µl</i>
<i>d TTP</i>	<i>0.5 µl</i>
<i>Oligo1</i>	<i>2.0 µl</i>
<i>Oligo2</i>	<i>2.0 µl</i>
<i>Taq polimerasa</i>	<i>0.5 µl</i>
<i>H₂O</i>	<i>26 µl</i>

Tabla 3. Reactivos utilizados para la mezcla para el PCR.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia sentido</i>	<i>Secuencia antisentido</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Ciclos</i>
<i>GnRH</i>	<i>CAA CCC ATA GGA</i> <i>CCA GTG CTG G</i>	<i>CAC TAT GGT CAC</i> <i>CAG CGG GG</i>	<i>53.0</i>	<i>32</i>
<i>GAPDH</i>	<i>GTA TTG GGC GCC</i> <i>TGG TCA CC</i>	<i>CGC TCC TGG AAG</i> <i>ATG GTG ATGG</i>	<i>55.1</i>	<i>32</i>

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la retro-transcripción, así como las temperaturas y ciclos utilizados para la técnica de PCR.

► Electroforesis

Una vez obtenidos los productos del PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2%, preparado con TBE al 1% (Tris Boratos EDTA) y teñido con bromuro de etidio, fue preparado de la siguiente manera: En un matríz Erlenmeyer se agregó 1 gr de agarosa con 50 mL de una solución Buffer de TBE 1x que se calentó en horno de microondas (marca Pelco 3400, series Laboratory Microwave Oven) durante un min, hasta su completa disolución. Cuando la solución de agarosa alcanzó una temperatura de $\pm 37^{\circ}\text{C}$, se agregaron 2.5 μL de bromuro de etidio. Agitando el recipiente en forma circular, se mezclaron los diferentes componentes, evitando la formación de burbujas en la solución. El gel se vertió lentamente en la cámara de electroforesis horizontal (Horizon 11-14. Life Technologies, Gibco BRL, USA) por uno de sus extremos, con una punta de micro-pipeta limpia y estéril se retiraron las burbujas y se dejó polimerizar la agarosa. Para la corrida de las muestras, se llenó el tanque de la cámara de electroforesis con buffer TBE 1x. Se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, se gradu   el voltaje a 100V y se dejaron correr las muestras. Las bandas resultantes del corrimiento de las muestras en los geles se observaron en un trans-iluminador de luz ultravioleta. Las fotografías del gel fueron tomadas con una cámara Kodak EDAS 216. Las bandas se analizaron por medio del Sistema de Análisis Logic GEL 112.

► Análisis estadístico

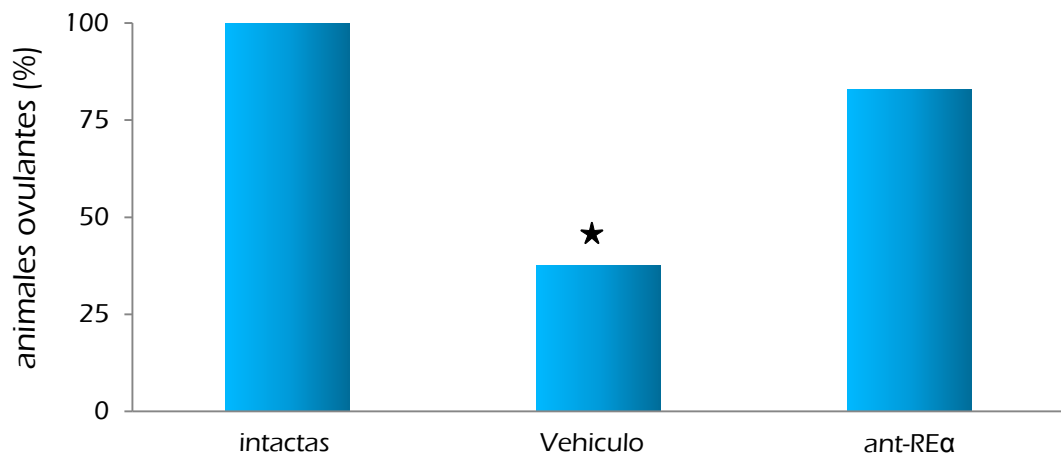
Los resultados del porcentaje de animales ovulantes (número de animales que ovularon del total de los tratados en ese grupo experimental) se analizaron por medio de la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher. Los resultados del número de ovocitos liberados se analizaron por la prueba de Kruzkall-Wallis seguida de la prueba Dunn. Mientras que los datos del peso de los ovarios, del útero, de las concentraciones séricas de las hormonas y de la expresión relativa del ARNm para la GnRH fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza múltiple (ANOVA), seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de "t" de Student    de "U" Mann-Withney. En todos los casos se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS

TASA DE ANIMALES OVULANTES

La micro-inyección del vehículo entre las 8:30 y 9:30 horas del estro provocó que solo el 33% de los animales ovularan el día del estro esperado.

En cambio, la micro-inyección del antagonista del RE α aumentó el porcentaje de animales que ovularon el día del estro esperado, es decir, 98 horas después del tratamiento (Gráfica 2).



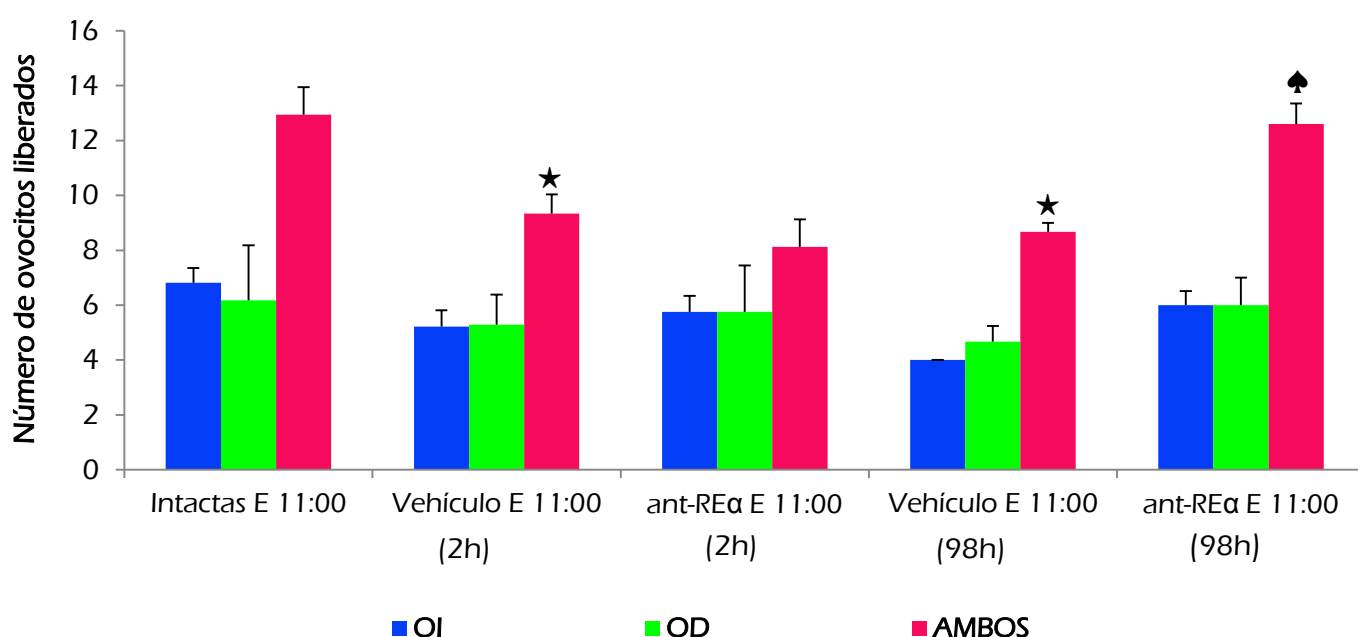
★ $p < 0.009$ vs. Intactas; ♠ $p < 0.01$ vs. vehículo (Prueba de χ^2).

Gráfica 2. Efecto de la micro-inyección del vehículo y del antagonista de los RE α en el lado izquierdo de POA-AHA a las 9:00 hrs del estro, sobre el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado.

OVOCITOS LIBERADOS

La micro-inyección del vehículo provocó disminución del número de ovocitos liberados a las 2 horas del tratamiento; este efecto no fue alterado por la micro-inyección del antagonista del RE α .

En los animales sacrificados a las 98 horas de inyectar el vehículo (estro esperado), disminuyó el número total de ovocitos liberados. Por el contrario, el bloqueo de los RE α provocó la liberación de un mayor número de ovocitos por ambos ovarios (Gráfica 3).

