

00524
108



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXPRESION DE LAS ISOFORMAS α Y β DEL RECEPTOR A
ESTROGENOS EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA DURANTE
EL CICLO ESTRAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

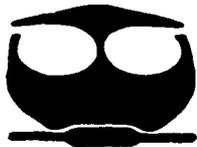
LUCIANO MENDOZA GARCES



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2003





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

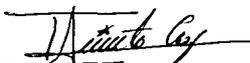
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Prof. Raquel Ortega Muñoz
Secretario	Prof. Isabel Arrieta Cruz
1er. Suplente	Prof. Ignacio Camacho Arroyo
2°. Suplente	Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Sitio donde se desarrollo el tema:

**Laboratorio de investigación en Endocrinología Molecular.
Departamento de Biología. Facultad de Química. UNAM.**

Asesor del Tema:


Med. Cir. Isabel Arrieta Cruz

Supervisor Técnico:


Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Sustentante:


Luciano Mendoza Garcés

Muchas veces oigo decir que la verdad es sencilla. Eso es cierto, me temo únicamente que la gente lo interpreta mal. Ellos piensan que lo sencillo es sencillo de entender. Pero no hay nada más difícil.

Michael Ende

Quiero agradecer de todo corazón a mis padres que me han brindado la oportunidad de realizar todo tipo de actividad, siempre dejándome elegir lo que es de mi interés, muchas gracias por eso; se termina una etapa tan anhelada por ustedes, perdón si me tarde un poquito, los quiero Luciano e Isaura.

Gracias a la banda pacheca por los fines de semana de reflexión y de meditación trascendental con té y galletitas, fueron de gran ayuda durante la carrera, gracias Daniel, Juan, Julio, Orvil, Pancho y Toño.

Debo agradecer al comité del decoro y las buenas costumbres del laboratorio 202 por su compañía y consejos, gracias a Mauricio, Elizabet, Nelly, Eilly, Gaby y Andrea. Los momentos de sano esparcimiento contribuyeron de manera importante a la culminación de la tesis, gracias por todos esos momentos de convivencia. Espero que en un futuro haya colaboraciones de todo tipo.

Muchas gracias Isabel por tu interés en el proyecto, sin ti no habría sido posible llevarlo a cabo, serás una magnífica jefa de grupo, en lo personal no hay mejor mentor que tú, gracias.

La tesis se realizó también por ayuda del Dr. Marco Antonio Cerbón, Dra. Adriana Mendoza y el Dr. Ignacio Camacho, gracias por su apoyo y ayuda, gracias por brindar un poco de su tiempo y conocimiento cuando se los pedí.

Agradezco a los integrantes del grupo del Dr. Camacho su ayuda para la realización de este proyecto, Cristian, Aliesha, Olga y Tere. Amor y paz.

Carmen, quizás nunca veas este agradecimiento, pero para mí es de gran satisfacción decirte muchas gracias, deseo que los problemas que compartiste conmigo se resolvieran y no haber contribuido a que se complicaran.

Resumen

El estradiol ejerce su efecto a través de su unión con su receptor nuclear específico, este complejo hormona-receptor se une a secuencias específicas del DNA activando la transcripción de genes regulados por esta hormona. Hasta el momento se conocen dos tipos de receptores a estrógenos: la isoforma α y la isoforma β , ambas proteínas se han detectado en diversas estructuras del cerebro de los mamíferos en diversos modelos experimentales. El hipocampo forma parte del sistema límbico del Sistema Nervioso Central y se encarga de modular algunas de las funciones cognitivas y de conducta en los mamíferos. Los mecanismos involucrados en estas funciones implica un re-arreglo de conexiones sinápticas necesarias para el proceso de memoria y de aprendizaje. Múltiples trabajos han demostrado que el hipocampo participa en la regulación de la conducta reproductiva de los animales y este proceso se debe en parte a los efectos del estradiol endógeno durante el ciclo estral de la rata. El objetivo de este estudio fue determinar la expresión de la proteína del receptor a estrógenos α y β en el hipocampo durante el ciclo estral de la rata. Para esto se utilizó la técnica de inmunohistoquímica en cortes coronales del cerebro de la rata, los datos obtenidos se cuantificaron utilizando un analizador de imágenes. Los resultados muestran que existe una mayor expresión de la isoforma β del RE que la isoforma α en CA1 y CA3 del hipocampo. Se observó un mayor número de células inmuno-reactivas para la isoforma α durante el estro y para la isoforma β durante el metaestro en CA1, mientras que para la región CA3 se observó mayor número de células inmuno-reactivas durante la etapa del metaestro y proestro para la isoforma α , en contraste con lo observado para la isoforma β en el diestro. Estos resultados sugieren una regulación diferencial de ambas isoformas por los niveles hormonales endógenos durante el ciclo estral de la rata.

Índice

1. Antecedentes.	2
1.1. Hormonas esteroides sexuales.	2
1.1.1 Generalidades.	2
1.1.2 Mecanismo de acción de hormonas esteroides.	4
1.1.2.1 Mecanismo genómico.	4
1.1.2.2 Mecanismo no genómico.	6
1.2. Receptor a estrógenos.	9
1.2.1 Generalidades.	9
1.2.1.1 RE α.	10
1.2.1.2 RE β.	11
1.3. Participación del RE en el SNC.	12
1.3.1 Generalidades.	12
1.3.2 RE α y β en el SNC.	12
1.3.3 RE en el hipocampo.	15
1.4. Ciclo estral de la rata.	18
1.4.1 Generalidades.	18
1.4.2 Niveles hormonales durante el ciclo estral.	20
2. Planteamiento del problema.	23
3. Hipótesis.	24
4. Objetivos.	25
4.1. General.	25
4.2. Particulares.	25
5. Materiales y métodos.	26
5.1. Animales de experimentación.	26
5.2. Diseño experimental.	26
5.3. Obtención de tejido.	26
5.4. Inmunohistoquímica.	26
5.5. Análisis cuantitativo.	28
6. Resultados.	30
7. Discusión.	37
8. Conclusiones.	41
9. Referencias.	42
10. Apéndice.	52
11. Trabajos publicados.	56

1. Antecedentes.

1.1. Hormonas esteroideas sexuales.

1.1.1. Generalidades.

Hormona es “un mensajero químico secretado por células específicas, el cual es transportado por el torrente sanguíneo, ejerciendo su efecto en una célula blanco donde actúa regulando el crecimiento o la actividad de las células”. Las hormonas generalmente son transportadas en la sangre desde su lugar de producción hasta el sitio en que actúan (Vilée CA, 1988).

Las hormonas esteroideas son moléculas lipídicas cuya estructura básica consiste de un núcleo tetracíclico al cual se le denomina ciclopentanoperhidrofenantreno, debido a que presenta tres anillos de seis átomos de carbono (perhidrofenantreno) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclopentano) (Gorbman A y Bern H, 1962). El colesterol es la molécula precursora de todos los esteroideas, estos incluyen a las hormonas sexuales, las hormonas adrenocorticales, los glucósidos y los ácidos biliares. El colesterol esta constituido por un núcleo tetracíclico, grupos metilos unidos a los carbonos 10 y 13 y una cadena lateral formada de ocho carbonos unida al carbono 17. La separación de los carbonos 20 y 22 de la cadena lateral da lugar a los pregnanos, esta serie incluye a las progestinas. La segmentación de los carbonos 17 y 20 de la cadena lateral origina la serie de androstanos o esteroideas de 19 carbonos, en los cuales se ubican a los andrógenos. Finalmente, la salida del grupo metilo unido al carbón 10 forma la serie de estranos o esteroideas de 18 carbonos y da origen a los estrógenos. La corteza suprarrenal, los testículos, el ovario y la placenta secretan esteroideas. La hormona sexual femenina primaria, el estradiol, es sintetizada por aromatización a partir de la testosterona (Gore-Langton RE y Armstrong DT, 1988) (Figura 1).

1.1.2. Mecanismo de acción de hormonas esteroides.

Hasta el momento se conocen dos mecanismos de acción de las hormonas esteroides: 1) el clásico llamado "genómico" y 2) el no clásico llamado "no genómico" (Beato M y Klug J, 2000).

1.1.2.1. Mecanismo genómico.

Los esteroides están involucrados en varias respuestas fisiológicas celulares a través de su acción genómica. De acuerdo a la teoría clásica de acción, las hormonas esteroides se unen a sus receptores específicos, que son factores de transcripción intracelulares que al unirse con su ligando modulan la expresión de genes blanco regulados por esteroides ejerciendo un efecto positivo o negativo en estos genes (Beato M et al., 1996; Beato M y Klug J, 2000).

El esteroide libre se difunde pasivamente dentro de su célula blanco hasta llegar al núcleo, en este sitio se une con su receptor específico. La unión del esteroide con su receptor genera cambios conformacionales en este último, permitiendo que el complejo hormona-receptor se una con alta afinidad a los elementos de respuesta a hormona (ERH). Estos ERH reguladores son secuencias palindrómicas de DNA de 15-20 pares de bases localizadas en el extremo 5' (o incluso dentro del gen) de genes regulados por hormonas. Se han caracterizado cuatro clases de ERH: 1) el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE); 2) el elemento de respuesta a andrógenos (ERA); 3) el elemento de respuesta a progesterona (ERP) y 4) el elemento de respuesta a mineralocorticoides (ERM), que tienen una secuencia consenso común, GTACAnnnTGGTCT, por medio de la cual actúan. La secuencia consenso del elemento de respuesta a estrógenos (ERE), AGGTCAnnnTGACCT, es muy parecida al elemento de respuesta a hormonas tiroideas (ERHT), solamente que esta no tiene los nucleótidos separadores (TCAGGTCA TGACCTGA). La unión del complejo hormona-receptor al ERH activa la transcripción de genes regulados por hormonas, generando la síntesis del RNA mensajero, que posteriormente se

traducirá en una proteína, y está ejercerá su efecto en su propia célula o fuera de ella (Fuller PJ, 1991) (Figura 2).

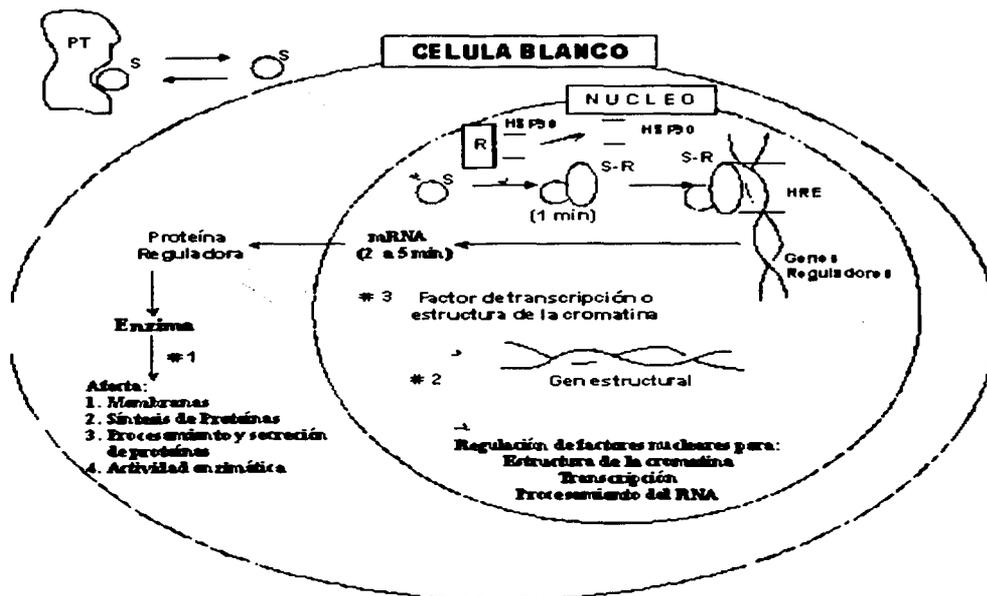


Figura 2. **Mecanismo general de acción de las hormonas esteroides.** El receptor activado por la hormona esteroide se une a un elemento de respuesta hormonal localizado en el extremo 5' de un gen regulador (también llamado gen temprano o primario). Esta unión regula la transcripción del gen regulador minutos después de que la hormona entra a la célula. Dentro de la célula blanco pueden existir varios genes reguladores que responden a una hormona en particular, y cuya proteína participa en una multitud de sucesos en varios sitios dentro de la célula. El tiempo indicado representa el tiempo estimado para que ocurra el suceso después de la entrada de la hormona a la célula. PT= proteína transportadora, R=receptor, S=esteroide, S-R= receptor activado, HRE= elementos de respuesta a hormonas esteroides, HSP90= proteína de choque térmico (Landers y Spelsberg, 1992).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Los receptores a hormonas esteroides actúan como factores de la transcripción para regular la expresión génica por el reconocimiento palindrómico de ERE en el DNA después de la homo o heterodimerización del complejo ligando-receptor. Subsecuentemente, la transcripción es iniciada en conjunción con el complejo de la transcripción basal, diferentes coactivadores, represores y reguladores (Beato M y Klug J, 2000). La modulación de la transcripción depende de la unión del complejo ligando-receptor y se le ha denominado "genómico" y es sensible a inhibidores de la transcripción y la traducción (Verrey F, 1998).

1.1.2.2. Mecanismo no genómico.

En contraste al mecanismo de acción genómico, los efectos no-genómicos por esteroides son principalmente caracterizados por la insensibilidad a inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas representando la más obvia evidencia experimental por la cual su acción comienza rápidamente (en cuestión de segundos o minutos). Estos rápidos efectos están mediados a través de receptores con propiedades farmacológicas distintas a la de los receptores esteroides intracelulares (Falkenstein E, et al., 2000).

