



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Expresión asimétrica de la GnRH y del receptor a
estrógenos en POA-AHA durante el ciclo estral de la rata
Posible participación del sistema colinérgico.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

PAOLA REBECA ARTEAGA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

MÉXICO

m344098

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

∞ Una nueva idea se considera, de entrada, ridícula, y más tarde se desestima por trivial, hasta que por fin se convierte en lo que todo mundo sabe.

William James

DEDICATORIAS

Dedico con todo mi amor esta tesis a mi pequeña hija Andrea quien llena mi vida de alegría y esperanza.

A mi mamá Lulú y a mi hermana Carla por ser los pilares que sustentan mi existir.

A mis padres Aurelio y Rebeca por ser un ejemplo de vida y de amor para todos.

A mis tias Sara, Clavel, Bety, Blanca, Gloria y Juanita por darle a mi vida la alegría y apoyo para seguir adelante.

A mi tío Julio por saber ser un buen tío.

A mis primos Sandra, Fabián, Viris, Oscar, Iván, Bety, Jorge, Israel, Aldo, Montse y Daniela, por quererme tanto.

Muy especialmente a mi gran maestro y amigo de siempre, Ing. Raúl Sandoval por compartir conmigo sus conocimientos tanto académicos como de vida; gracias.

A toda mi familia, tanto a los que todavía están aquí, como a los que partieron antes.

A Dios por permitirme el seguir viviendo para disfrutar la vida misma.

AGRADECIMIENTOS

- Quiero agradecer a los Doctores Ma.Esther Cruz, Marco Antonio Cerbón y Roberto Domínguez Casalá por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y, sobre todo, por su invaluable ayuda y apoyo sin los cuales mi formación académica y profesional seria incompleta.
- Al Dr. Antonio Velázquez y a la Dra. Cristina Mejía por su invaluable apoyo al proporcionarme un espacio en sus laboratorios de la torre de investigaciones del Instituto Nacional de Pediatría, para realizar mis experimentos durante la huelga en la UNAM.
- A todos los sinodales por el tiempo dedicado a la revisión y corrección de esta tesis.
Dr. Alonso Fernández Guasti
Dra. Rosalinda Guevara
Dr. Roberto Domínguez Casalá
Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán
Dr. Marco A. Sánchez Ramos
Dra. Ma. Elena Zambrano
Dr. Enrique Pedernera Asteguiano
- A los integrantes del laboratorio 202 de Endocrinología Molécula de la Facultad de Química.
- A todos los integrantes del laboratorio L-323 de la UIBR así como al personal del bioterio de la FES Zaragoza campus II.
- A Isabel Arrieta y a Adriana Mendoza por enseñarme a utilizar las técnicas de RT-PCR e inmunohistoquímica las cuales fueron empleadas para la realización de esta tesis.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U.N.A.M. en colaboración con el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Química, U.N.A.M.

y se basa en los siguientes artículos

- **Paola R. Arteaga-López**, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Carmen A. Mendoza-Rodríguez, and María Esther Cruz (2003) **Differential mRNA Expression of Alpha and Beta Estrogen Receptor Isoforms and GnRH in the Left and Right Side of the Preoptic and Anterior Hypothalamic Area During the Estrous Cycle of the Rat.** *Endocrine*, vol. 21, no. 3, 251–260, August.
- **Paola R. Arteaga-López**, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Isabel Arrieta, Carmen A. Mendoza-Rodríguez, and María Esther Cruz (2004) **Effects cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the preoptic and anterior hypothalamic area of cyclic female rats.** (Enviado a publicar)

Para la realización de esta tesis se contó con el siguiente apoyo financiero:

- *Beca de Doctorado otorgada por CONACYT 121846*
- *Proyecto de investigación CONACYT IN-2785*

ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La presentación escrita del trabajo de investigación se organizó en tres capítulos, una discusión general, un modelo general, conclusiones, expectativas, bibliografía y un apéndice con las técnicas empleadas.

PRIMER CAPITULO.– Este capítulo está destinado a la investigación inicial sobre la expresión del ARNm de GnRH y de las isoformas α y β del receptor a estrógenos en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA, durante el ciclo estral de la rata intacta. Este capítulo incluye los antecedentes, el planteamiento del problema, la hipótesis, así como los objetivos propuestos para llevar a cabo la investigación. Al final del capítulo se presenta el artículo que se publicó como resultado de este primer objetivo

- **Paola R. Arteaga-López, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Carmen A. Mendoza-Rodríguez, and María Esther Cruz (2003) Differential mRNA Expression of Alpha and Beta Estrogen Receptor Isoforms and GnRH in the Left and Right Side of the Preoptic and Anterior Hypothalamic Area During the Estrous Cycle of the Rat. *Endocrine*, vol. 21, no. 3, 251–260, August.**

SEGUNDO CAPITULO.– En este capítulo se estudiaron los efectos del bloqueo del sistema colinérgico sobre la máxima expresión del ARNm de los genes estudiados. Por último se analizó la expresión de la proteína del receptor a estrógenos en ambos lados de POA-AHA durante el ciclo estral en la rata intacta, así como en la rata tratada para bloquear el sistema colinérgico. Al igual que el capítulo anterior está organizado en antecedentes, planteamiento del problema, hipótesis, objetivos y como resultado se presenta el artículo

- **Paola R. Arteaga-López, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Isabel Arrieta, Carmen A. Mendoza-Rodríguez, and María Esther Cruz (2004) Effects cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the preoptic and anterior hypothalamic area of cyclic female rats.. (Enviado a publicar)**

La **DISCUSIÓN GENERAL** retoma y une las discusiones presentadas en cada artículo dando forma y origen a un **MODELO GENERAL** en donde se representa de manera esquemática la forma en que funcionaría y se regularía el sistema estudiado.

Por último en el **APÉNDICE** se describen las técnicas empleadas en estos estudios.

INDICE

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
Agradecimientos.....	i
Dedicatoria.....	ii
Apoyos.....	iii
Indice.....	iv-viii
Resumen.....	ix
Summary.....	x
Primer Capítulo	
ANTECEDENTES	
❖ Hormona Liberadora de las Gonadotropinas y Receptor a Estrógenos	1-9
❖ Asimetrías neuroendocrinas.....	10-11
Justificación del estudio.....	12
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	12
Resultados	13
• Paola R. Arteaga-López, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Carmen A. Mendoza-Rodríguez, and María Esther Cruz (2003) Differential mRNA Expression of Alpha and Beta Estrogen Receptor Isoforms and GnRH in the Left and Right Side of the Preoptic and Anterior Hypothalamic Area During the Estrous Cycle of the Rat. <i>Endocrine</i> , vol. 21, no. 3, 251–260, August.	14-23
Cuadro 1.- Resumen de la máxima expresión del ARNm de GnRH, ER- α y ER- β en el lado izquierdo y derecho de POA-AHA durante el ciclo estral.....	24
Segundo Capítulo	
ANTECEDENTES	
• Los sistemas de neurotransmisión y su participación en la regulación de las funciones reproductoras.....	25-35
• Asimetrías del sistema colinérgico vinculadas con las funciones reproductoras.	36

Justificación del estudio.....	37
Hipotesis.....	38
Objetivos.....	38

Resultados

39-76

- **Paola R. Arteaga-López, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Isabel Arrieta, Carmen A. Mendoza-Rodríguez, and María Esther Cruz (2004) Effects cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the preoptic and anterior hypothalamic area of cyclic female rats.. (Enviado a publicar)**

DISCUSION GENERAL.....	77
MODELO GENERAL.....	84
CONCLUSIONES GENERALES.....	86
PERSPECTIVAS.....	90
BIBLIOGRAFIA.	91

APENDICES

Apéndice 1.- Frótis vaginales de ratas hembras adultas.....	113
Apéndice 2.- Extracción de muestras cerebrales y suero sanguíneo.....	115
Apéndice 3.- Extracción de ARN total de POA-AHA izquierda y derecha.....	116
Apéndice 4.- Proceso de retrotreanscripción de ARN acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	117
Apéndice 5.- Inmunohistoquímica por free floating sections para ER- α	119

RESUMEN

Estudios previos han mostrado la existencia de asimetrías en el hipotálamo relacionadas con el sistema reproductor, las cuales pueden ser funcionales, anatómicas o bioquímicas. En este estudio se aborda el análisis de las asimetrías desde un punto de vista molecular.

Para ello estudiamos, por medio de técnicas de biología molecular, la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH, así como la de las isoformas α y β del receptor a estrógenos (ER- α , ER- β), en los lados izquierdo y derecho del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) durante el ciclo estral de la rata.

Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de estos genes es asimétrica, ya que fue en el lado derecho de POA-AHA en donde se observó una mayor expresión de ARNm de ER- α en el día del estro; mientras que en el lado izquierdo se observó la mínima expresión. El ARNm de ER- β permaneció en niveles bajos y constantes en ambos lados de POA-AHA durante casi todos los días del ciclo estral, excepto en el día del diestro-2 día en el que en el lado izquierdo de POA-AHA se observó un aumento significativo en su expresión. Con respecto a la expresión del ARNm de la GnRH, este también fue baja y constante durante el ciclo estral, y solamente se observó un aumento significativo en su expresión en el lado derecho de POA-AHA en el día del diestro-2. Estas diferencias asimétricas en la expresión del ARNm hacen pensar que cada lado de POA-AHA tiene una actividad diferente en la regulación de las funciones reproductivas.

En la segunda parte de este trabajo, se realizaron experimentos para evaluar si el sistema colinérgico participa en la regulación de las asimetrías observadas anteriormente, para lo cual se analizaron los efectos de la inyección de sulfato de atropina (ATR) sobre la expresión de los genes antes estudiados. Los resultados muestran que la inyección de ATR inhibió la máxima expresión del ARNm del ER (ausencia total) mientras que la expresión del ER- β y de GnRH solo disminuyó considerablemente en ambos lados de POA-AHA.

Basándonos en el hecho de que las inyecciones de ATR bloqueaban la expresión del ARNm de ER- α , se cuantificó la proteína del ER- α en ambos lados de POA-AHA durante el ciclo estral de la rata intacta así como en la rata tratada con ATR. Los resultados obtenidos mostraron que también la proteína del ER- α se expresó de forma asimétrica, presentando variaciones durante el ciclo estral. La máxima expresión se observó en el día del diestro-1 en el lado derecho de POA-AHA, casi 24 h después del máximo en la expresión del ARNm del ER- α . Cuando se evaluaron los efectos de la inyección de ATR sobre la expresión de la proteína del ER- α , se encontró que el número de ER- α disminuyó significativamente en ambos lados de POA-AHA.

A partir de estos resultados se concluye que:

- La expresión del ARNm de GnRH y de las isoformas del receptor a estrógenos es asimétrica.
- El sistema colinérgico participa de manera estimulante en la regulación de la expresión del ER- α , no así en la del ER- β y la de GnRH.
- La regulación del sistema colinérgico sobre la expresión del ER- α , indicaría que es por medio de este receptor que el sistema colinérgico participa en la regulación de las funciones reproductoras de la rata, y que esta participación es asimétrica.

ABSTRACT

The GnRH and estrogen receptor α and β isoforms ribonucleic messenger acid (mRNA) expression in the right and left sides of preoptic and anterior hypothalamic area (POA-AHA) during the estrous cycle, is asymmetric. In the right side of POA-AHA the ER- α mRNA expression reached its maximal in the day of estrous, while in the left side the maximal mRNA expression was reached by ER- β in diestrus-2 day. For GnRH the maximal expression was observed in the left side of POA-AHA

in diestrus-2 day. The asymmetrical differences in the mRNA expression suggest a different regulation of each side of POA-AHA in the reproductive functions.

To evaluate if the cholinergic system participates in the asymmetric mRNA expression, we decided to inject atropine sulfate (ATR). When the ATR was injected, the maximal expression of ER- α was blocked, while the ER- β and GnRH mRNA maximal expression were diminished in both sides of POA-AHA.

Because the ATR injections affects the ER- α mRNA expression, we evaluated the effects of ATR injection over the ER- α protein expression. First, we evaluated the estrogen receptor number, in the right and left sides of POA-AHA during the estrous cycle. The results shown that the ER- α was different in each side of POA-AHA and varies along the estrous cycle, being the maximal expression observed in diestrus-1 day at 09:00 h, almost 24 h after the ER- α mRNA maximal expression. Then, we evaluated the effects of ATR injections over the maximal ER- α expression, the results shown that the number of ER- α was diminished significantly in both sides of POA-AHA.

This results suggest that:

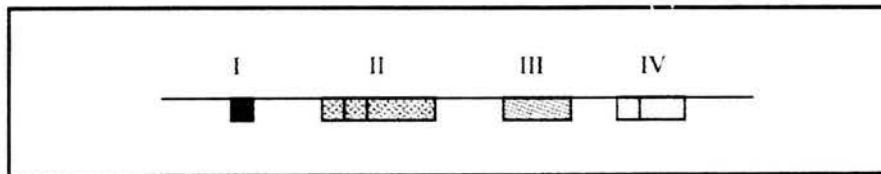
- The mRNA expression for GnRH and ER isoforms is asymmetric between both sides of POA-AHA.
- The cholinergic system participates in a stimulatory way on the regulation of the ER- α expression, but not the ER- β and GnRH expression.
- The cholinergic system influence the ER- α expression, indicates that the receptor mediates the cholinergic system participation in reproductive functions.

Primer Capítulo
ANTECEDENTES

*∅ La vida es aquello que te va pasando
mientras tu te empeñas en hacer otros planes.
John Lennon*

HORMONA LIBERADORA DE LAS GONADOTROPINAS (GnRH) y RECEPTOR A ESTRÓGENOS (ER)

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés), es un neuropéptido clave en las funciones reproductoras, el cual está compuesto por diez aminoácidos cuya secuencia es *pyro-Glu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-Gly6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly-amida*^{2,15}. La GnRH es codificada por un gen integrado por 4 exones: el primero (I) contiene la región 5' no traducida. El exón dos (II) codifica para el péptido señal del decapeptido de la GnRH, para el sitio de amidación y para el sitio del precursor; también codifica para el sitio amino terminal de once aminoácidos de un segundo péptido asociado de 56 aminoácidos denominado (GAP), el cual contiene el segmento prepro-GnRH; el exón tres (III) codifica para los siguientes 32 residuos del GAP; el exón cuatro (IV) codifica para los últimos trece aminoácidos del GAP, para el codón de terminación y para la región 3' no traducida del ARN mensajero^{102,151,168,171,280} (Fig. 1)



***Fig. 1. - Esquema del gen que codifica para la GnRH
(tomado de Adelman, 1996)***

La GnRH es producida en el hipotálamo por las neuronas GnRHérgicas que forman redes extensas y difusas. Las neuronas GnRHérgicas se localizan desde la Banda Diagonal de Broca y áreas septales (incluso los núcleos septal medial y triangular) hasta el lecho del núcleo de la estría terminal y áreas diencefálicas (área periventricular, área preóptica medial y lateral, área hipotálmica anterior, zona retroquiasmática)^{218,284}

Las principales vías de neuronas GnRHérgicas en el sistema nervioso central son:

- la septo-preóptico infundibular,
- la de la región pericomisural,
- las vías a órganos circunventriculares y
- las que proyectan a zonas extrahipotalámicas

En todas las especies, la vía más importante de fibras GnRHérgicas es la septo-preóptica-infundibular, la cual es la vía común que participa en la regulación de la función secretora de la hipófisis. Esta vía se conforma y origina en las neuronas que sintetizan GnRH que se localizan en zonas rostrales a la Banda Diagonal de Broca. Este paquete se bifurca cerca del área preóptica (POA), donde principia el tercer ventrículo. Ambos paquetes viajan en la línea media: uno dorsal y el otro ventral a lo largo de la superficie del quiasma óptico^{24,167,168} Los axones de las neuronas GnRH de las zonas más caudales y laterales a POA y al hipotálamo viajan cerca del haz medial del cerebro anterior; cerca de la eminencia media este haz se desvía hacia la zona medial. Estas fibras periventriculares contribuyen a la inervación de la eminencia media y quizá a la de estructuras más caudales. En algunas especies las células de GnRH también están presentes en el hipotálamo medio basal, los axones viajan a lo largo de la eminencia media y algunos de ellos pasan por el tallo infundibular y entran a la hipófisis anterior^{246,269}

Importancia de la GnRH en las funciones reproductoras.

La importancia de la GnRH en las funciones reproductoras radica en que las neuronas GnRHérgicas integran el control de estas funciones en ambos sexos. La liberación episódica de GnRH desde las terminales nerviosas localizadas en la eminencia media del hipotálamo hacia el sistema portal de la adenohipófisis crea un patrón pulsátil de secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH)^{18,45,70,176,191} Esta secreción es originada por el efecto

que tiene la GnRH sobre los gonadotropos de la adenohipófisis al actuar sobre su receptor. El receptor a GnRH es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR por sus siglas en ingles) los cuales tienen siete dominios transmembranales. La actividad del receptor se da cuando se une a la GnRH lo que desencadena una serie de eventos de activación de proteínas G que desarrollan el patrón de secreción pulsátil de LH ^{43,44,135,183,196,197,285}

Las fluctuaciones cíclicas en amplitud y frecuencia en la secreción de GnRH, son responsables de cambios marcados en el perfil de la secreción de LH y FSH, ya que altas frecuencias de GnRH estimulan la secreción de LH, mientras que las frecuencias bajas estimulan la secreción de FSH. ^{22, 116, 117, 123, 150, 177, 213, 212, 214, 219,229,232,279,286}

Estos cambios son importantes para el funcionamiento de los ovarios, así como para la generación de un aumento en la concentración de LH el cual es conocido como secreción preovulatoria de LH, necesaria en el proceso de la ovulación. ^{20,59,99,134,145,209}

Según la especie de mamífero en estudio, los mecanismos que culminan con la ovulación ocurren cíclicamente. ^{147,154,227} Para el caso de la rata suceden cada cuatro días, a este período se le dió el nombre de ciclo estral. Para su estudio el ciclo estral se divide en diestro-1 (D-1), diestro-2 (D-2), proestro (P) y estro (E). Estos días se caracterizan por cambios fisiológicos que son comandados por el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios. A continuación se presenta una tabla descriptiva en donde se resumen dichos cambios en cada uno de los días del ciclo estral de la rata ^{45,47,114,139,143,251,258,270,273,275} (Tabla 1).

TABLA 1.- Resumen de los eventos fisiológicos que suceden durante el ciclo estral de la rata hembra.

Día	Concentraciones hormonales	Ovario	Frotis Vaginales
<i>Diestro-2</i>	Durante la tarde de este día, las concentraciones plasmáticas de FSH y LH se mantienen bajas pero las de 17β -estradiol comienzan a aumentar en la tarde de este día	Sólo se presentan folículos pequeños y cuerpos lúteos grandes, producto de las ovulaciones anteriores.	Se caracteriza por presentar muchos leucocitos y pocas células epiteliales sin núcleo.
<i>Proestro</i>	Las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol alcanzan su máximo valor a las 11:00 horas, evento que estimula la secreción preovulatoria de las gonadotropinas en la tarde de este día (17:00 o 18:00 horas según la cepa de rata). Este aumento en la concentración de gonadotropinas es seguido por un marcado aumento en la concentración de progesterona (19:00 a 21:00 horas, según la cepa de rata)	Varios folículos maduran simultáneamente y alcanzan su tamaño máximo en este día del ciclo	Se caracteriza por células epiteliales con núcleo. Sin la presencia de leucocitos.
<i>Estro</i>	En esta fase del ciclo ocurre la ovulación (en las primeras horas del día). La concentración de LH, 17β -estradiol y progesterona en sangre se encuentran en sus valores basales, mientras que la de FSH muestra un segundo aumento en la mañana de este día.	En la rata se lleva a cabo la ovulación en las primeras horas de este día. En el ovario se pueden observar folículos de más de 1000 μm que no ovularon y que entraron en la fase de atresia, cuerpos lúteos recién formados y viejos, así como folículos en las diferentes etapas de crecimiento.	Se observan solamente células cornificadas.
<i>Diestro-1</i>	La concentraciones plasmáticas de FSH, LH, 17β -estradiol son basales, en cambio la de progesterona alcanza un máximo hacia el medio día para después disminuir a sus concentraciones basales.	Se observan folículos en diferentes etapas de crecimiento. Se localizan cuerpos lúteos.	Se presentan muchos leucocitos y unas pocas células cornificadas.

Los receptores a estrógenos y la neurona GnRHérgica.