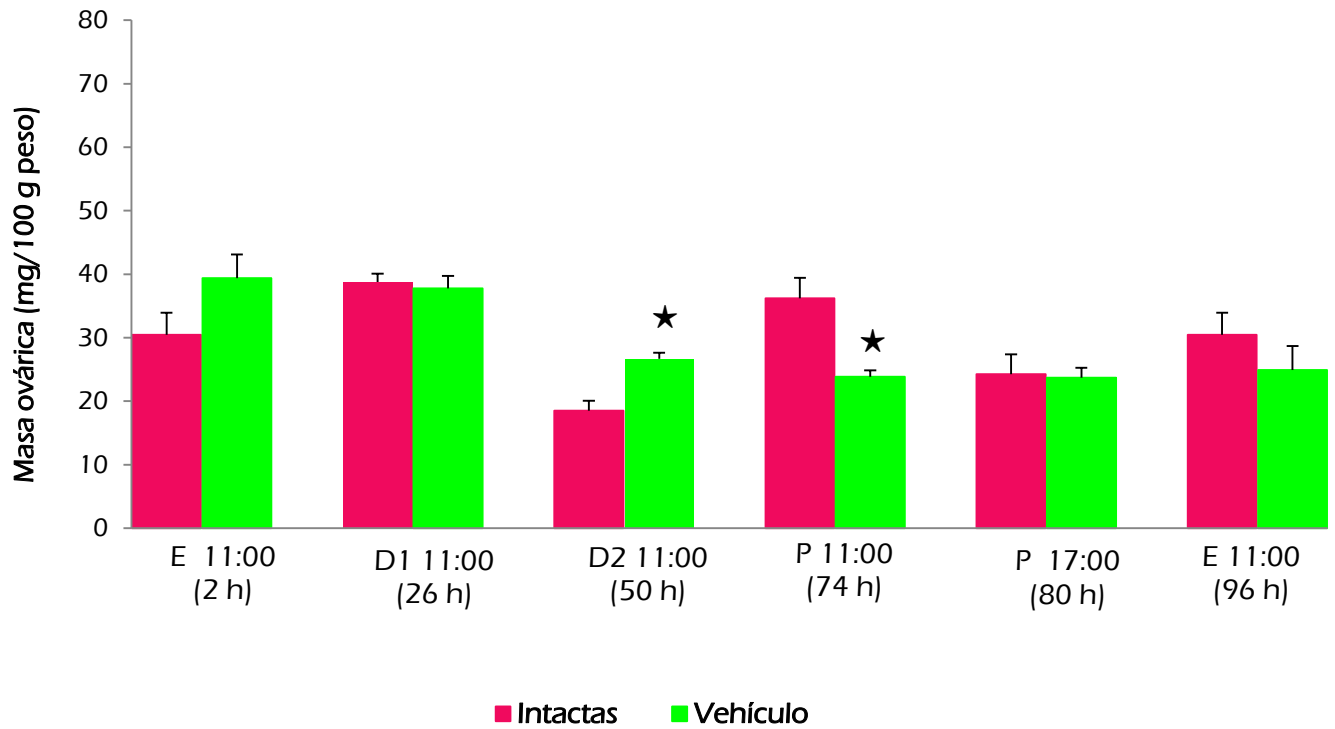


★ $p < 0.01$ vs. intactas, ♠ $p < 0.01$ vs. vehicle 98 h (Kruskal-Wallis seguida de la Prueba de Comparación Múltiple de Dunn)

Gráfica 3. Efecto del bloqueo del RE α en el lado izquierdo de POA-AHA a las 9:00 hrs. del estro, sobre el número de ovocitos liberados a las 2 y 98 horas post-tratamiento. Los resultados se expresan como la media $\pm$ e.e.m.

PESO DE LOS OVARIOS

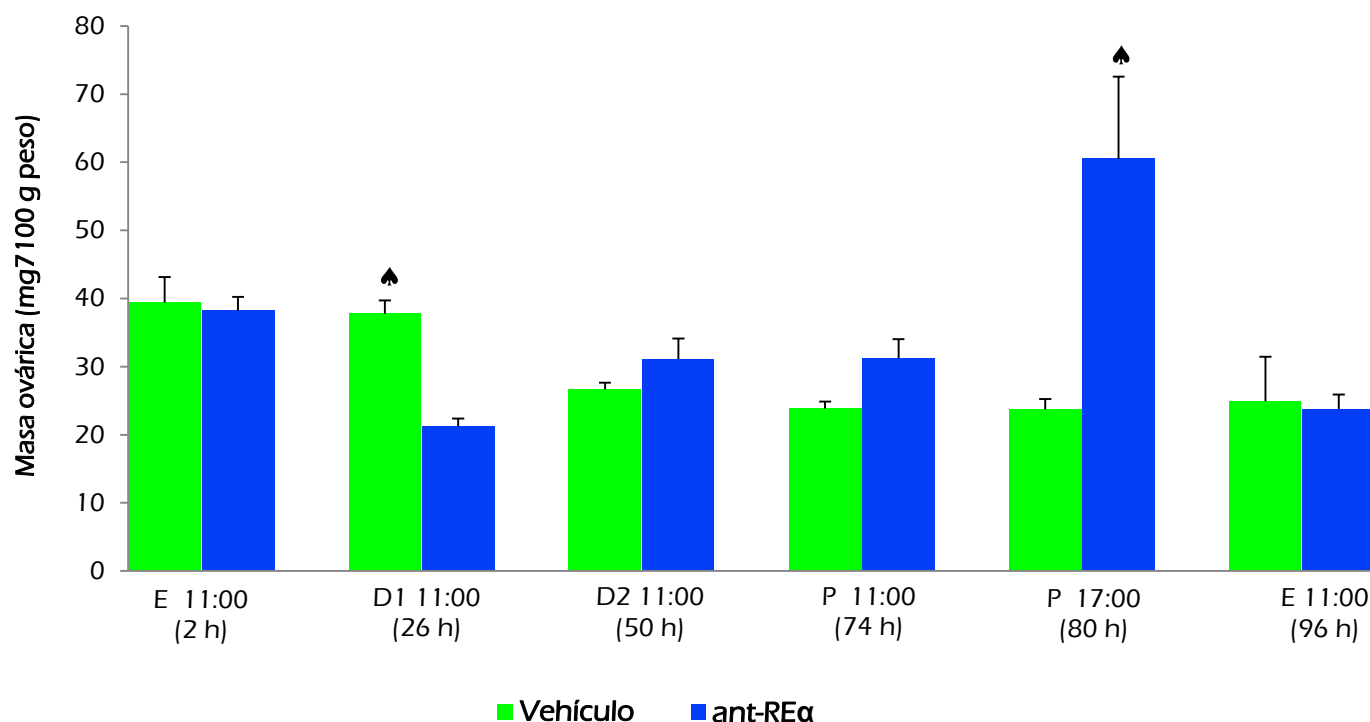
La micro-inyección de vehículo provocó aumento en el masa ovárica a las 50 horas del tratamiento, pero a las 74 horas, la disminuyó (Gráfica 4).



★p < 0.001 vs. Intactas (ANOVA seguida de Prueba de Tukey)

Gráfica 4. Efecto de la microinyección de vehículo en el lado izquierdo de POA-AHA entre las 8:30 y 9:00 h del día del estro, sobre la masa ovárica (peso del OI + peso del OD), durante las diferentes horas de la evaluación. Los resultados se expresan como la media ± e.e.m.

El bloqueo de los RE α provocó disminución de la masa ovárica a las 26 horas de la inyección del antagonista del RE α (Gráfica 5); ochenta horas después este parámetro disminuyó, pero sólo fue significativo en la masa del ovario derecho (37.72 ± 9.5 vs. 12 ± 1 , $p < 0.05$).

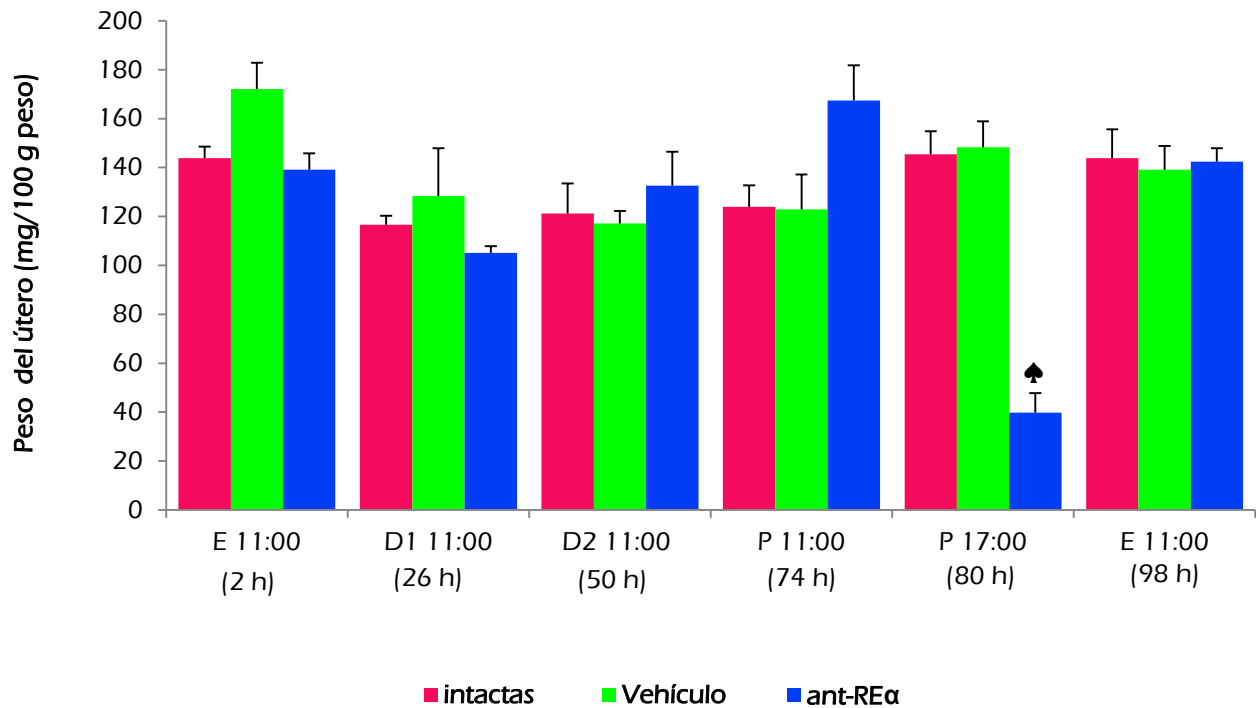


♠ < 0.001 vs. vehículo (ANOVA seguida de Prueba de Tukey)

Gráfica 4. Efecto del bloqueo del RE α en el lado izquierdo de POA-AHA realizado a las 9:00 horas del estro, sobre la masa ovárica (peso del OI + peso del OD), evaluada a diferentes horas después del tratamiento. Los resultados se expresan como la media $\pm$ e.e.m.

PESO DE ÚTERO

La micro-inyección de vehículo no provocó cambios en el peso del útero. Únicamente a las 80 h del bloque de los RE α se observó la disminución del peso del útero, es decir a las 17:00 h del proestro (Gráfica 5).