Distinto a los receptores esteroides intracelulares, los receptores de interacción en la membrana (tales como péptidos agonistas, catecolaminas o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas) afectan la función celular por modulación de los niveles intracelulares de un segundo mensajero. En adición a estos efectos directos de los segundos mensajeros, los cambios inducidos por agonistas de mensajeros intracelulares modulan la transcripción por esteroides a través de un entrecruzamiento de señales intracelulares "cross-talk". Por ello, la activación de células por péptidos agonistas puede modular la transcripción nuclear inducida por esteroides a través de la activación de segundos mensajeros con una capacidad intrínseca para regular la transcripción nuclear (Nordeen SK et al., 1994). Además, el "cross-talk" intracelular puede ocurrir a la par en ausencia del esteroide, por ejemplo, se ha demostrado que el factor de crecimiento

epidermal activa al receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) por señalización a través de la vía metabólica de la MAP cinasa (MAPK), sugiriendo que la MAPK directamente fosforila al $RE\alpha$ (Bunone G et al., 1996).

Los efectos no-genómicos de los esteroides sobre la función celular involucra convencionalmente cascadas de segundos mensajeros, algunas de estas incluyen a la fosfolipasa C (PLC^2) (Civitelli R et al., 1990), al pH intracelular (Jenis LG et al., 1993; Wehling M et al., 1996), al calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (De Boland AR y Norman AW, 1990; Wehling M et al., 1990) y a la proteína cinasa C (PKC) (Sylvia VL et al., 1993).

La respuesta no-genómica específica parece depender del tipo de esteroide, tipo celular, tejido o especie utilizado. Sin embargo, las cascadas de señalización comparten grandes homologías con $[Ca^{2+}]_i$, PKC, PLC, cAMP, pH, MAP cinasa y otros tradicionales segundos mensajeros actuando por vías distintas, pero con similar resultado (Falkenstein E et al., 2000) (Figura 3).

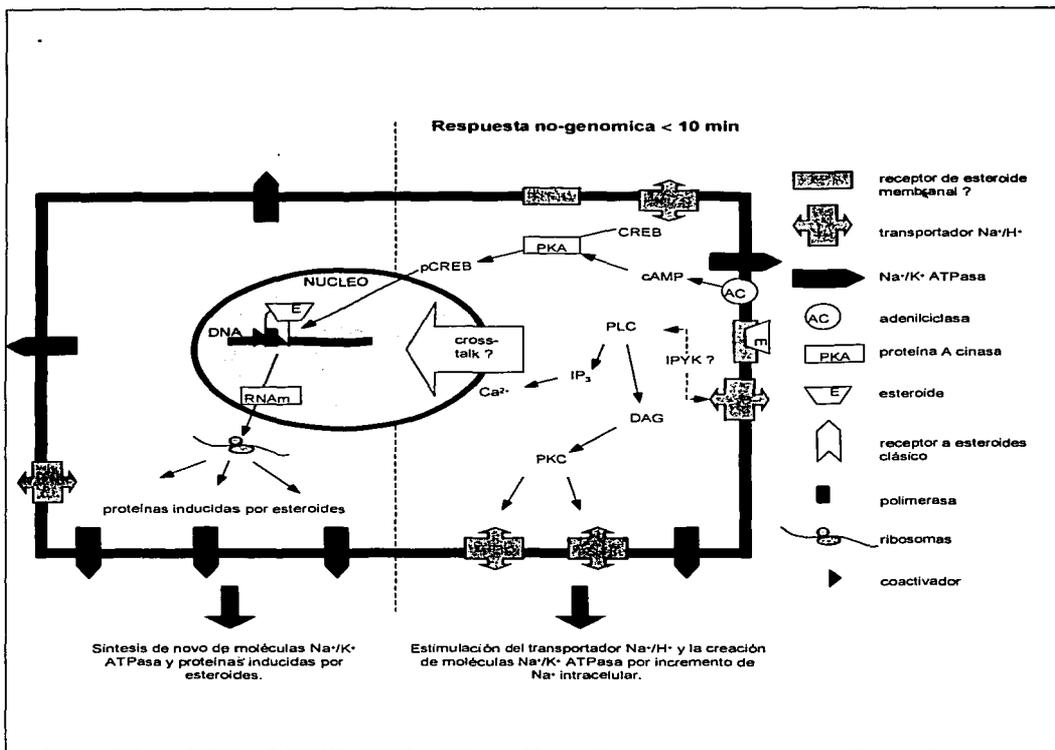


Figura 3. **Diagrama del efecto no-genómico.** En el diagrama se aprecian algunas vías metabólicas que estarían involucradas en el fenómeno, también se especula de la existencia de un receptor a esteroides membranar (Modificado de Falkenstein E et al. 2000).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1.2. Receptor a estrógenos.

1.2.1 Generalidades.

Los miembros de la superfamilia de receptores a hormonas esteroideas se han organizado en tres grupos generales basados en la similitud química de sus ligandos. 1) Los receptores para hormonas esteroideas son: receptores a andrógenos (RA), receptores a mineralocorticoides (RM), receptor a estrógenos (RE), receptores a glucocorticoides (RG) y receptor a progesterona (RP); 2) los receptores de RXR-heterodiméricos incluido el receptor a tirosina (TR), receptor a vitamina D (VDR), receptor a ácido retinoico (RAR), receptor ácido 9-cis-retinoico (RXR), y receptor a ecdisona (EcR), el cual se encuentra en insectos y 3) un tercer grupo de receptores llamados huérfanos debido a que no se conoce su ligando, se incluyen a un número de receptores potencialmente importantes como el receptor activador de proliferación de peroxisomas (PPAR), el factor 1 esteroideogénico (SF-1), el receptor al factor-inducido de crecimiento nervioso (NGFI), y el receptor huérfano ligado al cromosoma X (DAX-1) (Evans RM. 1988; Enmark E et al., 1996; Robertson D et al., 1997).

Se han caracterizado distintas isoformas por los receptores nucleares a hormonas esteroideas (Lazar MA. 1993; Chambon P. 1996; Gustafsson JÅ. 1997). El RE tiene dos diferentes isoformas, el receptor a estrógenos α (ER α) y el receptor a estrógenos β (ER β) que son codificados por genes diferentes (Lazar MA. 1993; Chambon P. 1996; Gustafsson JÅ. 1997).

La proteína del RE está constituido por cinco regiones denominadas como A/B, C, D, E, F. Estos dominios estructurales son variables en tamaño y en función (Figura 6). En el extremo carboxilo-terminal del RE se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD) que corresponde a la region E y F; en la región D contiene secuencias de reconocimiento para ciertas proteínas activadoras y/o represoras, es el llamado dominio de unión a proteínas de choque térmico "Heat shock"

(HspBD) cuya función es la localización nuclear del receptor (Jackson TA et al., 1997); el dominio de unión al DNA (DBD) que corresponde a la región C de la proteína se une a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) del DNA así como a otras secuencias, estos otros sitios de unión pueden modular alostericamente la naturaleza de la respuesta y también involucrar otros factores de transcripción (Gottlicher M et al., 1998; Lefstin JA et al., 1998); cerca del extremo amino-terminal de la proteína se encuentra el dominio de transactivación que corresponde a la región A/B, este dominio es el menos conservado entre los receptores a hormonas esteroides (Danielsen M et al., 1987; Lees JA et al., 1989; Tora L et al., 1989).

1.2.1.1 RE α .

El gen del RE α humano fue clonado y secuenciado de las células humanas de cáncer de mama, llamadas MCF-7. El RE α humano es localizado en el cromosoma 6q sub-banda 25.1 (Menasce LP et al., 1993), el RE α de ratón se localiza en el cromosoma 10 (Sluysen M et al., 1988) y en la rata se localiza en el cromosoma 1 en la banda 1q12 (Szpirer C et al., 1997). La proteína de RE α consiste en 595 aminoácidos con un peso molecular de 66 KDa y conserva una estructura similar a los receptores a hormonas esteroides nucleares descrita anteriormente (Green S et al., 1986). La proteína es traducida de 8 exones (Kumar V et al., 1986,1987) (Figura 4).

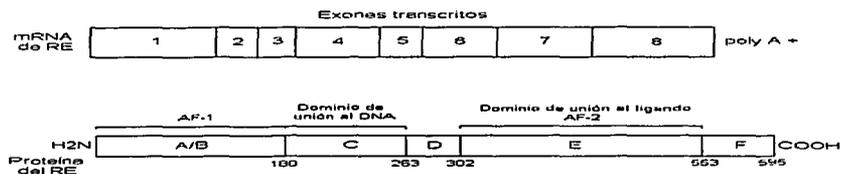


Figura 4. Estructura del mRNA que codifica para la proteína del RE α . La proteína del RE α consiste de seis dominios funcionales (AF), transcritos por ocho exones, los dominios aparecen marcados con letras mayúsculas de la A a la F (Kumar V et al., 1986).

1.2.1.2 RE β .

El gen del RE β fue clonado a partir de la próstata de la rata. La proteína esta constituida por 485 aminoácidos y el peso molecular es de 54.2 KDa (Figura 5). El RE β tiene homología con el RE α específicamente en el DBD (95%) y el HBD (55%), también tienen homología funcional, ya que ambos receptores unen con alta afinidad a los estrógenos (Kuiper *et al.*, 1996). El RE β de la rata esta localizado en el cromosoma 12, al gen se le ha nombrado como Estrb, el DNA complementario codifica para una proteína de 485 aminoácidos y tiene una similitud del 97% con el DBD y un 60% con el LBD del RE α del ratón, presentando las mismas propiedades farmacológicas que el RE α (Tremblay GB *et al.*, 1997). Una de las principales diferencias que existen entre las isoformas es en su regulación, ya que es posible activar el RE β del ratón a través de fosforilación por una proteína cinasa activadora de la mitosis, contrario a lo que sucede con el RE α que es activado como un receptor nuclear clásico, por transducción, que esta descrito anteriormente (Kato S *et al.*, 1995; Bunone G *et al.*, 1996).

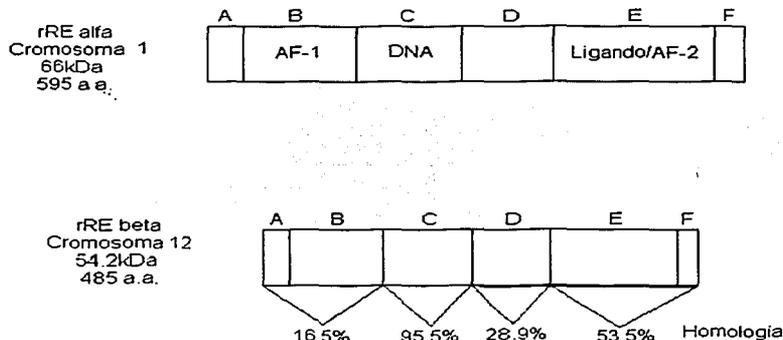


Figura 5. Comparación entre la estructura de la proteína del RE α y β de la rata y porcentaje de homología en los aminoácidos de las diferentes regiones funcionales (Kuiper *et al.*, 1996).

1.3. Participación del RE en el SNC.

1.3.1 Generalidades.

Las hormonas esteroideas tienen efectos importantes en la regulación de la función del Sistema Nervioso Central (SNC). Los estrógenos, en particular, participan en diversas funciones neuronales, como por ejemplo, el estradiol afecta áreas del SNC, como el hipotálamo que está relacionado directamente en la reproducción o en funciones cognoscitivas, como la memoria y el aprendizaje en el hipocampo (Woolley CS. 1999).

1.3.2 RE α y β en el SNC

El RE se ha localizado en diversas áreas y tipos celulares del SNC en diferentes modelos experimentales en roedores utilizando diferentes técnicas. La proteína del RE α se ha detectado en el diencefalo de ratas hembras y machos en diversas etapas del desarrollo, presentando un patrón de distribución diferente entre ambos sexos en el área preóptica y en el hipotálamo, encontrándose que en las hembra la expresión del RE α es mucho mayor que en los machos y que aumenta conforme avanza el desarrollo (Yokosuka et al., 1997). Por hibridación in situ se detectó el RNAm del RE α en el área preóptica con similares resultados a los anteriores (Don Carlos et al., 1994).

Diversos estudios han demostrado la presencia de las isoformas del RE en el SNC. En la estricta terminalis de ratas hembras y machos adultos la expresión del RE α y β es diferencial; y el RE α y β se expresa más en las hembras que en los machos, mientras que en la hembra ambas isoformas se expresan en el macho sucede que sólo el RE α es la que se expresa. En el núcleo preóptico medial hay una expresión semejante de RE α en machos y hembras mientras que el RE β se expresa sólo en hembras pero en menor grado que al RE α . En el núcleo periventricular anteroventral del área preóptica se observa un patrón similar. En el

área preóptica lateral no hay expresión de la isoforma β en hembras y machos y la expresión de α es mayor en machos que en hembras. En núcleo paraventricular del hipotálamo sólo hay expresión de RE β y es mayor en hembras que en machos. En el núcleo periventricular intermedio sólo se expresa el RE α en ambos sexos y en hembras es mayor la expresión que en el macho. En el núcleo supraóptico sólo hay expresión de RE β en ambos sexos y en la hembra es mayor que en el macho. En el núcleo ventromedial ambas isoformas se expresa en las hembras aunque en menor cantidad la β y en el macho la expresión es un poco más baja que en la hembra. En núcleo arcuato se presenta un patrón similar al de núcleo ventromedial (Laflamme *et al.*, 1998).

En ratas hembras ovariectomizadas (OVX) se detectó por hibridación *in situ* la expresión del mRNA de ambas isoformas en área preóptica y área hipotalámica anterior presentando el mismo patrón el RE α y RE β . En núcleo periventricular hay una mayor expresión de α que de β . En núcleo paraventricular solo hay expresión de β , lo mismo sucede con núcleo supraquiasmático y núcleo supraóptico. En el área retroquiasmática hay igual expresión de α y β , lo mismo sucede en núcleo dorsomedial e hipotálamo lateral. En el núcleo arcuato existe una mayor expresión de α que de β . En el núcleo ventromedial sólo hay expresión de α (Shughrue *et al.*, 1997). En ratas OVX + estradiol (E_2) por medio de hibridación *in situ* se observa que la expresión del RNAm en el núcleo preóptico medial es menor comparado contra un macho intacto, lo contrario se observa en el núcleo preóptico anteroventral (Simerly *et al.*, 1990).