El receptor a estrógenos es un miembro de la familia de los factores nucleares de transcripción ligando-dependientes. El gen que codifica para el receptor de estrógenos alfa tiene nueve exones y pesa 65 Kda, la cual ha sido dividida en seis dominios, que se denominan con las iniciales de la A a la F ^{46,234} El sitio de unión del esteroide (SBD, por sus siglas en inglés) al receptor conocido como dominio E, consiste en una cadena de aproximadamente 250 aminoácidos, los que forman una sección hidrofóbica con una alta especificidad por los estrógenos. La unión de los estrógenos al receptor inicia una secuencia de eventos que resultan en la activación transcripcional o la supresión de algunos genes ^{85,86,87,131}

La acción del estrógeno se da cuando al unirse al receptor este es llevado al núcleo de la célula por las señales de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés) ^{85,86,87} El receptor tiene un sitio de unión al DNA (DBD, por sus siglas en inglés) conocido como dominio D, que consiste de dos dedos de zinc que tienen interacciones específicas con los elementos de respuesta a los estrógenos (ERE, por sus siglas en inglés) ^{85,86,87} El receptor a estrógenos contiene dos regiones que regulan la actividad transcripcional, estos son conocidos como AF-1 y AF-2, los cuales están localizados en los dominios A/B y E, respectivamente. ^{85,86,87,131}

En 1986 se clonó el primer receptor a estrógenos proveniente del útero de la rata. Diez años después se clonó un nuevo miembro de los receptores nucleares en la próstata de la rata. Los experimentos de unión o binding mostraron que ambos son específicos para los estrógenos así que fueron llamados receptor a estrógenos isoforma alfa (ER- α) y beta (ER- β) respectivamente. ^{94,130} Cada isoforma es expresada por un gen diferente. ^{198,199}

Los ER- α y ER- β tienen el mismo número de exones y los cDNAs (ADN complementario, por sus siglas en inglés) clonados de humanos, ratas y ratones, también coniparten secuencias homólogas, especialmente con los dominios de ligando y unión al DNA.⁹⁴ (Fig 3)

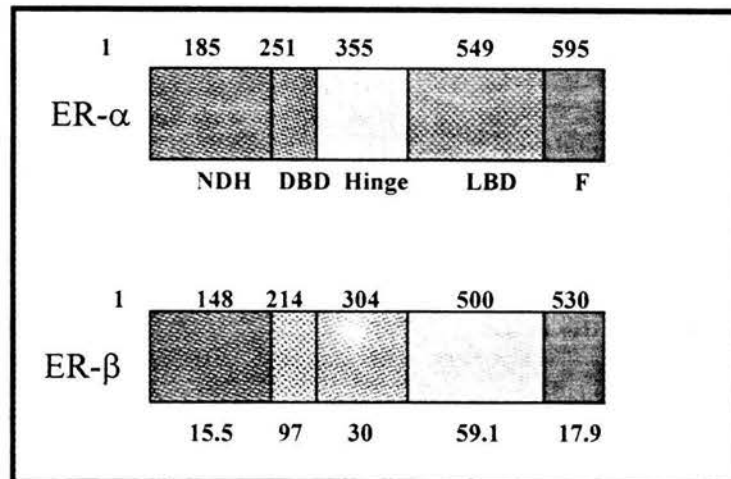


Fig.3 Comparación de las estructuras primarias de ER- α y ER- β .

El número 1 representa el amino terminal y los subse cuentas indican la cantidad de aminoácidos que los componen Los número abajo del ER- β - representan el porcentaje de homología entre los ER. (Tomado de Gustafsoon,1999)

En el sistema nervioso central se encuentran las dos isoformas, aunque la presencia de una o de ambas depende de la región cerebral que se estudie. En el caso del hipotálamo se describe la existencia de las dos isoformas, siendo ER- β la isoforma más abundante en la región.^{34,144}

Los estrógenos regulan la secreción de GnRH.^{6,10,11,16,75,77,148,200} En las hembras,pueden tener un efecto estimulante o inhibitorio sobre la secrecion de GnRH en función de la etapa del ciclo estral, aunque en gran parte del ciclo los estrógenos tienen efectos inhibitorios dando como resultado la disminución en la secreción de LH^{65,71,82,95,193,226} El efecto estimulante sobre la secreción de GnRH provoca la liberación preovulatoria de las gonadotropinas lo que se refleja en un máximo en las concentraciones plasmáticas de LH y FSH.^{195, 207,283}

Los mecanismos por medio de los cuales los estrógenos influyen en el funcionamiento de la neurona secretora de GnRH no son muy claros. Primero se había descrito la ausencia de receptores a estrógenos en la neurona secretora de GnRH, por lo cual se consideraba que los efectos de los estrógenos sobre esta no se realizan por medio de los mecanismos clásicos del funcionamiento del receptor nuclear. ^{38,39,67,69,264,269,278}

Para explicar los efectos de los estrógenos se propuso que actuaban sobre la neurona secretora de GnRH, utilizando otras vías, como por ejemplo la del receptor membranal a estrógenos el cual fue identificado por Pietras y Szego. ⁵⁵ El cual se ha observado en el hipotálamo y otras regiones cerebrales. ^{1,179,215} Este tipo de receptor está implicado en cambios de las propiedades eléctricas de las neuronas, en alteraciones en la liberación de neurotransmisores, ⁴² así como en una gran variedad de respuestas mediadas por la membrana plasmática. ^{1,179,215}

También se pensó que los estrógenos actuaban por medio de vías indirectas de acción, por medio de otras neuronas pertenecientes a diferentes sistemas de neurotransmisión o a interacciones glía-neurona GnRHérgica. ^{19,33,136,137,138,180}

Actualmente hay evidencias de la existencia de receptores a estrógenos en las neuronas secretoras de GnRH. ^{6,142} El primer indicio de que las neuronas secretoras de GnRH expresan el receptor a estrógenos lo dieron Butler et al ³⁸ quienes observaron que aproximadamente el 20% de las neuronas GnRHérgicas de ratas ovariectomizadas fueron inmunoreactivas al ER- α .

Posteriormente, en experimentos hechos con ratón hembra intacta, se describió que las neuronas GnRHérgicas de estos ratones expresaban transcritos para ER- α y ER- β , sin embargo los resultados para el ER- α fueron falsos ¹⁴⁹

Posteriores estudios respaldaron las evidencias de que aproximadamente el 70% de las neuronas GnRHérgicas contienen ER- β . ^{157,158,159,160,161,173,265,267,276}

La existencia de la proteína del ER- β en la neurona GnRHérgica de rata fueron mostradas por Hrabovszky ¹⁶¹ y Kallo ¹⁷³ en el año 2001.

Modelos de animales genéticamente modificados para reprimir la expresión de las isoformas del receptor a estrógenos.

Los animales que son modificados genéticamente para reprimir la expresión de cualquier gen son conocidos como knockout (KO). Estudios recientes han caracterizado los defectos resultantes de la ausencia de una u otra isoforma del receptor, como son las alteraciones en las respuestas fisiológicas y genómicas que dependen de los estrógenos. Así que las hembras KO del ER- α (ER α KO) son infértiles porque no ovulan, pues presentan interrupción en la secreción de LH y tienen úteros insensibles a los estrógenos. ¹⁹⁴

En contraste, las hembras KO del ER- β (ER β KO) presentan un deficiente desarrollo folicular y por lo tanto una deficiente tasa de ovulación. Por otro lado ratones con ausencia de ambos receptores presentan características similares a aquellos que no tienen ER- α . Estos resultados muestran que las funciones de los estrógenos dependen del tipo de receptor sobre el cual actúan. ^{9,31,40,48,49,50,51,52,53,60,61,84,90,106,152,153,222,260,262,266,281}

ASIMETRÍAS CEREBRALES RELACIONADAS CON EL SISTEMA REPRODUCTOR

El concepto de asimetría cerebral no es muy usado en la actualidad, sin embargo la descripción de las asimetrías cerebrales data de dos siglos atrás. Una de las primeras evidencias la dio Marcel Dax cuando sugirió que en el humano, únicamente el hemisferio cerebral izquierdo está involucrado en el proceso de comunicación verbal^{73,118,119,132,133,252,254,283,287} Posteriormente Paul Broca observó que aquellos pacientes que con afasia tenían malformaciones o lesiones solamente en la corteza temporal izquierda del cerebro³² Más adelante se describió que la región temporal de la corteza del hemisferio izquierdo es más grande que la derecha a la cual se le dio el nombre de área de Broca.

A finales del siglo se retomó el concepto de asimetría cerebral, al estudiar los efectos de las lesiones unilaterales en el hipotálamo sobre las funciones reproductoras de la rata hembra o macho, se descubrió que según el lado del hipotálamo lesionado, era el efecto sobre dichas funciones. En la rata hemiovariectomizada la lesión del lado derecho del hipotálamo anterior inhibe la hipertrofia compensadora del ovario, mientras que la lesión del lado contrario no la modifica. Por otro lado diversos estudios mostraron que también los ovarios y los testículos presentan asimetrías^{27,66,80,112,115,162,250}

Otros estudios han mostrado que las cantidades del número así como la expresión de receptores, neurotransmisores y neurohormonas en los lados izquierdo y derecho del hipotálamo son diferentes, en la rata hembra adulta hay más GnRH en el hipotálamo medio basal derecho del que en el izquierdo^{76,120,121,122,155} Cuando a la rata hembra se le extirpa el ovario derecho aumenta la asimetría en el contenido de GnRH; mientras que la extirpación del ovario izquierdo la anula. De manera muy interesante la extirpación de ambos ovarios dió como resultado la disminución en el contenido total de GnRH en ambos lados¹⁴ Posteriormente se

supo que en el ratón macho hay mas células inmunoreactivas a la GnRH en el lado derecho del cerebro que en el izquierdo y que la orquidectomia bilateral o la extirpación del testículo derecho disminuye el número de células positivas a GnRH, mientras que la extirpación del testículo izquierdo no cambia el número de células positivas a GnRH ²³⁷. Ratas recién nacidas o de cuatro días de edad presentan asimetría en el contenido de receptores a estrógenos en la corteza cerebral, lo que depende del sexo del animal: en el macho hay mayor número de receptores a estrógenos en el lado izquierdo, mientras que en la hembra ocurre lo contrario. ²⁴⁰ En estos estudios no se define el subtipo de receptor a estrógenos.

Por último se demostro que los implantes de estrógenos en el hipotálamo de la rata hembra recién nacida, inducen cambios conductuales en la edad adulta; estos cambios dependen del lado y del núcleo hipotálamico en el que se coloque el implante. Así la implantación de estrógenos en el lado izquierdo del núcleo ventromedial disminuye la conducta sexual femenina; mientras que el implante del lado derecho del área preóptica incrementa la conducta sexual de tipo masculina.

242,263

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Alteraciones morfológicas y fisiológicas en las porciones izquierda y derecha del hipotálamo, mediante la utilización de técnicas de lesión, deaferentación, estimulación eléctrica o de implantes de hormonas o fármacos, afectan de manera asimétrica los eventos involucrados en la reproducción del animal en estudio. Dado que en la rata adulta la cantidad de GnRH y el número de receptores a estrógenos es diferente entre las porciones izquierda o derecha del hipotálamo; se consideró importante saber si estas diferencias son originadas desde la transcripción del gen. Dado que en la rata la función asimétrica del hipotálamo es un fenómeno dinámico que cambia durante el ciclo estral, se decidió analizar las variables antes señaladas en horas específicas de los diferentes días del ciclo estral en animales intactos.

HIPÓTESIS

Dado que de la secreción de la GnRH y que existen dos tipos de receptores para esta hormona, se consideró pertinente estudiar la expresión del ARNm para el receptor a estrógenos α y β en las porciones izquierda y derecha de POA-AHA. Finalmente, la expresión del ARNm de GnRH así como de ER- α y ER- β es diferente entre el lado izquierdo y derecho de POA-AHA y varía durante el ciclo estral de la rata.

OBJETIVOS

- Evaluar la expresión del ARNm de GnRH en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA, durante el ciclo estral de la rata.
- Evaluar la expresión del ARNm del ER- α y ER- β en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA, durante el ciclo estral de la rata.

RESULTADOS

- ❖ **Differential mRNA Expression of Alpha and Beta Estrogen Receptor Isoforms and GnRH in the Left and Right Side of the Preoptic and Anterior Hypothalamic Area During the Estrous Cycle of the Rat** Paola R. Arteaga-López, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Carmen A. Mendoza-Rodríguez, and María Esther Cruz *Endocrine*, vol. 21, no. 3, 251–260, August 2003

Differential mRNA Expression of Alpha and Beta Estrogen Receptor Isoforms and GnRH in the Left and Right Side of the Preoptic and Anterior Hypothalamic Area During the Estrous Cycle of the Rat

Paola R. Arteaga-López,¹ Roberto Domínguez,¹ Marco A. Cerbón,² Carmen A. Mendoza-Rodríguez,² and María Esther Cruz¹

¹Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; and ²Facultad de Química, U.N.A.M. México D.F., México

Asymmetric mRNA expression was found in preoptic anterior and hypothalamic anterior areas of the two estrogen receptor isoforms and the gonadotropin-releasing hormone. On the right side of these areas, estrogen receptor alpha mRNA expression reached its peak on estrus day, while on the left side the peak was reached on proestrus day. Estrogen receptor beta mRNA expression peaked on both sides on the same day, diestrus-2 day, but at different hours, showing a sustained expression for the next measured hour on the left side, while peaking and dropping abruptly on the right side. Gonadotropin-releasing hormone also peaked on both sides on diestrus-2 day, being the left side peak expression significantly lower than the peak expression at the right side. The side expression differences suggest that different sides of the before mentioned areas may play different roles of endocrine reproductive functions, while differences of expression at different times may suggest interaction between sides for the same functions.

Key Words: GnRH; ER- α ; ER- β ; hypothalamic lateralization; estrous cycle; mRNA expression.

Introduction

Estrogen (E_2) is involved in the regulation of several functions of the central nervous system. In the hypothalamus one of the most important roles of E_2 is the regulation of reproductive functions, through the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin secretion (1,2). The

regulation of these peptides is mediated by two ER isoforms: the estrogen receptor alpha (ER- α) and the estrogen receptor beta (ER- β) (3). Both ER- α and ER- β are expressed in the hypothalamus of the rat (4). However, only ER- β is present in the hypothalamic GnRH neurons (5,6).

The existence of an asymmetric function of different endocrine organs, including the gonads, the adrenals, and the thyroid gland, has been indicated in many studies (7). Different studies have shown that manipulations of the right side of the hypothalamus (such as lesions, deafferentations, or pharmacological or hormonal implants), affect the response of the neuroendocrine reproductive axis asymmetrically (8–12).

In female rats the development of sex-specific reproductive functions can be differentially disturbed, depending on which side in the hypothalamus an early implantation of estradiol is performed. Implantation of the hormone in the right side of the hypothalamus leads to masculinization (e.g., preference for other females), while implantation in the left side induces defeminization (e.g., loss of the estrous cycle) (13). Unilateral implants of estradiol in the right side of the hypothalamus of adult rats induces better behavioral responses (lordosis) than in animals with implants in the left side (14).

Furthermore, asymmetric activity in the hypothalamic and limbic structures, as well as in other brain structures related to the neuroendocrine control systems, has been reported (7). Accordingly, in adult female rats the GnRH peptide content is higher in the right side of the median eminence than in the left.

The preceding observations indicate that an asymmetric expression of ER- α , ER- β , as well as GnRH may exist in different areas of the hypothalamus of female rats. Asymmetric mRNA expression of ER- α , ER- β , and GnRH, between the left and right side of the preoptic anterior and hypothalamic anterior areas (POA-AHA), during the estrous cycle of the rat, was found. The implication of asymmetric reproductive functions is then discussed.

Received March 25, 2003; Revised May 29, 2003; Accepted June 2, 2003.
Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: María Esther Cruz, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México D.F., México.
E-mail: parteaga_lopez@hotmail.com

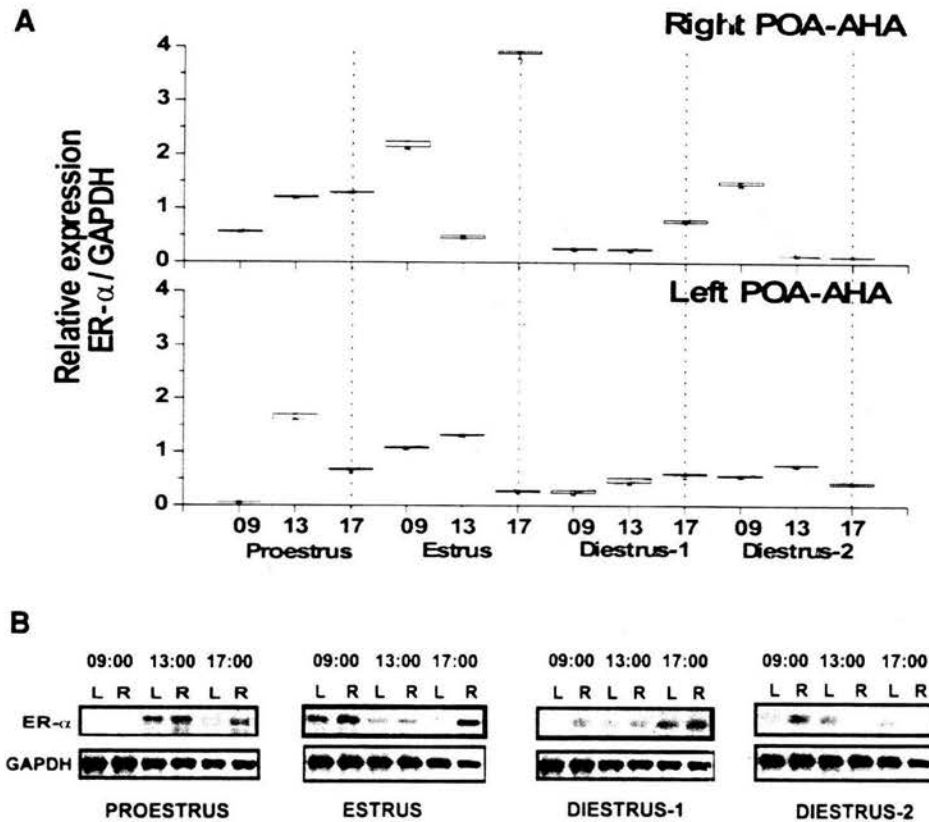


Fig. 1. Densitometric analysis of ER- α mRNA expression in the left and right side of POA-AHA of cyclic adult female rat at 09:00, 13:00, and 17:00 of estrous, diestrus-1, diestrus-2 and proestrous days. (A) Densitometric analysis of RT-PCR products. Each point in the graph is a box plot representing the whole distribution of the sample for each side, day, and hour. Note that each experimental group is represented by a normal distribution with no outlier points. Multivariate analysis of variance was performed (F -ratio = 2.0027; p = 0.021) showing statistical significance between sides, followed by pairwise Tukey tests, showing statistical significant differences (p < 0.05) between experimental groups, especially between left and right sides of POA-AHA at 17:00 of the estrous day. (B) Simultaneous RT-PCR representative assays for ER- α and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) side of POA-AHA. RT-PCR was performed using total RNA isolated from both sides of POA-AHA of adult female rats during the estrous cycle.

Results

When the results were analyzed, all together (by the day of the estrous cycle, the side of POA-AHA, and the hour of the day when the animals were sacrificed), we found that in the right side of POA-AHA, the ER- α mRNA expression reached its maximal level during the estrous day, with a peak at 17:00 (Fig. 1A, Table 1). Two other small peaks were observed at 09:00 of the day of diestrus-2 and at 13:00 on proestrus. However, only the 17:00 estrous day peak was statistically significant when compared to the values in the left side for the same day and hour (Table 1). ER- α mRNA expression on the left side of the POA-AHA show less variations along the different hours of the day of the estrous cycle and the small peaks at 13:00 of the proestrus and dies-

trous-2 days are not significantly different from the corresponding values on the right side. A larger expression activity of ER- α is seen on the right side especially at 17:00 of the estrous day.

ER- β mRNA expression peaked on both sides on diestrus-2 day, peaking at 9:00 on the right side and at 13:00 on the left side (Fig. 2A, Table 2). No expression was shown on any other day of the cycle indicating precise timing for the use of this receptor. The left side showed a little more expression than the right side and sustained its expression for a longer time, although peaking at 13:00 it showed the same drastic increase at 9:00 that the right side. It seems that ER- β , although slightly more expressed in the left than in the right side, is expressed for a precise timed action.

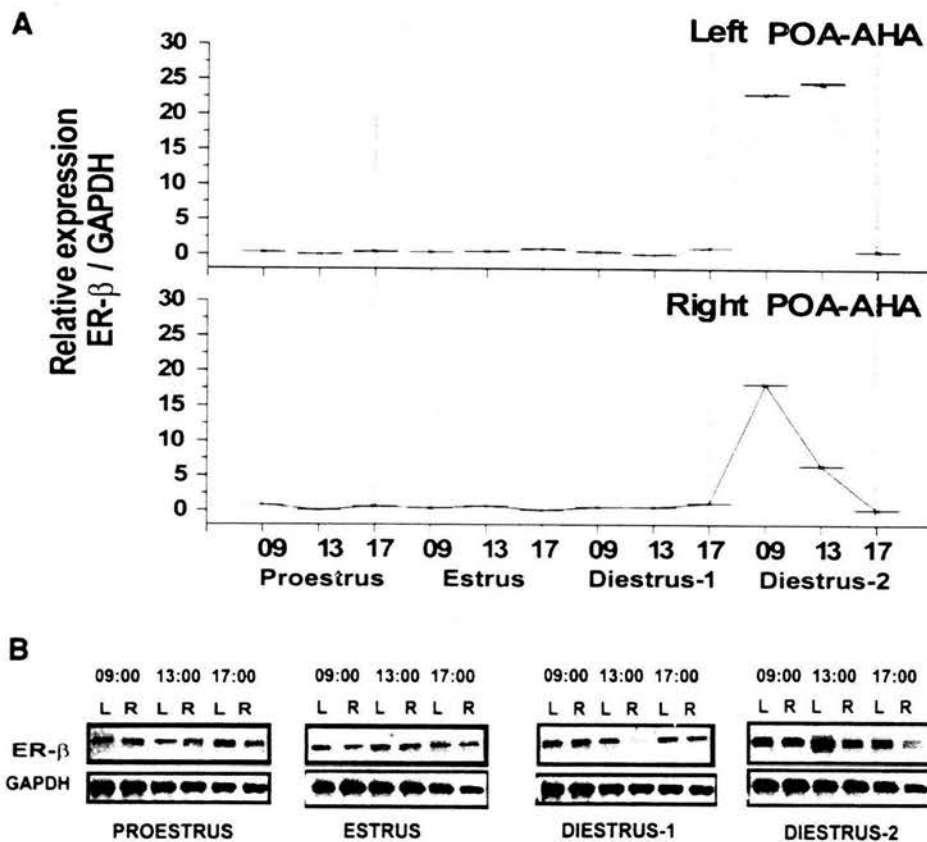


Fig. 2. Densitometric analysis of ER- β mRNA expression in the left and right side of POA-AHA of cyclic adult female rat at 09:00, 13:00, and 17:00 of estrous, diestrus-1, diestrus-2 and proestrous days. (A) Densitometric analysis of RT-PCR products. Each point in the graph is a box plot representing the whole distribution of the sample for each side, day, and hour. Note that each experimental group is represented by a normal distribution with no outlier points. Multivariate analysis of variance was performed (F -ratio = 9.5; $p = 1e-5$) showing statistical significance between sides, followed by pairwise Tukey tests, showing statistical significant differences ($p < 0.05$) between experimental groups, especially between left and right sides of POA-AHA at 13:00 of the diestrus-2 day. (B) Simultaneous RT-PCR representative assays for ER- β and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) side of POA-AHA. RT-PCR was performed using total RNA isolated from both sides of POA-AHA of adult female rats during the estrous cycle.

in the right side, especially on estrous day, on which the receptor is only expressed in the right side. This suggests a specialization of the receptor on the right side at precise timing on estrous day, allowing the other side to take care of another totally different function at the same time. Besides, the fact that female and male ER α KO are both infertile (15-19) suggests that this specialization of ER- α has to do with some neuroendocrine reproductive function.