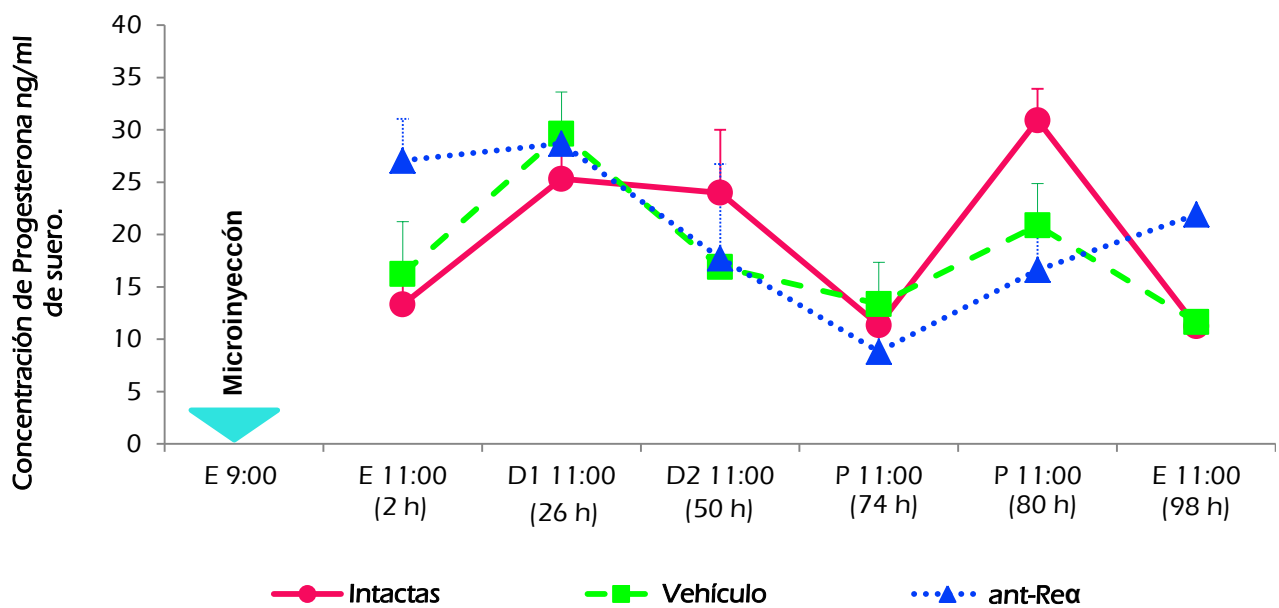


♠ < 0.001 vs. vehículo (ANOVA seguida de Prueba de Tukey)

Gráfica 5. Efecto del bloqueo del RE α en el lado izquierdo de POA-AHA a las 9:00 hrs. del estro sobre el peso del útero. Los resultados se expresan como la media $\pm$ e.e.m.

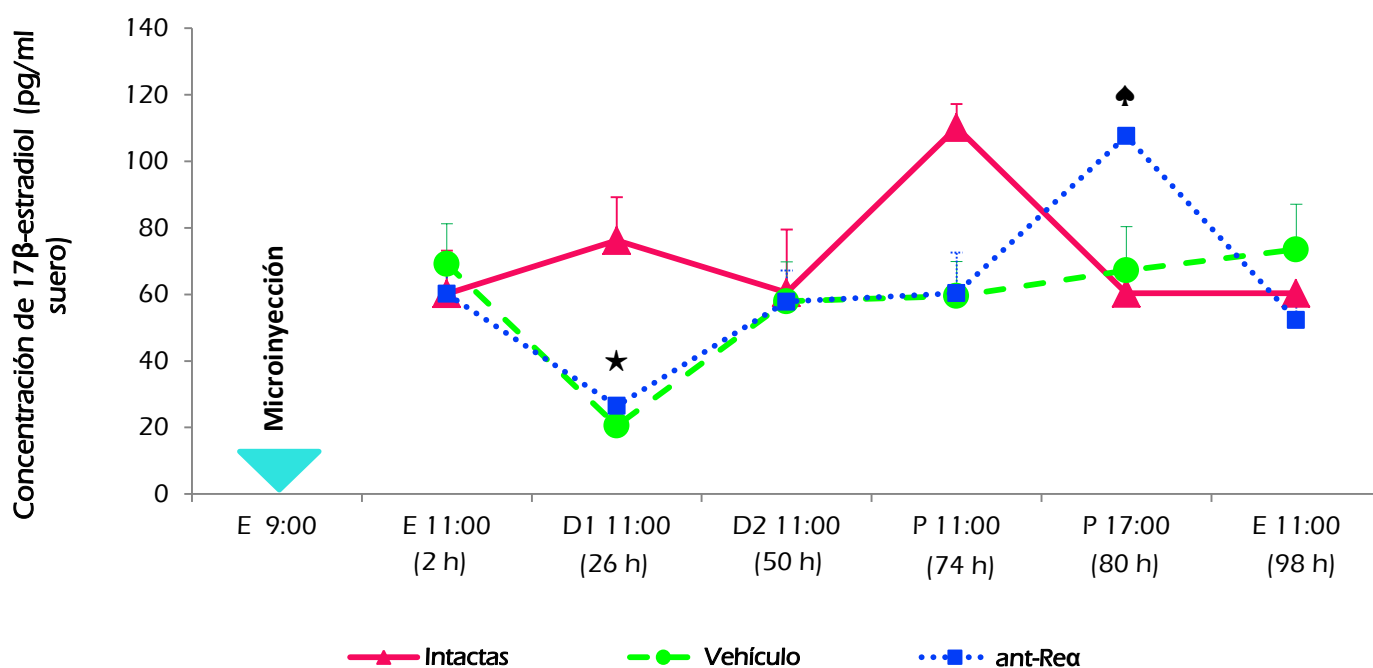
CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA Y 17β -ESTRADIOL

Con respecto al grupo de animales intactos, los animales micro-inyectados con vehículo no mostraron cambios en la concentración sérica de progesterona evaluada en las diferentes horas posteriores al tratamiento. El bloqueo de los RE α en el lado izquierdo de POA-AHA el día del estro, tampoco provocó cambios significativos en las concentraciones séricas de progesterona evaluadas en las horas posteriores al tratamiento (Gráfica 6).



Gráfica 6 Media + e.e.m. de la concentración de progesterona en el suero de ratas intactas o inyectadas con vehículo o antagonista a los RE α en la porción izquierda de POA-AHA.

La concentración de 17β -estradiol disminuyó por la micro-inyección del vehículo a las 26 horas del tratamiento. A las 80 horas el bloqueo de los RE α provocó que la concentración sérica de 17β -estradiol aumentara con respecto al grupo inyectado con el vehículo, y alcanzara valores similares al grupo de ratas intactas, (Gráfica 7).



★ $p < 0.001$ vs. Intactas (ANOVA seguida de Prueba de Tukey) ♠ $p < 0.05$ vs. Vehículo (prueba "t")

Gráfica 7. Media + e.e.m. de la concentración de estradiol en el suero de ratas intactas o inyectadas con antagonista del RE α en la porción izquierda de POA-AHA

Expresión relativa del ARNm para GnRH

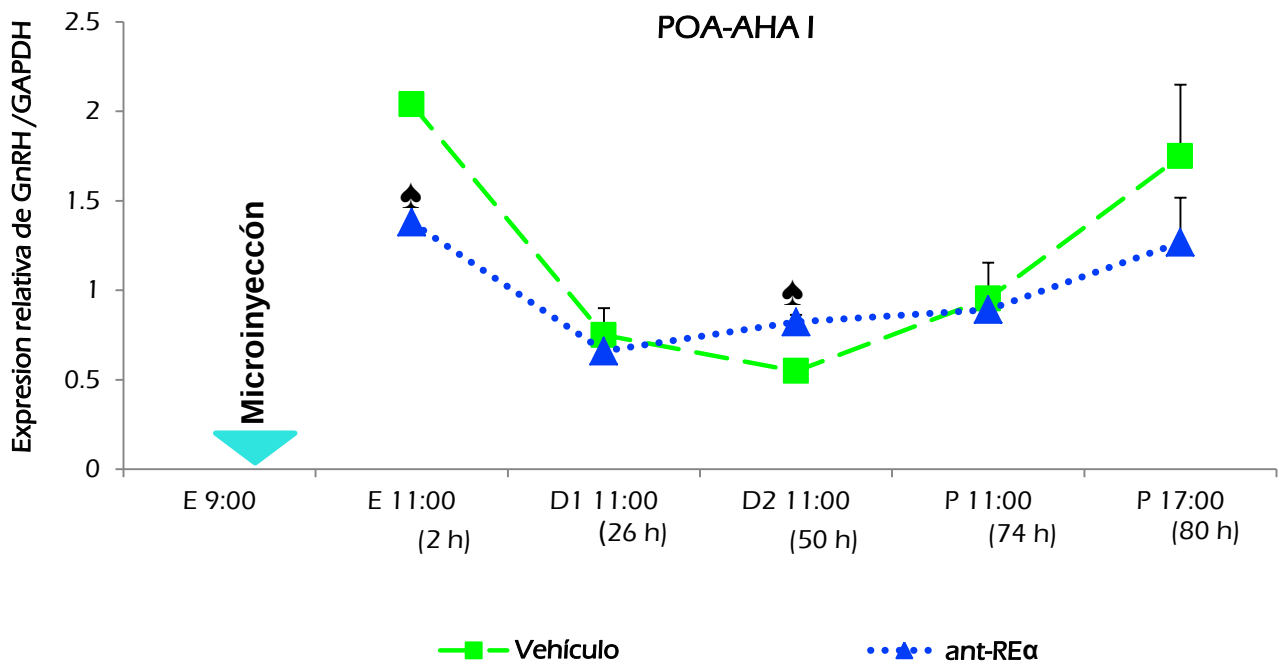
En la Tabla 5 se muestra la expresión relativa del ARNm de la GnRH en la porción izquierda y derecha de POA-AHA de animales intactos y micro-inyectados con el vehículo en una y otra porción de la zona de estudio. En el grupo de animales intactos la expresión del ARNm para la GnRH no mostró diferencias entre las porciones izquierda y derecha de POA-AHA en las horas evaluadas. La micro-inyección de vehículo disminuyó la expresión de ARNm a las 50 horas del tratamiento (11:00 h del diestro-2) en ambas porciones de POA-AHA (Gráfica 12 y 13). A las 80 horas (17:00 h del proestro), el tratamiento incrementó la expresión del mensajero, pero solo en la porción izquierda de POA-AHA.