En el hipotálamo y el área preóptica la expresión del mRNA del RE β es diferente, pues en el hipotálamo anterior y medio es similar, mientras que en el hipotálamo posterior es mucho menor (Shughrue *et al.*, 1996). La expresión del RNAm en ciclo estral de ratas presenta algunas diferencias en el área preóptica medial, la expresión es mayor en estro y menor en el proestro, en el núcleo arcuato no hay cambio y en el núcleo ventromedial la expresión mayor se ve en proestro y menor en estro (Shughrue *et al.*, 1992).

Investigaciones recientes muestran que las neuronas cultivadas expresan RE α y β en colocalización con sitios colinérgicos (Hösli E et al., 1999), las neuronas provienen de la neocorteza, el hipocampo, el área preóptica y la médula espinal. También se han detectado ambas isoformas en glía, específicamente en astrocitos en cultivo (Hösli E et al., 2000). Existen estudios de colocalización que demuestran que neuronas con acetilcolina transferasa del núcleo basal de corteza anterior en la rata contiene una actividad biológica de RE y muestra que RE α es la isoforma predominante en estas neuronas (Shughrue PJ et al., 2000). En un estudio de inmunolocalización en el tejido humano se observó que en la corteza cerebral en neuronas existe presencia de RE β más no así de RE α , en oligodendrocitos existe la presencia de ambos, en neurofila no hay RE α ni RE β , pero en células glía existen ambos RE α y RE β . En el cerebelo en células glía en capa molecular solo hay presencia de RE β , en células pequeñas nerviosas en capa granular sucede lo mismo, en cambio en células de Purkinje pasa lo contrario, ya que sólo hay presencia de RE α . En el hipocampo solo se encontró RE α . En la médula oblongata en células epindimales se encontró la presencia de RE β (Taylor AH, y Al-Azzawi F. 2000). Otros experimentos han demostrado que la localización del RE α en neuronas del hipocampo de ratas neonatales se da extranuclear en plasma muy cerca de membrana. Esta localización subcelular tiene consecuencias funcionales en otro tipo de células y es factible que este mediado por acción no-genómica de estrógenos (Clarke CH et al., 2000). También se ha relacionado la expresión de los ER α y β con sitios muscarínicos, colinérgicos, nicotínicos y además a galanina. Los estrógenos también influyen otros sistemas de neurotransmisores tales como las monoaminas y otros neuropéptidos (Hösli E y Hösli L. 1999).

Estudios anatómicos, de conducta, y bioquímicos, sugieren que los estrógenos tienen la capacidad para estimular las neuronas que mantienen la estructura y/o función en la corteza cerebral en animales y humanos maduros. Estudios que han utilizado inmunohistoquímica para mapear la distribución de las isoformas α y β del RE en todas las capas de la corteza cerebral de la rata adulta

revelaron la inmunoreactividad de RE α y/o RE β en células de las principales áreas de la iso y allocorteza de las ratas machos y hembras hormonalmente intactos. Aunque ambas isoformas presentaron similar distribución en los machos y en las hembras y que el RE se presentó sólo en neuronas y no en glía como en otros reportes (Kritzer MF. 2002).

1.3.3 RE en el hipocampo.

Se conoce que los estrógenos regulan la conectividad sináptica en una amplia variedad de regiones del cerebro de animales adultos, esto se ha demostrado en múltiples núcleos hipotalámicos, pero también en el hipocampo, estos cambios resultan de las fluctuaciones endógenas en los niveles séricos de los esteroides ováricos, principalmente por el E₂ y la progesterona (P₄), o por la administración exógena de hormonas (Desmond NL y Levy WT. 1997; Woolley CS. 1998). Se ha observado que en ratas hembras adultas OVX hay una reducción en el número y densidad de las espinas dendríticas, así como una disminución de las sinapsis axoespinales de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Gould E et al., 1990; Woolley CS et al., 1992, 1993 y 1997; Washburn SA et al., 1997). Esta reducción puede ser revertido con estradiol, se ha sugerido que este efecto del estradiol sobre la densidad dendrítica requiere de la activación de los receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA) (Woolley CS y McEwen BS. 1994):

Uno de los mecanismos por el cual el estradiol ejerce efectos sobre las espinas dendríticas y la sinapsis del hipocampo son por una serie de estudios in vitro que han revelado una interacción entre estradiol, interneuronas GABAérgicas y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la inducción de nuevas espinas dendríticas, para esto se requiere de la exposición crónica de las neuronas hipocámpales al E₂, además de la activación de los receptores a NMDA (Woolley CS y McEwen BS. 1994; Murphy DD y Segal M. 1996).

Recientes estudios in vitro demuestran la formación de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo inducidos por estradiol mediante la inhibición GABAérgica. En un patrón similar al que se ve in vivo, neuronas del hipocampo inhibitorias cultivadas expresan $RE\alpha$, el tratamiento con estradiol induce una respuesta bifásica en neuronas GABAérgicas in vitro, inicialmente disminuye la inmunoreactividad de ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glutamato descarboxilasa (la enzima limitada por el producto de su síntesis, que es GABA) subsecuentemente produciendo un incremento en ambós. Incrementando la conducta excitatoria sobre las células espinales se logra contrarestar la inhibición. Reducción farmacológica de inhibición por pérdida de GABA se imita el efecto de estradiol sobre la densidad espinal. En adición, el tratamiento de cultivos con tetrodotoxina, la cual deberá bloquear la acción potencial del sodio de descarga, también se incrementa el aumento inducido por estradiol en la densidad espinal, indicando un mecanismo dependiente de actividad de la formación de la espina (Weiland NG et al., 1997; Murphy DD et al., 1998).

La regulación de la expresión de la neurotrofina parece ser clave para los efectos del estradiol sobre la función inhibitoria y subsecuentemente sobre la densidad dendrítica espinal del hipocampo in vitro. El tratamiento de estradiol de cultivos de hipocampo disminuye los niveles de BDNF (Murphy DD et al., 1998). Esta disminución en BDNF resulta en activación de células piramidales, permitiendo el incremento dependiente de actividad en la densidad dendrítica espinal. El BDNF exógeno puede bloquear el incremento generado por estradiol sobre la densidad dendrítica espinal, se ha observado que bloquear el efecto del BDNF por oligonucleotido antisentido o anticuerpo contra BDNF generan un efecto similar al observado en el estradiol. El gen de BDNF contiene un elemento de respuesta putativa de estrógenos y esto puede explicar su respuesta sobre el estrógeno (Sohrabji F et al., 1995).

La formación de espinas dendríticas inducidas por estradiol en cultivo de neuronas del hipocampo también se ha ligado recientemente a la activación de

elemento de respuesta cAMP uniendo la proteína (CREB) y la proteína de enlace de CREB (CBP). Un incremento dependiente del receptor NMDA en CBP y posterior fosforilación de CREB, y es requerido para el incremento en la densidad dendrítica espinal (Murphy DD y Segal M. 1997). El tratamiento de cultivos con un análogo de cAMP por lo menos parcialmente imita el efecto del estradiol.

Las hormonas secretadas por el ovario también han inducido la expresión del mRNA de BDNF en el hipocampo en modelos in vivo, sugiriendo que la asociación entre estradiol, BDNF y la formación de la espina demostrada in vitro puede ser relevante para la formación de ésta en el cerebro intacto. Los niveles de mRNA de BDNF fluctúan a través del ciclo estral de las ratas intactas, con los niveles bajos observados sobre la tarde del proestro (Gibbs RB. 1998) cuando los niveles de P₄ y E₂ alcanzan su máxima liberación. Este es también el punto en el ciclo en el cual la espina dendrítica del hipocampo y la densidad sináptica es mayor en el hipocampo de hembras gonadalmente intactas (Woolley CS et al., 1990).

Muchos reportes epidemiológicos sugieren que la terapia de sustitución de estrógenos en mujeres posmenopáusicas puede ser protectora contra la enfermedad de Alzheimer. La búsqueda para las bases biológicas de la protección por estrógenos de la enfermedad de Alzheimer ha acumulado numerosos estudios que tienen significantes avances en el entendimiento de los efectos de los estrógenos sobre el SNC. El progreso se ha hecho en por lo menos cuatro áreas clave. Primero, estudios genómicos del RE α y β han sugerido nueva complejidad en la señalización de los estrógenos. Segundo, estudios recientes han mostrado indicios para el mecanismo de la señalización rápida de los estrógenos a través de vías metabólicas no-genómicas. Tercero, se ha avanzado en el conocimiento de las consecuencias y los mecanismos por los cuales los estrógenos regulan la conexión sináptica de las neuronas del hipocampo in vivo e in vitro. Cuarto, múltiples razones por las cuales los estrógenos pueden ser neuroprotectores se han demostrado (Woolley CS. 1999).

1.4. Ciclo Estral de la Rata.

1.4.1. Generalidades

La palabra *estro* proviene de "estrus" que es una adaptación latina de la palabra griega "oistros" que significa moscardón, escozor o éxtasis. El término fue usado por Heape, para describir el período especial de deseo sexual de la hembra y distinguirlo del "rutinario" en el macho. A Heape es al que le debemos los nombres que tiene el ciclo estral de la rata, utilizando los prefijos pro-, di- y meta- con el sufijo *estro*, con estos nombres Heape describió a los hechos que notaba en la conducta de la rata entre cada ciclo. Durante este lapso la secreción de hormonas esteroideas de los ovarios prepara al tracto reproductivo para recibir al óvulo, si éste es fertilizado poco después del apareamiento durante el *estro*. Si no hubo fertilización, el animal regresa a la etapa del *proestro* y el ciclo comienza nuevamente (Heape W, 1900).

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliestro. Esto es, el ciclo ovulatorio continua a través del año (caso opuesto a ciclos ovulatorios restringidos a una estación, como por ejemplo en las ovejas). Mediante frotis vaginal ha sido posible conocer la duración de las diferentes etapas del ciclo estral de la rata, el cual ocurre cada 4 a 5 días durante todo el año. (Long JA, *et al.*, 1922; Astwood EB, 1939; Hartman CG, 1944; Mandl AM, 1951). El *proestro* dura de 12 a 14 hrs; el *estro* de 25 a 27 hrs; el *metaestro* de 6 a 8 hrs y el *diestro* de 55 a 57 hrs. Los diferentes estados del ciclo estral pueden ser monitoreados por el tipo de células que aparecen en el frotis vaginal (Figura 6). El *proestro* está caracterizado por un predominio de células nucleadas epiteliales, estas son redondas, nucleadas y aparecen en grupos a la mitad del *proestro*, ocasionalmente pueden aparecer unas cuantas células escamosas cornificadas epiteliales (Figura 6a). En el *estro*, la mayoría de las células son escamosas cornificadas epiteliales, este tipo de células aparecen sin un núcleo visible con un citoplasma altamente granular y de forma irregular, aparecen en gran cantidad (Figura 6b). Durante el *metaestro* (también llamado *diestro 1*) y el

diestro, las células que predominan son los leucocitos, los cuales aparecen con un significativo número de células nucleadas epiteliales, los leucocitos son pequeños con citoplasma granular si se examina a aumentos mayores usualmente tienen núcleos vesiculados (Figura 6c y d). Si el ciclo fuera de 5 días, es posible que en el quinto día se observen células cornificadas (estro) o leucocitos (diestro) (Mandl AM, 1951).

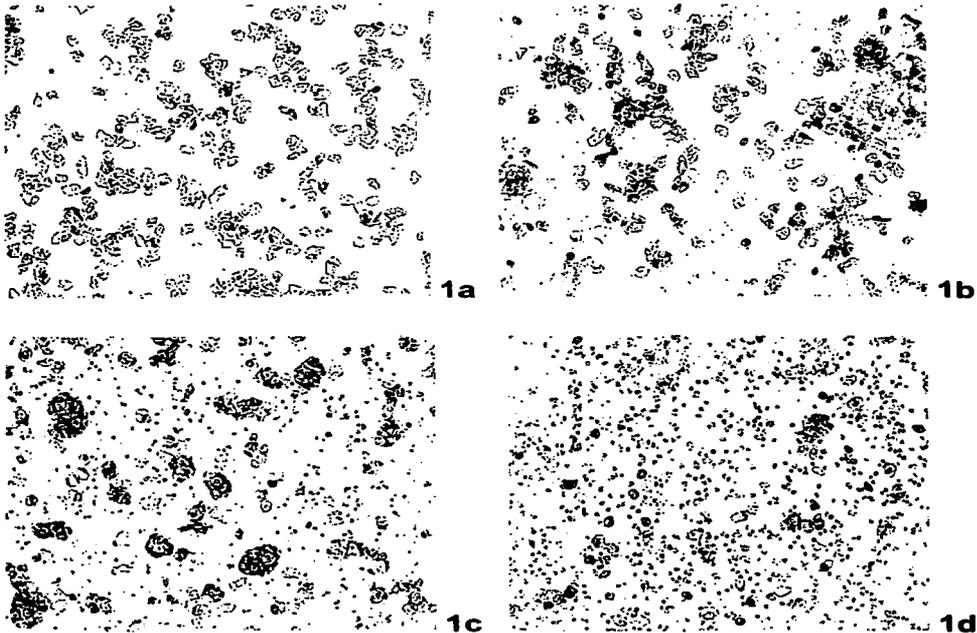


Figura 6. **Etapas del ciclo estral de la rata.** Análisis citológico, frotis obtenidos de la pared vaginal de la rata, las células fueron teñidas con hematoxilina y eosina para determinar los diferentes tipos celulares en cada etapa. 1a. Proestro: células epiteliales nucleadas; 1b. Estro: células epiteliales cornificadas; 1c. Metaestro: células cornificadas y leucocitos; 1d. Diestro: únicamente leucocitos. Microscopio de luz a un objetivo 10X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.4.2. Niveles hormonales durante el ciclo estral.