The ER- β isoform is also asymmetrically expressed on both sides of POA-AHA, with a somewhat larger expression on the left side. In contrast with the ER- α receptor, the ER- β receptor is expressed at a very precise time on diestrus-2 day with no expression on any other day of the

estrous cycle. However, the fact that the ER β KO female mice are just subfertile and that the difference between sides is not large indicates that ER- β plays some role on a neuroendocrine reproductive function but it possibly has another nonreproductive function that is related to both sides.

GnRH also shows asymmetry between sides, but like ER- β its expression is precisely timed on diestrus-2 day with no expression on any other day. In contrast with ER- β the difference between sides is noticeable with a larger expression on the right side. These results are in agreement with previous observations (20,21), which show that on female rats, the GnRH peptide content is higher on the right half of the medial basal hypothalamus (7). GnRH marked

Table 2
ER- β Tukey Test Pairwise Comparison of mRNA Expression Between POA-AHA Sides

		Left side.															
		Proestrus			Estrus			Diestrus-1			Diestrus-2						
		9:00	13:00	17:00	9:00	13:00	17:00	9:00	13:00	17:00	9:00	13:00	17:00				
Right side.	Proestrus	9:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
		13:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		17:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Estrus	9:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		13:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		17:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Diestrus-1	9:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		13:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		17:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Diestrus-2	9:00	5.8e⁻⁴	4.2e⁻⁴	6.2e⁻⁴	5.8e⁻⁴	6.3e⁻⁴	9.3e⁻⁴	6.3e⁻⁴	6.3e⁻⁴	4.3e⁻⁴	0.99	0.95	1.1e⁻⁴	0.99	0.95	1.0
		13:00	0.99	0.95	0.97	0.97	0.97	0.99	0.97	0.97	0.95	0.002	4.3e⁻⁴	0.97	0.99	0.95	1.0
		17:00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

*Probabilities in bold and in shadowed cells indicate statistically significant differences between pairs ($p < 0.05$). Although Tukey test was performed for pairs within sides, the data are not shown because only the peak is statistically significant, as should be expected. Note that only the peak at diestrus-2 day is statistically significant between sides.

asymmetrical mRNA expression in POA-AHA during the diestrus-2 day could be related to the differences in the number of GnRH neurons between the two sides of POA-AHA, since there is evidence that male mice have more GnRH immunoreactive neurons in the right side of the brain than in the left side (22). The fact that the GnRH peak starts to disappear in diestrus-2 afternoon is consistent with observations made in male rats, where higher GnRH content in the right side of the hypothalamus was observed only in

samples taken in the morning, but not in samples taken in the evening (23).

Although not shown by the results of this study, the high levels of ER- α in the right side of POA-AHA together with the higher content of GnRH mRNA in the right side of POA-AHA, suggests that the stimulation of the ER- α receptor may be linked to the GnRH synthesis. Since the GnRH neurons do not have ER- α (5,6), this stimulatory effect may be accomplished throughout an intermediary neuron,

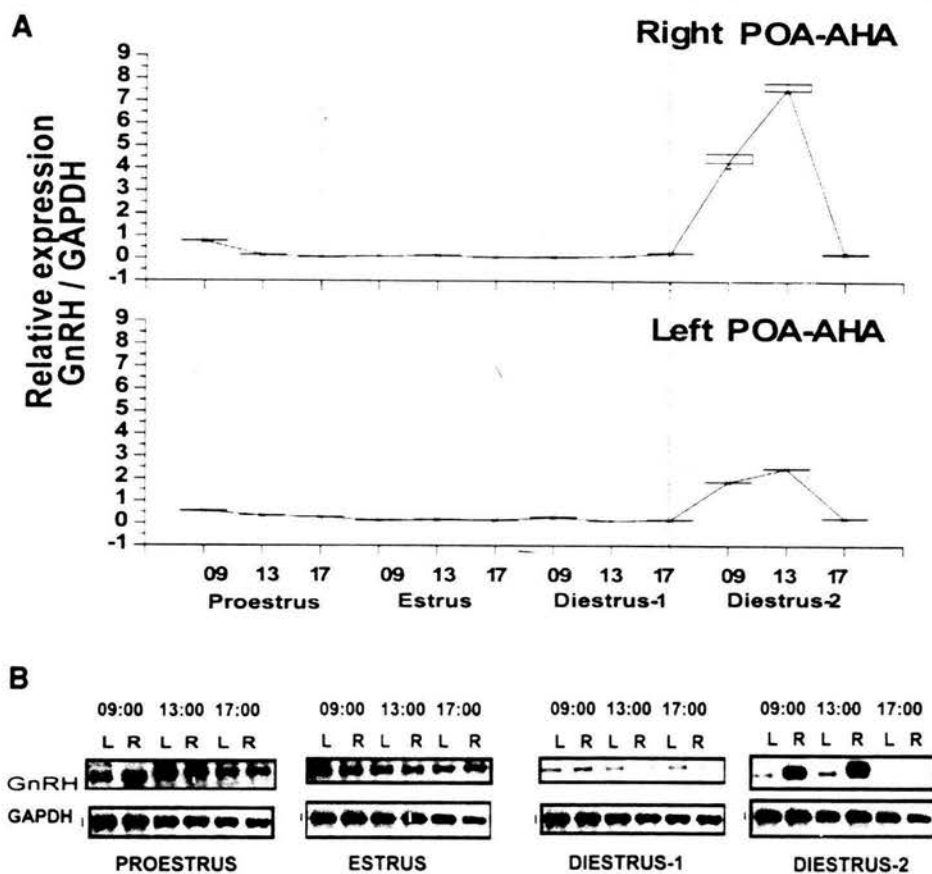


Fig. 3. Densitometric analysis of GnRH mRNA expression in the left and right side of POA-AHA of cyclic adult female rat at 09:00, 13:00, and 17:00 of estrous, diestrus-1, diestrus-2 and proestrous days. (A) Densitometric analysis of RT-PCR products. Each point in the graph is a box plot representing the whole distribution of the sample for each side, day, and hour. Note that each experimental group is represented by a normal distribution with no outlier points. Multivariate analysis of variance was performed (F -ratio = 1368; $p = 1 \times 10^{-5}$) showing statistical significance between sides, followed by pairwise Tukey tests, showing statistical significant differences ($p < 0.05$) between experimental groups, especially between left and right sides of POA-AHA at 13:00 of the diestrus-2 day. (B) Simultaneous RT-PCR representative assays for GnRH and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) side of POA-AHA. RT-PCR was performed using total RNA isolated from the both sides of POA-AHA of adult female rats during the estrous cycle.

possibly an interneuron. Such an idea is supported by the fact that the ER- α is present in cholinergic neurons and possibly in GABAergic and catecholaminergic neurons (2,24).

The GnRH peaks have also been observed previously on a RNase protected assay (25,26), but, because there was no sampling between 11:00 and 18:00 on diestrus-2 day, this peak was missed. In that study both sides of POA-AHA were taken for their assay, while, as it is shown here, the large diestrus-2 day peak is better observed when POA-AHA sides are taken separately. In that study an important unsolved issue was the origin for the mRNA expression peak on diestrus-2 day. Taking in consideration the synchrony of ER- β and GnRH, but acting on different sides,

it is possible that the neurotransmitter which is responsible for synchronicity could also be responsible for a post-transcriptional mechanism that triggers the diestrus-2 day GnRH peak.

Hypothetically, the high levels of ER- β mRNA in the left side of POA-AHA on diestrus-2 day, one day before preovulatory release of GnRH, may be linked with the GnRH preovulatory triggering. This triggering effect is suggested by the presence of the ER- β in GnRH neurons (5,6). At precisely the same time, GnRH mRNA is peaking, but on the right side, suggesting a complementary action between ER- β and GnRH on diestrus-2 day. If true, this necessarily means close communication between the neurons on both

Table 3
GnRH Tukey Test Pairwise Comparison of mRNA Expression Between POA-AHA Sides

		Left side.												
		Proestrus			Estrus			Diestrus-1			Diestrus-2			
		9:00	13:00	17:00	9:00	13:00	17:00	9:00	13:00	17:00	9:00	13:00	17:00	
Right side.	Proestrus	9:00	0.27	3e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴
		13:00	1e⁻⁴	0.37	0.96	1.0	1.0	0.99	0.99	1.0	1.0	1e⁻⁴	1e⁻⁴	0.99
		17:00	6e⁻⁴	*	0.019	0.25	1.0	1.0	0.99	0.45	1.0	0.99	1e⁻⁴	1e⁻⁴
	Estrus	9:00	1e⁻⁴	0.09	0.61	1.0	1.0	1.0	0.83	1.0	1.0	1e⁻⁴	1e⁻⁴	0.97
		13:00	3e⁻⁴	0.24	0.88	1.0	1.0	0.99	0.97	1.0	1.0	1e⁻⁴	1e⁻⁴	0.99
		17:00	1e⁻⁴	*	0.02	0.25	1.0	1.0	0.99	0.45	1.0	0.99	1e⁻⁴	1e⁻⁴
	Diestrus-1	9:00	1e⁻⁴	0.029	0.33	1.0	0.99	1.0	0.56	1.0	0.99	1e⁻⁴	1e⁻⁴	0.84
		13:00	1e⁻⁴	0.099	0.64	1.0	1.0	1.0	0.85	1.0	1.0	1e⁻⁴	1e⁻⁴	0.98
		17:00	0.012	0.99	1.0	0.92	0.99	0.97	1.0	0.74	0.97	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1.0
	Diestrus-2	9:00	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴
		13:00	3e⁻⁴	0.99	1.0	0.99	0.99	0.99	1.0	0.95	0.99	1.0	*1e⁻⁴	1.0
		17:00	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴	1e⁻⁴

*Probabilities in bold and in shadowed cells indicate statistically significant differences between pairs ($p < 0.05$). Although Tukey test was performed for pairs within sides, the data are not shown because only the peaks are statistically significant, as should be expected. Note that only the peak at diestrus-2 and proestrous days are statistically significant between sides.

sides. However, the fact that ER β KO female mice are subfertile while the ER α KO are infertile (15-19) suggests that ER- β may not be completely involved in GnRH synthesis.

In summary, the results clearly indicate the existence of asymmetry in ER isoforms and GnRH mRNA expression in POA-AHA. This asymmetry seems to have distinct functional reproductive tasks and in the ER- β case possibly non-reproductive tasks. On one hand, the appearance of ER- α on the right side of POA-AHA could indicate the synthesis

of GnRH; on the other hand, the appearance of ER- β on the left side of POA-AHA could indicate a triggering role on GnRH release. Complementation between ER- β and GnRH seem possible, indicating communication between sides. It is clear that the participation of estrogens in the regulation of reproductive functions depends on which side of the hypothalamus, as well as on the type of receptor, they act. It seems that the right and left side of neuronal structures in POA-AHA play different roles in the control of endocrine repro-

ductive functions, while keeping close communication for synchronization and time-dependent processes.

Materials and Methods

Animals

Virgin adult female rats CIIZ-V strain from our own stock, 195–225 g body weight, were used. Animals were kept under controlled lighting conditions (lights on from 0500 to 1900), with free access to food (Purina S.A., Mexico) and tap water. Estrous cycles were monitored by daily vaginal smears. Only those rats showing at least two consecutive 4-d cycles were used in the experiment.

At 09:00, 13:00, and 17:00 of diestrous-1, diestrous-2, proestrous, and estrous days, groups of six rats were sacrificed by decapitation. Each experimental group consisted of three repetitions. After decapitation, the brain was quickly removed and placed on a dry-ice-cooled plate. A slice (1.4 mm) was cut and the POA–AHA region was punched out with a needle (0.4 mm inner diameter), following the parameters (A-7020 to A-5660) of the Könnig and Klippel (27) rat's stereotaxic atlas. The left and right side of POA–AHA were separated.

Total RNA Isolation and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

The conventional methods for mRNA quantitation such as Northern blot or ribonuclease protection assay sometimes lack enough sensitivity to study low-abundance mRNA or to work with limited amounts of biological samples. PCR is a very powerful tool for evaluation of nucleic acids owing to its high efficiency, convenience, and better sensitivity, being chosen frequently for low-abundance mRNA and/or limited amounts of biological samples. Quantification using Northern blot and RT-PCR with ethidium bromide has been reported to show similar results within the standard error (28,29).

Total RNA from each side of POA–AHA was extracted separately by a single-step method based on guanidine isothiocyanate–phenol–chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL). RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm, and its integrity was verified by electrophoresis on 1.2% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. A 2- μ g amount of total RNA was reverse transcribed to synthesize single-stranded cDNA. Subsequently, 10 μ L of the reverse transcriptase reaction was subjected to PCR in order to co-amplify a fragment of GnRH, ER- α and ER- β , and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes.

The PCR reaction was done in an Eppendorf gradient thermocycler. The 50 μ L PCR reaction included: 10 μ L of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each the four dNTPs, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 U of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with nontranscribed RNA were included in all experiments.

Initial standard conditions were established for GnRH, ER- α , ER- β , and GAPDH amplification. The cycle number was performed within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. In all samples a single product of 250 bp corresponding to GnRH fragment, one of 337 bp corresponding to ER- α , and another of 301 bp corresponding to ER- β were obtained. Primers selected for the amplification of GnRH, ER- α , and ER- β had the following sequences: GnRH sense: CAA CCC ATA GGA CCA GTG CTG G, GnRH antisense: CAC TAT GGT CAC CAG CGG GG, ER- α sense: TTC ACA CCA AAG CCT CGG G, ER- α antisense: TGC AGC AGC ATC AGC GGA, ER- β sense: TCC CGG CAG CAC CAG TAA C, ER- β antisense: CCC AGA TGC ATA ATC GCT GC. For semiquantitative analysis of mRNA from GnRH, ER- α , and ER- β , RT-PCR amplification of mRNA corresponding to GAPDH was carried out routinely in parallel as an internal control of messenger quality and quantity.

After the PCR, amplified products (25 μ L) were resolved on 2% agarose gel stained with ethidium bromide, and photographed under an UV transilluminator. The image was captured with the Kodak EDAS 206 system. To determine changes in the expression of GnRH, ER- α , and ER- β mRNA, the density and area of each band of the GnRH, ER- α , and ER- β PCR products were analyzed with the Scion Image program and values were normalized to densitometric values of corresponding GAPDH PCR products.

Reagents

Chemical reagents were purchased from Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO) and Gibco-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD). Taq DNA polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, New Jersey).

Statistic Analysis

Normalized densitometric GnRH, ER- α , and ER- β mRNA expression values of left and right sides of POA–AHA at 09:00, 13:00, and 17:00 of each day of the estrous cycle were analyzed. Each experimental group ($n = 3$) was analyzed separately using box plots to find outlier distribution values. In all the groups, the values fell within normal distribution limits, thus there was no need for more repetitions within groups. Complete box plots were used instead of the mean \pm SEM in Figs. 1A, 2A, and 3A. As an example Fig. 4 shows the box plot of two experimental groups with the individual values of each group. From the broken relative expression axis it can be seen that the distributions seem independent of each other and that the values in each distribution should be significantly different from the values of the other distribution. To determine if there were statistical significant differences between experimental groups, especially between experimental groups of different sides, multivariate analysis of variance (MANOVA) was used, taking as variables the side, day, and hour, independently,

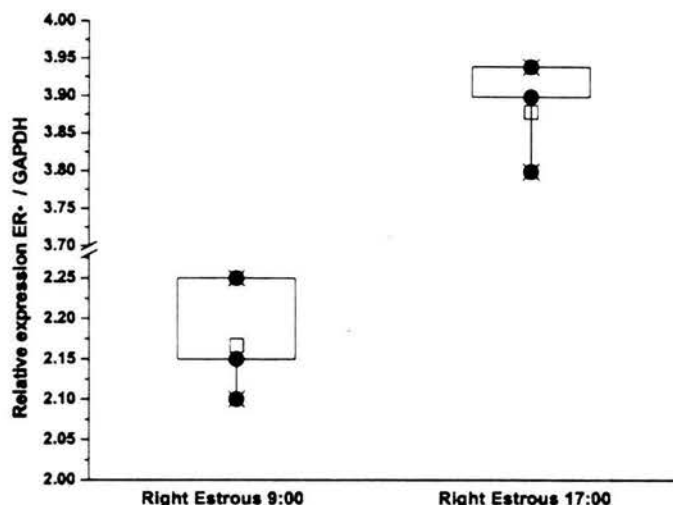


Fig. 4. Example of box plot distribution for two different experimental groups. Box plots for two different experimental groups are shown together with the sampled values. The box represents the range between the 25–75 percentiles, the square represents the mean, the X's represent 1% and 99%, and the underscores represent the minimum and maximum of the distribution. Filled circles represent the values of the sampled data. The relative expression axis has been broken to accommodate both distributions in the same graph. Note that, although the distributions are not symmetrical, the data stays within the distributions.

and in nested combinations of the three variables. Significant results were only obtained when side was used as the variable and when day and hour were nested under the side. The F -ratio was calculated and a corresponding probability of $p < 0.05$ was considered as statistically significant between at least two experimental groups. To find which groups had the statistical differences, pairwise Tukey test was performed between pairs of experimental groups where $p < 0.05$ was accepted as significant. Tables 1, 2, and 3 show those groups that had significant differences between them for ER- α , ER- β , GnRH, respectively. The tables do not show pairwise statistics within sides because only the peaks were statistically significant, as should be expected. Tables are included for the reader to check which pairs are significant and which not because is difficult to see it from the figures directly, especially for nonpeak values. All statistics were performed using SYSTAT 7.0 for Windows (SYSTAT, Inc., Evanston, IL).

Acknowledgments

CONACYT Grants 2785-1N and Fellowship 121846 supported this study.

References

- Conn, P. M. (1994). In: *The physiology of reproduction*. Knobil, E. and Neill J. (eds.). Raven Press: New York, pp. 1349–1377.
- Freeman, M. E. (1994). In: *The physiology of reproduction*. Knobil, E. and Neill, J. (eds.). Raven Press: New York, pp. 613–658.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., et al. (1997). *Endocrinology* **138**, 863–870.
- Laflamme, N., Nappi, R. E., Drolet, G., Labrie, C., and Rivest, S. (1998). *J. Neurobiol.* **36**, 357–378.
- Hrabosvsky, E., Steinhauser, A., Barabas, K., et al. (2001). *Endocrinology* **142**(7), 3261–3264.
- Kallo, I., Butler, J. A., Barkovics-Kalo, M., Goubillon, M. L., and Coen, C. W. (2001). *J. Neuroendocrinol.* **13**(9), 741–748.
- Gerendai, I. and Halász, B. (1997). *Front. Neuroendocrinology* **18**, 354–381.
- Cruz, M. E., Jaramillo, L. P., and Dominguez, R. (1989). *J. Endocrinol.* **123**, 437–439.
- Fukuda, M., Hashimoto, R., Yamanouchi, K., Arai, Y., Kimura, F., and Takada, M. (1992). *Zool. Sci.* **9**, 223–226.
- Moran, J. L., Cruz, M. E., and Dominguez, R. (1994). *Brain Res. Bull.* **33**, 663–668.
- Nance, D. M. and Moger, W. H. (1982). *Brain. Res. Bull.* **8**, 299–302.
- Nance, D. M., White, J. P., and Moger, W. H. (1983). *Brain Res. Bull.* **10**, 353–355.
- Nordeen, E. J. and Yahr, P. (1982). *Science* **218**, 391–393.
- Davis, P. G., McEwen, B. S., and Pfaff, D. W. (1984). *Endocrinology* **104**, 898–903.
- Krege, J. W., Hodgin, J. B., Couse, J. F., et al. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15671–15682.
- Lubahn, D. B., Mayer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. F., Korach, K. S., and Smithes, O. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11162–11166.
- Rissman, E. F., Early, A. E., Taylor, J. A., Korach, K. S., and Lubahn, D. (1997). *Endocrinology* **138**, 507–510.
- Wersinger, S. K., Sannen, K., Villalba, C., Lubahn, D. J., and Rissman, E. F. (1997). *Horm. Behav.* **32**, 176–183.

19. Wersinger, S. K., Hasienleder, D. J., Lubahn, D. J., and Rissman, E. F. (1999). *Endocrine* **11**, 137–143.
20. Gerendai, I., Rotsztjen, W., Marchetti, B., Kordon, C., and Scapagnini, U. (1978). *Neurosci. Lett.* **9**, 333–336.
21. Gerendai, I., Rotsztjen, W., Marchetti, B., and Scapagnini, U. (1979). In: *Neuroendocrinology: biological and clinical aspects*. Polleri A. and MacLeod R. M. (eds.). Academic Press: New York-London, pp. 97–102.
22. Inase, Y. and Machida, A. T. (1992). *Brain Res.* **580**, 338–340.
23. Bakalkin, G. Y., Tsibezov, V. V., Sjutkin, E. A., Veselova, S. P., Novikov, I. D., and Krivosheev, O. G. (1984). *Brain Res.* **296**, 361–364.
24. Shugrue, P. J., Scrimo, P. J., and Merchenthaler, I. (2000). *Neuroscience* **96**(1), 41–49.
25. Gore, A. C. and Roberts, J. L. (1995). *Endocrinology* **136**(3), 889–896.
26. Gore, A. C. and Roberts, J. L. (1997). *Front. Neuroendocrinology* **18**(2), 209–245.
27. König, J. F. R. and Klippel, R. A. (1963). In: *The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem*. Williams and Wilkins: Baltimore, MD, pp. 162–163.
28. Santagati, S., Garnier, M., Carlo, P., et al. (1997). *Brain Research Protocols* **1**, 217–223.
29. Wang, A., Doyle, M., and Mark, D. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9717–9721.