Grupos	POA-AHA	Día y hora de la cuantificación				
		E 11:00	D1 11:00	D2 11:00	P 11:00	P 17:00
		2 h	26 h	50 h	74 h	80 h
Intactas	I	1.94 ± 0.03	0.72 ± 0.09	1.31 ± 0.06	0.82 ± 0.06	0.87 ± 0.05
	D	1.96 ± 0.04	0.59 ± 0.20	1.38 ± 0.05	0.84 ± 0.05	0.91 ± 0.10
Vehículo	I	2.04 ± 0.04	0.75 ± 0.15	0.55 ± 0.001 ★	0.95 ± 0.20	1.75 ± 0.4 ★
	D	1.81 ± 0.18	1.00 ± 0.17	0.58 ± 0.03★	0.81 ± 0.10	1.04 ± 0.07

★ p < 0.001 vs. Intactas (ANOVA seguida de Prueba de Tukey)

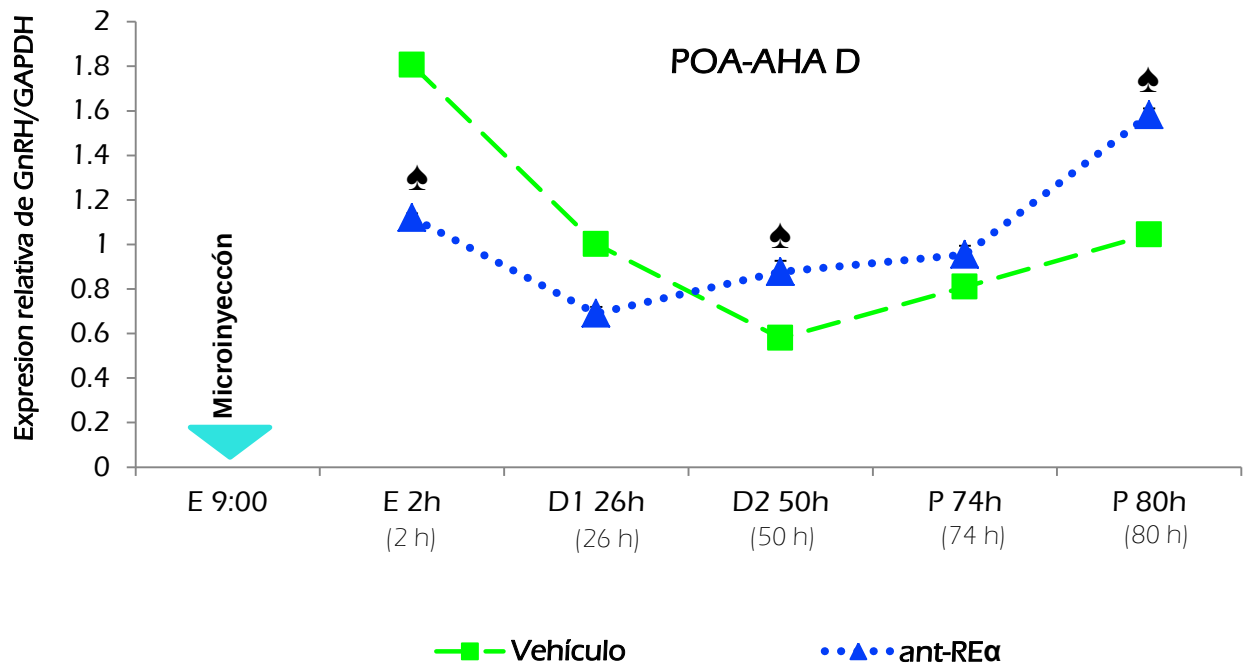
Tabla 5. Media ± e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para GnRH en el lado izquierdo (I) o derecho (D) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con vehículo en la porción izquierda de POA-AHA.

En ambas porciones de POA-AHA la micro-inyección del antagonista para los RE α disminuyó la expresión del mensajero para la GnRH a las 2 horas del tratamiento (11:00 del estro) aumentó a las 50 horas (11:00 h del diestro-2) con respecto al efecto causado por el vehículo (Gráfica 8 y 9). A las 80 horas la micro-inyección del antagonista del RE α incrementó la expresión del mensajero únicamente en la porción derecha de POA-AHA (Gráfica9).



♠ $p < 0.001$ vs. Vehículo (ANOVA seguida de Prueba de Tukey)

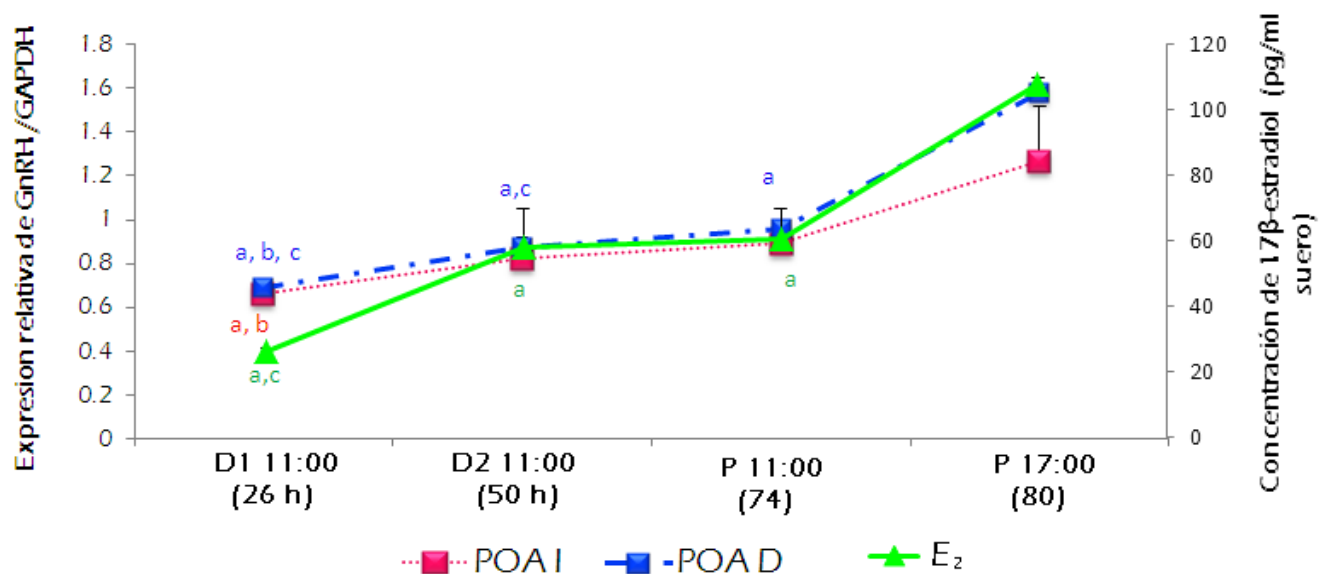
Gráfica 8. Media $\pm$ e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para GnRH en el lado izquierdo de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con antagonista para RE α en la porción izquierda de POA-AHA.



♠ $p < 0.001$ vs. Tween (ANOVA seguida de Prueba de Tukey)

Gráfica 9. Media $\pm$ e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para GnRH en el lado derecho de POA-AHA, de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con antagonista del REα en la porción izquierda de POA-AHA.

Cuando comparamos los resultados de la expresión del ARNm de la GnRH, en una y otra POA-AHA con la concentración sérica de 17β -estradiol, observamos que después de la disminución inicial provocada por la inyección del antagonista al $RE\alpha$ (a las 2h de la inyección), tanto la cantidad de ARNm de la GnRH y la concentración de 17β -estradiol se van recuperando paulatinamente conforme avanzamos en el ciclo, es decir, en las horas posteriores a la micro-inyección del antagonista (Gráfica 10).



a, $p < 0.001$ vs. proestro 17:00 h (80 h pos-tratamiento)

b, $p < 0.05$ vs. diestro-2 11:00 h (50 h pos-tratamiento)

c, $p < 0.05$ vs. proestro 11:00 h (74 h pos-tratamiento) (ANOVA seguida de Tukey).

Gráfica 10. Expresión relativa del ARNm de la GnRH en la porción izquierda y derecha de POA-AHA, y la concentración sérica de 17β -estradiol a partir de las 26 horas del bloqueo de los $RE\alpha$ por el antagonista. Los resultados se expresan como la media $\pm$ e.e.m.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en la mañana del estro, la unión del RE α a su ligando en el lado izquierdo de POA-AHA inhibe la expresión del ARNm de la GnRH, así como la secreción de estradiol.

El antagonista del RE α , metil-piperidino-pirazol o MPP inhibe la Expresión del ARNm de la GnRH a las 2 horas y tiene un tiempo de acción de aproximadamente 30 horas.

EFFECTOS DEL VEHÍCULO (TWEEN 20®)

El efecto inhibitorio del vehiculo (tween 20®) sobre la ovulación esperada (es decir a las 96 horas del tratamiento) está relacionado con la caída en la expresión máxima del ARNm de la GnRH en ambas porciones de POA-AHA, que normalmente debe ocurrir a las 11:00 horas del diestro-2. El tween 20® es un surfactante (detergente no iónico) que se utiliza para solubilizar las membranas celulares, al disolver enlaces lípido-lípido y lípido-proteína; este efecto podría modificar la disposición de proteínas que conforman sitios de contacto celular, de receptores o ambos, lo que resulta en alteraciones en la actividad y en la respuesta eléctrica y sintética de la neurona GnRH, de las inter-neuronas vecinas a ella o de todas a la vez. Dado que la inyección del vehículo en el día del estro bloquea la ovulación espontánea del día del estro esperado, podemos sugerir que estos posibles contactos celulares y receptores de membrana que se establecen en el estro determinan que el animal ovule normalmente.

Aparentemente, una vez que pasó el efecto del tween 20® sobre las membranas celulares, se recuperan los puntos de contacto celular y de receptores, de tal forma que la expresión máxima del ARNm de la GnRH se retrasa por 30 horas y ocurre hasta las 17:00 horas del proestro (80 horas después del tratamiento), pero únicamente en la porción de POA-AHA micro-inyectada (la izquierda).

¿Cómo se explica que los efectos del vehículo (tween 20®) en las primeras 50 horas se observe en ambos lados de POA-AHA y después de este tiempo solo en la porción izquierda? La explicación radicaría en la estructura de la neurona GnRH, ya que la dendrita de ésta mide $\approx 1000 \mu\text{m}$ y puede llegar a conectarse con neuronas GnRH del órgano vascular de la estría terminal, el cual no está dividido por el

tercer ventrículo y puede relacionarse con otra neurona GnRH (Herde y col, 2011; Liu y col, 2011), de tal forma que se puede conectar con neuronas GnRH del lado opuesto. Este proceso puede implicar las 50 horas en que observamos el efecto en ambos lados de POA-AHA.