El período preovulatorio del ciclo estral es caracterizado por el crecimiento de los folículos ováricos y un concomitante aumento en la secreción de estrógenos. El nivel de secreción de estradiol en el plasma es bajo en el estro (17 ± 2 pg/ml), comenzando a aumentar significativamente en la última parte del metaestro y mañana del diestro (37 ± 5 pg/ml), y alcanzando la máxima concentración en la tarde del proestro (88 ± 2 pg/ml). Las células responsables de la secreción de estradiol durante el ciclo son las células de la teca interna y granulosa del folículo ovárico (Yoshinaga K, et al., 1969; Shaikh AA, 1971).

En la rata adulta, los progestágenos más importantes secretados por los ovarios durante el ciclo estral es la 20α -hidroxipregn-4-en-3-ona, también conocida como 20 hidroxiprogesterona (20α -OH-P) y la progesterona (P_4). Se presentan dos fases de secreción máxima para la 20α -OH-P y la P_4 del ovario durante el ciclo estral. El primer nivel máximo ocurre durante la tarde del metaestro, y ambos esteroides se originan del cuerpo lúteo; el segundo nivel máximo ocurre durante la última parte de la tarde del proestro (Eto T, et al., 1962; Telegdy G, et al., 1963; Hashimoto I, et al., 1968; Uchida K, et al., 1969; Piacsek BE et al., 1971), esto se debe a que la 20α -OH-P se sintetiza del cuerpo lúteo, mientras que el pico de la P_4 se origina de las células granulosa del folículo preovulatorio (Hashimoto I, et al., 1969). La secreción de estas progestinas en el ovario es semejante al patrón de secreción en el plasma periférico. En el cuarto día del ciclo de las ratas, la secreción de la 20α -OH-P en el plasma periférico es totalmente variable, los niveles bajos son observados durante la mañana del diestro. Sin embargo, los niveles en la periferia crecen durante la tarde del diestro y la mañana del proestro para alcanzar los niveles más altos a las 20:00 hrs del proestro. La secreción de progesterona es más regular, un gran incremento de origen folicular toma lugar durante el medio día y tarde del proestro (46 ± 7 ng/ml). Este incremento ocurre casi simultáneamente con el mayor incremento de ovulación-inducida de la secreción de hormona luteinizante. Se consiguen los niveles altos alrededor del

tiempo en el que se alcanza el pico de la LH que es en la tarde temprana y retorna a los niveles basales por la mañana del estro (2 ± 1 ng/ml). Un importante segundo nivel alto de origen luteal inicia alrededor del medio día del metaestro (24 ± 3 ng/ml) y es prolongado hasta la temprana mañana del diestro y cae a niveles basales poco después del comienzo del diestro (Goldman BD et al., 1969; Barraclough CA et al., 1971; Butcher RI et al., 1974; Smith MS et al., 1975; Shaikh AA et al., 1975; Nequin LG et al., 1979).

El aumento en la concentración de los estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH a su vez desencadena la secreción de la hormona luteinizante (LH) por la hipófisis y los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse alrededor de las 14 a 15 hrs del proestro, y alcanzan su nivel máximo (37 ± 5 ng/ml) entre las 17 y las 19 hrs. Este rápido incremento de LH induce la ruptura del folículo produciendo la ovulación en las primeras horas del estro. El nivel en sangre de LH empieza a disminuir en la noche del proestro, alcanza niveles basales (0.5 ± 0.15 ng/ml) en las primeras horas de la mañana del estro y permanece así durante el metaestro y el diestro. El patrón de secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y prolactina durante el ciclo estral es similar al de LH (Brown-Grant K, et al., 1970; Butcher RI, et al., 1974; Freeman ME, 1988). Ver Figura 7.

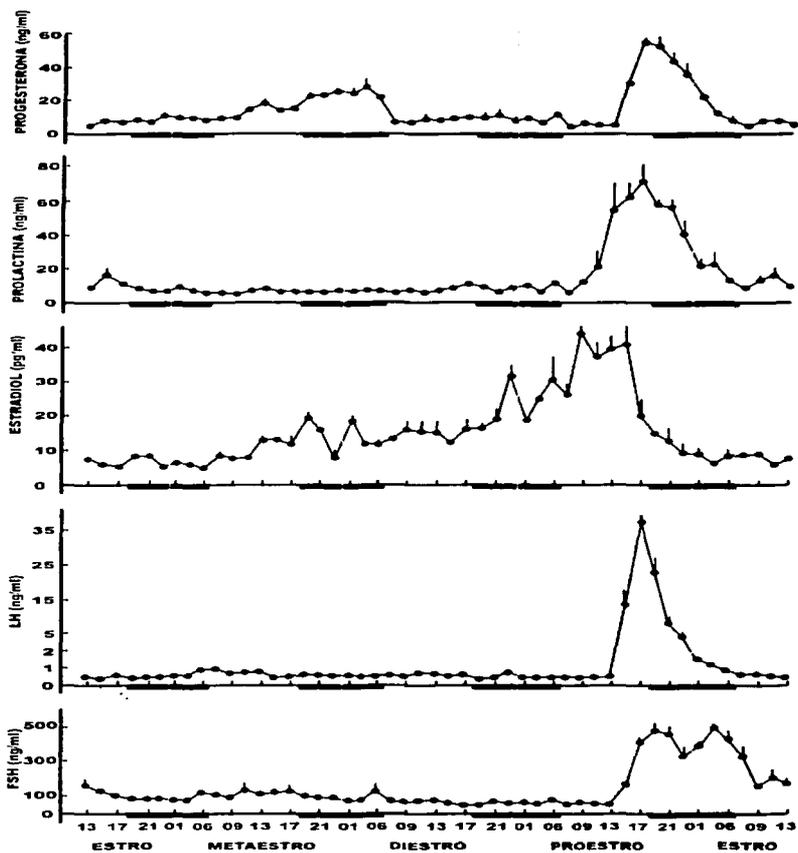


Figura 7. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral de la rata. Concentración de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan las barras de oscuridad en la colonia y los números en la base representan la hora del día (Freeman ME, 1988).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Planteamiento del problema.

En los mamíferos el hipocampo es una estructura del SNC involucrada en el control de procesos cognoscitivos como la memoria y el aprendizaje, además de participar en la regulación de la conducta reproductiva, esto se debe a su gran capacidad plástica. El hipocampo es sensible a los cambios en los niveles de estradiol endógeno que se generan durante el ciclo estral de la rata produciendo cambios estructurales y bioquímicos en esta región, como lo es, la arborización dendrítica y la cantidad de sinápsis. Por tal razón es relevante estudiar la presencia de las isoformas del RE en el hipocampo a través de las diferentes etapas del ciclo estral y correlacionarlos con los niveles de estradiol circulante.

3. Hipótesis.

Si el hipocampo es sensible a los cambios de estradiol hormonal durante el ciclo estral de la rata entonces se detectarían cambios en el contenido de las isoformas α y β del RE en las diferentes células de esta región.

4. Objetivos.

4.1. General.

Determinar la expresión de las proteínas del RE α y RE β en el hipocampo de la rata durante el ciclo estral.

4.2. Particulares.

En las diferentes etapas del ciclo estral (proestro, estro, metaestro, diestro):

1. Estudiar y cuantificar la expresión de la proteína del RE α y β en la región CA1 y CA3 del hipocampo de la rata.
2. Estudiar si hay diferencias entre la expresión de las isoformas del RE (α y β) en la región CA1 y CA3 del hipocampo.
3. Estudiar si hay una relación entre la expresión de las isoformas del RE (α y β) y los niveles séricos de E₂ y P₄.

5. Materiales y métodos.

5.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron 20 ratas hembras de la cepa Wistar de 2 meses de edad (Harlan, México). Los animales se distribuyeron en 4 cajas, y cada una con 5 ratas.

5.2. Diseño experimental.

Durante 12 días consecutivos se determinó la etapa del ciclo estral en que se encontraba cada rata esto se realizó por medio de frotis vaginal. En este estudio sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron 3 ciclos estrales consecutivos de 4 días cada ciclo. Antes de sacrificar a los animales se confirmó por frotis vaginal la etapa del ciclo. Los animales se sacrificaron a la una de la tarde por decapitación y la sangre se recolectó para cuantificación en suero de E₂ y P₄. Por cada etapa del ciclo se obtuvo un número de 3 animales.

5.3. Obtención de tejido.

Una vez obtenido el cerebro, se lavó con solución salina para eliminar el exceso de sangre, inmediatamente se fijaron los cerebros con solución de p-formaldehído al 4% de 24 a 72hrs. Posteriormente se procedió a la deshidratación del cerebro mediante soluciones de diferentes concentraciones de agua-alcohol y alcohol-xilol para seguir con la inclusión en parafina. Una vez obtenidos estos bloques se procedió a realizar cortes coronales seriados en micrótopo de 10µm de grosor, colocándolos en portaobjetos distribuidos en series de 4.

5.3. Inmunohistoquímica.

1. Se colocaron los cortes de tejido con parafina en horno a 60°C por 15 min.
2. Inmediatamente se eliminó la parafina con xilol y alcohol:

Xilol 5 min, xilol 2 min, xilol-alcohol 2 min, alcohol 100% 2 min, alcohol 96% 2 min, alcohol 90% 2 min, alcohol 70% 2 min, alcohol 50% 2 min, agua destilada 2 min.

3. Se colocaron las laminillas en citrato de sodio (nuevo) 10 mM pH 6.0 y se calentaron en horno de microondas, 10 minutos 2 veces, entre cada calentamiento, se esperó 5 min. (Horno en alta potencia).
4. Se dejó a que enfriara el citrato de sodio a temperatura ambiente.
5. Se Lavó en PBS, 2 veces por 5 min c/u
6. Se Incubó con H₂O₂ 3% por 45 minutos.
7. Se Lavó con PBS, 2 veces por 5 min c/u
8. Se permeabilizó con tritón 0.5% en PBS por 60 min.
9. Se Lavó con PBS, 2 veces por 5min c/u
10. Se bloqueó con suero de bloqueo al 1% + H₂O₂ al 1% + PBS por 30 min.
11. Se aplicó el primer anticuerpo por 72 h (policlonal de cabra para RE β y policlonal de conejo para RE α Santa Cruz Biotechnology dil 1:50) en PBS más tritón x-100 al 0.3% a 4°C.
12. Se Lavó con PBS, 2 veces por 5 min c/u.
13. Se Incubó con anticuerpo secundario (ABC Staining System contra cabra para RE β o contra conejo para RE α Santa Cruz Biotechnology dil 1:100) en suero de bloqueo al 2% y tritón x-100 al 0.3% en PBS por 2h a temperatura ambiente.
14. Se Lavó con PBS, 2 veces por 5 min c/u
15. Se Aplicó soluciones de Avidina y Biotina, dilución 1:50 para cada compuesto en PBS.
16. Se Lavó con PBS, 2 veces por 5 min c/u
17. Se Incubó con el cromógeno (Peroxidase substrate kit DAB sk - 41000 vector):
Preparado minutos antes de ser usado.
 - A 5 ml de agua destilada, se le adicionó dos gotas de sol. Buffer y se mezcló.
 - Se adicionó 4 gotas de sol. DAB y se mezcló bien.

- Se adicionó 2 gotas de sol. H_2O_2 y se mezcló.

Se incubó a temperatura ambiente hasta observar tinción, generalmente es de entre 2 a 10 min.

18. Se contratiñó:

- a. Solución de hematoxilina de Mayer por 5 min
- b. Se lavó con agua 5 min
- c. Se hizo virar las muestras en carbonato de litio o agua caliente por 2 min
- d. Se pasó a agua a temperatura ambiente por 2 min

19. Se deshidrató, a través de alcohol 50% 15 seg, alcohol 70% 15 seg, alcohol 90% 15 seg, alcohol 95% 15 seg, alcohol 100% 15 seg, xilol-alcohol 15 seg, xilol 15 seg, xilol 5 min

20. Se agregó resina y se cubrió con cubreobjetos.

5.5. Análisis cuantitativo.

Se observaron los cortes en el microscopio óptico con objetivo 10X para determinar el área de interés, en este caso fue hipocampo medial en las regiones CA1 y CA3, las células observadas fueron neuronas (piramidales y granulares). Se cuantificaron las regiones inmunoreactivas para $RE\alpha$ y $RE\beta$ en las diferentes áreas de interés, por medio del analizador de imágenes KS300 (Karl Zeiss). Se analizó el número de células e intensidad de la inmunoreactividad, este conteo consistió en digitalizar la imagen capturada por el microscopio y en la computadora se procedió a la selección de células inmunoreactivas delimitándose un área de $545\mu m \times 58\mu m$ que incluye la mayor parte de la capa de células piramidales de CA1 y un radio de $200\mu m$ para CA3. Se procuró que las zonas seleccionadas fueran las mismas para cada corte analizado. Una vez hecho esto se transformó la imagen a un fondo negro y las células inmunoreactivas en blanco sirvieron para contabilizar las células inmunoreactivas.

Para el análisis de intensidad de la inmunoreactividad la imagen digitalizada se editó utilizando un filtro que permitió usar una escala de grises, dándole al blanco el valor mínimo de 0 y al negro el valor máximo de 120 y la variedad de grises entre estos dos colores fue la escala contra la que se comparaba la inmunoreactividad detectada.

Una vez que se obtuvieron los datos se procedió a realizar un análisis estadístico que consistió en determinar el número estimado de células contadas para evitar dobles conteos, para esto se utilizó el método de Abecrombie, que se basa en la siguiente fórmula:

$$(a/(a+b))(c) = \# \text{ células}$$

donde:

a, es el grosor del corte.

b, es el promedio del diámetro de las células contadas.

c, es el promedio del # de células contadas por el programa de computadora en cada corte de la laminilla de una sola rata, el número obtenido por el conteo de computadora se multiplica por 4, en este caso es porque los cortes se hicieron en series de cuatro.