Falta página

N° 23

CUADRO 1. - Resumen y representación esquemática de la máxima expresión del ARNm de ER- α , ER- β y GnRH en el lado izquierdo y derecho de POA-AHA durante el ciclo estrol.

Expresión del ARNm	Lado de POA-AHA en que ocurrió la máxima expresión del ARNm	Día del ciclo estrol en que ocurrió la máxima expresión del ARNm	Hora del ciclo estrol en que ocurrió la máxima expresión del ARNm
ER- α	DERECHO	ESTRO	17:00 horas
ER- β	IZQUIERDO	DIESTRO-2	13:00 horas
GnRH	DERECHO	DIESTRO-2	13:00 horas

Segundo Capítulo

ANTECEDENTES

♣Lo mejor de la vida es el pasado, el presente y el futuro.

Pier Paolo Pasolini

LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES REPRODUCTORAS.

En el sistema nervioso central la comunicación entre neuronas se lleva a cabo por transmisión sináptica, que genera la propagación de impulsos nerviosos de una neurona a otra. Esto sucede a través de la sinápsis, que es el contacto de la neurona presináptica con la neurona postsináptica. Un axón puede hacer sinapsis en cualquier zona de la otra neurona, así que pueden existir sinápsis del tipo axodendrítica, axosomática, dendro-dendrítica y axo-axónica.

En la mayoría de los casos los impulsos nerviosos son transmitidos en las sinapsis por medio de la liberación de sustancias químicas conocidas como neurotransmisores. Los neurotransmisores son un grupo de compuestos químicos diversos que van desde aminas simples y aminoácidos, como la dopamina y GABA, hasta compuestos más complejos como los polipéptidos.

Diversos neurotransmisores regulan la actividad de las neuronas GnRHérgicas^{18,36,164,166} Para fines prácticos a continuación se resumen los sistemas de neurotransmisión que participan en la regulación de las funciones reproductoras (Tabla 2).

Tabla 2.- Resumen de los diferentes sistemas de neurotransmisión y su relación con las funciones reproductoras.

Neurotransmisores

Neurotransmisor		
<p>Acetilcolina (ACh) 25,105,109,181,249,259</p>	<p>Las concentraciones del neurotransmisor, del receptor así como de las enzimas que sintetizan y degradan a la ACh, varían durante el ciclo estral de la rata.</p>	<p>Estimula la liberación de LH</p>
<p>Serotonina (5-HT) 104,113,124,169,170,187,188,210,261</p>	<p>Hace sinápsis en eminencia media y área preóptica medial (MPO y EM) con GnRH. El núcleo del rafe presenta receptores a estrógenos y progesterona.</p>	<p>Estimula la liberación preovulatoria de LH</p>
<p>GABA 62,81,111,146,165,188,211,230</p>	<p>Es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro. Se encuentra en altas concentraciones en el hipotálamo. Tiene receptores a estrógenos. Terminales neuronales hacen sinápsis con GnRH.</p>	<p>Inhibe la liberación de LH</p>
<p>Glutamato 13,35,74,81,100,101,188</p>	<p>Presenta receptor a estrógenos y progesterona</p>	<p>Estimula la liberación de GnRH</p>
<p>Histamina 188</p>	<p>Hace sinápsis con la neurona GnRH en POA, en otros núcleos cerebrales presenta receptor a estrógenos</p>	<p>Estimula la liberación de GnRH vía los receptores H1</p>
<p>Catecolaminas 23,54,182,184,187,188,205,208</p>	<p>Poseen receptores a estrógenos</p>	<p>Estimula la liberación de GnRH, vía los receptores α y β adrenérgicos.</p>
<p>Neuropeptido Y 93,110,188</p>	<p>La expresión del gen a NPY aumenta durante la secreción preovulatoria de LH</p>	<p>Estimula la secreción de LH, efecto que depende de los estrógenos.</p>

<p>Sustancia P 93,110,188,192</p>	<p>En el sistema nervioso central, la concentración de la sustancia P varía durante el ciclo estral en la rata hembra adulta.</p>	<p>Induce la liberación de LH en ratas hembras adultas.</p>
<p>Dopamina 21,163,187,188,282</p>	<p>En POA se han descrito sinapsis entre las neuronas GnRH y las dopaminérgicas, quienes poseen receptores a estrógenos.</p>	<p>Puede estimular o inhibir la secreción de LH.</p>
<p>Óxido Nítrico 74,247,287</p>	<p>El óxido nítrico es secretado por células que rodean a las neuronas GnRH. No coexiste con GnRH. En mPOA las neuronas que sintetizan ON presentan receptor a estrógenos.</p>	<p>El óxido nítrico estimula la secreción de LH, ya que en estudios hechos <i>in vivo</i> se demostró que la administración de inhibidores de ON disminuye la concentración de LH</p>
<p>Neurotensina 3,4,5,107,188,274</p>	<p>La expresión de este neuropeptido es sensible a estrógenos</p>	<p>La infusión de la neurotensina en POA aumenta las concentraciones de LH.</p>
<p>Factor Natriurético Atrial 174,175,188</p>	<p>Se localiza en áreas hipotalámicas relacionadas con el control del balance de agua</p>	<p>En concentraciones de 10-1000 nM aumenta la concentración de LH en cultivos de hipófisis.</p>
<p>Galanina 28,81,108,156,188,221,228</p>	<p>La galanina está colocalizada con GnRH, GABA y neurotensina. Se correlaciona de manera sincrónica con la secreción fásica de GnRH del sistema portahipofisario. Es coliberada con GnRH.</p>	<p>Potencia la respuesta de la hipófisis a la GnRH en la secreción de LH.</p>
<p>CRF 174,175,188</p>	<p>Inerva neuronas A1, relacionadas con la regulación de la secreción de gonadotropinas</p>	<p>Inhibe la secreción de GnRH y de LH.</p>
<p>Colecistoquinina 140,174,175,188</p>	<p>Esta colocalizada con dopamina, serotonina y</p>	<p>Estimula la secreción de LH.</p>

GABA		
Angiotensina II 140,174,175,188		Estimula la secreción de LH.
Endotelinas 140,174,175,188	En células GT-1 estimula la secreción de GnRH	In vivo estimula la secreción de LH.
Bradiquininas 140,174,175,188		Inhibe la secreción de FSH.
VIP 93,110,188		Estimula la secreción de LH.
GIP (péptido inhibidor de la gastrina) 93,110,188,231	No estimula la secreción de FSH	Estimula la secreción de GnRH y de LH.
Péptidos opioides 93,110,188,201,225	Disminuyen la frecuencia de pulsos de GnRH. Regulan la amplitud y frecuencia de los pulsos de LH	Inhiben la secreción preovulatoria de LH..
Citoquinas 140,174,175,188	Sus efectos sobre la concentración de LH, dependen de las condiciones hormonales.	Inhibe la secreción de LH.
Somatostatina 174,175,188	Inerva a las neuronas GnRH. Varía durante el ciclo estral.	Inhibe la secreción de LH.

EL SISTEMA COLINERGICO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES REPRODUCTORAS.

En la primera parte de esta tesis se mostro que la expresión del ARNm para ER- α , ER- β y GnRH es asimétrica y que varia durante el ciclo estral, por otro lado se sabe que el sistema colinérgico participa de manera estimulante en la regulación de las funciones reproductoras y hay evidencia experimental que parece indicar que esta regulacion es asimétrica, por lo tanto se decidio estudiar la posible exstencia de una relacion entre la expresión asimétrica del ARNm de ER- α , ER- β y GnRH y la regulación asimétrica del sistema colinérgico sobre las funciones reproductoras.

El sistema colinérgico tiene como neurotransmisor a la acetilcolina (**ACh**), la cual es una molécula que se sintetiza a partir de la colina y de la acetil-CoA por medio de la acción de la colinoacetiltransferasa (CAT) (Fig 4).

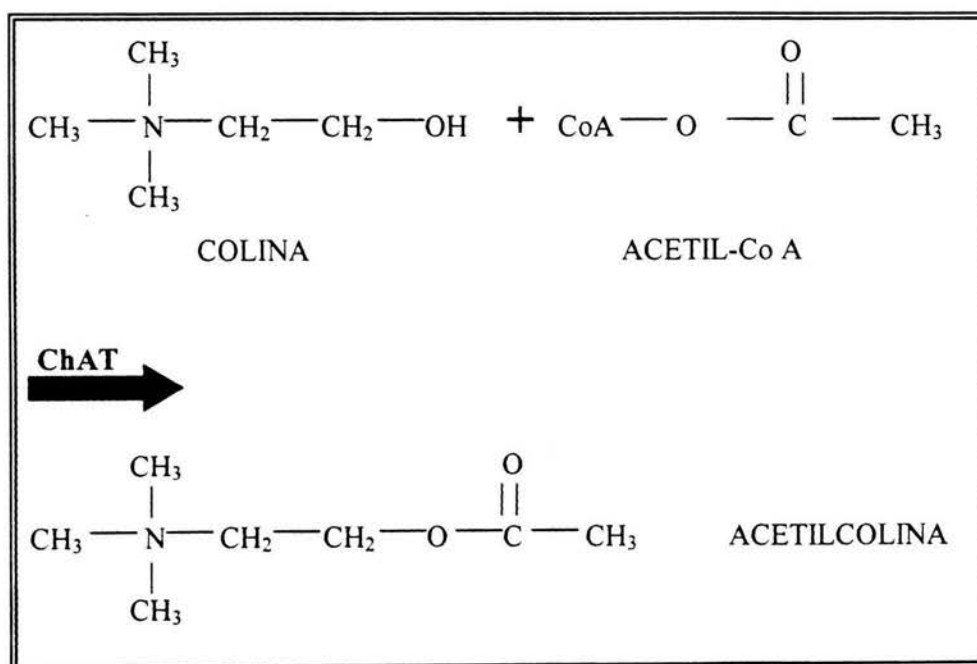


Figura 4.- Síntesis de Acetilcolina a partir de colina y acetil- CoA

Las neuronas que sintetizan y liberan ACh son llamadas neuronas colinérgicas. La localización neuroanatómica de estas neuronas en el cerebro de la rata se determinó por métodos inmunohistoquímicos de su enzima biosintética la ChAT.^{88,89}

En el sistema nervioso central (SNC) existen cuatro grupos en donde se localizan los grupos neuronales colinérgicos :

1. **EL NÚCLEO ESTRIADO** : Las neuronas localizadas en el núcleo estriado se proyectan hacia el neostriado (núcleo caudado, putamen) y hacia áreas asociadas (núcleos accumbens, tubérculo olfatorio)⁷
2. **EL NÚCLEO BASAL MAGNOCELULAR:** en el núcleo basal magnocelular se observaron neuronas más grandes, marcadas con CAT,. Estas neuronas se localizan en el núcleo de la banda diagonal de Broca (límites horizontales y verticales). El núcleo magnocelular preóptico, la sustancia innominata y en el globus pallidus. Este grupo neuronal proyecta axones colinérgicos hacia todas las partes de la neocorteza, partes de la corteza límbica y la amígdala. También la banda diagonal de Broca y el núcleo septo medial proyectan axones colinérgicos hacia el hipocampo y el giro dentado.⁷
3. **NÚCLEOS CRANEALES DE NERVIOS MOTORES:** Otro grupo de neuronas grandes fue observado en todos los núcleos somáticos y viscerales del núcleo motor nervioso.⁷
4. **EL NÚCLEO PONTINO TEGMENTAL:** Se observaron neuronas agrupadas en el núcleo tegmental pontino del cerebro medio caudal; dorsolateralmente en la parte más caudal de la sustancia nigra, y extendidas en dirección caudodorsal a través de la formación reticular

del cerebro dentro del área que rodea el pedúnculo cerebelar superior. Las neuronas de este último grupo constituyen el núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) ⁷

Un grupo adicional de células correspondientes al núcleo tegmental laterodorsal (LDT) se observaron adyacentes al PPT. Las neuronas pertenecientes a estos grupos proyectan sus terminales hacia el tálamo e hipotálamo. ⁷

La ACh ejerce sus efectos a través de dos tipos de receptores: los receptores nicotínicos (nAChR) y los muscarínicos (mAChR). Los receptores nicotínicos son del tipo ionotrópico y los muscarínicos metabotrópicos. ^{241,243,257,277}

Los nAChR se caracterizan por tener varios subtipos que varían según el tipo de subunidades que los componen ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$). Su estructura general está compuesta por un dominio extracelular amino terminal, tres dominios transmembranales y una región extracelular carboxi terminal.

En este trabajo son los mAChR los que se estudiaron así que se describirán con más detalle sus características. Los mAChR tienen cinco subtipos (M1 –M5) los M1, M3 y M5 están acoplados a Gq/11 y son intermediarios en la activación de la fosfolipasa C (PLC) y de la señalización de la vía del inositolfosfato (InsP3 /Ca²⁺). Los M2 y M4 están acoplados a Gi/o y son intermediarios en la inhibición de la producción del AMPc. Ambas clases de receptores colinérgicos se expresan en todo el cerebro y son abundantes en el hipotálamo ^{8,41,277}

Los receptores muscarínicos pueden ser estimulados o inhibidos por fármacos específicos, tal es el caso de la atropina (ATR) que es clasificada como un fármaco antagonista, es decir bloquea el receptor inhibiendo cualquier tipo de acción que pueda tener la acetilcolina sobre este. La ATR (Fig 6) está clasificada

como un alcaloide (bases orgánicas nitrogenadas) derivada de la planta *Atropa belladonna*. La presencia del grupo N-metilo cambia la actividad del ligando, previniendo así la interacción cercana entre el ligando y la membrana del receptor.^{103,172,185,216,217,235}

En diversos estudios donde se emplearon fármacos antagonistas y agonistas de ACh se mostró que este sistema de neurotransmisión está involucrado en la regulación de las funciones reproductoras, así como en la secreción de la GnRH.^{12,92,105,186,189} La estimulación de los receptores muscarínicos resulta en la liberación de la GnRH. Estudios *in vitro* utilizando la coincubación de hipófisis e hipotálamo, muestran que la acetilcolina estimula la liberación de la FSH y de la LH, efecto que es bloqueado por ATR.⁹¹ Por el contrario, la liberación preovulatoria de la LH, que ocurre en el día del proestro, estaría regulada de manera inhibitoria por los receptores nicotínicos, ya que la administración de nicotina durante el "período crítico" del día del proestro, suspende la liberación de la LH, pero no la de la FSH.^{26,272}

Por otro lado, estudios realizados en la coneja y la rata han confirmado que el sistema colinérgico participa de manera estimulante en la regulación de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción preovulatoria de gonadotropinas durante el día del proestro. En la coneja, animal de ovulación refleja, la inyección de sulfato de atropina inmediatamente después del coito bloquea la ovulación. En la rata, animal de ovulación espontánea, el mismo tratamiento en la tarde del proestro, impide la ovulación esperada en la mañana del estro.^{96,97,98}

La participación del sistema colinérgico en la regulación de la ovulación varía durante el ciclo estral. Esta afirmación resulta del hecho de que la cantidad de sulfato de atropina necesaria para bloquear la ovulación en un ciclo estral determinado varía entre 700 mg/kg en el día del proestro, hasta 100 mg/kg en los

días del diestro 1 y 2. En los días del diestro 1 y 2, la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación parece tener un ritmo circádico. La inyección de 100 mg/kg a las 09:00 hrs, no afecta la ovulación; si se inyecta a las 13:00 hrs, la bloquea y vuelve a no tener efectos cuando se le inyecta a las 17:00 o 21:00 hrs.⁷⁹

En POA-AHA, la cantidad de los receptores muscarínicos varía durante el ciclo estral, siendo mayor en el día del proestro, lo cual coincide con el hecho de que es en el día del proestro cuando se requiere de la dosis mas alta de sulfato de atropina (700 mg/kg) para bloquear la ovulación. Por otro lado la división mitótica de los gonadotropos que sintetizan la LH es estimulada por la administración de fármacos colinomiméticos.^{239,244,271}

El sistema colinérgico regula la función de la neurona GnRHérgica. Estudios en neuronas GT1 y en cultivos de neuronas extraídas de ratas hembras durante el ciclo estral, mostraron que dependiendo del receptor muscarínico que se estimule o inhiba farmacológicamente, se inhibe la producción de GnRH. Es así que los m4 AchR y m2 AchR que están ligados a la vía de las fosfoinositol inhiben la secreción de GnRH mientras que los otros tres subtipos no la afectan²⁰⁴

La actividad funcional del sistema colinérgico (medida por la actividad de la ChAT, por el contenido o la liberación de la acetilcolina y por la densidad o la afinidad de sus receptores), está regulada por las hormonas esteroides. La administración de estradiol incrementa la actividad de la CAT en la vía colinérgica septo-hipocampo y el sistema baso-cortical¹²⁵, la concentración de la CAT en POA-AHA^{255,256} y la densidad de receptores muscarínicos en el hipotálamo medio basal y los sitios de unión a la α -bungarotoxina en el núcleo supraquiasmático. En áreas extrahipotalámicas como en la corteza frontal y en el hipocampo, los estrógenos también regulan la actividad del sistema colinérgico.

Algunos estudios muestran que el sistema colinérgico regula el funcionamiento del receptor a estrógenos, ya que la inyección de un agonista muscarínico como el betanecol, incrementa en un 35% el número de sitios de unión a estradiol en el hipotálamo de ratas hembras ovariectomizadas, en comparación con los valores encontrados en el hipotálamo de ratas hembras testigo. Por otro lado el pretratamiento con sulfato de atropina, un antagonista muscarínico, bloqueó el efecto estimulante del betanecol. ^{64,78,126,127,128,129,202,203,223,224,238,248}

ASIMETRIAS DEL SISTEMA COLINERGICO Y SU RELACIÓN CON LAS FUNCIONES REPRODUCTORAS.

Se ha mostrado que el sistema colinérgico es asimétrico desde el punto de vista funcional. En ratas hembra adultas la actividad de ChAT, la concentración de ACh, así como la cantidad de receptores muscarínicos es mayor en el lado derecho de POA-AHA que en el lado izquierdo. Estas varían durante el ciclo estral.^{55,57}

En días específicos del ciclo estral de la rata el bloqueo farmacológico generado por implantes de cristales de atropina en un lado específico de POA-AHA, inhiben la ovulación en la rata^{56,58,220}

El papel regulador del sistema colinérgico en la región de POA-AHA es diferente entre el lado izquierdo y derecho, y varía durante el ciclo estral. Dado que cuando se hacen implantes de atropina en el lado derecho de POA-AHA en el día del estro y diestro-1 se bloquea la ovulación de las ratas implantadas, mientras que cuando se hace el implante en el lado izquierdo de POA-AHA en los días del diestro-1 y diestro-2 la ovulación es bloqueada.

Cuando se reemplazó hormonalmente la señal ovárica con una inyección subcutánea de 17β -estradiol, en aquellos grupos que no ovularon con el implante de atropina en el lado izquierdo, estos reestablecieron su ovulación; mientras que los grupos con implante en el lado derecho de POA-AHA no reestablecieron la ovulación.^{56,58}

Estos resultados parecen indicar que este efecto es debido a que el bloqueo del sistema colinérgico en el lado derecho de POA-AHA resulta en una alteración en la respuesta o síntesis del receptor a estrógenos de esa área de cuya función depende la ovulación.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El sistema colinérgico regula de manera asimétrica la secreción de LH, GnRH y la ovulación. Ya que la inyección subcutánea de sulfato de atropina a diferentes horas del día, en los diferentes días del ciclo estral, o el implante de atropina en las porciones derecha o izquierda de POA-AHA a las 13:00 hs de los diferentes días del ciclo bloquean la ovulación esperada en el día del ciclo estudiado; y que el tratamiento con GnRH sintética o con hCG en el día del proestro reestablecen la ovulación en ratas con bloqueo colinérgico, y que ratas implantadas con atropina en el lado derecho POA-AHA tratadas con benzoato de estradiól en la tarde del diestro 2 no ovulan pero si lo hacen las ratas con implante en el lado izquierdo, en esta segunda parte de la investigación se evaluarán los efectos del bloqueo del sistema colinérgico por vía subcutánea sobre la expresión del ARNm para ER- α , ER- β y GnRH, evaluadas en el momento del ciclo en que ocurre su máxima expresión en POA-AHA.

HIPOTESIS

El bloqueo del sistema colinérgico afectará la expresión del ARNm de una o de ambas isoformas del receptor a estrógenos, así como la expresión de GnRH en el momento en que se da la mayor expresión de estos genes en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA de la rata hembra.

OBJETIVOS

- Evaluar los efectos de la inyección subcutánea de sulfato de atropina sobre la expresión del ARNm de las isoformas del receptor a estrógenos y de GnRH en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA de la rata hembra.

RESULTADOS

Differential cholinergic system regulation of mRNA expression of estrogen receptor isoforms and GnRH, in the left and right sides of the preoptic and anterior hypothalamic area of cyclic female rats.

Paola R. Arteaga-López*, Roberto Domínguez†, Marco A. Cerbón†, Carmen A. Mendoza-Rodríguez† and María Esther Cruz*

* Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
† Facultad de Química, U.N.A.M. México D.F., México.

Effects of cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the preoptic and anterior hypothalamic area of cyclic female rats.