¿Cuál sería la señal que normalmente promueve la expresión del ARNm de la GnRH, pero que se altera por efectos del vehículo a las 50 horas de inyectarlo? Lo desconocemos, pero según Herbison (2006) podrían ser: aumento del tono GABAérgico, incremento en las protrusiones de los astrocitos por efecto de los estrógenos o alteraciones entre tanacitos y la terminal GnRHérgica por estradiol.

La disminución del número de ovocitos presentes en las trompas uterinas, a las dos horas de la micro-inyección del vehículo (tween 20®) en POA-AHA izquierda, nos lleva a sugerir que se estimuló el tránsito de los ovocitos de la trompa uterina hacia el útero. La ciliogénesis y la actividad secretora del epitelio del oviducto están regulados por progesterona y estradiol. La progesterona atrofia el epitelio e induce apoptosis del mismo, mientras que el estradiol estimula el crecimiento celular y la ciliogénesis (Hess y col., 2006). En comparación con el útero y el ovario, el oviducto recibe fibras sensoriales que sintetizan sustancia P (SP) (Nance y col, 1988), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), péptido intestinal vasoactivo (VIP), óxido nítrico sintetasa (NOS) (Czaja, 2000). Fibras SP/NOS, SP y NOS se han encontrado en la capa muscular y alrededor de los vasos sanguíneos del oviducto del cerdo (Majewski y col, 1995). Czaja (2000) sugiere que este tipo de innervación (SP, NOS y SP/CGRP) está involucrada en la relajación antidrómica del oviducto y del tono muscular del mismo.

La alteración de estas señales neuroendocrinas en la mañana del estro, por la inyección de tween 20®, estaría modificando la frecuencia de los pulsos de secreción tónica de la GnRH, lo que en parte, se tradujo en la disminución de la secreción preovulatoria de estradiol en la mañana del proestro, a consecuencia de modificaciones en el crecimiento de los folículos. Se ha mostrado que la secreción de estradiol se correlaciona con la concentración de FSH (Ferin M, 1998),

EFFECTOS DEL ANTAGONISTA AL RE α (MPP)

La activación del RE α por su ligando en la mañana del estro regula de manera inhibitoria la ovulación, ya que cuando se bloqueó este receptor aumentó el número de animales ovulantes. Este efecto se acompañó del aumento aparentemente

progresivo de la expresión del ARNm de la GnRH en la porción derecha de POA-AHA, desde las 26 hasta las 80 h post-tratamiento (que corresponde de la mañana del diestro-1 a la tarde del proestro). Lo que implica que la desactivación del $RE\alpha$ estimula la transcripción del mensajero, sin afectar la traducción ni la liberación de la proteína. Yeo et al., (1996) señalan que el procesamiento del primer transcrito de la GnRH es rápido, ya que ocurre en un tiempo promedio de 18 minutos.

Dicho efecto estimulante aparentemente también ocurre sobre la secreción tónica o basal del decapeptido, pero de manera específica hacia la regulación de la secreción de la FSH, ya que en los animales inyectados con MPP aumentó el número de ovocitos liberados (en el día del estro esperado) y el peso de los ovarios (en la tarde del proestro). Estos hechos en conjunto nos llevan a sugerir que la estimulación en la secreción de FSH y la respuesta de los folículos a la misma regularon el crecimiento de los folículos. Se ha sugerido que existe correlación entre el número de folículos en crecimiento y la concentración de FSH (Richards, 1980).

El desplazamiento de la secreción preovulatoria de estradiol por 6 h puede ser otra de las respuestas al retraso en la expresión del ARNm de la GnRH, ya que por un lado estuvo bloqueado el $RE\alpha$, y por otro el efecto “feedback” estimulante del 17β -estradiol ocurrió en el momento en que había ARNm de la GnRH, pero aún no se traducía. Lo que posiblemente generó que la secreción preovulatoria de LH y FSH ocurriera más tarde de lo esperado (17:00 h del proestro), sin embargo, ocurrió y el animal ovuló. Este mecanismo también explicaría por qué el peso del útero en la tarde del proestro también fue bajo.

La respuesta estimulante de la expresión del ARNm de la GnRH en POA-AHA derecha, es un hecho más que confirma que en este día del ciclo, los mecanismos de regulación de la secreción de GnRH que aseguran la ovulación ocurren en el lado derecho. Previamente se ha mostrado en la rata hembra, que el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal es el doble del lado derecho respecto al izquierdo (Gerendai y col, 1978), además, la expresión del ARNm de la GnRH es mayor en el lado derecho de POA-AHA a las 13:00 h del diestro-2 (Arteaga-López y col, 2003). También se ha mostrado que la cantidad de células GnRH en el cerebro de ratones macho es mayor en el hemisferio derecho (Inase y Machida, 1985).

Con base en los resultados obtenidos deducimos que el antagonista al $RE\alpha$ (MPP) actúa durante 30 horas. Una vez que el E_2 endógeno puede acoplarse al receptor, estimula gradualmente la expresión del ARNm de la GnRH. De tal forma

que la máxima expresión que debe ocurrir a las 13:00 horas del diestro-2 en la porción derecha de POA-AHA (Arteaga-López y col, 2003) en condiciones naturales, se presenta 30 horas después (figura 17).

Un efecto inhibitor semejante ocurre para las concentraciones de 17β -estradiol. Durante las 26 horas posteriores al tratamiento, la concentración de la hormona es baja. Pero al igual que la expresión del ARNm de la GnRH, aumentan sucesivamente hasta la tarde del proestro. Lo que nos lleva a sugerir que el estradiol asociado al $RE\alpha$ regularía de manera inhibitoria la secreción de FSH, se reconoce que a medida que la concentración de FSH va aumentando durante la fase folicular del ciclo, se van produciendo cantidades mayores de 17β -estradiol (Gore & Armstrong, 1994).

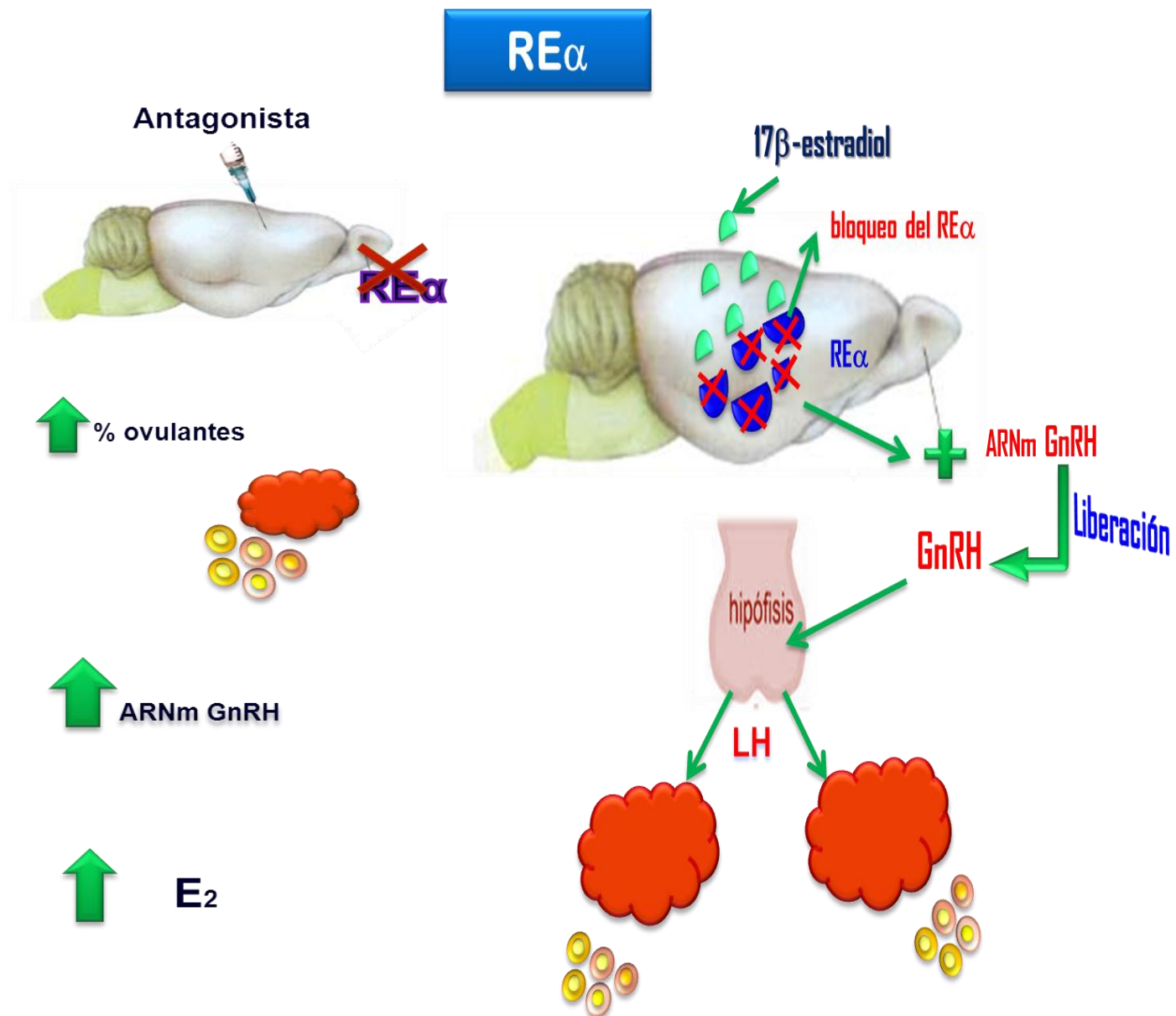


Figura 18.- Esquematización del posible papel del 17β -estradiol al unirse al $RE\alpha$ en la mañana del Estro en la porción izquierda de POA-AHA, en la regulación de la expresión del ARNm de la GnRH, la secreción de Estradiol y la ovulación.

CONCLUSIONES

- ❖ En la mañana del estro, el bloqueo de los $RE\alpha$ del lado izquierdo de POA-AHA estimula la expresión del ARNm de la GnRH en POA-AHA, lo que se acompaña de la estimulación de la secreción de estradiol.
- ❖ El antagonista del $RE\alpha$, metil-piperidino-pirazol o MPP regula de manera inhibitoria el gen de la GnRH a las 2 horas y tiene un tiempo de acción de aproximadamente 30 horas.
- ❖ La estimulación de la ovulación por el bloqueo del $RE\alpha$ ocurre porque después del tiempo de bloqueo, el sistema logra ajustarse rápidamente al reloj biológico que regula la secreción de la GnRH y la ovulación en sus momentos justos.