Ya obtenido el número real de células de cada rata se realizó un promedio de las inmunoreactivas para RE α en CA1 y CA3, así como para RE β en las regiones CA1 y CA3 en las diferentes etapas del ciclo estral, con estos datos se realizó un histograma y se analizaron los diferentes grupos con la prueba "t students" no pareada de doble cola con un nivel de significancia del 0.05, en el caso de la intensidad de la inmunoreactividad se promediaron los datos obtenidos por el análisis en la computadora de las diferentes ratas y los diferentes grupos y al igual que el conteo de células se realizó histograma y prueba "t students", con los mismos parámetros.

6. Resultados.

Detección de la proteína del RE α y RE β en CA1.

Se observó la inmunoreactividad en las diferentes zonas del hipocampo y se aprecia una variación en las diferentes etapas del ciclo; para el RE β en las células de la región CA1 del hipocampo medial es mucho mayor que la observada para el RE α . El análisis cuantitativo muestra que la etapa del ciclo estral en la cual se ve el mayor número de células inmunoreactivas es diferente para cada una de las isoformas; para el RE α esto se observa durante el estro, mientras que para el RE β es en el metaestro, en ambos casos se observó una diferencia significativa con respecto al resto de las etapas del ciclo estral. La etapa del ciclo donde se observó la mínima expresión de la proteína para el RE α fue en el proestro y para el RE β en el diestro, es de resaltar que no hay diferencia significativa de células inmunoreactivas del RE α entre estro y metaestro, ni tampoco entre diestro y proestro. La localización celular de la proteína fue nuclear para ambas isoformas y solamente en el caso del RE α en todas las etapas del ciclo se localizó extranuclearmente (Figura 8). Lo observado correlaciona con el número estimado de células inmunoreactivas en esta región del hipocampo (Figura 9).

En cuanto a la intensidad se observó en CA1 el mismo patrón que en el número de células inmunoreactivas en cuanto a que la isoforma β del RE presenta mayor intensidad en la inmunoreactividad y esta permanece constante a lo largo de todas las etapas del ciclo estral, contrario a lo que presenta la isoforma α donde es en la etapa del proestro donde se observa la menor intensidad estadísticamente significativa y cambia a lo largo del ciclo (Figura 10).

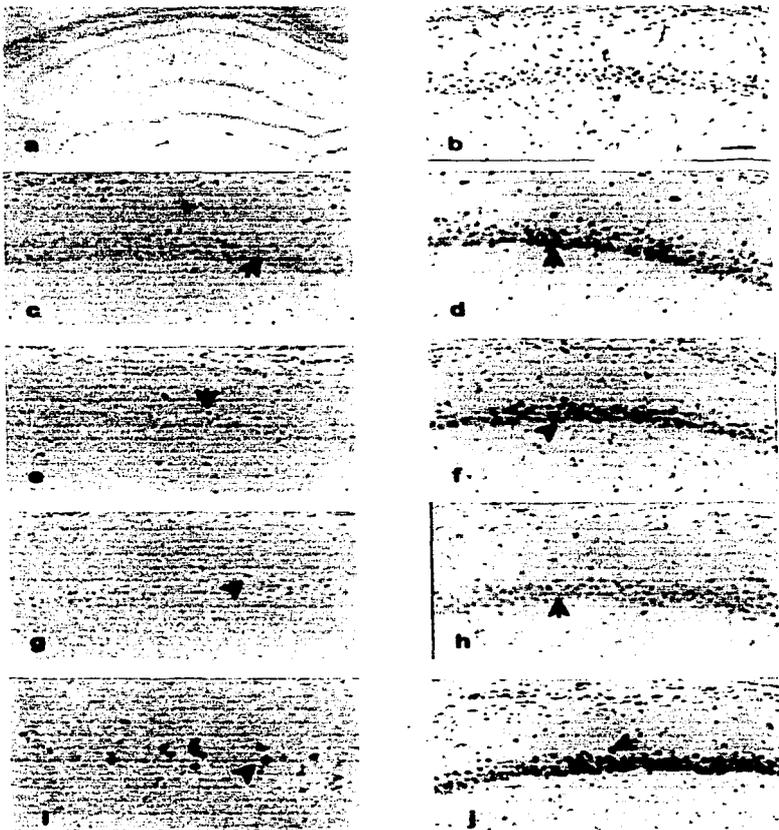


Figura 5. Expresión de la proteína del FEx y FEP en la región CA1 del hipocampo durante el ciclo estroal de la rata. Fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad para el FEx en células piramidales; en el proestro (a), estró (b), metestro (c), y en el diestro (d, e, f). También se observa la inmunoreactividad para el FEP; en todas las etapas del ciclo estroal es mayor que la del FEx. Todas las fotomicrografías a un aumento de 20X. Fotomicrografías de controles negativas de la inmunohistoquímica de la región CA1 del hipocampo con un objetivo 4X (g) y con un objetivo 20X (h). Las flechas indican la inmunoreactividad, la base en los corneales corresponde a 100µm.

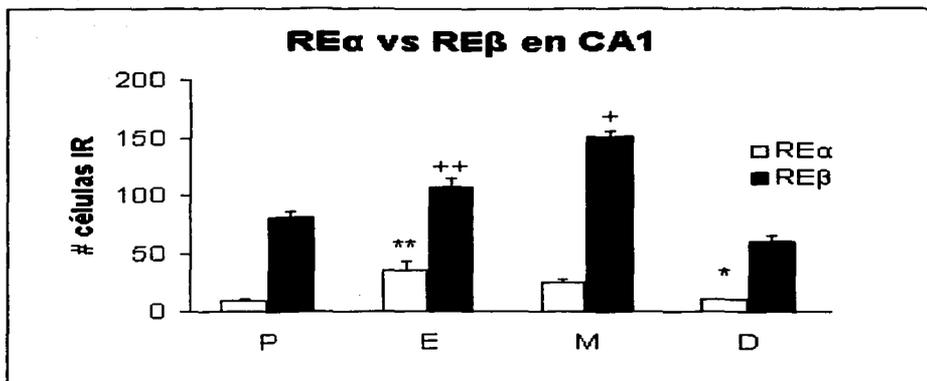


Figura 9. **Cambios en la expresión del RE α y RE β en CA1.** Análisis cuantitativo de la expresión de las isoformas de la proteína de RE en la región CA1 del hipocampo medial en las diferentes etapas del ciclo estral de la rata. * $p < 0.05$ comparado con M y E; ** $p < 0.05$ comparado con D y P; + $p < 0.05$ comparado con D, P y E; ++ $p < 0.05$ comparado con D.

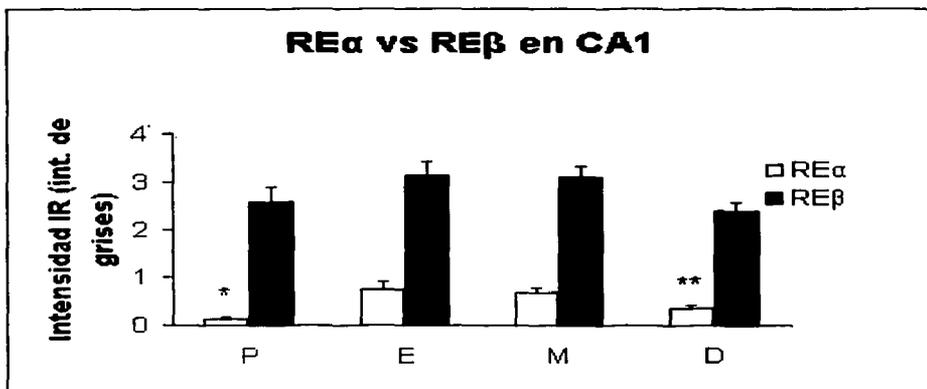


Figura 10. **Cambios en la intensidad del RE α y RE β en CA1 del hipocampo.** Análisis cuantitativo de la intensidad en la inmunoreactividad de la proteína de RE en la región CA1 del hipocampo medial en el ciclo estral de la rata. * $p < 0.05$ comparado con E, M y D; ** $p < 0.05$ comparado con M.

Detección de la proteína del RE α y RE β en CA3.

Se observó mayor inmunoreactividad del RE β en comparación con el RE α en la región CA3 del hipocampo medial y estas diferencias son estadísticamente significativas en el estro y el diestro siendo cuando se dan los dos mínimos en el número de células inmunoreactivas del RE α los otros dos máximos se dan en el proestro y el metaestro sin embargo se puede ver una tendencia de predominio de la isoforma β sobre la α . Por otro lado el número de células inmunoreactivas del RE β es constante a lo largo de las etapas del ciclo estral, salvo en la etapa del diestro cuando se presenta el máximo de células inmunoreactivas, existiendo diferencia significativa con respecto a las otras etapas del ciclo del RE β . En esta región se observó al igual que en la región CA1 que la ubicación de la inmunoreactividad se da en el núcleo celular en ambas isoformas, pero en la isoforma α se da también en el citoplasma (Figura 11). Todo lo anterior se ve reflejado en la grafica 12. En la intensidad de la inmunoreactividad en la región CA3 se pudo observar predominio de la isoforma β sobre la isoforma α , permaneciendo la isoforma β constante a lo largo de las etapas del ciclo, pues no se encontró diferencia significativa, mientras que el RE α presenta diferencias significativas con un máximo de intensidad en el estro y un mínimo de intensidad en el metaestro (Figura 13).

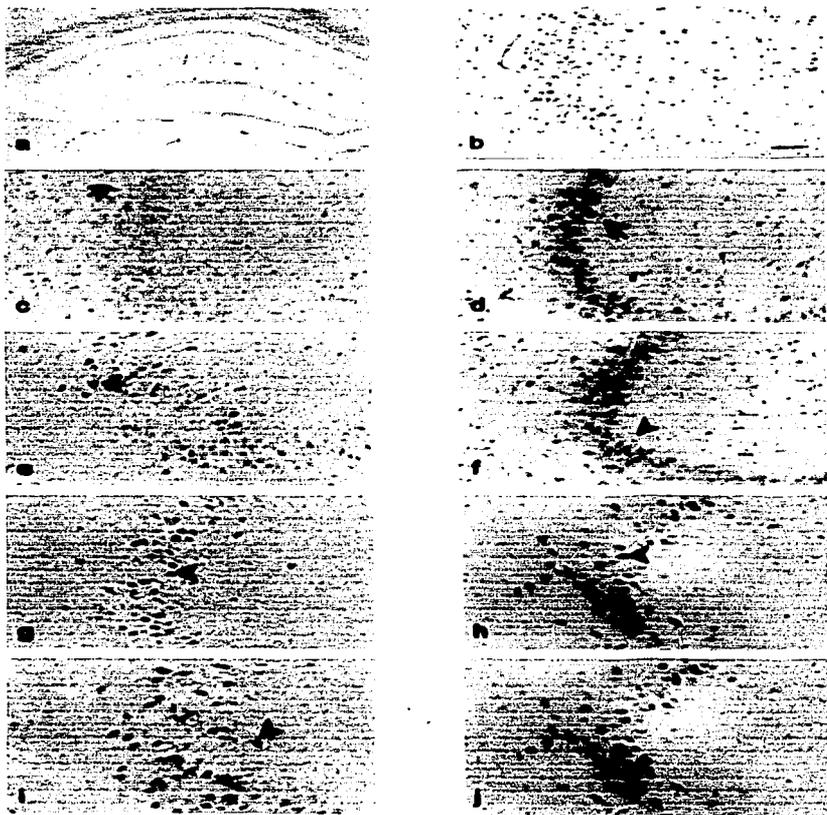


Figura 11. Expresión de la proteína del RIN y RIB en la región CAS del Hipocampo durante el ciclo estral de la ratona. Fotomicrografías representativas de la inmunoreactividad para el RIN en células piramidales; en el proestro (a), estrus (c), metestrus (e), y en el diestro (g). También se observan la inmunoreactividad para el RIB; en el proestro (b), estrus (d), metestrus (f), y en el diestro (h). Se pueden apreciar que la inmunoreactividad del RIB es constante a lo largo del ciclo estral y predomina sobre el RIN. Todas las fotomicrografías a un aumento de 20X. Fotomicrografías de cortes transversales de la inmunohistoquímica de la región CAS del Hipocampo con un objetivo de 4X (a) y con un objetivo de 20X (b). Las flechas indican inmunoreactividad, la barra en los cortes transversales corresponde a 100µm.

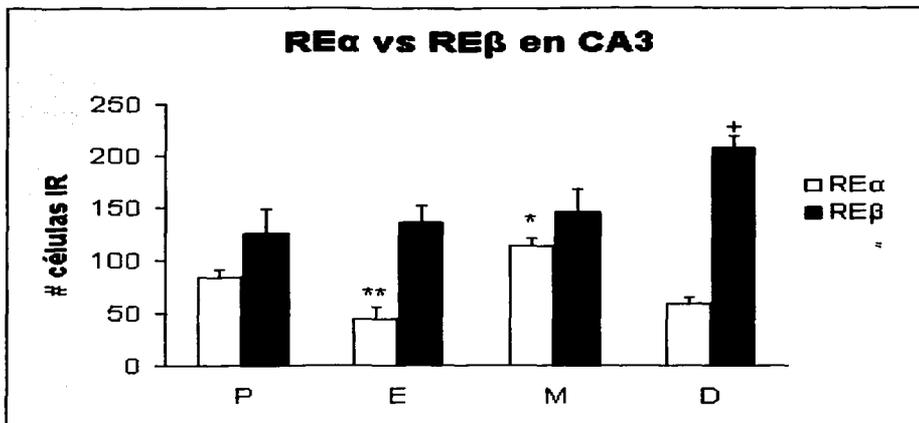


Figura 12. Cambios en la expresión del RE α y RE β en CA3. Análisis cuantitativo de la expresión de la proteína de las isoformas α y β del RE en la región CA3 del hipocampo medial en las diferentes etapas del ciclo estral. * $p < 0.05$ comparado con E y D; ** $p < 0.05$ comparado con P; † $p < 0.05$ comparado con P y E.