Paola R. Arteaga-López*, Roberto Domínguez[†], Marco A. Cerbón[†], Isabel Arrieta[†], Carmen A. Mendoza-Rodríguez[†] and María Esther Cruz[†]

* Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza + Facultad de Química, U.N.A.M. México D.F., México.

Abstract.

In a previous study, we showed that in the left and right side of the pre-optic and anterior hypothalamic area (POA-AHA), mRNA levels of GnRH, and estrogen receptors alpha ($ER\alpha$) and beta ($ER\beta$) vary along the estrous cycle. There is also evidence that the blocking effects on ovulation blockade caused by injecting atropine sulfate also vary along the estrous cycle. The present study aims to determine if the cholinergic system participates in regulating mRNA expression of GnRH and $ER\alpha$ and $ER\beta$ isoforms in the left and right sides of the POA-AHA. To accomplish this objective, the effects of injecting atropine sulfate on estrus (E) or diestrus-1 (D1) was analyzed on the maximum mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the POA-AHA.

Injecting atropine sulfate on E blocked mRNA expression for $ER\alpha$ in both sides of the POA-AHA, but had no apparent effect on the maximum mRNA expression for $ER\beta$ in either side of the POA-AHA, while atropine sulphate treatment diminished mRNA expression for GnRH in both sides of the POA-AHA.

Injecting atropine sulphate on D1 resulted in the suppression of $ER\alpha$ expression in both sides of the POA-AHA on diestrus 2; the maximum expression of $ER\beta$ diminished in the left side of the POA-AHA, without changes in the right one; and the mRNA expression for GnRH increased in the left side of the POA-AHA.

The expression of the $ER\alpha$ protein during the estrous cycle had its maximum expression on the right side of the POA-AH on D1 at 09:00 h. Injecting atropine sulphate at 13.00 h on E resulted in a significant decrease in the number of cells measuring positive for $ER\alpha$ protein at 17.00 h on the same day of treatment. These observations suggest that the expression of $ER\alpha$ mRNA and the protein synthesis are stimulated by the cholinergic system, while the regulation of mRNA expression for $ER\beta$ and GnRH depend on other systems of neurotransmitters.

Keywords: cholinergic system, atropine, GnRH, ER alpha, ER beta, hypothalamic lateralization, estrous cycle, mRNA expression

Running title: Cholinergic regulation of expression of GnRH and estrogen receptor isoforms.

Introduction.

Estrogen (E_2) participates in regulating several central nervous system functions, the most important of which is in regulating reproductive functions, including GnRH and gonadotropine secretion (1). The secretion of both of these hormones is mediated by two estrogen isoform ($ER-\alpha$ and $ER-\beta$) receptors (2), while the activity of GnRH neurons is modulated by several neurotransmitters (3).

Using agonists or antagonist drugs to block or stimulate the "activity" of cholinergic receptors, the stimulatory role played by the cholinergic system in regulating gonadotropine and GnRH secretion has been demonstrated (4).

Work by Dominguez et al (1982) (5) has shown that Injecting atropine sulphate (muscarinic antagonist) subcutaneously blocks ovulation, and the dose required to achieve this effect varies along the estrous cycle. Diestrus-1 (D1) requires the minimal required dose for blocking ovulation, while treatment on proestrus (P) requires the highest dose to achieve .

The effects of implanting agonist or antagonist drugs, in the right or left side of the POA-AHA, on ovulation depends on both, the day of the estrous cycle and the side of hypothalamus where the drugs are injected or implanted (6,7,8,9,10). Ovulation is blocked when atropine implants on the right side of the POA-AHA are applied on E, while the same treatment on the left side had no apparent effect. In turn, when the atropine implant was applied on D1, the blockade of ovulation did not present asymmetric response. Compared to the effects of implanting atropine on E, implants applied on diestrus 2 (D2) showed an inverse asymmetry, i.e. the implants placed on the left side of the POA-AHA blocked ovulation, while the implant on the right side had no apparent effect. Conversely, blocking the cholinergic system unilaterally on the day of P did not modify spontaneous ovulation (6,7,8,9).

The participation of the cholinergic system in regulating GnRH hypothalamic secretion also presents asymmetry when the system was unilaterally stimulated with pilocarpine, and its participation was also found to vary along the estrous cycle (10). The most marked difference in the asymmetric responses of stimulating the POA-AHA's cholinergic system on ovulation was observed on E. Stimulating the left side resulted in complete ovulation blockade, while the same treatment on the right side had no effect. These results are a mirror image of the effects observed when implanting atropine sulphate. Ovulation was blocked when the pilocarpine was implanted on P in the right side of the POA-AHA, while the same procedure on the left side had no apparent effect (10).

Previously, we showed that in the POA-AHA, the expression of mRNA for ER- α , ER- β and GnRH is asymmetric and varies along the estrous cycle (11). The maximum expression of the mRNA for ER- α was observed on E in the right side of the POA-AHA at 17.00 h, with a small second peak on D2 at 13.00 h. In turn, the maximum expression of mRNA for both, ER- β and for GnRH, was observed on D2 in the left side of the POA-AHA at 13.00 h (11).

Based on our laboratory's previous results (5,6,7,8,9,10) and on published evidence that the cholinergic system seems to regulate ovulation and the secretion of both, GnRH and gonadotropin (4,5), this study analyzes if blocking the cholinergic system by injecting atropine sulfate on E or D1 affects the maximum expression of mRNA for ER- α , ER- β and GnRH on either side of the POA-AHA. Based on the results obtained during the experiment, we also analyzed if the expression of the gene codifying for the ER- α also varies along the estrous cycle and if the cholinergic system participates in regulating such expression. For this purpose, using immunohistochemical methods, we identified and measured the levels of ER- α protein in the POA-AHA.

Results.

The effects of injecting atropine sulphate subcutaneously, on E at 13:00 h, in the left and right sides of POA-AHA on mRNA expression for ER- α , ER- β and GnRH.

Injecting atropine sulfate at 13:00 h on E blocked the maximum expression of ER- α mRNA in both sides of the POA-AHA when measured the same day of treatment at 17:00 h. Control animals, treated with vehicle and sacrificed at the same time, showed normal levels of ER- α mRNA expression (Figure 1).

The maximum expression of ER- β mRNA (D2 at 13:00 h) was not affected by the injection of atropine sulfate on E in either side of the POA-AHA (Figure 2); while the expression of GnRH mRNA decreased significantly in both sides of POA-AHA (Figure 3).

The effects of injecting atropine sulphate subcutaneously, at 13:00h of D1, in the left and right sides of the POA-AHA on ER- α , ER- β and GnRH mRNA expression.

Injecting atropine sulfate blocked the ER- α mRNA expression in both sides of the POA-AHA (Figure 4), while injecting vehicle did not modify it.

Atropine sulfate treatment resulted in a decrease in the maximum expression of ER- β mRNA in the left side of POA-AHA, but no changes in ER- β mRNA levels in the right side of the POA-AHA (Figure 5).

In turn, atropine sulfate treated animals, sacrificed at 13:00h of D2, showed GnRH mRNA expression increases in both sides of the POA-AHA, though levels were significantly higher in the left than in the right side of the POA-AHA (Figure 6).

Modifications on ER- α protein expression in the right and left sides of POA-AHA during the estrous cycle of the rat

No significant difference in the mean number of cells expressing the ER α protein was observed between the left and right sides of the POA-AHA (1011 \pm 97 vs. 1112 \pm 103, non significant n.s.). Figure 7 presents the changes along the estrous cycle in the mean number of cells showing positive for the ER α protein. During the estrous cycle, the highest number of positive cells was observed at 09.00 of D1 in the right side of the POA-AHA (2256 \pm 163), and in the left side on D2 at 17.00 h (2072 \pm 147). The lowest number of cells expressing the ER α protein was observed in the left side of the POA-AHA at 13.00 of E.

Figure 7 presents the number of ER α positive cells in the left and right side of the POA-AHA at 09.00, 13.00 and 17.00 hours of each day of the estrous cycle. At 09.00, the number of positive cells was similar on D2, P, and E. At 13.00 h the number of positive cells measured on D2, P and E were significantly lower than those measured on D1. The number of ER α positive cells measured at 13-h on P was significantly higher than in D2 or E; while the lowest number of positive cells was observed at 17.00 hours of P. In the left side of the POA-AHA at 09.00 the lowest number of positive cells counted was at P, while at 13.00 it was on D2 and E, and at 17.00 h it was observed at P.

Significant differences in the number of ER α positive cells, between the left and right side of the POA-AHA, were observed at 09.00 on D1 and P, and at 13.00 on E. In the three instances, the highest values were observed in the right side of the POA-AHA.

The atropine sulphate injection at 13:00 h of E blocked the ER- α mRNA expression in both sides of the POA-AHA measured at 17:00 h of the same day (left side 842 \pm 110 vs vehicle 1290 \pm 64; right side 743 \pm 98 vs. 1579 \pm 221 p<0.05 Student's t test).

Discussion

The results presented herein show that protein levels resulting from the mRNA for ER- α expression vary along the estrous cycle and are asymmetric between the left and right sides of the POA-AHA. The results also suggest that the pretranscriptional mechanisms of the genes coding for ER- α are modulated by the cholinergic system, and are mediated by muscarinic receptors in a stimulatory way. In turn, such modulation is partial for ER- β expression. Present results agree with Leubner et al. (12,13) observations, that injecting atropine into the brain of rats diminishes ER affinity in the POA-AHA. Given that injecting atropine sulfate into the POA-AHA partially affected the expression of the GnRH gene in both sides of the POA-AHA, we suggest that gene expression is modulated by several neuroendocrine mechanisms.

The observed inhibiting effect of atropine sulfate on ER- α mRNA expression but not on ER- β could be explained as a sign that the muscarinic receptors are linked to second messengers that elicit different functions, such as the gene stimulation suggested by Krishmanov (14). Thus, ER α mRNA expression could depend directly on the stimulation of muscarinic receptors, while ER β mRNA expression does not seem to completely depend on them.

According to Silverman et al (1994) (15), there is no evidence regarding the direct communication between GnRH neurons and the cholinergic fibers. However, blocking muscarinic receptors affects GnRH synthesis, (14), suggesting that this blockade could be mediated by second messengers.

Present results suggest that the cholinergic system partially regulates GnRH mRNA expression in a stimulatory way, that such regulation is different for the right and left sides of the POA-AHA, and that it varies along the estrous cycle. These results support the idea of asymmetry in the mechanisms regulating GnRH and gonadotropin secretion (6,7,8,9). In addition, the higher

sensitivity to atropine sulfate observed on D1, compared to the effects observed on E (5), further supports this idea.

ER α could mediate the effects of the cholinergic system blocking ovulation since injecting agonist or antagonist cholinergic drugs increases or decreases the number of cytosolic hypothalamic estradiol binding sites in female rats (12,13). In addition, anatomical data suggest that ER α and ER β are present in cholinergic neurons, being the ER α predominant (16).

There is evidence that blocking muscarinic receptors affects GnRH secretion in GT1-7 hypothalamic line cells (14). The results presented herein support the idea that such regulation presents asymmetry *in vivo*, as it was shown previously (6,7,8,9).

To our knowledge, these results are the first evidence on lateralization and modifications on the effects of atropine sulphate on GnRH mRNA expression along the estrous cycle.

Taken together, present results suggest that the mechanisms triggered by the cholinergic system in regulating reproductive functions could be mediated by its interaction with ER- α , but not with ER- β or GnRH.

Materials and Methods

Animals.

Virgin adult female rats of the CIIZ-V strain from our own stock, 195–225 g body weight, were used in this experiment. Animals were kept under controlled lighting conditions (lights on from 0500 to 1900 h), with free access to food (Purina S.A., Mexico) and tap water. Estrous cycles were monitored by daily vaginal smears. Solely rats showing at least two consecutive 4-day cycles were used in the experiment. The maintenance and handling of the animals was carried out according with the Mexican Law of Animal Protection Guidelines, and protocols were approved by the FES Zaragoza.

Experiment 1: Effects of injecting atropine sulphate subcutaneously, at 13:00 h of E, in the left and right sides of the POA-AHA, on ER- α , ER- β and GnRH mRNA expression.

At 13:00 h of E, 3 groups of 6 rats were subcutaneously (s.c.) injected with 300 mg/kg body weight, atropine sulfate, the previously established dose necessary to block ovulation on E (5). For control purposes, 3 groups of 6 rats were injected with distilled water. Animals were sacrificed by decapitation at the days and hours of the estrus cycle corresponding to the maximum mRNA expression for the studied genes, 17:00 h on E to study the effects on ER- α , and at 13:00 h of D2 to analyze the effects on ER- β and GnRH (11).

Experiment 2: Effects of injecting atropine sulfate subcutaneously, at 13:00h of D1, in the left and right sides of the POA-AHA on ER- α , ER- β and GnRH mRNA expression.

At 13:00 h of D1, 3 groups of 6 rats were injected s.c. with 100 mg/kg body weight, atropine sulfate the previously established dose necessary to block ovulation on D1 (5). Three groups of 6 rats were injected with distilled water for control purposes. Animals were sacrificed by

decapitation on D2 at 09:00 h to evaluate the effects on the mRNA expression for ER- α , ER- β , and GnRH.

Total mRNA isolation and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

After decapitation, the brain was quickly removed and placed on a dry ice-cooled plate. A slice (1.4 mm) of the brain was cut and the POA-AHA region was punched out with a needle (0.4 mm inner diameter), following parameters (A-7020 to A-5660) of the König and Klippel (17) rat's stereotaxic atlas. The left and right side of the POA-AHA were subsequently separated.

Total RNA from each side of the POA-AHA was extracted, separately, by a single step method, based on guanidine isothiocyanate-phenol-chloroform extraction, using TRIzol reagent (Gibco-BRL). RNA concentration was determined by light-spectrophotometry absorbance at 260 nm, and its integrity was verified by electrophoresis on 1.2 % denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. 2- μ g of total RNA was reverse transcribed to synthesize single stranded cDNA. Subsequently, 10 μ l of the reverse transcriptase reaction was subjected to PCR in order to co-amplify a fragment of the GnRH, ER- α and ER- β , and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes.

The PCR reaction was performed in an Eppendorf gradient thermocycler. The 50 μ l PCR reaction included 10 μ l of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.2 mM of each of the 4 dNTPs, 0.5uM of each primer, and 2.5 units of TAQ DNA polymerase. Negative controls, without RNA and with non-transcribed RNA, were included in all experiments.

Initial standard conditions were established for GnRH, ER- α , ER- β , and GAPDH amplification. The cycle number was performed within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were studied and analyzed together throughout the experiments. In all samples, a single 250 bp product corresponding to GnRH fragment, a 337 bp product corresponding to

ER- α , and a 301 bp corresponding to ER- β were obtained. Primers selected for the amplification of GnRH, ER- α , and ER- β had the following sequences:

GnRH sense: CAA CCC ATA GGA CCA
GTG CTG G;

GnRH antisense: CAC TAT GGT CAC CAG
CGG GG,

ER- α sense: TTC ACA CCA AAG CCT
CGG G;

ER- α antisense: TGC AGC AGC ATC AGC
GGA;

ER- β sense: TCC CGG CAG CAC CAG
TAA C;

ER- β antisense: CCC AGA TGC ATA ATC
GCT GC.

For semi-quantitative analysis of mRNA for GnRH, ER- α and ER- β , RT-PCR amplification of mRNA corresponding to GAPDH was carried out routinely and in parallel as an internal control of messenger quality and quantity.

After PCR procedures, amplified products (25 μ l) were resolved on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide, and photographed under an UV trans-illuminator. The image was captured with a Kodak EDAS 206 system. To determine changes in the expression of GnRH, ER- α and ER- β mRNA, the density and area of each band of PCR products (GnRH, ER- α and ER- β) were analyzed with a Scion Image program. PCR product values were normalized to corresponding GAPDH -PCR densitometric values.

Reagents.

Chemical reagents were purchased from Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO) and Gibco-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD). TAQ DNA polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, New Jersey).

Immunohistochemistry study of ER- α protein levels

At 09:00, 13:00 and 17:00 hs of D1, D2, proestrus and estrus, groups of 3 rats cyclic rats were perfused.

Perfusion and Tissue Processing

For immunohistochemistry analysis, the animals were perfused under pentobarbital anesthesia (1 mg/100 g body weight) via the ascending aorta with saline solution, followed by 250 ml of ice-cold 4% paraformaldehyde at pH 7.6. After removal, the brains were post-fixed in the perfusion solution for 3 hours and subsequently stored overnight in potassium PBS with 10% sucrose at 4 °C. Serial coronal sections throughout the POA-AHA brain regions were cut (50 μ m) on a cryostat. Serial sections for each region were collected, placed in tissue-cultured wells containing cryoprotectant solution (ethylene glycol) and maintained at -4 °C, until immunohistochemistry analysis was performed.

ER α immunoreactivity (ER α -ir) was detected using the conventional avidin-biotin immunoperoxidase protocol as previously (18), following the methodology described by Sawchenko et al, (1990) (19). In brief, the free-floating sections were pretreated with hydrogen peroxide for 10min, to quench endogenous peroxidase activity, followed by two rinses in PBS. Then, the free-floating sections were incubated overnight in 1.0% sodium borohydride to reduce free aldehydes levels. Tissue sections were then incubated at 4 °C for 72 h with the rabbit-raised primary antibody at a 1:50 dilution ratio. Overnight incubation with the secondary antibody was performed using a 1:100 dilution ratio at 4 °C. The primary antibody was detected with the avidin-DH-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA); and the diaminobenzidine reaction product was developed using a nickel-enhanced glucose oxidase method.

Two different procedures were used as negative controls. In the first procedure the primary antibody was omitted, and in the second procedure the primary antibody was pre-absorbed with

the specific synthetic peptide (sc-539P, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) used to raise the antibody.

Effects of injecting atropine sulfate subcutaneously on the maximum expression of ER- α maximum protein in cyclic female rats

Three groups of rats (three animals per group) were subcutaneously injected on E at 13:00 h with atropine sulfate (300 mg/ kg body weight) dissolved in water, and killed on D1 at 09:00 h. The rats were treated for immuno-histochemistry.

Using the KS300 Imaging System (Karl Zeiss, Germany), the number of ER- α -ir nuclei in the POA-AHA was determined by counting positive nuclei. ER- α -ir cells from each animal were counted, unilaterally, in all the sections corresponding to the POA-AHA area. Abercrombie's method (20) was used to correct for double-counting errors.

Statistical analysis: The densitometric values of mRNA's for ER- α , ER- β and GnRH were analyzed by a multivariate analysis of variance (MANOVA) followed by Tukey's test. Data for the number of ER- α -ir positive cells was analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test or by a Student's *t* test when two separate groups were compared. All measurements are expressed as mean \pm S.E.M. A $p < 0.05$ was accepted as significant.

References

1. Freeman ME. (1994) In: The Physiology of Reproduction. Edit: E Knobil, JD Neill, 2nd. edición, vol. 2, cap. 46, Raven Press, Nueva York, pp. 613-658.
2. Kuiper GGM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996) *Proc Natl-Acad Sci USA*; 93:5925–5930.
3. Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G, Weiner RI. (1994) In: The Physiology of Reproduction. Edit: E Knobil, JD Neill, 2nd. edición, vol. 1, cap. 27, Raven Press, Nueva York, pp. 1621-1677.
4. Everett JW (1994) In: The Physiology of Reproduction. Edit: E Knobil, JD Neill, 2nd. edición, vol. 1, cap 27, Raven Press, Nueva York, pp.
5. Domínguez R, Riboni L, Zipitria D, Revilla R. (1982) *Journal of Endocrinology*; 95:175-180.
6. Cruz ME, Arteaga PR, De la Huerta M, Sánchez M, Domínguez R. (1998) *Medical Science Research*; 25:823-825.
7. Cruz ME, Castro J, Domínguez R. (1992) *Journal of Endocrinology*; 133:205-210.
8. Cruz ME, Chávez R, Rosas P, Lujambio VM, Morán JL, Domínguez R. (1990) *Medical Science Research*; 18:137-138.
9. Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. (1989) *Journal of Endocrinology*; 24:739-742.
10. López E, Cruz ME, Domínguez R. (1997) *Archives of Medical Research*; 28(3):343-348.

11. Paola R. Arteaga-López, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Carmen A. Mendoza-Rodríguez and María Esther Cruz. (2003) *Endocrine*, 21(3):251-260.
12. Lauber AH, Whalen RE (1988) *Brain Res.* 443:21-26
13. Lauber AH (1988) *Brain Res Bull* 20 (2):273-276
14. Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Catt KJ (1996). *Trends Endocrinol Metab* 7:56 – 59
15. Silverman AJ, Livne I, Witkin JW. (1994) In: *The Physiology of Reproduction*. Edit: E Knobil, JD Neill, 2nd. edition, vol. 1, cap. 28, Raven Press, Nueva York, pp. 1638-1709.
16. Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I (2000) *Neuroscience* 96:41–49.
17. Köning JF, Klippel RA. (1963) *The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
18. Isabel Arrieta, Leticia Berenice Díaz-Ibañez, Teresa Morales, Luciano Mendoza-Garcés, Sumiko Morimoto, Norma Moreno-Mendoza, and Marco A. Cerbon (2003) *J Neurobiol* 56:338-346
19. Sawchenko PE, Arias C, Bittencourt JC. (1990) *J Comp Neurol* 291:269-280.
20. Abercrombie (1946) *Anat. Rec* 94:239 -247

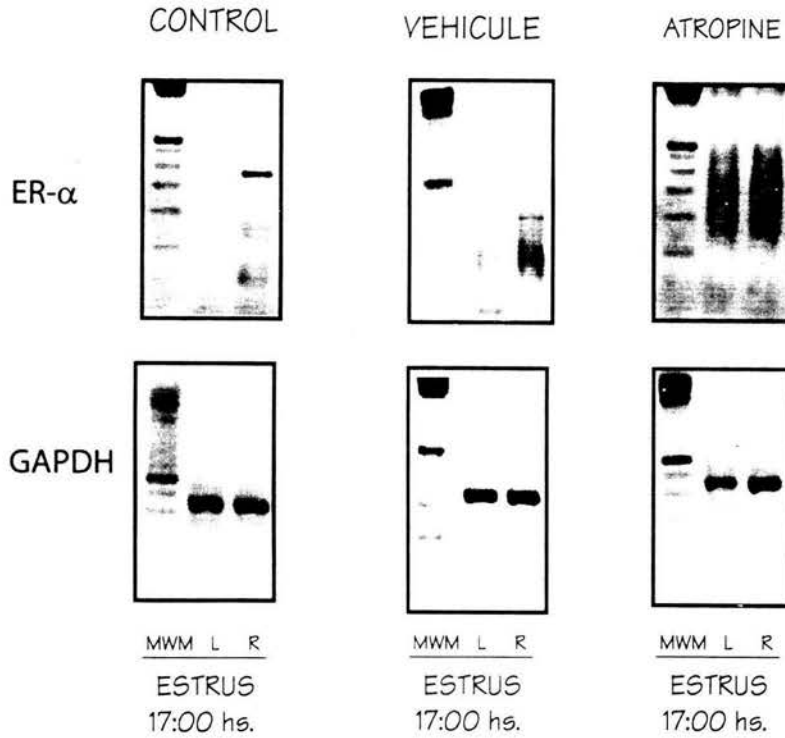
Acknowledgements

This study was supported by CONACYT, grants Grants 2785-1N and Fellowship 121846. The English revision by M.S. Álvaro Domínguez-González is gratefully appreciated.