BIBLIOGRAFÍA

Anstead GM, Carlson Ke, Katzenellenbogen JA. (1996). The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and model for the receptor binding site. *Steroids*. 62: 268-303

Arimura A. (2000). Hypothalamic hormones. En: *neuroendocrinology in physiology and medicine*, Editors: Conn PM, Freeman ME. Human press Inc., Totowa N.J. Cap 3: 41-58.

Arteaga López PR, Dominguez R, Cerbón, M A, Arrieta I, Mendoza CA, & Cruz ME. (2004). Effects of cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the preoptic and anterior hypothalamic area of cyclic females rats. *Endocrine*, 21:251-260, 2003.

Arteaga-López PR. (2005). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*. 21; 251-260.

Arteaga López PR, Domínguez R, Cebon MA, Mendoza Rodriguez CA, Cruz ME. (2003). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrus cycle of the rat. *Endocrine* vol.21, no. 3, 251-260.

Bakalkin GYa, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID, Krivosheev OG. 1984. Lateralization of LHRH in rat hypothalamus. *Brain Res*; 296: 361–364.

Barraclough CA, Collu R, Massa R, and Martini L. (1971). Temporal interrelationships between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progestin concentrations in the rat: effects of nembutal and exogenous gonadotropins. *Endocrinology* 88, 1437–1447.

Barry J. (1979). Immunohistochemistry of luteinizing hormone-releasing hormone-producing neurons of the vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 60, 179–221.

Bernard D, Fortin J, Wang Y, Lamba P. (2010). Mechanisms of FSH Synthesis: what we know, what we don't and why you should care. *Fertil Steril*.

Bjersing L. (1978). Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. En *The Mammalian Ovary. Comparative Biology*. Ed. RE Jones, Raven Press, Nueva York; PP. 181-214.

Brown R. (1994). The hypothalamic hormones. En: *Introduction To Neuroendocrinology*. Cambridge University Press, Great Britain, 44-55.

Botella Llusia J. (1995). El ovario fisiología y patología. 1º Edición Diez de Santos. Madrid España pp.49-57.

Burden HW. (1978). Ovarian innervation. En: The vertebrate ovary. Competitive biology and evolution. Editor: Jones RE. New York: Plenum Press. p. 615–638.

Busby WH, Quackenbush GE, Humm J, Youngblood WW, Kiser JS. (1987). An enzymes(s) that converts glutaminil peptides pyroglutamylpeptides. J. Biol. Chem; 262: 8532-8536.

Butcher RL, Collins WE, and Fugo NW. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17b throughout the 4-day estrous cycle of the rat. Endocrinology 94, 1704–1708.

Carmel PW, Araki S and Ferin M. (1976). Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Endocrinology 99, 243–248.

Charli JL, Ponce G, Joseph.Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de las neuronas LRHérgicas hipotálamicas. En: Tópicos selectos de la biología de la reproducción. Editado por Domínguez R, UNAM-Porrúa. México, 59-85.

Cheng CK, Lung PC. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. Endocrinology Rev. 26; 283-306.

Clemens JA, Samlting EB,Sawyer BD. (1976). Studies on the role of the preoptic área in the control of reproductive function in the rat. Endocrinology, 728-735.

Conn PM. (1994). The molecular mechanism of gondotropin-releasing hormone actions in the pituitry. The physiology of reproduction. Cap.32 Ed. E. Knobil y J Neil y col, Raven Press. Ltd. New york. 1349-1377.

Cruz ME, Jamarillo LP, Dominguez R. 1989. Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of cyclic rat. J Endocrinol; 123: 437–439.

Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. (1989). The frequency of gonadotropin releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. Endocrinology. 125; 917-924.

Daane TA, and Parlow AF. (1971). Perioviulatory patterns of rat serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the normal estrous cycle: effects of pentobarbital. Endocrinology 88, 653–663.

Dekel N, Sherizly I, Tsafiriri A, Naor Z, (1983). A comparative study of the mechanism of action of luteinizing hormone and a gonadotropin releasing hormone analog on the ovary. Biol. Reprod. 28; pp 161-166.

Dominguez R. (1993). Secreciones periódicas y la regulación de la ovulación. Comunicación neuroendocrina bases celulares y moleculares. México. 251-258

Domiínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción. Editor; Domínguez R. Ed. UNAM-Porrúa, México, capítulo. 7; 161-192.

Dunaif AE, Zimmerman EA, Friesen HG, Frantz AG, (1982). Intracellular localization of prolactin receptor and

Enmarck E, Gustafsson JA. (1999). Oestrogen receptors – an overview. *Journal international medicine*. 246: 133-138

Erickson GF. (1982). Follicular maturation and atresia. In Flamigni C. Givens JR. The gonadotropins: Basic Science and Clinical Aspects in Females. New York. Academic Press. p. 177-182.

Eriksson H, Upchurch S, Hardin JW, Peck EJ jr, Clark JH (1998). Heterogeneity of estrogen receptors in the cytosol and nuclear fraction of the rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1-7.

Fanjul ML. (1995). Hipófisis. En: fisiología humana, endocrinología y metabolism. 1^{ra} ed. Ed. El manual modern; S.A. de C.V. México D.F. Cap. 2:51-71

Fink G. (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary function, En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Totowa N.J. Humana Press inc. 107-133.

Fink G. (1998). Gonadotropin secretion and its control. En: the physiology of Reproduction. Ed. E Knobil y JD Neil. Raven Press, New York, USA; 1349-1378.

Fink G. (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary function Neuroendocrinology in physiology and medicine. Human Press. Inc. Totowa NY. PP 107-133.

Flanagan CA, Millar RP, Illing N. (1997). Advances in understanding gonadotropin releasing hormone receptor structure and ligand interactions. *J. of reproduction*; 2:113-120.

Freedman LP. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocrine Rev*, 13 (2), 129-145.

Freeman ME. (1994). The neuroendocrine control of the rat estrous cycle. En: The Physiology of Reproduction. Ed. Knobil E, Neil J D, 2da edición, Nueva York. Raven Press; 2(46); 613-658.

Freeman ME. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill's Physiology of reproduction, 3a ed. Cap 43. Ed by Jimmy D.

Neill Elsevier, 2327-2330.

Fox SR, and Smith MS. (1985). Changes in the pulsatile pattern of luteinizing hormone secretion during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 116, 1485–1492.

Gallo RV. (1981). Pulsatile LH release during the ovulatory LH surge on proestrus in the rat. *Biol. Reprod.* 24, 100–104.

Gallo RV. (1981). Pulsatile LH release during periods of low level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biol. Reprod.* 24, 771–777.

Gay VL, Midgley AR Jr, and Niswender GD. (1970). Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. *Fed. Proc.* 29, 1880–1887.

Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neuroscience Letters*: 9:333-336.

Gerendai I, Halász B. (2001). Asymmetry of neuroendocrine System. *New Physiol*, volume 16. 92-95.

Goldman BD, Kamheri IA, Sitteri PK, and Porter JC. (1969). Temporal relationship of progesterin secretion, LH release and ovulation in rats. *Endocrinology* 85, 1137–1143.

Goldsmith PC, Thind K, Song T, Kim RJ and Boggan JE. (1990). Location of the neuroendocrine gonadotropin-releasing hormone neurons in the monkey hypothalamus by retrograde tracing and immunostaining. *J. Neuroendocrinol.* 2, 157-168.

Grandien K, Berkenstam A, Gustafsson JA. (1993). The estrogen receptor gene: promoter organisation and expression. *Int. Biochem. Cell Biol.* 29, 1343-1369.

Gray WGN, Biswas EE, Bashirelahi N, Biswas SB. (1994). A low-affinity estrogen binding site in pregnant rat uteri: analysis and partial purification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:8606-8610.

Guyton AC and Hall JE. (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. Décima edición, McGraw-Hill-Interamericana. México pp. 100-120; 512-538.

Halász B. (2000). The hypothalamus as an endocrine organ. En: *Neuroendocrinology in physiology and Medicine*. Totowa New Jersey, USA: Humana Press, 3-21.

Herbison AE. (2006). Physiology of the gonadotropin-Releasing Hormone Neural Network. Cap 28. Editores: Knobil E, Neill JD. *Physiology of Reproduction*. 1:1415-1456.

Horwitz KB, Jackson TA, Rain DL, et al. (1996). Nuclear coactivators and corepressors. *Mol. Endocrinol.* 10, 1167-1177.

Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. (2000). Detection of receptor- β messenger ribonucleic acid and 125 I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurones of the rat brain. *Endocrinol* 141 (9): 3506-3509

Higuchi T, and Kawakami M. (1982). Changes in the characteristics of pulsatile luteinizing hormone secretion during the oestrous cycle and after ovariectomy and oestrogen treatment in female rats. *J. Endocrinol.* 94, 177-182.

Hsueh AJW, Jones PBC, Adashi EY, Wang C, Zhuang LZ, Welsh TH. (1983). Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rat. *J. Reprod. Fertil*; 69:325-342.

Inase Y and Machida T. 1992. Differential effects of right-sided and left-sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Res* 580: 338-340,

Jensen EV, DeSombre ER.(1972) Mechanisms of action of the female sex hormone. *Ann Rev. Biochem.* 41: 203-230.

Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons. *Journal of Comparative Neurology.* 232; 534-547.

Katt JA, Duncan JA, Herbon I. (1985). The frequency of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells. *Science.* 215; 983-985.

King JC and Rubin BS. (1995). Dynamic alterations in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal cell bodies and terminals of adult rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15, 89-106.

King JC, Tobet SA, Snavely FL, and Arimura AA. (1982). LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *J. Comp. Neurol.* 209, 287-300.

Knobil E. (1980). Neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 36:53.

Kobayashi Y, Kitamoto T, Masuhiro Y. (2000). p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 estrogen receptor α and β interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.* 275, 15645-15651.

König JFR, Klippel RA. (1963). The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system. Williams and Wilkins Co. Baltimore U.S.A

Kozłowski GP and Coates PW. (1985). Ependymoneuronal specializations

between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell. Tissue Res.* 242, 301–311.