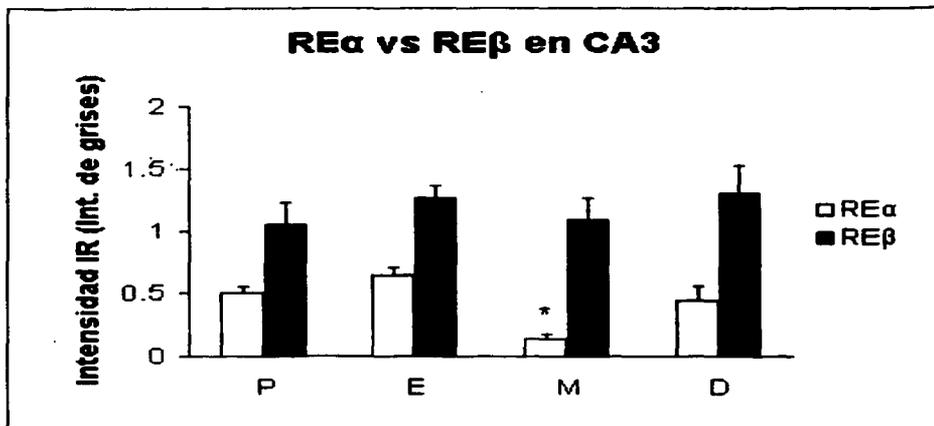


Figura 13. Cambios en la intensidad del RE α y RE β en CA1 del hipocampo. Análisis cuantitativo de la expresión de la proteína de las isoformas α y β del RE en la región CA3 del hipocampo medial en las diferentes etapas del ciclo estral. * $p < 0.05$ comparado con P y E.

Determinación sérica de E₂ y P₄ durante el ciclo estral de la rata.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que durante el proestro se encuentran los niveles más altos de E₂, en comparación con las otras etapas del ciclo estral, y esta diferencia es estadísticamente significativa. Para la progesterona el nivel más alto se observa en el metaestro. Estos datos coinciden con lo reportado en la literatura.

Tabla 1. Valores de hormonas esteroides en suero de rata

	E₂*	P₄*
P	31.47 ± 8.79⁺	2.13 ± 1.35
E	7.53 ± 0.62	6.30 ± 0.58
M	4.00 ± 0.98	12.30 ± 6.50
D	17.37 ± 3.22	6.25 ± 2.75

* Valor promedio y su valor de desviación estándar

+ p > 0.05 comparado con E, M, D.

7. Discusión.

Los estrógenos ejercen su efecto a través de su unión a receptores nucleares específicos activando la transcripción de genes hormonoregulados. Estudios previos han demostrado la expresión del RNAm y de la proteína del RE en el hipocampo de la rata en diversos modelos experimentales; por otro lado se conoce bien la participación del estradiol sobre la densidad dendrítica y sináptica de esta región del hipocampo (Wooley CS y McEwen BS, 1992). Hasta el momento no se ha determinado cuál es la distribución de las isoformas del RE en esta área del cerebro durante el ciclo estral de la rata.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de la proteína del RE β predomina sobre el RE α en las diferentes etapas del ciclo estral de la rata. Experimentos realizados en el útero de la rata indican que el RNAm y la proteína de la isoforma α del RE se regula directamente por E₂ y P₄ en contraste con la isoforma β , la cual no se regula a la baja por estas hormonas (Wang H et al., 1999), además experimentos en hipocampo de ratas hembras y machos establecen que la inmunoreactividad del RE α se ve regulada a la baja por estrógenos (Weiland NG et al., 1997). Estos resultados sugieren que la proteína de la isoforma α del RE se regula a la baja por estrógenos circulantes durante la etapa del estro en CA1 y del diestro en CA3 del hipocampo de la rata. Esto se explica debido a que en estas etapas del ciclo estral se encuentran niveles circulantes basales de E₂ por lo cual el número de receptores aumenta en esta región estudiada. En contraste, la isoforma β del RE no se regula a la baja por estrógenos en esta región.

Estudios in vitro en células de riñón de mono (COS-1), y estudios in vivo en células de ovario de hamster chino han demostrado que la proteína del RE, en ausencia del ligando, tiene una vida media de 5 días y en presencia del ligando tiene una duración de 3 a 4 hrs y esta degradación es tejido específico (Pakdel F et al., 1993). En diversas áreas del SNC en un modelo de ratas OVX tratadas con

hormonas esteroideas y un inhibidor del proteosoma (PSI) se ha observado una regulación tejido específico de la degradación de la proteína del RP, este último, se encuentra dentro de la superfamilia de las hormonas esteroideas cuya estructura es similar al RE (Camacho I et al., 2002). Lo anterior, en nuestro modelo de estudio, podría explicar el porque los niveles de expresión de la proteína del RE α en CA1 en el metaestro y el diestro son bajos, ya que en estas etapas los niveles circulantes de E₂ son bajos se esperaría detectar una expresión similar a la observada en el estro. Esto podría entenderse a través de la degradación de la proteína. En contraste, lo observado para la proteína del RE α en CA3 parece indicar que existe una regulación por estradiol a la alta en las etapas donde los niveles séricos de estradiol son bajos.

Los datos obtenidos para la proteína del RE β en la región CA1 y CA3 del hipocampo son completamente diferentes a lo observado en la proteína del RE α en éstas regiones, Aunque se observa niveles altos de la expresión de la proteína del RE β en las etapas del ciclo donde los niveles de E₂ son bajos, este fenómeno no se aprecia en todas las etapas y lo que sugiere que el RE β no es regulado directamente por hormonas séricas es el hecho de ver que la expresión de la proteína en el proestro es muy similar a la expresión en las etapas en las cuales hay niveles basales de las hormonas séricas. Una posible explicación consiste en que la regulación de la proteína sea regulada por otro tipo de hormonas, se sabe que en el ovario de hamster la FSH estimula la expresión de de ambas isoformas del RE y los estrógenos estimulan la expresión del RE, pero la progesterona inhibe esta acción estrogenica (Yang P et al., 2002).

En este estudio se encontró que la expresión de una misma isoforma presenta un patrón diferente en la región CA1 y CA3 del hipocampo. Una de las explicaciones posibles a lo anterior sería la participación de otros sistemas, entre los cuales se encuentra el de la de neurotransmisión ampliamente estudiado en esta región. Experimentos in vivo e in vitro en mamíferos han demostrado la participación de los receptores a aminoácidos excitadores en la regulación de la

plasticidad sináptica en el hipocampo. El glutamato es uno de los aminoácidos excitadores más importantes en el funcionamiento de los mecanismos celulares y moleculares que participan en funciones cognitivas que se integran en el hipocampo (Murphy DD et al., 1998). En general se conocen dos grandes grupos de receptores agonistas a glutamato. El primer grupo, los ionotrópicos, los cuales funcionan como canales iónicos a Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , un segundo grupo, los receptores metabotrópicos que funcionan a través de proteínas G. Dentro de los receptores ionotrópicos se encuentran los receptores a NMDA que son localizados abundantemente en CA1, mientras que para CA3, los que están presentes son los receptores a AMPA y kainato (Boehm S y Kubista H, 2002). Estas diferencias en el sistema de neurotransmisión en las regiones del hipocampo podría explicar el aumento o disminución de la arborización dendrítica durante los niveles cambiantes de estradiol endógeno durante el ciclo estral de la rata.

Los niveles hormonales endógenos de estradiol durante el ciclo estral influye en el funcionamiento de la unión del ligando al receptor a NMDA en el hipocampo (Cyr M et al., 2001). Por otro lado, se sabe que la presencia de estradiol en cultivo de neuronas piramidales de hipocampo disminuye la inhibición excitatoria debida a GABA logrando una mayor excitabilidad neuronal e induciendo por consiguiente algunos mecanismos para la formación de nuevas espinas dendríticas (Murphy DD et al., 1998). Lo anterior explicaría el porque del comportamiento diferente en la expresión del RE en CA1 y en CA3. Con estos datos se puede sugerir que los efectos del estradiol en hipocampo no sólo deben a su acción directa sobre el RE sino también a través de mecanismos a nivel membranal en los cuales se involucra a los receptores a NMDA.

Hay que entender que difícilmente se han encontrado similitudes en la distribución del RNA mensajero y la proteína de las isoformas del RE en el cerebro de diferentes especies indicando que no se puede generalizar la localización del RE. En la actualidad los anticuerpos para RE tienen que ser más específicos, es decir más selectivos a las variantes del receptor en cuanto a su estructura, pues el no saber si el receptor que se detecta en la inmunohistoquímica tiene diferencias

"
mínimas en su estructura, nos puede hacer caer en conclusiones falsas del funcionamiento del receptor en los diferentes tejidos, lo anterior es por recientes descubrimientos de variantes del RE en ratones knock out (KORE α RE β), parecen tener la misma afinidad por estradiol (Mitra SW et al., 2003).

La importancia de detectar las isoformas α y β del RE durante el ciclo estral de la rata en el hipocampo contribuye a entender el mecanismo de acción del E₂ en la fisiología de la conducta reproductiva del hipocampo de los mamíferos.

8. Conclusiones.

Existen cambios en la expresión de la proteína del RE a lo largo del ciclo estral en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo medial del cerebro de la rata.

En las diferentes etapas del ciclo estral existe un predominio en la expresión de la isoforma β sobre la isoforma α del RE

Para las neuronas de la región CA1 la regulación de la expresión del RE es distinta en comparación con las neuronas de la región CA3.

El número de RE que expresa una sola célula es constante para la isoforma β no así para la isoforma α .

9. Referencias.

- Astwood E B. (1939). Changes in weight and water content of the uterus of the normal adult rat. *Am J Physiol*; 126:162-170.
- Barraclough CA, Collu R, Massa R y Martini L. (1971). Temporal interrelationships between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progesterin concentrations in the rat: Effects of nembutal and exogenous gonadotropins. *Endocr*; 88:1437-1447.
- Beato M, Chavez S y Truss M. (1996). Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*; 61:240-251.
- Beato M y Klug J. (2000). Steroid hormone receptors: An update. *Hum Reprod Update*; 6:225-236.
- Boehm S y Kubista H. (2002). Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacological Reviews*; 54:43-99.
- Brown-Grant K, Exley D y Naftolin F. (1970). Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrus cycle of the rat. *J. Endocr*; 48,295.
- Bunone G, Briand PA, Miksic K RJ y Picard D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the map kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J*; 15:2174-2183.
- Butcher RI, Collins WE y Fugo NW. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β Throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocr*; 94:1704-1708.
- Camacho I, Villamar O, González A y Guerra C. (2002). Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology*; 76:267-271.
- Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*; 10:940-54.

- Civitelli R, Kim YS, Gunsten SL, Fujimori A, Huskey M, Avioli LV y Hruska KA. (1990). Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in osteoblast-like cells. *Endocr*; 127: 2253-2262.
- Clarke CH, Norfleet AM, Clarke MSF, Watson CS, Cunningham KA y Thomas ML. (2000). Perimembrane Localitazation of the estrogen receptor α protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology*; 71:34-42.
- Cyr M, Ghribi O, Thibault C, Morissette M, Landry M y Di Paolo T. (2001). Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors. *Brain Research Reviews*; 37:153-161.
- Danielsen M, Northrop JP, Jonklass J y Ringold GM. (1987). Domains of the glucocorticoid receptor involved in specific and nonspecific deoxyribonucleic acid binding, hormone activation, and transcriptional enhancement. *Mol. Endocr*; 1:816-22.
- De Boland AR y Norman AW. (1990). Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent transcaltachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport). *Endocr*; 127:2475-2480.
- Desmond NL y Levy WT. (1997). Ovarian steroidal control of connectivity in the female hippocampus: an overview of recent experimental findings and speculation on its functional consequences. *Hippocampus*; 7:39-45.
- Don Carlos LL y Handa RJ. (1994). Developmental profile of estrogen receptor mRNA in the preoptic area of male and female neonatal rats. *Develop. Brain Res*; 79(2):283-9.
- Dupon C y Kim MH. (1973). Peripheral plasma levels of testosterone androstenedione and oestradiol during the rat estrous cycle. *J Endocr*; 59:653-654.
- Enmark E y Gustafsson JÅ. (1996). Orphan nuclear receptors—the first eight years. *Mol. Endocr*; 10: 1293-307.
- Eto T, Masuda H, Suzuki Y y Hosi T. (1962). Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in rat ovarian venous blood at different stages in reproductive cycle. *Jpn J Anim Reprod*; 8:34-40.