Figure 1.- Densitometric analysis of ER- α mRNA expression in the left and right sides of POA-AHA in E at 17:00 h of female rat treated with atropine sulfate on E at 13:00 h. (A) Simultaneous RT-PCR representative assays for ER- α and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) sides of POA-AHA. RT-PCR was performed using total RNA isolated from both sides of POA-AHA for adult female rats treated with atropine sulfate. (B) Densitometric analysis of RT-PCR products a= $p \leq 0.05$ compared with left side of POA-AHA; b= $p \leq 0.05$ compared with control group and c= $p \leq 0.05$ with vehicle treatment.

EFFECTS OF SUBCUTANEOUS ATROPINE INJECTION IN ESTROUS DAY AT 13:00 hs. OVER THE ER- α mRNA EXPRESSION IN ESTROUS DAY AT 17:00 hs.

A



B

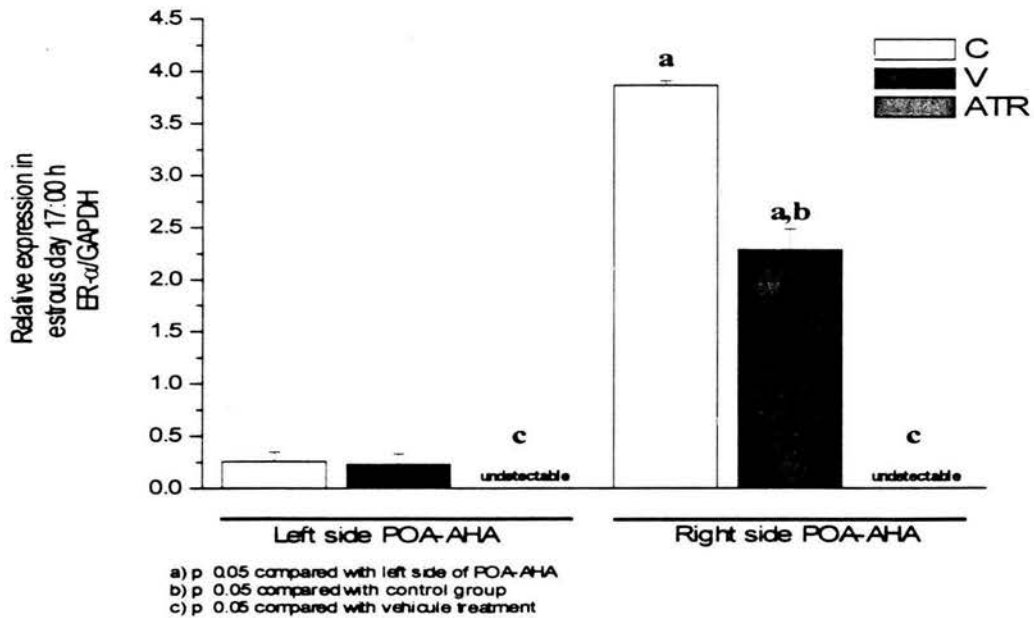
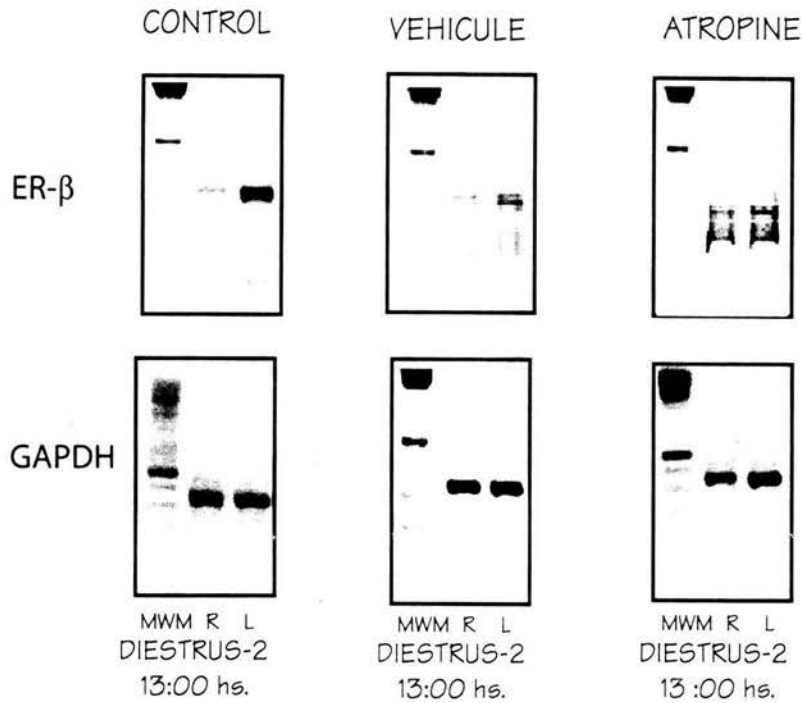


Figure 2.- Densitometric analysis of ER- β mRNA expression in the left and right sides of POA-AHA in D2 at 13:00 h of female rat treated with atropine sulfate on E at 13:00 h. **(A)** Simultaneous RT-PCR representative assays for ER- β and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) sides of POA-AHA. RT-PCR was performed using total RNA isolated from both sides of POA-AHA of adult female rats treated with atropine sulfate. **(B)** Densitometric analysis of RT-PCR products a= $p \leq 0.05$ compared with left side of POA-AHA; b= $p \leq 0.05$ compared with control group and c= $p \leq 0.05$ with vehicle treatment.

EFFECTS OF SUBCUTANEOUS ATROPINE INJECTION IN ESTROUS DAY AT 13:00 hs. OVER THE ER- β mRNA EXPRESSION IN DIESTRUS-2 DAY AT 13:00 hs.

A



B

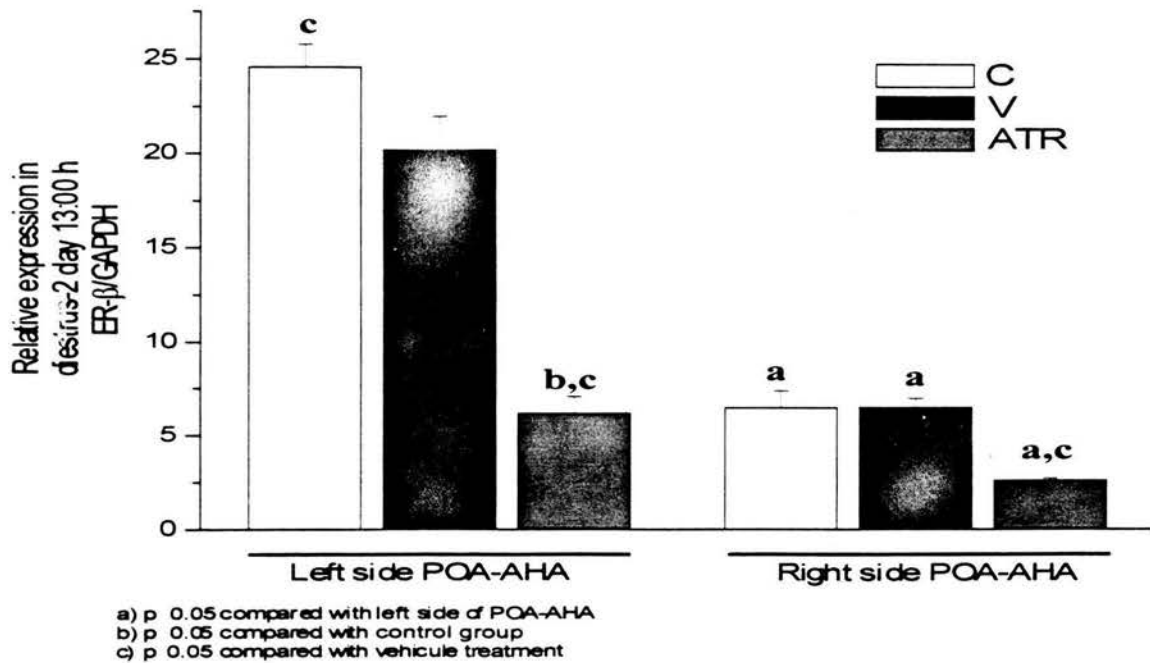
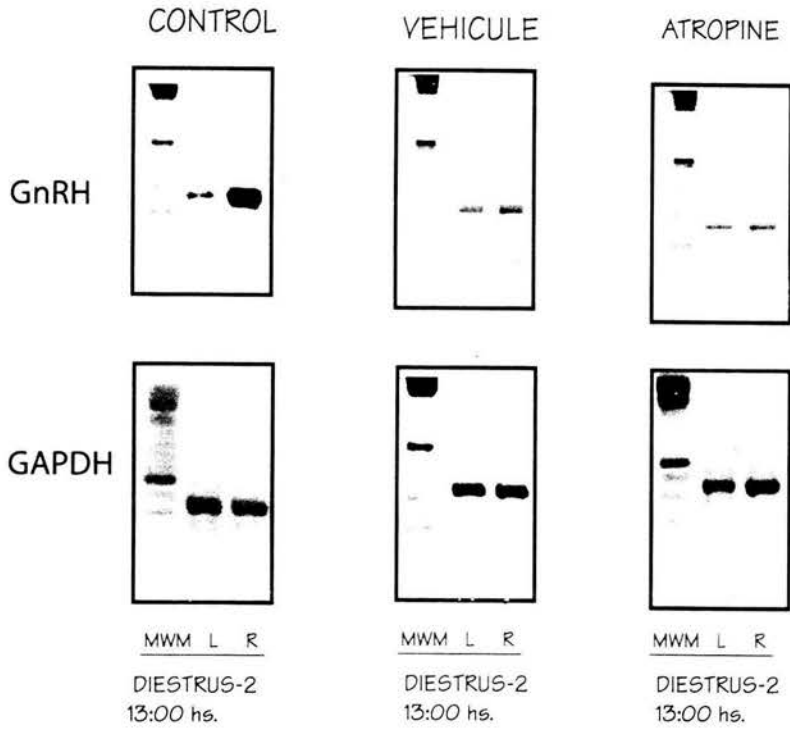


Figure 3.- Densitometric analysis of GnRH mRNA expression in the left and right sides of POA-AHA in D2 at 13:00 h of female rat treated with atropine sulfate on E at 13:00 h. (A) Simultaneous RT-PCR representative assays for GnRH and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) sides of POA-AHA. RT-PCR was performed using total RNA isolated from both sides of POA-AHA of adult female rats treated with atropine sulfate. (B) Densitometric analysis of RT-PCR products a= $p \leq 0.05$ compared with left side of POA-AHA; b= $p \leq 0.05$ compared with control group and c= $p \leq 0.05$ with vehicle treatment.

EFFECTS OF SUBCUTANEOUS ATROPINE INJECTION IN ESTROUS DAY AT 13:00 hs. OVER THE GnRH mRNA EXPRESSION IN DIESTRUS-2 DAY AT 13:00 hs.

A



B

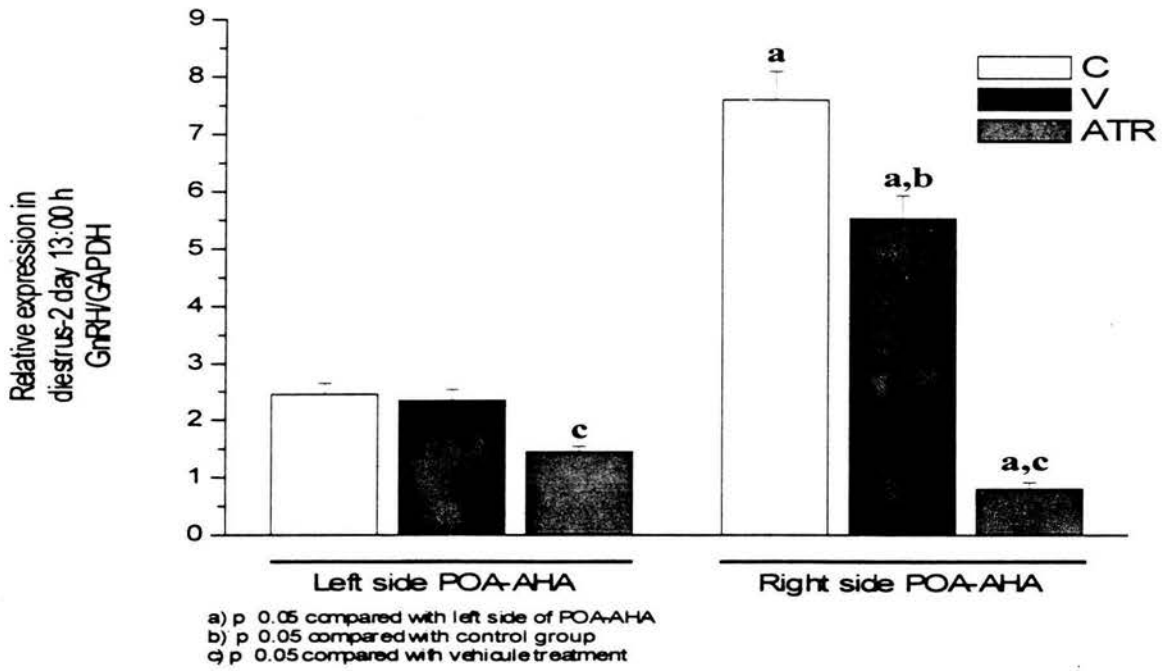
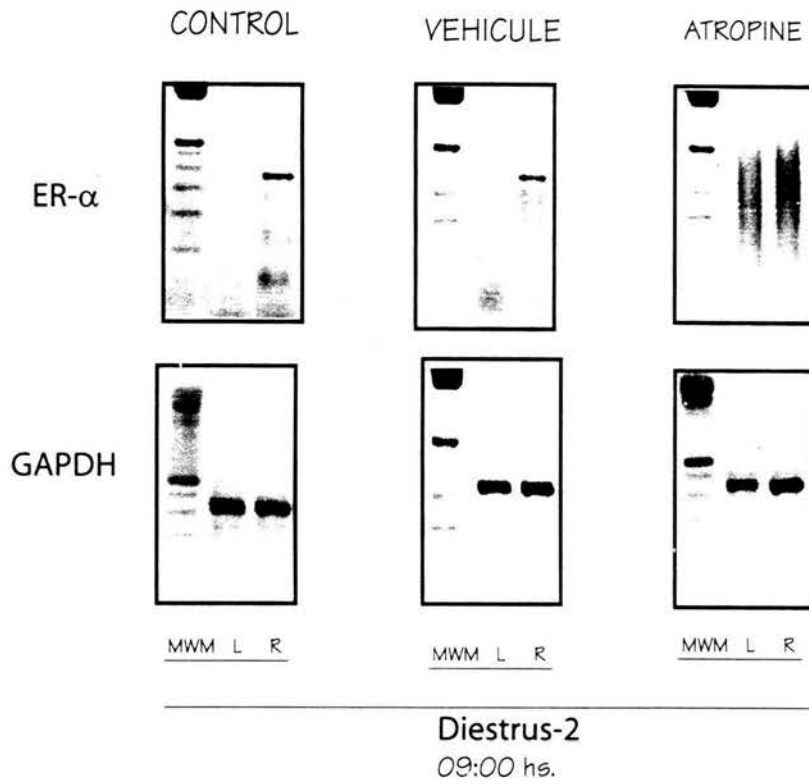


Figure 4.- Densitometric analysis of ER- α mRNA expression in the left and right sides of POA-AHA in E at 17:00 h of female rat treated with atropine sulfate on D1 at 13:00 h. (A) Simultaneous RT-PCR representative assays for ER- α and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) sides of POA-AHA. RT-PCR was performed using total RNA isolated from both sides of POA-AHA for adult female rats treated with atropine sulfate. (B) Densitometric analysis of RT-PCR products a= $p \leq 0.05$ compared with left side of POA-AHA; b= $p \leq 0.05$ compared with control group and c= $p \leq 0.05$ with vehicle treatment.

EFFECTS OF SUBCUTANEOUS ATROPINE INJECTION IN DIESTROUS-1 DAY AT 13:00 hs.
OVER THE ER- α mRNA EXPRESSION IN ESTROUS DAY AT 17:00 hs.

A



B

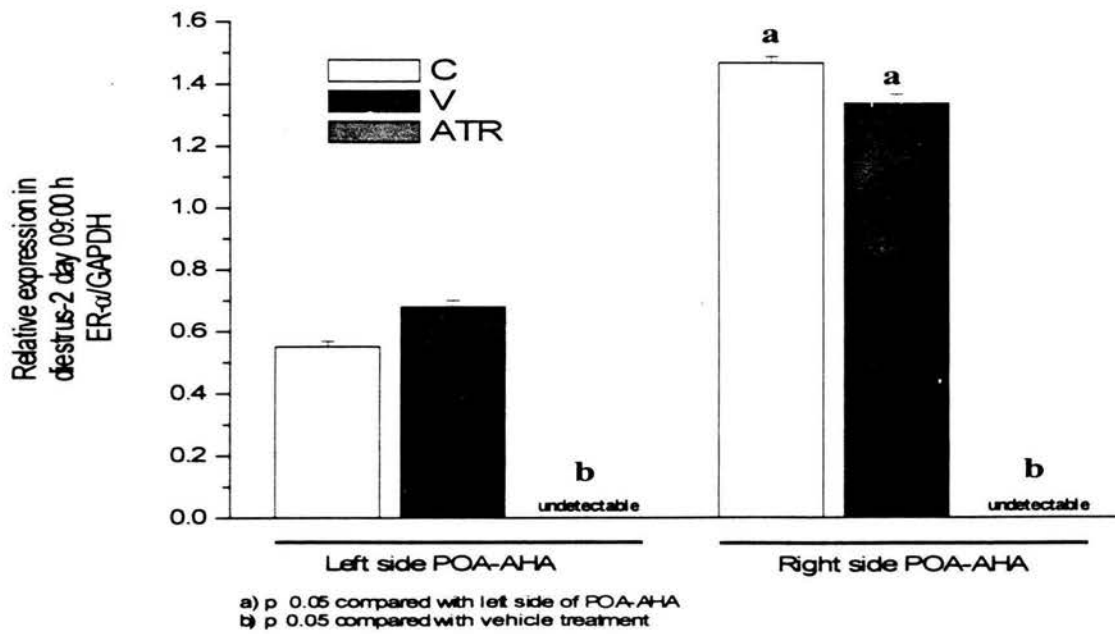
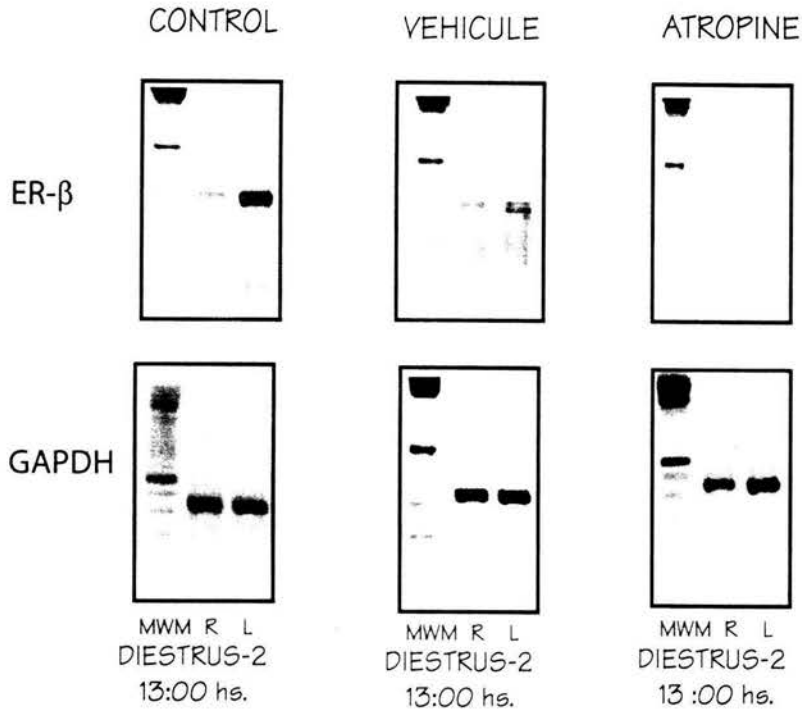


Figure 5.- Densitometric analysis of ER- β mRNA expression in the left and right sides of POA-AHA in D2 at 13:00 h of female rat treated with atropine sulfate on D1 at 13:00 h. **(A)** Simultaneous RT-PCR representative assays for ER- β and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) sides of POA-AHA . RT-PCR was performed using total RNA isolated from both sides of POA-AHA of adult female rats treated with atropine sulfate. **(B)** Densitometric analysis of RT-PCR products a= $p \leq 0.05$ compared with left side of POA-AHA; b= $p \leq 0.05$ compared with control group and c= $p \leq 0.05$ with vehicle treatment.