Kronenberg M, Melmed S, Polonski K, Larsen R. (2009). *Williams Textbook of Endocrinology*. 11a ed. Editorial Elsevier España. Pp. 133-140.

Krisch, B. (1980). Two types of luliberin-immunoreactive perikarya in the preoptic area of the rat. *Cell. Tissue Res.* 212, 443–455.

Korach KS. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science Rev.* 266; 1524-1527.

Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930.

Kupferman I. (1985). Hypothalamus, Limbic System and cerebral cortex: Homeostasis and Arousal. En: *Principles of neural Science*, Sec. 2^{da} Ed, Ed, Elsevier. New York, 609.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Shultz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Manuel M, Chambon P, Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily. The second decade. *Cell.* 83: 835-839.

Larrea, Folliart RM, Escorza A, Ulloa-Aguirre A, y Valencia X. (1991). Capítulo V, "fisiología y mecanismos de acción de las gonadotropinas hipofisiarias". En: *temas selectos de la biología de la reproducción*. Domínguez R. Ed. Porrua, 1ra edición, México D.F. 107-131.

Liteack G, Schmidt TJ (2000). *Bioquímica de las hormonas II: Las hormonas esteroides*. En: *Bioquímica*. Editor: Devlin MT. 3ra edición. Editorial Reverte S.A España, pp. 893-917.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Shultz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Manuel M, Chambon P, Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily. The second decade. *Cell.* 83: 835-839.

Markaverich BM, Williams M, Upchurch S, Clark JH. (1981). Heterogeneity of nuclear estrogen binding sites in the rat uterus: A simple method for the quantification of type I and type II sites by (³H)-estradiol exchange. *Endocrinology*. 109:62-69.

McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG. (1987). *Molecular neurobiology of the mammalian*. 2da ED. Nueva York U.S.A. 150.

Menasce LP, White GR, Harrison CJ, et al. (1993). Localization of the estrogen locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and simple post-FISH banding technique. *Genomics* 17, 263-265.

Mendoza L, Arteaga PR, Domínguez R, Cerbón M A, Arrieta I, Flores A.

(2007). Changes in the number of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells on POA-AHA during the estrous cycle of the rat 40th annual meeting of society study of reproduction, 128, 106.

Merchenthaler I, Shughrue PJ and Scrimo PJ. (2004). Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER α and ER β) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience*. 96; 1: 41-49.

Merchenthaler I, Setalo G, Csontons C, Petrusz P, Flerko B and Negro-Vilar A. (1989). Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology* 125, 2812-2821.

Moran JL, Cruz ME, Dominguez R. 1994. Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic and anterior hypothalamic area performed on each day of the estrous cycle of adult rats. *Brain Res Bull*; 33: 663–668.

Muramatsu M and Inoue S. (2000). Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 1-10

Nardulli AM, Katzenellenbogen BS. (1986). Dynamics of estrogen receptor turnover in uterine cells *in vitro* and in uteri *in vivo*. *Endocrinology*. 119: 2038-2046.

Nequin LG, Alvarez J, and Schwartz NB. (1979). Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. *Biol. Reprod.* 20, 659–670.

Nilsson S, Gustafsson JA. (2002). Biological role of estrogen and estrogen receptors, *Critical Reviews in biochemistry and Molecular Biology*. 37: 1-28.

Nilsson S, Makela S, Treuter E. (2001). Mechanism of estrogen action. *physiol*, 81 (4), 1535-1565.

Norris OD (1996). An overview of chemical regulation. En: *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press; 146-150.

Ortolano GA, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Iliff-Sizemore SA, Landefeld TD, Maurer RA, and Marshall JC. (1988). Follicle-stimulating hormone β subunit messenger ribonucleic acid concentrations during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 123, 2946–2949.

Osborne CK, Chiff R. (2005). Estrogen –receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of clinical Oncology*. 23:1616-1622.

Palkovits M. (2000). Micro and Macroscopic structure, innervations and vasculature of the hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Conn PM y Freeman ME. Human Press pp.23-31.

Phelps CJ, Hurley DL. (1999). Pituitary hormones as neurotrophic signals: update on hypothalamic differentiation in genetic models of altered feedback. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222; 39-58.

Prevot V, Dutoit S, Croix D, Tramu G and Beauvillain JC. (1998). Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* 84, 177–191.

Prieto GB, Velázquez PM. (2002). Fisiología de la reproducción; hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev. Fac. Med UNAM.* 45(6):252-257.

Rajkovic y col., 2006 Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Hum. Reprod. Update* 12, 65-76

Rissman EF, Wersinger SR, Tailor JA, Lubahn D. (1997). Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Horm Behav*, 31(3), 323-43.

Rollerova E, Urbancikova. (2000). Intracellular estrogen receptor, their characterization and function (review). *Endocrine regulations.* 34:203-218.

Ronnekleiv OK, Kelly JM. (2005). Diversity of ovarian steroid in the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26, 65-69.

Roy EJ, Lynn DM. (1987). Asymmetry in responsiveness of hypothalamus of the female rat to estradiol. *Physiol Behav*; 40:267-269.

Silverman AJ, Jhamandas J, and Renaud LP. (1987). Localization of Luteinizing Hormone –releasing (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J. Neurosci.* 7, 2312-2319.

Silverman AJ, Levine I, Within JW. (1998). The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*, 1, 28. 1963-1709

Skinner MJ, Sim JA, Herbison AE. (1999). Detection of estrogen receptor α and β messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing Hormone neurons. *Endocrinol* 140: 5195-5201

Silverman AJ, Levine I, Within JW. (1994). The Gonadotropin–Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; Vol 1, Cap. 28. p.1683-1709.

Sluyster M. Rijkers AW. De Goeij CC. (1988). Assignment of estradiol receptor gene to mouse chromosome 1. *J. Steroid biochem.* 31, 757-761.

Smith MS, freeman ME, Neill JD. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin,

gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96 (1), 219-26.

Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn, DB, Korach KS, and Rosenfeld MG. (1997). Role of estrogen receptor in the anterior pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* 11; 674–681.

Roy EJ, Lynn DM. 1987. Asymmetry in responsiveness of the hypothalamus of the female rat to estradiol. *Physiol Behav*; 40: 267–269.

Tresguerres AF, y Castillo C. (1999). *Fisiología Humana*. 2da Edición. Ed. Mac.Graw-Hill Interamericana. España, pp. 1007-1015.

Ugrumov M, Hisano S and Daikoku S. (1989). Topographic relations between tyrosine hydroxylase- and luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive fibers in the median eminence of adult rats. *Neurosci. Lett.* 102, 159–164.

Ulloa-Aguirre A y Timossi C. (1998). Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reprod.* 260-283.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsmura P y Dias JA. (1999). Role of glycositation in function of Follicle-stimulating hormone. *Endocrine*, 205-215.

Vázquez MMA. (2011). Efectos del bloqueo del Rea en el lado izquierdo de POA-AHA sobre la ovulación, la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides. En *tesis para obtener el título de Q.F.B.* pg. 57. D.F., México FES Zaragoza UNAM

Welsh TH, Nann KG, Kimberly N, Livingstone. (1998). Stress and reproduction. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neil D (eds), Academic press. U.S.A. vol 4:662, 665, 668.

Wintermantel TM, Campbell E, Porteous R, Bock D, GrÖne HJ, Todman MG, Korach KS, Pérez CA, schütz G, Herbison AE. 2006. Definition of Estrogen receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Fertility. *Neuron* 52: 271-280.

Witkin JW. (1990). Access of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the vasculature in the rat. *Neuroscience*. 37, 501-506.

Witkin JW. (1996). Effects of ovariectomy on GnRH neuronal morphology in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Neuroendocrinol.* 8, 601–604.

Witkin JW, O'Sullivan H and Silverman AJ. (1995). Novel associations among gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 136, 4323–4330.

Witkin JW, Paden, CM and Silverman AJ. (1982). The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* 35, 429–438.

Witkin, JW. (1996). Effects of ovariectomy on GnRH neuronal morphology in rhesus monkey (macaca mulatta). *J. Neuroendocrinol.* 8, 601–604

Wray S, and Hoffman G. (1986). Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *Neuroendocrinology* 43, 93–97.

Wolfe A, Wu S. (2012). Estrogen Receptor- β in the Gonadotropin. Releasing Hormone Neuron. *Semin. Reprod. Med*; 30: 20-31.

Xia ZF, Patino R, Gele WL. (1999). Cloning *in vitro* expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. *General comp. Endocrin.* 113, 360-368.

Yamashita H, Kannan H, Inenaga K, koizumi K. (1983). Electro physiological and immunocytochemical studies of neurons in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Biomed Res*; 4:217.

Yao HH, y Bahr JM (1990). Ovary, overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (Eds.). Academic Press. U. S. A. 3; 590-595.

Yen J, Adashi EY, (2001). El ciclo ovarico. En: *endocrinología de la reproducción*. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. ed medica panamericana. 4ta México pp.164-202

Yen SC, Jaffe BR, Barbieri LR. (2001). *Endocrinología de la Reproducción: Fisiología fisiopatología y Manejo Clínico*. 4ta Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires Argentina. pp.33-47.

Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Díaz-Cueto L, Veldhuis JD, Ulloa- Aguirre A. (1995). Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoforms distribution through the human menstrual cycle. *J Clin. Endocrinol Metab.* 1647-1656.

Zmeili, SM, Papavasiliou SS, Thorner MO, Evans WS, Marshall JC, and Landefeld TD. (1986). Alpha and luteinizing hormone β subunit messenger ribonucleic acids during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 119, 1867–1869.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

Figura 7 “partes de la glandula hipofisiaria” <http://www.genomasur.com>

Figura 10. “Ovario de mamífero”
<http://personal.us.es/salles/OMA/docencia/practicadasdifiore/imagenesdifiore/Ovario01.jpg>

Figura 11. “Imagen de un folículo antral”. <http://www.genomasur.com>

Figura 12. “Ruta Biosintetica de hormonas esteroides sintetizadas por el ovario”
<http://brhvenezuela.galeon.com>

Figura 14. “*Dominios Funcionales del RE*” <http://vitae.ucv.ve>

ANEXO 1

LIGANDO SINTETICO ESPECÍFICO PARA EL RE α : Metil-Pipiridino-Pirazol (MPP)

El MPP contiene un grupo pirazol, el cual tienen una alta afinidad para los RE, aunque se unen con mayor afinidad al RE α que al RE β (Stauffer y col, 2000; Sun y col., 1999). (Fig18) Por ello y a falta de antagonistas selectivos para el RE α , Sun y colaboradores, (2002) desarrollaron compuestos que antagonizaran con este receptor y no con el RE β , al adicionar una cadena lateral a ligandos pirazólicos [agonistas selectivos para el RE α (BSC- pirazoles)], que substituye a la típica encontrada en agentes antiestrógenos como el tamoxifen y el raloxifen. Entre estos BSC-pirazoles, el más selectivo para el RE α es el metil-piperidino-pirazol (MPP).