- **Evans RM. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science; 240:889-95.**
- **Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M y Wehling M. (2000). Multiple actions of steroid hormones- A focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev; 52: 513-555.**
- **Freeman ME. (1988). The ovarian cycle of the rat. En The Physiology of Reproduction, (E Knobil y J Neill, ed) pp 1893, Raven Press, Ltd, New York.**
- **Fuller PJ. (1991). The steroid receptor superfamily: Mechanisms of diversity. FASEB J; 5:3092-3099.**
- **Funder JW. (2000). Aldosterone and mineralocorticoid receptors: Orphan questions. Kidney Int; 57: 1358-1363.**
- **Gay VL y Tomacari RL. (1974). Follicle stimulating hormone in the female rat: Cyclic release is dependent on circulating androgen. Science; 184:75-77.**
- **Gibbs RB. (1998). Levels of trk-A and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. Brain. Res; 787: 259-268.**
- **Goldman BD, Kamberi IA, Sitteri PK y Porter JC. (1969). Temporal relationship of progesterin secretion, LH release and ovulation in rats. Endocr; 85:1137-1143.**
- **Gorbman A y Bern H. (1962). Steroid hormones and steroidogenesis. In: A textbook of comparative endocrinology, 9, (Wileg J. And SMS. Inc.) pp 230-246, New York, USA.**
- **Gore-Langton RE y Armstrong DT. (1988). Follicular steroidogenesis and its control. In: Physiology of reproduction. Knobil E, Neil JD, et al. (Eds) Vol. 1. pp. 331-335. Raven Press Ed. New York.**
- **Gottlicher M, Heck S y Herrlich P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. J. Mol. Med; 76:480-89.**
- **Gould E, Woolley CS, Frankfurt M y McEwen BS. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. J Neurosci; 10:1286-1291.**

- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P y Chambon P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology with v-erb. *Nature (Lond.)* 320:134-139.
- Gustafsson JÅ. (1997). Estrogen receptor beta—getting in on the action? *Nat. Med*; 3:493-94.
- Hartman CG. (1944). Some new observations on the vaginal smear of the rat. *Yale J Biol Med*; 17:99-112.
- Hashimoto I, Hendricks DM, Anderson LL y Melampy RM. (1968). Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocr*; 82:333-341.
- Hashimoto I y Wiest WG. (1969). Correlation of the secretion of ovarian steroids with function of a single generation of corpora lutea in the immature rat. *Endocr*; 84: 873-885.
- Heape W. (1900). The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. *Q J Micr Sci*; 44:1-70.
- Hösli E y Hösli L. (1999). Cellular localization of estrogen receptors on neurones in various regions of cultured rat CNS: coexistence with colinergic and galanin receptors. *Int. J. Devl. Neurosci*; 17:317-330.
- Hösli E, Rühl W y Hösli L. (2000). Histochemical and electrophysiological evidence for estrogen receptors on cultured astrocytes: colocalization with cholinergic receptors. *Int. J. Devl. Neuroscience*; 18:101-111.
- Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L y Horwitz KB. (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol. Endocr*; 11:693-705.
- Jenis LG, Lian JB, Stein GS y Baran DT. (1993). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-induced changes in intracellular pH in osteoblast-like cells modulate gene expression. *J Cell Biochem*; 53:234-239.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D y Chambon P.

- (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science (Wash. DC)*; 270:1491-1494.
- Kritzer MF. (2002). Regional, laminar, and cellular distribution of immunoreactivity for ER α and ER β in the cerebral cortex of hormonally intact, adult male and female rats. *Cerebral Cortex.*; 12:116-128.
 - Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S y Gustafsson J-A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:5925-5930.
 - Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR y Chambon P. (1987). Functional domains of the estrogen receptor. *Cell*; 51:941-951.
 - Kumar V, Green S, Staub A y Chambon P. (1986). Localisation of the estradiol binding and putative DNA-binding domains of the estrogen receptor. *EMBO J*; 5:9931-9936.
 - Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C y Rivest S. (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiology*; 36(3):357-78.
 - Landers JP y Spelsberg TC. (1992). New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Euk. Gene Express*; 2, 19.
 - Lazar MA. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*; 14:184-93.
 - Lees JA, Fawell SE y Parker MG. (1989). Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *Nuc. Acid Res*; 17:5477-88.
 - Lefstin JA y Yamamoto KR. (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature*; 392:885-88.
 - Long J A y Evans H M. (1922). The estrous cycle of the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif*; 6:1-148.
 - Mandl AM. (1951). The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *J Exp Biol*; 28:576-584.

- Mandl AM. (1951). Cyclical changes in the vaginal smear of adult ovariectomized rats. *J Exp Biol*; 28:585-592.
- Menasce LP, White GR, Harrison CJ y Boyle JM. (1993). Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and simple post-FISH banding technique. *Genomics*; 17: 263-265.
- Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP y Alves SE. (2001). Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *The J of comparative neurology*; 429:355-371.
- Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS y Alves SE. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α . *Endocr*; 144(5):2055-2067.
- Murphy DD y Segal M. (1996). Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci*; 16: 4059-4068.
- Murphy DD, Cole NB, Greenberger V y Segal M. (1998). Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neurosci*; 18: 2550-2559.
- Murphy DD, Cole NB y Segal M. (1998). Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 95:11412-11417.
- Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL y O'Malley BW. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 96:1858-1862.
- Nequin LG, Alvarez J y 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.
- Nordeen SK, Moyer ML y Bona BJ. (1994). The coupling of multiple signal transduction pathways with steroid response mechanisms. *Endocr*; 134:1723-1732.

- Pakdel F, Le Goff P y Katzenellenbogen BS. (1993). An assessment of the role of domain F and PEST sequences in estrogen receptor half-life and bioactivity. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 46(6):663-72.
- Piacsek BE, Schnaider TC y Gay VL. (1971). Sequential study of luteinizing hormone (LH) and "progesterin" secretion on the afternoon of proestrus in the rat. *Endocrinology*; 89:39-45.
- Robertson D, Willy P, Heyman R y Mangelsdorf D. (1997). In *nuclear orphan receptors: Scientific Progress and Therapeutic Opportunities*, ed. J. Bristol, pp. 251-60. New York: Academic.
- Shaikh AA y Shaikh SA. (1975). Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. *Endocr*; 96:37-44.
- Smith MS, Freeman ME y Neil 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. *Endocr*; 96: 219-226.
- Shaikh AA. (1971). Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod*; 5:297-307.
- Shughrue PJ, Sar M y Stumpf WE. (1992). Progesterin target cell distribution in forebrain and midbrain regions of the 8-day postnatal mouse brain. *Endocr*; 130(6):3650-9.
- Shughrue PJ, Komm B y Merchenthaler I. (1996). The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*; 61(12):678-81.
- Shughrue PJ, Lane MV y Merchenthaler I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp. Neurology*; 388(4):507-25.
- Shughrue PJ, Scrimo PJ, y Merchenthaler I. (2000). Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER α and ER β) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience*; 96:41-49.

- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M y Swanson LW. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurology*; 294(1):76-95.
- Sluysen M, Rijkers AW, de Goeij CC, Parker M y Hilkens J. (1988). Assignment of estradiol receptor gene to mouse chromosome 10. *J. Steroid Biochem*; 31: 757-761.
- Sohrabji F, Miranda RC y Toran-Allerand CD. (1995). Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 92:11110-11114.
- Sylvia VL, Schwartz Z, Schuman L, Morgan RT, Mackey S, Gomez R y Boyan BD. (1993). Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D₃ metabolites in chondrocyte cultures. *J Cell Physiol*; 157:271-278.
- Szpirer C, Szpirer J, Tissir F, Stephanova E, Vanvooren P, Kurtz TW, Iwai N, Inagami T, Pravenec M, Kren V, Klinga-Levan K y Levan G. (1997). Rat Chromosome 1: regional localization of seven genes (Slc9a3, Srd5a1, Esr, Top1, Grik5, Tnnt3, Jak2) and anchoring of the genetic linkage map to the cytogenetic map. *Mammalian Genome*; 8:657-660.
- Taylor AH, y Al-Azzawi F. (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocr*; 24:145-155.
- Telegdy G y Endroczi E. (1963). The ovarian secretion of progesterone and 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one in rats during the estrous cycle. *Steroids*; 2: 119-123.
- Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E y Chambon P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*; 59(3):477-87.
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F y Giguère V. (1997). Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor. *Mol. Endocr*; 11: 353-365.
- Verrey F. (1998). Early aldosterone effects. *Exp Nephrol*; 6:294-301.
- Villee CA. (1988). *Biología 7°ed.* McGraw-Hill. México.

- Uchida K, Kadowaki M y Miyake T. (1969). Ovarian secretion of progesterone and 20 α -hidroxypregn-4-en-3-one during rat estrous cycle in chronological relation to pituitary release of luteinizing hormone. *Endocr Jpn*; 16:227-237.
- Wang H, Masironi B, Eriksson H y Sahlin L. (1999). A comparative study of estrogen receptors alpha and beta in the rat uterus. *Biol Reprod*; 61(4):955-64.
- Washburn SA, Lewis CE, Johnson JE, Voytko ML y Shively CA. (1997). 17 α dihydroequilenin increases hippocampal dendritic spine density of ovariectomized rats. *Brain Res*; 758:241-244.
- Wehling M, Kasmayr J, y Theisen K. (1990). Aldosterone influences free intracellular calcium in human mononuclear leukocytes in vitro. *Cell Calcium*; 11:565-571.
- Wehling M, Bauer MM, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon CB y Christ M. (1996). Nongenomic effects of aldosterone on intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 223: 181-186.
- Weiland NG, Orikasa C, Hayashim S y McEwen BS. (1997). Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J. Comp. Neurol*; 388:603-612.
- Woolley CS, Gould E, Frankfurt M y McEwen BS. (1990). Naturally-occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci*; 10:4035-4039.
- Woolley CS y McEwen BS. (1992). Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J. Neurosci*; 12:2549-2554.
- Woolley CS y McEwen BS. (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J. Comp. Neurol*; 336:293-306.
- Woolley CS y McEwen BS. (1994). Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor dependent mechanism. *J. Neurosci*; 14:7680-7687.

- Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS y Schwartzkroin PA. (1997). Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J. Neurosci*; 17:1848-1859.
- Woolley CS. (1998). Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav*; 34:140-148.
- Woolley CS. (1999). Effects of estrogen in the CNS. *Current Opinion in Neurobiology*; 9:349-354.
- Yang P, Kriatchko A y Roy SK. (2002). Expression of ER α and ER β in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and ovarian steroid hormones. *Endocr* 143(6):2385-2398.
- Yokosuka M, Okamura H y Hayashi S. (1997). Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat. *J. Comp. Neurology*; 389(1):81-93.
- Yoshinaga K, Hawkins RA y Stocker JF. (1969). Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocr*; 85:103-112.

10. Apéndice.

Abreviaturas

20 α -OH-P, 20 hidroxiprogesterona

BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro

CBP, proteína de enlace de CREB

CREB, elemento de respuesta cAMP uniendo la proteína

DAX-1, receptor huérfano ligado al X

DBD, dominio de unión al DNA

DNA, ácido desoxiribonucleico

E₂, estradiol

EcR, receptor a ecdisona

ERA, elemento de respuesta a andrógenos

ERH, elementos de respuesta a hormona

ERM, elemento de respuesta a mineralocorticoides

ERP, elemento de respuesta a progesterona

ER α , receptor estrógenos α

ER β , receptor a estrógenos β

FSH, hormona folículoestimulante

GABA, ácido γ -aminobutírico

GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas

GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides

HspBD, dominio de unión a proteínas de choque térmico "Heat shock"

LBD, dominio de unión al ligando

LH, hormona luteinizante

NGFI, receptor al factor-inducido de crecimiento nervioso

NMDA, N-metil-D-aspartato

OVX, ovariectomizadas

P₄, progesterona

PPAR, receptor activador de proliferación de peroxisomas

RA, receptor a andrógenos
RAR, receptor a ácido retinoico
RE, receptor a estrógenos
RG, receptor a glucocorticoides
RM, receptor a mineralocorticoides
RNA, ácido ribonucleico
RNA_m, RNA mensajero
RP, receptor a progesterona
RXR, receptor ácido 9-cis-retinoico
SNC, Sistema Nervioso Central
SF-1, factor 1 esteriogénico
TR, receptor a tirosina
VDR, receptor a vitamina D

Soluciones

Deshidratación de cerebros

- ⇒ Lavar con agua por 3h***
 - ⇒ Etanol 50% por 12h***
 - ⇒ Etanol 50% por 1h***
 - ⇒ Etanol 70% por 1h***
 - ⇒ Etanol 80% por 1h***
 - ⇒ Etanol 90% por 1h***
 - ⇒ Etanol 96% por 1h***
 - ⇒ Etanol 100% por 1h***
 - ⇒ Etanol 100% por 1h***
 - ⇒ Etanol/Xilol por 1h***
 - ⇒ Xilol por 1h***
 - ⇒ Xilol por 12h***
 - ⇒ Parafina líquida (60°C) por 2h***
 - ⇒ Parafina líquida (60°C) por 6h***
- * con agitación constante.**

Eosina

Solución stock

Eosina Y	10g
Agua destilada	200mL
Etanol 96%	800mL

Se mezcla en frío y se filtra, filtrar cada que se utilice.

Para usarse: 375 mL de etanol 80%, 25 mL de la solución stock y 2.5 mL de ácido acético glacial 5% v/v.

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina	1g
Oxido rojo de mercurio	0.5g
Alumbre (sulfato de aluminio, amonio o potasio)	20g
Etanol absoluto	10mL
Agua destilada	200mL

Disolver la hematoxilina en el etanol a baño maría y tapado; por otra parte disolver el alumbre en la mitad de agua destilada, se mezclan ambas soluciones y se les adiciona el resto de agua. Al hervir se le adiciona el óxido de mercurio (cuidado) hasta coloración rojo púrpura; enseguida se enfría con hielo y se filtra 10 veces. Se le agregan 3-5 gotas de ácido acético por cada 10 mL de solución. Filtrar antes de usar.

..

PBS

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g
H ₂ O destilada	c.p.b. 1L
pH 7.4	

Solución de poly-L-lisina

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de poly-L-lisina en tris-HCl 10 mM (1.5764g en 1000 mL de agua destilada o desionizada) a pH 8, almacenar a 4°C, se recomienda utilizar en los 15 días siguientes de su preparación.



**Sociedad Mexicana
de Biología del Desarrollo. A.C.**

V CONGRESO NACIONAL
24-26 DE SEPTIEMBRE DE 2001
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA-UNAM
CAMPUS JURIUQUILLA

COMITÉ ORGANIZADOR:

Dra. Raquel Trejo Albarrán
Presidenta SMBD
UIMEO-IMSS

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar
Vicepresidente SMBD
CNI3-UNAM

PATROCINADORES:

Coordinación de la Investigación Científica-UNAM
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN
Centro de Neurobiología-UNAM
Campus Juriquilla
Nestlé México. S.A. de C.V.

R5. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS α Y β DEL RECEPTOR A ESTROGENOS EN EL HIPOTALAMO Y ÁREA PREOPTICA DE LA RATA HEMBRA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL.