EFFECTS OF SUBCUTANEOUS ATROPINE INJECTION IN DIESTROUS-1 DAY AT 13:00 hs. OVER THE ER- β mRNA EXPRESSION IN DIESTROUS-2 DAY AT 13:00 hs.

A



B

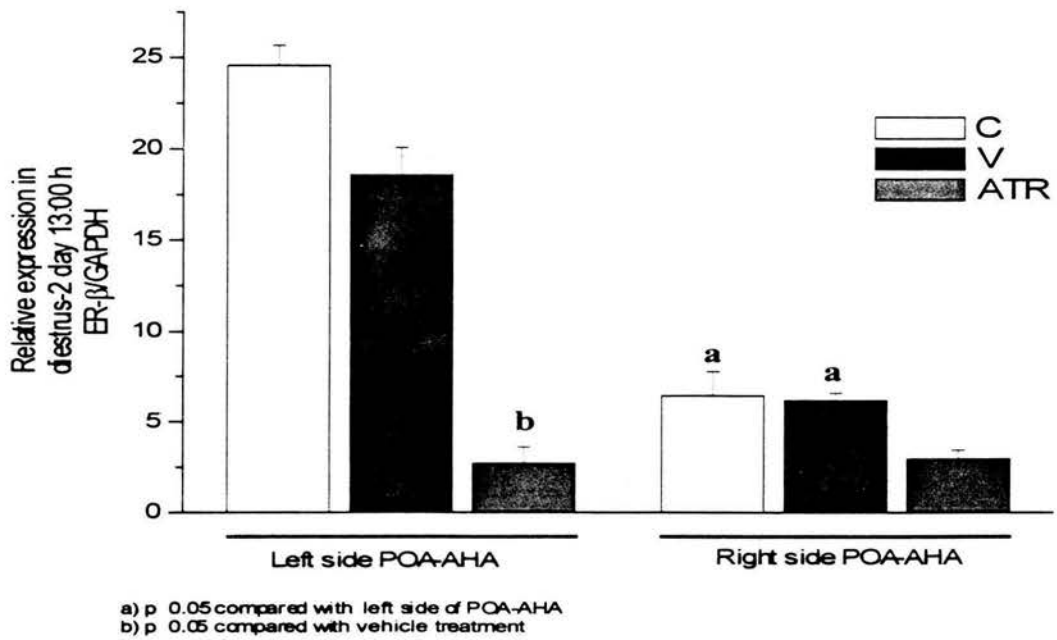
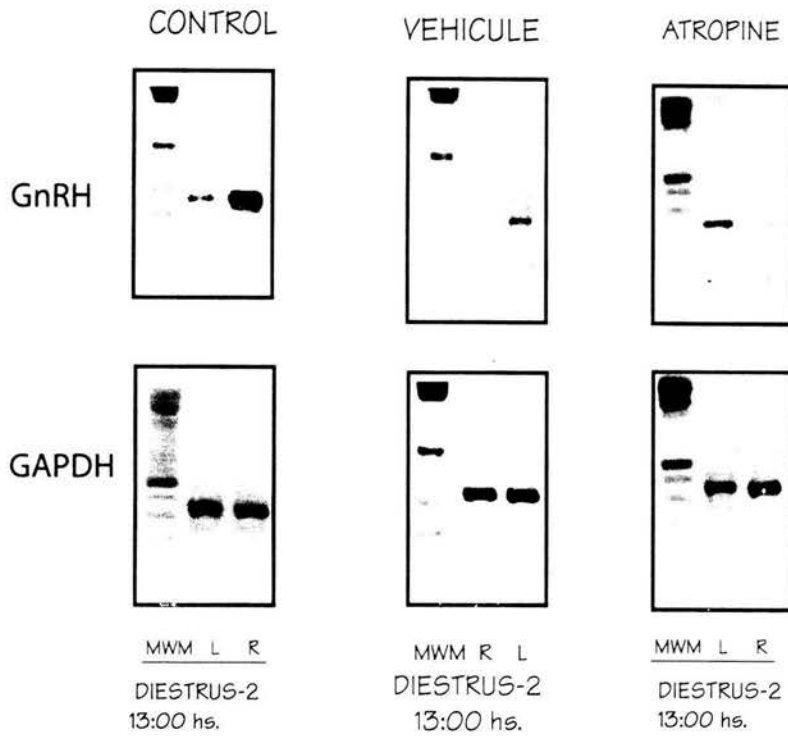


Figure 6.- Densitometric analysis of GnRH mRNA expression in the left and right sides of POA-AHA in D2 at 13:00 h of female rat treated with atropine sulfate on D1 a 13:00 h. (A) Simultaneous RT-PCR representative assays for GnRH and GAPDH mRNA expression in the left (L) and right (R) sides of POA-AHA. RT-PCR was performed using total RNA isolated from both sides of POA-AHA of adult female rats treated with atropine sulfate. (B) Densitometric analysis of RT-PCR products a= $p \leq 0.05$ compared with left side of POA-AHA; b= $p \leq 0.05$ compared with control group and c= $p \leq 0.05$ with vehicle treatment.

EFFECTS OF SUBCUTANEOUS ATROPINE INJECTION IN DIESTROUS-1 DAY AT 13:00 hs. OVER THE GnRH mRNA EXPRESSION IN DIESTROUS-2 DAY AT 13:00 hs.

A



B

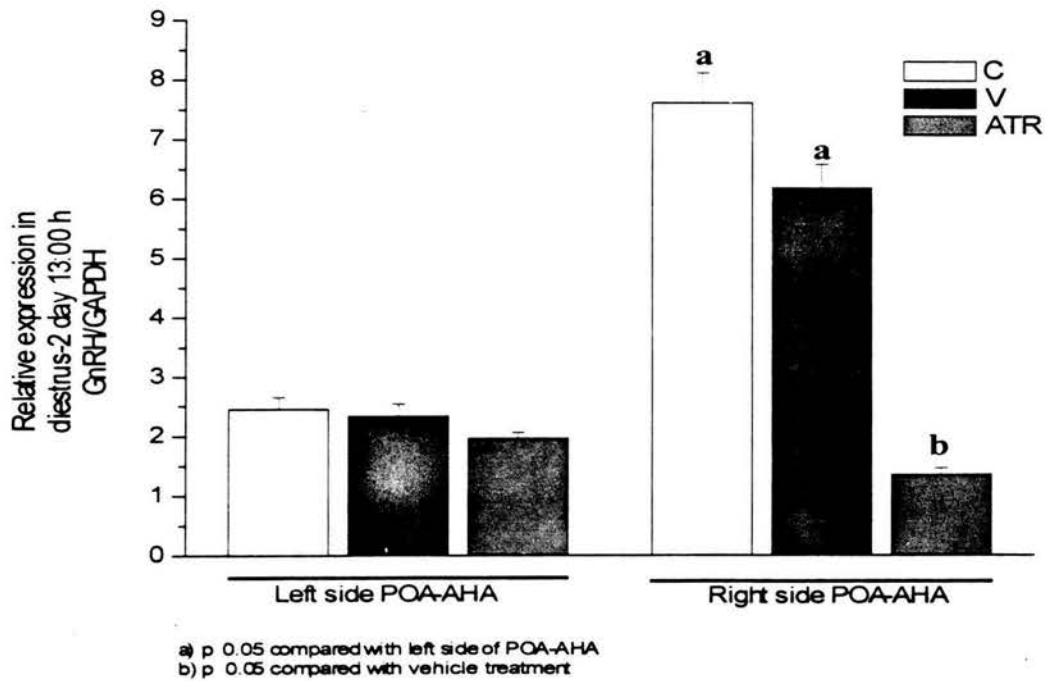
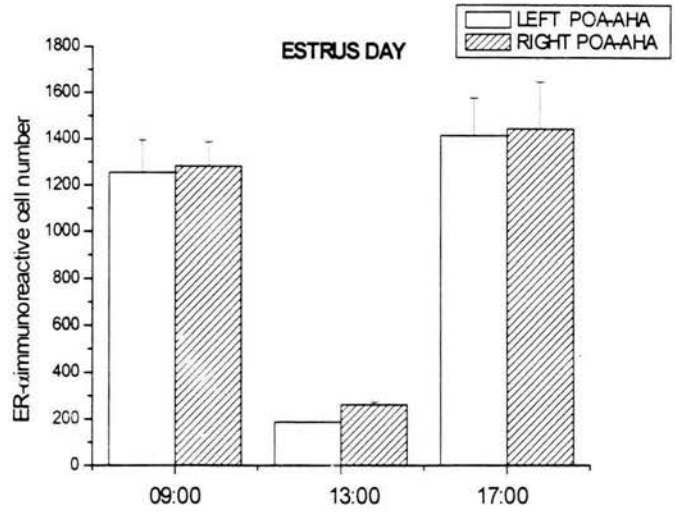
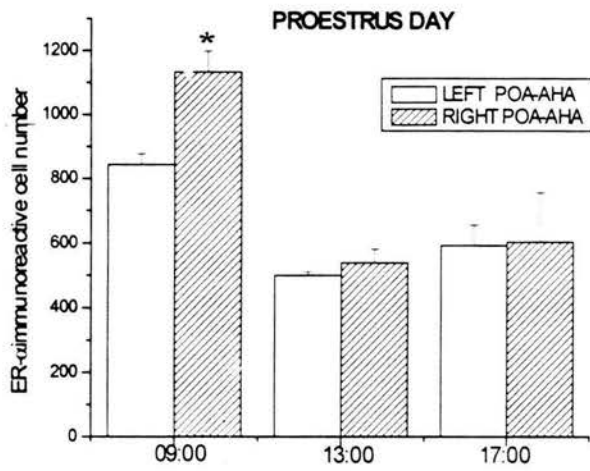
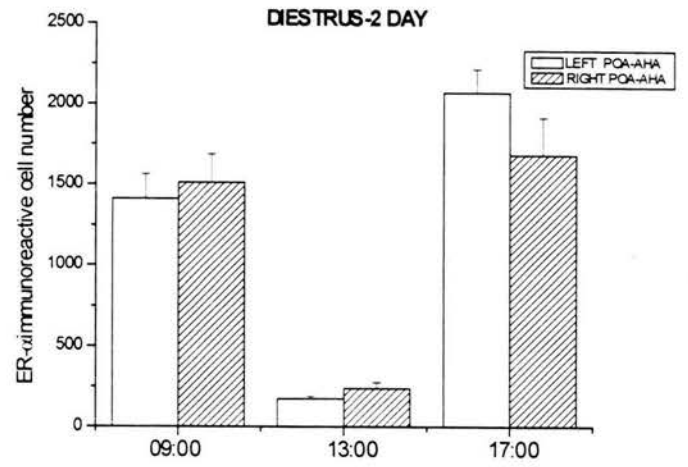
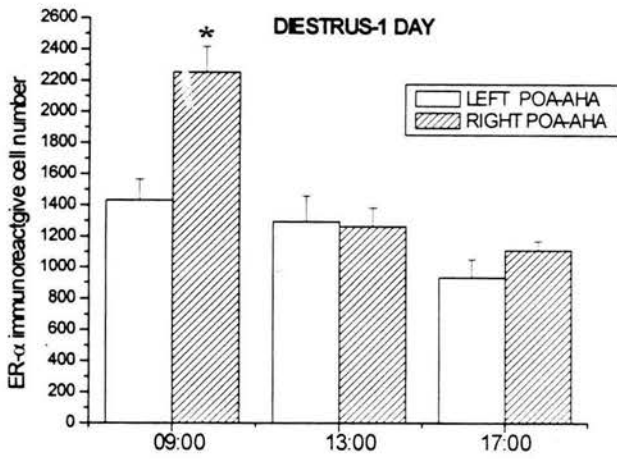


Figure 7 .- Changes in the ER α immunoreactive cells (ER- α IR) in the left and right side of POA-AHA at 09.00, 13.00 and 17.00 hours of each day of the estrous cycle. * ($p \leq 0.05$ vs left side)

A



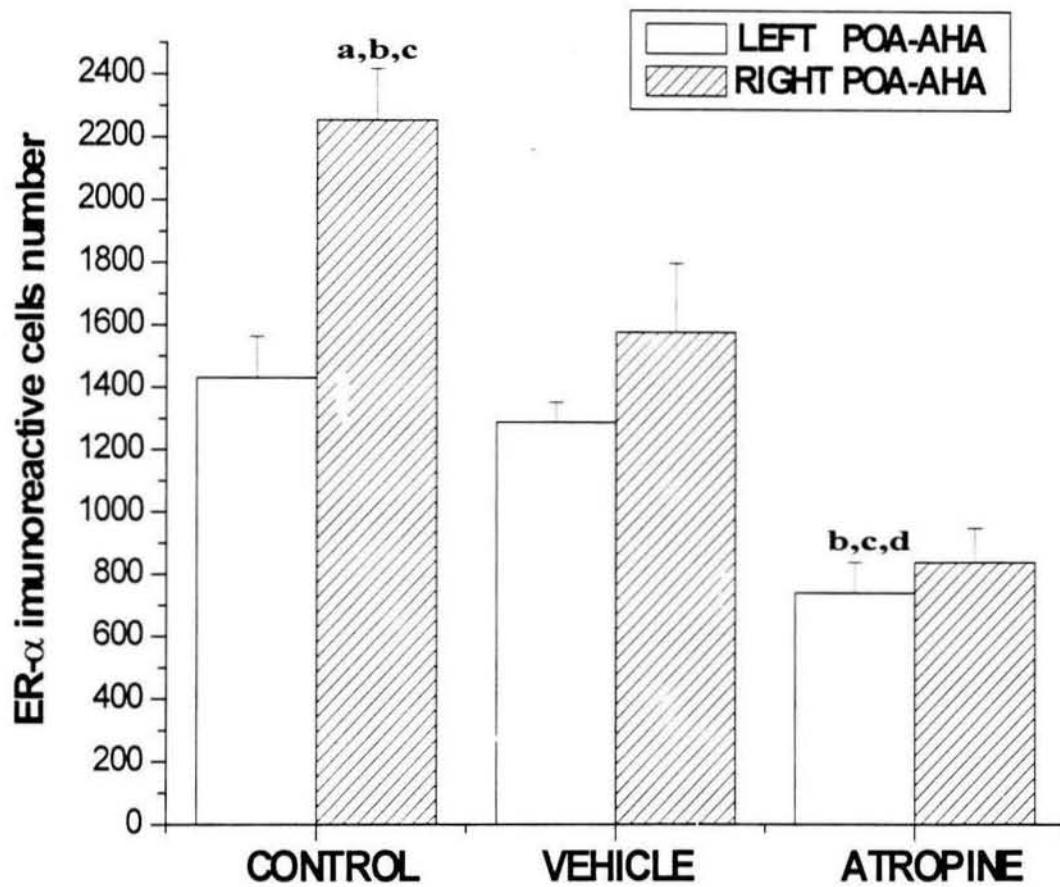
*p 0.05 vs left side

Figure 8.- Changes of ER- α immunoreactive cells (ER- α IR) in POA of cyclic female rats at 09:00 of diestrus-1 day. Representative photomicrographs of ER- α IR nuclei in POA. Slides of 30 μ m were incubated with specific anti-ER- α antibody and processed for Immunohistochemistry (see Materials and Methods). (A) microphotograph of ER- α IR at (4X) showing right and left sides of POA, (B) left side of AHA (10X), (C) right side of POA (10X).

Figure 9.- Changes of ER- α immunoreactive cells (ER- α IR) in AHA of cyclic female rats at 09:00 of diestrus-1 day. Representative photomicrographs of ER- α IR nuclei in AHA. Slides of 30 μ m were incubated with specific anti-ER- α antibody and processed for Immunohistochemistry (see Materials and Methods). (A) microphotograph of ER- α IR at (4X) showing right and left sides of POA, (B) left side of AHA (10X), (C) right side of AHA (10X).

Figure 10 .- Changes in the ER α immunoreactive cells (ER- α IR) in the left and right side of POA-AHA in D1 at 09:00 h, of treated female rats with atropine sulfate in E day at 17:00 h.

* ($p \leq 0.05$ vs left side)



p 0.05 vs left side
p 0.05 vs vehicle treatment
p 0.05 vs atropine treatment
p 0.05 vs control group

Figure 11.- Effects of injection of sulfate atropine in E day at 17:00 h over ER- α immunoreactive cells (ER- α IR) in POA of cyclic female rats at 09:00 of diestrus-1 day. Representative photomicrographs of ER- α IR nuclei in POA. Slides of 30 μ m were incubated with specific anti-ER- α antibody and processed for Immunohistochemistry (see Materials and Methods). (A) microphotography of POA stained with crescile violet at (4X) showing right and left sides of POA, (B) microphotography of POA ER- α IR of intact rat showing right and left sides of POA (4X) (C) microphotography of POA ER- α IR of rats treated with vehicle showing right and left sides of POA (4X), (D) microphotography of POA ER- α IR of rats treated with atropine sulfate showing right and left sides of POA (4X)

Preoptic Area (POA)

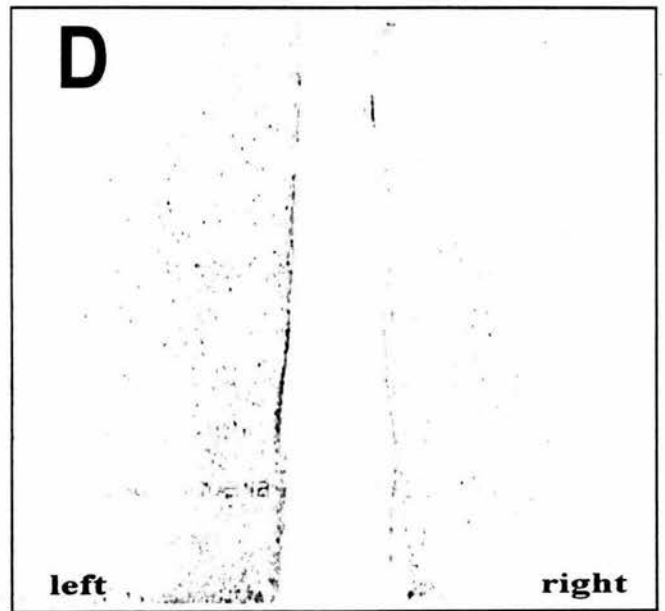
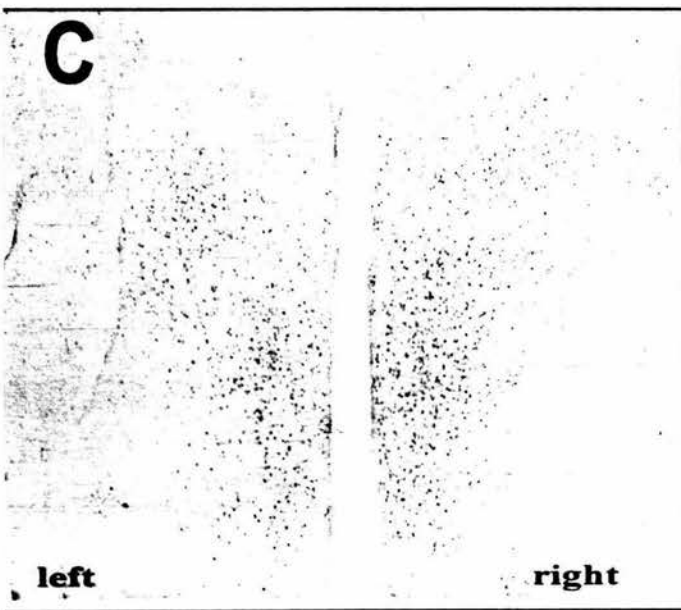
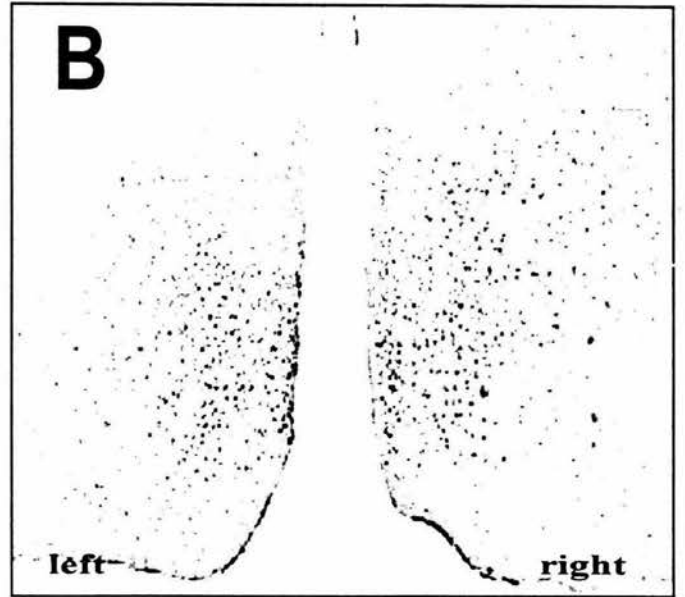
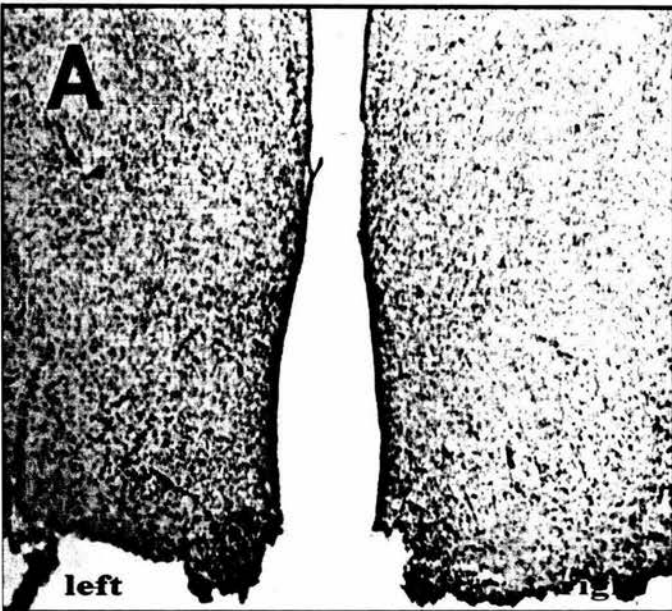
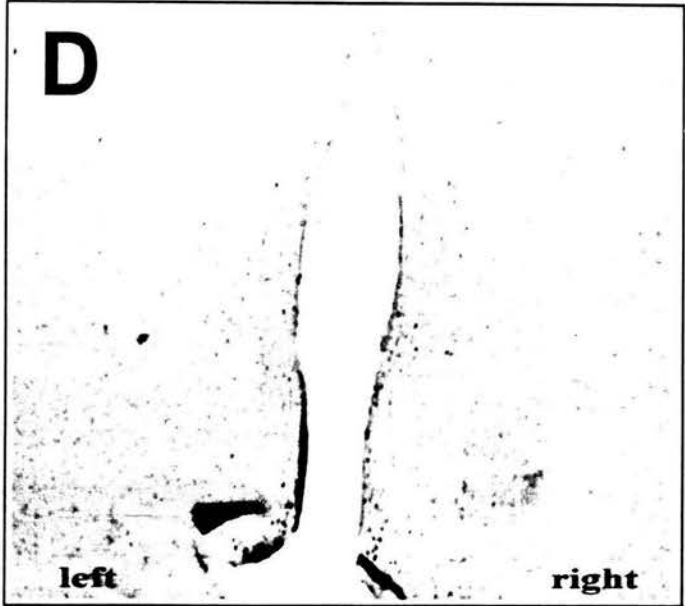
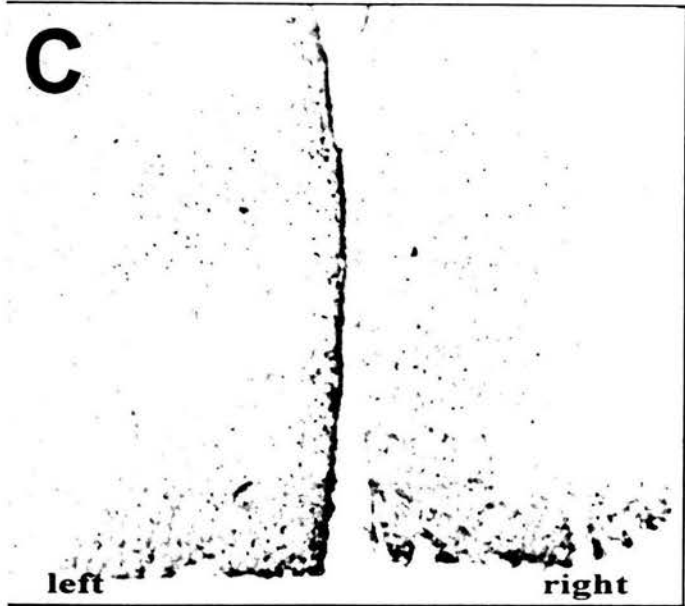
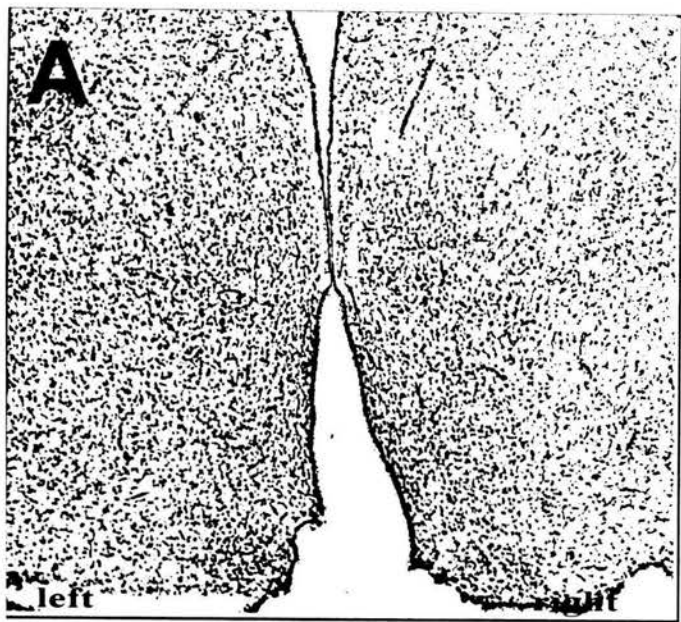