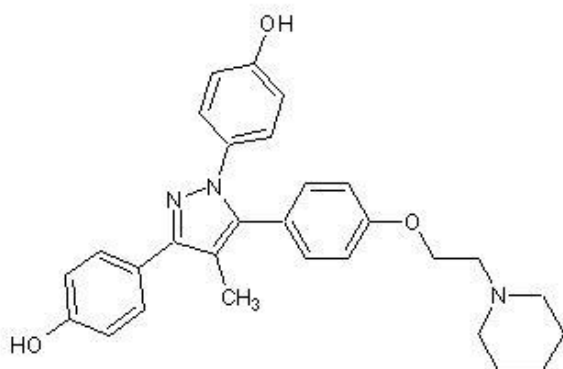


Figura. 19 Metil-piperidino-pirazol (MPP)

ER α =12 $\pm$ 2% Afinidad relativa de enlace (estradiol=100%)

(Los análogos de metil-piperidino-pirazol (MPP): Antiestrógenos con los receptores de estrógenos α actividad selectiva)

Peso molecular de 469.574 g/mol

Densidad de 1.22 g/mL.

A la fecha se conoce que el MPP incrementa el porcentaje de apoptosis de células del endometrio humano, cuando se compara con los efectos del estradiol. En ratones ovariectomizados, la administración de MPP aumenta el peso del útero y la

proliferación del endometrio (Davis y col, 2006). La inyección subcutánea de MPP durante 6 días consecutivos provoca disminución de la concentración de LH en la hipófisis y en el suero (García, 2007).

En ratas adultas cíclicas, la inyección subcutánea de MPP en la mañana del diestro-1 provoca aumento del número de ovocitos liberados y disminución del peso de los ovarios, lo que se acompaña de un menor número de folículos, reflejo de la disminución del número de folículos pequeños sanos y aumento de los medianos en los animales sacrificados a las 9:00 y 17:00 horas del proestro (Cabrera, 2009).

El MPP en dosis de 25 a 150 µg aumenta el peso húmedo del útero, pero no de la forma en que lo hace el 17β-estradiol, ya que provoca efectos pleiotrópicos dentro del útero, estos efectos incluyen el aumento del peso húmedo del útero y la diferenciación en el epitelio luminal y glandular, simulación de transcripción y translación de una variedad de productos genéticos que regulan la progresión del ciclo celular, hiperemia, edema del estroma e inhibición del agua, angiogénesis, incorporación de células inmunes y morfología endometrial (Dickson, 2000).

ANEXO 2

TWEEN 20®

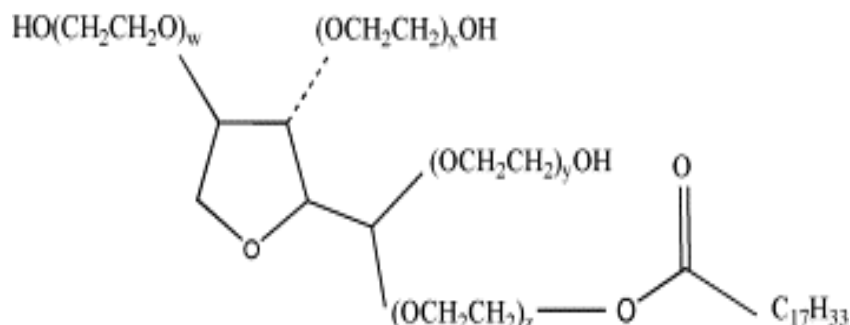


Figura 20. Estructura del Tween 20® (Wenger, et al., 2005)

Propiedades químicas:

Nombre común: Tween 20® 20

Otros nombres: Polysorbate 20, PEG (20) sorbitan monolaurate

Formula condensada: C₅₈H₁₁₄O₂₆

Masa Molecular: 1227.54 g/mol

Densidad: 1.1 g/mL

Punto de ebullición: >100°C

Actividad Farmacológica

El polisorbato 20 (comercialmente conocido como Tween 20®) es un surfactante no iónico que se utiliza principalmente en la fabricación de cosméticos, productos del cuidado de piel, en alimentos y productos farmacéuticos. El polisorbato se compone de un grupo central sorbitan con cuatro cadenas óxido de polioxietileno de lado, cuando estas cadenas se esterifican con un ácido oleoso (figura 19) y con ácido láurico dependiendo de la longitud variable de las cadenas, pueden obtener 1500 estructuras posibles. Ya que si las cadenas de polioxietileno son más cortas se forman agregados muy grandes y por tanto la solución es muy viscosa.

En el desarrollo biofarmacéutico, el Tween 20® se puede usar durante la purificación y la formulación para aminorar adsorción de superficie, como en las formulaciones líquidas el Tween 20® se agrega para aminorar la absorción de la proteína a superficies y mantiene la concentración a una distancia definida durante un proceso de purificación, tal como un paso de ultrafiltración o cromatografía.

Sin embargo los detergentes no iónicos también se utilizan para la solubilización de membranas y como un medio solvente para proteínas de membrana, generalmente el detergente óptimo para cierta proteína de membrana o

membrana se tiene que encontrar empíricamente y puede depender del tipo del experimento que uno quiere hacer (Helenius, et al., 1979)

Los detergentes no iónicos no poseen ningún grupo cargado. El carácter hidrófilo de estos detergentes se debe al grupo hidroxilo, disuelve los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína, mientras que las interacciones proteína-proteína no resultan afectadas. De este modo se conserva la estructura nativa de las proteínas. Además, el detergente sustituye a los lípidos, que normalmente están unidos (Helenius, et al., 1979).

La parte hidrófoba de las proteínas, con lo que crean un entorno de tipo lípido y pueden estabilizar proteínas solubilizadas.

Estudios han establecido que el Tween 20® por ser un detergente no iónico es usado para estudiar la estructura de las subunidades de proteínas de membrana y las interacciones de proteínas de membrana con estructuras externas ya que no desnaturalizan a las proteínas y no alteran la carga de las proteínas a las que se unen (Figura 19).

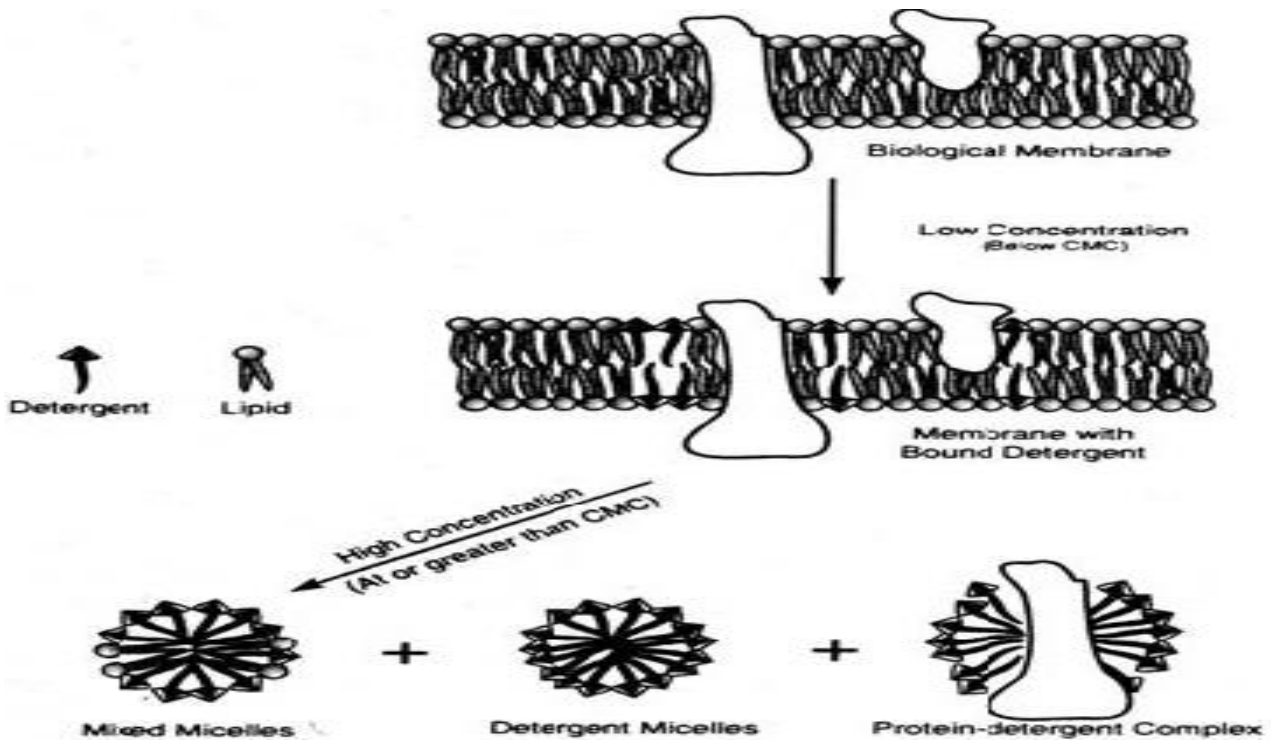


Figura 19. Propiedad de Detergentes (Helenius et al., 1979)

Por las propiedades mencionadas, el polisorbato 20 se emplea para estabilizar la solución de proteínas purificadas usada en prueba de piel para la exposición de tuberculosis, como un agente para lavar las marcas de pruebas de inmunoensayos como el de Western Blot y ELISA. Se puede disolver en Tris-Buffer Salino o buffer de Fosfato salino en diluciones de 0.05% a 0.5% de v/v (Joint, 1974).