Arrieta, I., Mendoza-Rodríguez, C.A., Díaz-Ibáñez, L.B., Mendoza-Garcés, L. y Cebón M.A. Facultad de Química, Departamento de Biología, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F. Tel: (52) 5622-3098. Fax: (52) 5616-2010. E-mail: arrieta@servidor.unam.mx

Los estrógenos participan en la regulación de diversas funciones del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos como es la neurogenesis, la diferenciación sexual y la plasticidad neuronal. La acción de los estrógenos está mediada por receptores intracelulares específicos. Se han caracterizado dos isoformas para el receptor a estrógenos (RE): el RE α y el RE β . Ambas isoformas poseen diferentes propiedades funcionales y muestran distintos patrones de distribución y regulación en diversas áreas del SNC. Sin embargo, aun se desconocen muchos de los mecanismos por medio de los cuales el estradiol regula la diferenciación sexual del cerebro. El propósito de este estudio fue conocer los cambios en la expresión de las isoformas α y β del receptor a estrógenos en el hipotálamo y área preóptica de la rata hembra durante el desarrollo postnatal. Se utilizaron ratas hembras recién nacidas de la cepa Wistar, que fueron mantenidas con sus madres hasta que fueron sacrificadas o hasta el día del destete. Se formaron 6 grupos, cada grupo de 4 animales que fueron sacrificados en diferentes días del desarrollo postnatal: DP1, DP5, DP10, DP14, DP21 y DP30. Se obtuvieron los cerebros, se deshidrataron e incluyeron en parafina y se hicieron cortes de 6 μ m e inmediatamente se procedió a realizar la inmunohistoquímica para detectar la proteína del RE α y del RE β . Los resultados muestran que el RE β se expresa más que el RE α en el núcleo preoptico medial, el núcleo ventromedial del área preóptica, el núcleo paraventricular y ventromedial del hipotálamo, así como en el núcleo arcuato. Esta expresión del RE β se observa intensamente en el DP1, DP14, DP21 y DP30 en comparación con el DP5 y DP10. Estos resultados sugieren que el estradiol ejerce sus efectos en el área preóptica y el hipotálamo primordialmente a través del RE β y probablemente esta distribución específica en algunos núcleos del área preóptica y del hipotálamo están relacionadas con la función del receptor a estrógenos en la fisiología reproductiva normal del animal adulto.

R6. PATRONES DIMÓRFICOS SEXUALES EN EL CEREBRO Y EN EL CEREBELO DE LA CREATINA CINASA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL HASTA EL ENVEJECIMIENTO DE LA RATA WISTAR.

Jiménez, E. y Ramírez, O. Depto. de Bioquímica, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07000, México, D.F. Apdo. Postal 14-740. Tel: (52) 5747-7000 ext. 5222 ó 5216 Fax: (52) 5747-7083. E-mail: ejimenez@mail.cinvestav.mx

Durante el desarrollo postnatal, la madurez y el envejecimiento, el cerebelo y el cerebro sintetizan de una manera dependiente de sexo la enzima citosólica catalíticamente activa creatina cinasa (CKc) en sus variedades muscular (MM) y cardíaca (MB), además de la anódica, supuestamente única y específica del cerebelo de vertebrados, la BB-CK. En ambos sexos, isoenzimas de la CKc cerebrales típicas y atípicas estuvieron presentes a lo largo del estudio. En el cerebro, las hembras mostraron un 26% más de variantes isoenzimáticas que los machos y en el cerebelo un 93 %. En el presente trabajo se muestra que en el cerebro y en el cerebelo de la rata la producción de ATP por transfosforilación anaeróbica a través del sistema CK/PC es específico de sexo y de edad, especialmente en el cerebelo cuando la glicólisis y el ciclo de Krebs pierden capacidad. Como en el corazón de rata, bajo condiciones fisiológicas a todas las edades las isoenzimas de la CKc pueden participar de manera específica de género, en favor de las hembras, en diversas funciones de los diferentes compartimentos celulares de las células gliales y neuronales con respecto a su alta y fluctuante demanda energética, no cubierta completamente por la glicólisis anaeróbica y aeróbica. La relación diferencial sexual de la actividad específica de la CKc cerebelo/cerebro desde los 60 días hasta los 2 años 4 meses (senectos) siempre estuvo a favor de las hembras.





**THE 5th INTERNATIONAL CONGRESS OF
NEUROENDOCRINOLOGY**

**The 5th International Congress
of Neuroendocrinology**

31 August--1 September 2002, Bristol, UK

Advance Abstracts of Papers

published by
BioScientifica



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

P341

Control of prolactin secretion in the rat: Effect of hypothalamic blockade of the prolactin signal transduction pathway
 J. Lawson¹, M. Niswamy², A. Deam¹, H. Lawson¹, B. Wakelny¹, & J. Leineweber¹
¹Department of Anatomy, University of Bristol, Bristol, UK; ²University Research Centre for Neuroendocrinology, University of Bristol, Bristol, UK

Dopamine (DA) acts centrally within the hypothalamus to regulate a variety of hormones, but not the control of prolactin secretion. PRL is secreted through the pituitary via specific receptors (PRL-R) located in distinct hypothalamic regions including the median MCH and supraoptic (SON) nuclei. Binding of PRL to the receptor (PRL-R) is followed by activation of the JAK2/STAT signal transduction pathway. We have previously shown that in the rat, peripheral injections of ovine PRL and PRL-R antisera into the SON, but not into the ARC and SON. In this preliminary study, we used a dopamine receptor antagonist of the PRL-R (muprePRL-R) in an anatomical series to investigate the effect of blocking PRL signalling on endogenous PRL secretion following aPRL administration. Male rats were anaesthetised and intracerebral injections administered either the rostral (PRL-R arc 5) or the midPRL-R (arc 5) were stereotactically injected into the rostral or mid hypothalamus. After 7 days, all animals received aPRL (100 µg, s.c.) and 2 or 3 rats were killed in late afternoon. In one animal group, brains were fixed for immunohistochemistry. The remaining animals were decapitated, trunk blood was collected for plasma PRL. In all animals in the brain spots, removed and the ARC and SON dissected out. Arc 5 or SON PRL-R mRNA were extracted and subjected to Northern blot analysis. Immunoprecipitation with aPRL-R antibody revealed expression of the muprePRL-R in the injection site (rostral STAT5 activation was significantly decreased in the SON by midPRL-R treatment (1.17 pg/mg protein vs 1.87 pg/mg protein, P < 0.05), whereas in the ARC, no significant effect was detected (1.26 pg/mg protein vs 1.06 pg/mg protein, NS). Unexpectedly, mean plasma PRL concentrations were significantly decreased by midPRL-R treatment (1.44 pg/ml plasma vs 1.92 pg/ml plasma, P < 0.05). Thus, expression of muprePRL-R in the MID blocks PRL signalling in the SON, and apparently results in a decrease in endogenous PRL secretion in rats treated with exogenous PRL.

P342

The immunolocalization of melanocortin 5 receptors (MCR5) in the female rat hypothalamus

H. Nairn¹, J. Bell¹, & C.A. Wilson²

¹Department of Physiology and ²Obstetrics & Gynaecology, St George's Hospital Medical School, Cranmer Terrace, London, UK

It has been suggested that the behavioural effects of melanin-concentrating hormone (MCH) may be mediated via the melanocortin 5 receptor (MCR5) in the hypothalamus. The aim of the present study was to determine if the pattern of expression changes of different melanin-concentrating hormone receptor subtypes (MCR1-5) mRNA was associated by RT-PCR or hypothalamic cDNA immunohistochemistry was then performed on sections from serial sections of hyp. thin slices taken from ovariectomized or ovariectomized rats with a progesterone antagonist (Mibolone). In particular, sections of the telencephalon were taken from the PVN, dorsal part of the PVN, the arcuate nucleus, the median eminence and the supraoptic nucleus. There were very few immunopositive cells in the central medial nuclei (VMN). The relative densities of immunopositive cells in the areas of the hypothalamus were then compared to immunopositive cells which were immunoreactive to progesterone. Initial data were similar and brains were collected on progesterone and administration of progesterone and Mibolone. Data obtained and independent sexes assessed the immunolocalization of MCR5 in each region. There was no significant difference in immunolocalization of MCR5 in any hypothalamic areas except the VMN in brains collected on the ovariectomized or progesterone. The pattern in the other groups was relatively low immunoreactive cells. In contrast, MCR5 expression was present in the hypothalamus and other areas during the rat oestrous cycle (J. Neuroendocrinology 2000; 31: 217-224).

P343

Paracrine regulation of gonadotrophin and prolactin secretion: Assessment of LH, FSH, and prolactin-receptor gene and protein expression within the ovine and equine pituitary glands
 J. Henderson¹, J. Townsend¹, M. Gregory², & D. Fortmeyer²
¹Department of Anatomy, University of Bristol, Bristol, UK

Previous studies have provided morphological and embryonic evidence for a paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in photoperiodic species. In both the sheep and the horse, we recently showed an effect of prolactin (PRL) on the gonadotroph response to GnRH *in vitro*, as well as a stimulatory effect of GnRH on PRL secretion. Here, we investigated the expression of LH receptor (LH-R), FSH-R and PRL-R within the ovine and equine pituitary gland to further examine the nature of the above mentioned paracrine mechanisms. In addition, the expression of S100 protein, a marker of folliculostellate cells, was investigated. Sheep and horse pituitaries were collected during the sexually active and inactive phases of the annual reproductive cycles. Gonadotrophin and PRL-R gene expression was examined by RT-PCR using primers designed from the respective complementary cDNA sequences. Protein expression of LH-R, FSH-R, PRL-R and S100 was determined by Western blot analysis and immunohistochemistry using specific antibodies. The results revealed that gonadotrophin receptors for either LH or FSH are not expressed in either the ovine or equine pituitary gland. In contrast, PRL-R mRNA and protein expression were detected in both species. Furthermore, the cDNA fragments amplified in the sheep and horse pituitaries were of the same size. In both species, S100 protein was abundantly expressed in the pars distalis, zona infundibularis and pars infundibularis of the pituitary. These findings support the hypothesis proposing a role of PRL in the immunopituitary regulation of gonadotrophin secretion. In addition, the results reveal that the reported stimulatory effects of GnRH on PRL release are unlikely to be mediated by LH or FSH, and thus may result from either a direct action of GnRH within the lactotroph, or an indirect mechanism involving a mediatory cell type such as folliculostellate cells.

P344

Changes in estrogen receptor beta expression in the hippocampus during the oestrous cycle of the rat

A. Aranda¹, E. Mendoza-García², & M.A. Corbin¹

¹Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

It is well known that estrogens participate in the development and differentiation of the central nervous system (CNS), mainly in sexual differentiation and neuronal plasticity. Estrogen action is mediated via nuclear estrogen receptors (ER). Two main ER isoforms have been described, ER alpha and ER beta. These isoforms possess different functions, tissue distribution, and regulation in different areas of the CNS. The aim of the present study was to assess by immunohistochemistry ER beta expression in the hippocampus during the oestrous cycle of the rat. Cycling Wistar female rats were used. Rats were sacrificed at different days of the oestrous cycle: estrus (E), proestrus (Pr), metestrus (M) and diestrus (D). Brains were removed, fixed, dehydrated and paraffin embedded. Slides of 10 micrometers were obtained and ER beta was detected by immunohistochemistry. The results indicate that ER beta markedly changed during the different days of the oestrous cycle in the hippocampus. This ER isoform was highly expressed in hippocampal areas CA2 and CA3 during M and D days. In contrast, during E and F days ER beta immunolocalization was detected in CA1. The overall results indicate that ER beta plays a role in the function of the hippocampus in the different areas of the hippocampus during the oestrous cycle of the rat. This work was supported in part by a CONACYT grant (4306) to Isabel Arrieta, a CONACYT scholarship.

ESTAS TESIS SON
 FALLA DE ORIGEN
 ESTAS TESIS NO SE
 VENDEN EN LA BIBLIOTECA

**ASOCIACIÓN MEXICANA DE
BIOLOGÍA MOLECULAR EN MEDICINA**

V CONGRESO NACIONAL

**PROGRAMA
Y
RESÚMENES**



26 AL 29 DE JUNIO DEL 2002

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES
AGUASCALIENTES, AGS.**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS ALFA Y BETA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA DURANTE EL CICLO ESTRAL

Mendoza-Garcés L., Arrieta I. y Corbón M.A. † Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

Se sabe bien que los estrógenos participan en la regulación de diversas funciones del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos como es la neurogénesis, la diferenciación sexual y la plasticidad neuronal. La acción de los estrógenos está mediada por receptores intracelulares específicos y hasta el momento se han caracterizado dos isoformas para este receptor: el RE-alfa y el RE-beta, ambas isoformas poseen diferentes propiedades funcionales y muestran distintos patrones de distribución y regulación en diversas áreas del SNC. El objetivo de este estudio consistió en determinar la expresión de las dos isoformas (alfa y beta) del receptor a estrógenos (RE) en el hipocampo de la rata durante las diversas etapas del ciclo estral. Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar que fueron sacrificadas a las 9:00 hrs en diversas etapas del ciclo estral: estro (E), proestro (P), diestro 1 (D1) y diestro 2 (D2). Inmediatamente se obtuvieron los cerebros que fueron fijados y deshidratados y embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 10 μ m. Se detectó la proteína de cada una de las isoformas del RE-alfa y RE-beta utilizando inmunohistoquímica con anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos muestran cambios en el patrón de expresión de la proteína para ambas isoformas del RE en el hipocampo en las diferentes etapas del ciclo. La isoforma del RE-beta es la que más se expresa en CA2 y CA3 del hipocampo en la etapa del D1 y D2 en comparación con la expresión del RE-alfa en estas regiones, la cual es menor. En la etapa del E y P se observó inmunoreactividad para el RE-beta en la región CA1, en contraste el RE-alfa fue detectado débilmente en esta región. Estos datos sugieren que la regulación de ambas isoformas del RE en el hipocampo es modificada por las diferentes concentraciones hormonales en las diversas etapas del ciclo estral de la rata y seguramente median efectos diferentes.

Este proyecto fue financiado en parte por CONACYT (proyecto 34861-N). Isabel Arrieta es becaria del CONACYT.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**