Figure 12.- Effects of injection of sulfate atropine in E day at 17:00 h over ER- α immunoreactive cells (ER- α IR) in AHA of cyclic female rats at 09:00 of diest us-1 day. Representative photomicrographs of ER- α IR nuclei in AHA. Slides of 30 μ m were incubated with specific anti-ER- α antibody and processed for Immunohistochemistry (see Materials and Methods). (A) microphotography of AHA stained with crescile violet at (4X) showing right and left sides of AHA, (B) microphotography of AHA ER- α IR of intact rat showing right and left sides of AHA (4X) (C) microphotography of AHA ER- α IR of rats treated with vehicle showing right and left sides of AHA (4X), (D) microphotography of AHA ER- α IR of rats treated with atropine sulfate showing right and left sides of AHA (4X)

Anterior Hypothalamic Area (AHA)



DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las expresiones del ER- α , ER- β y de la GnRH en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA son asimétricas durante el ciclo estral. El sistema colinérgico por medio de los receptores muscarínicos regula de manera estimulante la expresión del ER- α .

Asimetrías en la expresión del ARNm de ER- α , ER- β y GnRH en POA-AHA durante el ciclo estral.

El hecho de que la máxima expresión del ER- α ocurra en la porción derecha de POA-AHA, mientras que la del ER- β se presente en la porción izquierda, nos lleva a sugerir que cada porción de POA-AHA regula de manera asimétrica funciones reproductivas específicas, como se ha mostrado en diferentes estudios^{56,57,58,59}. Además, nos lleva a plantear que cada receptor regula diferentes funciones hipotalámicas. Esta idea estaría apoyada por el hecho de que la hembra y el macho ER α KO son infértiles, mientras que el ratón hembra ER β KO^{9,31,40,48,49,50,51,52,53,60,61,84,90,106,152,153,222,260,262,266,281} es subfertil (capaz de ovular pero con un número mínimo de ovocitos).

Por otro lado, diferentes estudios de expresión de genes, ensayos celulares y análisis con animales carentes de RE, demostraron que el RE- β atenúa la actividad del ER- α ^{218,167}, lo cual explicaría por que los aumentos en la expresión del ARNm de ER- α se dan durante los días del ciclo estral cuando la expresión del RE- β es baja.

Luego entonces, el ER- α podría regular la secreción tónica de gonadotropinas o mecanismos involucrados en la respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas; mientras que el ER- β regularía la secreción fásica de dichas gluco-proteínas.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos llevan a sugerir que la estimulación de los ER- α podría estar asociada a mecanismos de regulación de

la síntesis de la GnRH, ya que en esa misma porción hipotalámica, la cantidad del ARNm para la GnRH es máxima 44 horas después del "pico de ARNm del ER- α ". Es posible que la unión del estradiol al ER- α ocurra a través de una interneurona, dado que las neuronas GnRHérgicas de la región hipotalámica no presentan dicho receptor ^{173,160,161}.

Las altas cantidades del ARNm del ER- β en el lado izquierdo de POA-AHA en el diestro-2, un día antes de la liberación preovulatoria de GnRH, podría estar vinculada con la liberación pre-ovulatoria de la GnRH. La liberación fásica de la hormona podría requerir de la participación de ambos lados de POA-AHA y de que la disponibilidad del ER- β ocurra desde la mañana del proestro. Esta idea sería apoyada en parte, por el hecho de que la mayoría de las neuronas GnRH ^{157,158,159,160,161,173,265,267,276} presentan el ER- β .

El lado derecho del hipotálamo "gobernaría" la secreción de GnRH, ya que tanto la síntesis del ARNm en POA-AHA como la cantidad de la proteína en hipotálamo medio basal ^{120,121,122} son mayores en el lado derecho que en el lado izquierdo.

Participación del sistema colinérgico en la regulación de la expresión asimétrica de ER- α , ER- β y GnRH en POA-AHA de la rata hembra.

Uno de los antecedentes fundamentales en los cuales nos apoyamos para plantear la hipótesis de que el sistema colinérgico regula la expresión asimétrica del ER- α , ER- β y GnRH, son los resultados obtenidos por Cruz y col. ^{57,58,59} En estos estudios se mostró que los implantes de atropina en POA-AHA bloquea la ovulación de la rata, en función del lado en que se realiza el implante. Los autores plantearon que el bloqueo de la ovulación provocado por el implante unilateral de atropina en los días del estro (lado derecho de POA-AHA), diestro-1 (lado derecho o izquierdo de POA-AHA) o diestro-2 (lado izquierdo) era el resultado de una alteración en la secreción fásica de GnRH y LH, ya que la administración de GnRH sintético o de hCG en la tarde del proestro esperado, reestablecía la ovulación de casi todos los animales implantados.

Ahora bien, el hecho de que la administración de benzoato de estradiol, en la tarde del diestro-2 haya reestablecido la ovulación solamente en aquellos animales con implante de atropina del lado izquierdo, los llevó a sugerir que la respuesta de cada lado de POA-AHA a la acción estimulante de los estrógenos es asimétrica y que el sistema colinérgico regulaba al receptor a estrógenos^{57,58,59}.

Efectos del bloqueo del sistema colinérgico sobre la expresión del ARNm de GnRH en POA-AHA.

La disminución significativa del ARNm de GnRH en el lado derecho de POA-AHA al medio día del diestro-2, por la inyección subcutánea de sulfato de atropina en el día del estro o del diestro-1, nos lleva a sugerir que en POA-AHA, el sistema colinérgico juega un papel estimulante en la síntesis del ARNm de la GnRH del lado derecho de esta región; estos resultados evidencian el papel del sistema colinérgico sobre la expresión del gen de la GnRH.

Previamente se ha mostrado que la actividad de la CAT (enzima que sintetiza acetilcolina) difiere entre el lado izquierdo y derecho de POA-AHA y esta asimetría cambia durante el ciclo estral²⁵⁵. Lo mismo ocurre con la concentración de acetilcolina y el número de receptores muscarínicos⁵⁶; los implantes unilaterales de atropina en POA-AHA pueden o no bloquear la ovulación de la rata, dependiendo del día del ciclo y del lado del hipotálamo en el que se implante el fármaco⁵⁷.

Al momento desconocemos si la neurona GnRH presente conexiones directas con fibras colinérgicas²⁷⁰, sin embargo se ha mostrado que el bloqueo de los receptores muscarínicos con atropina disminuye la secreción de GnRH¹⁹⁵, a este hecho, Krishmanov y col¹⁹⁵ sugieren que al estar ligados a segundos mensajeros, los receptores muscarínicos pueden estimular la expresión de genes, en este caso de GnRH, por lo que la disminución de la expresión del ARNm de GnRH repercutiría en la disminución de la concentración de GnRH que es liberada en el día del proestro, y por lo tanto en la concentración plasmática de LH. Esta idea es apoyada por el hecho de que las inyecciones de

sulfato de atropina a las 13:00 horas del día del estro o del diestro-1 bloquean la secreción preovulatoria de LH en la tarde del proestro⁷⁹ y los animales no ovulan⁷⁹. Otra posibilidad es que el sistema muscarínico no actúe directamente sobre la neurona GnRHérgica sino por medio de una interneurona.

La máxima expresión del ARNm de ER- α y GnRH sucede en el mismo lado de POA-AHA, sin embargo esta no se observa en el mismo día y hora del ciclo estral. Por otro lado, la isoforma del ER- β , la que está presente en la neurona GnRHérgica^{173,267} tiene su máxima expresión en el lado izquierdo de POA-AHA a la misma hora y día del ciclo estral que la expresión de GnRH, luego entonces, el ER- α participaría de manera indirecta en la síntesis de GnRH, posiblemente por medio de interneuronas que contengan el ER- α y hagan sinapsis con GnRH, por ejemplo neuronas GABAérgicas²⁷⁰, NPYérgicas²⁷⁰, opióides²⁷⁰.

Con base en los resultados obtenidos, sugerimos que el sistema colinérgico sería uno de los mecanismos que regulan la síntesis de GnRH, ya que el bloqueo de los receptores muscarínicos no inhibe, sino que disminuye la expresión del ARNm de GnRH.

Efectos del bloqueo del sistema colinérgico sobre la máxima expresión del ARNm de ER- α y ER- β POA-AHA.

En POA-AHA, el sistema colinérgico regula de manera estimulante la síntesis del ARNm para el ER- α , ya que la inyección subcutánea de sulfato de atropina en el día del estro ó del diestro-1, bloqueo por completo la expresión del ARNm de dicho receptor en ambos lados de esta zona hipotalámica. Esta idea es respaldada por los resultados de Leuber²⁰³, quién mostró que la afinidad del ER en el hipotálamo de la rata disminuye con la inyección de atropina.

Otro hecho que apoya esta hipótesis son los resultados de Cruz y col⁵⁷, quienes observaron que ratas con implante de atropina del lado derecho de POA-AHA (realizado en estro o diestro-1) no ovulan aún cuando se reemplace la señal

ovárica con la inyección subcutánea de 10 μ g de benzoato de estradiol en la tarde del diestro-2.

Ahora bien, en cuanto al mecanismo asimétrico de regulación que ejerce el sistema colinérgico sobre la función reproductora de POA-AHA, existe correlación entre el efecto bloqueador de la ovulación de los implantes de atropina en el lado derecho de POA-AHA⁵⁹ y la máxima expresión del ARNm de ER- α en el lado derecho de POA-AHA en el animal intacto. Del mismo modo, el hecho que el implante de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA no afecte la ovulación coincide con lo observado en esta tesis doctoral, ya que también en el día del estro la expresión del ARNm de ER- α del lado izquierdo es mínima.

Una inquietud que surge a partir de estos resultados es conocer en donde se localizan estos receptores muscarínicos que regulan la síntesis del ARNm del RE- α . Por medio de la técnica de inmunohistoquímica de doble marcaje e hibridación *in situ*, se ha observado un alto grado de co-localización de los dos tipos de receptor a estrógenos en la zona posterior de la estria terminal, el núcleo medial de la amígdala, el núcleo preóptico peri-ventricular e incluso el área preóptica, aunque también se detectaron neuronas que sólo expresan el RE- β y otras que sólo expresan el ARNm del RE- α ¹⁷³. Otros investigadores, mostraron que sólo el 17% \pm 1% de las neuronas GnRH del cerebro de la rata son positivas al RE- β ¹⁷³. Recientemente, mediante la detección ARNm (por hibridación *in situ*) y la cuantificación de los receptores a estrógenos (por la técnica de unión con estrógeno tritiado) en neuronas GnRHérgicas (identificadas por inmunohistoquímica) se mostró que la mayoría de las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE- β pero no el ARNm para el RE- α ^{173,261}. En dirección rostro-caudal del área preóptica medial, el número de células GnRHérgicas que resultan positivas al marcaje con el RE- α van disminuyendo progresivamente¹⁷³

Con base en estos resultados uno puede sugerir que los RE- α regulados por el sistema colinérgico no estarían vinculados con la neurona GnRHérgica, sino

con otra que contiene el $RE-\alpha$ y que mantiene contacto directo con la neurona GnRHérgica.

Cuando cuantificamos por inmunohistoquímica el número de $ER-\alpha$ durante el ciclo estral, observamos que la expresión de éstos ocurrió casi 24 horas después de lo observado con el ARNm, esto es en la mañana del diestro-1. Nuestros resultados coinciden con otros previamente reportados²⁰³, cuyos autores muestran un máximo en la cantidad del receptor en el diestro-1.

Aunque existen otros investigadores que reportan un máximo en la expresión en la mañana del proestro, en esos trabajos no toman en cuenta las horas del día del ciclo estral, lo cual podría estar enmascarando el máximo que observamos en el día del diestro-1.

Ahora bien, dado que la síntesis de ARNm del $RE-\alpha$ fue bloqueada, uno esperaría no observar la proteína en las rebanadas de POA-AHA y no una disminución en ratas sacrificadas en la mañana del diestro-1. Este hecho puede ser explicado si consideramos que los receptores cuantificados hayan sido sintetizados previo a la inyección con atropina.

Efectos del bloqueo del sistema colinérgico sobre la máxima expresión del ARNm del $ER-\beta$ en POA-AHA.

El sistema colinérgico regula también de manera estimulante la expresión del $ER-\beta$ en POA-AHA, ya que la inyección subcutánea de sulfato de atropina disminuyó la cantidad de ARNm en ambos lados pero no dejó de expresarse. Sin embargo, este mecanismo regulador no sería exclusivo del sistema colinérgico como en el caso del $RE-\alpha$.

El hecho que la mayor expresión del $ER-\beta$ ocurra en el día del diestro-2 y en el lado izquierdo de POA-AHA, coincide con los efectos inhibitorios de la ovulación de los implantes de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA en el día del diestro-2^{59,245}. En ratas tratadas de esta forma, la inyección de benzoato de estradiol, si indujo la ovulación en los animales con implante de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA. Por otra parte, si recordamos que las ratas knockout

para el ER- β ovulan pero el número de ovocitos es bajo, llevan a sugerir que la participación de este tipo de receptor en las funciones reproductoras no es tan relevante como el ER- α y que quizá esté participando en la regulación de otras funciones distintas a la reproducción ^{30,83,112,141,206,233}

MODELO GENERAL

Los resultados obtenidos en esta tesis de doctorado nos llevan a sugerir que la regulación asimétrica que ejerce la región de POA-AHA sobre la secreción de gonadotropinas y la ovulación depende de disimilitudes bioquímicas entre las porciones izquierda y derecha de esta región, que se originan en la expresión de genes regulados en parte, por el sistema colinérgico.

Aún cuando no se ha mostrado en la rata hembra una disimilitud en la cantidad de neuronas que sintetizan GnRH en el hipotálamo según el lado de que se trate, como es el caso del ratón macho¹⁴, sabemos que la actividad del sistema colinérgico en POA-AHA es diferente entre sus lados y cambia durante el ciclo estral.

En condiciones naturales, la síntesis del ARNm de la GnRH y de los RE- α y RE- β ocurre en días y horas específicas del ciclo estral de la rata. La mayor cantidad de ARNm para GnRH y el RE- β ocurre aproximadamente 24 horas antes de que la GnRH sea liberada en forma fásica (día del proestro) y de que ocurra la secreción preovulatoria de 17 β -estradiol. Estos hechos llevan a sugerir que el RE- β regula la secreción preovulatoria de la LH; el complejo estradiol \rightleftharpoons receptor estimularía la liberación de GnRH y ésta a su vez, la de LH.

El papel del RE- α aún no es clara, sin embargo, si consideramos las observaciones llevadas a cabo en ratones ER α KO, podemos sugerir que este receptor estaría involucrado en los mecanismos reguladores de la secreción tónica de las gonadotropinas o del efecto "feedback negativo" de los estrógenos sobre la secreción de estas hormonas.

La ACh, por medio de los receptores muscarínicos, regula de manera diferente la síntesis del ARNm del RE- α y del RE- β . Este neurotransmisor estimula la síntesis del RE- α en POA-AHA. En cambio, el papel de la ACh sobre el RE- β depende del día del ciclo estral, lo que indica que los mecanismos de regulación para este receptor involucra a otro tipo de señal que se "enciende" o

“apaga” dependiendo del día del ciclo y que se vinculan o no con receptores muscarínicos.

Existe una correlación de los siguientes hechos:

1. Ratas implantadas con atropina en el lado derecho de POA-AHA, a las 13:00 horas del estro, no ovulan^{57,58,59} y no ocurre la secreción preovulatoria de la LH a las 17:00 horas del proestro^{57,58,59}.
2. La actividad de la CAT es mayor en el lado derecho de POA-AHA a las 13:00 horas del estro²⁵⁵.
3. La síntesis máxima de ARNm para el RE- α ocurre en el lado derecho de POA-AHA, a las 17:00 horas del estro²⁴⁵.
4. La inyección sc de sulfato de atropina a las 13:00 horas del estro inhibe la síntesis del ARNm del RE- α , no altera la de RE- β pero disminuye la de GnRH.

Por tanto podemos sugerir que en el día del estro, el receptor muscarínico (mAChR) pone en “marcha” la cascada de eventos neuroendocrinos que culminan con la ovulación, la que se establece en el lado derecho de POA-AHA.

En el día del diestro-1, la inyección sc de sulfato de atropina a las 13:00 horas, bloquea la ovulación⁷⁹ y la secreción preovulatoria de la LH. Además, a esta hora y día del ciclo, la cantidad de ACh en POA-AHA es mayor en la porción izquierda⁵⁶. La inyección sc de sulfato de atropina disminuye la expresión de ARNm del RE β en el lado izquierdo de POA-AHA; mientras que para la expresión del GnRH disminuye en el lado derecho.

Por tanto, en diestro-1 el mAChR también regula la síntesis del RE- β , el cual adquiere una funcionalidad más importante en la secreción de gonadotropinas y la ovulación en el día del diestro-2.

¿Por qué es más importante? , si consideramos que:

1. En diestro-2, el implante de atropina del lado izquierdo de POA-AHA bloquea la ovulación^{57,58,59}
2. En los animales con inyección sc de sulfato de atropina disminuye la secreción preovulatoria de LH⁷⁹

3. La actividad de la CAT es mayor en el lado izquierdo de POA-AHA⁵⁶
4. La expresión del ARNm de RE- β es mayor en la porción izquierda de POA-AHA²⁴⁵

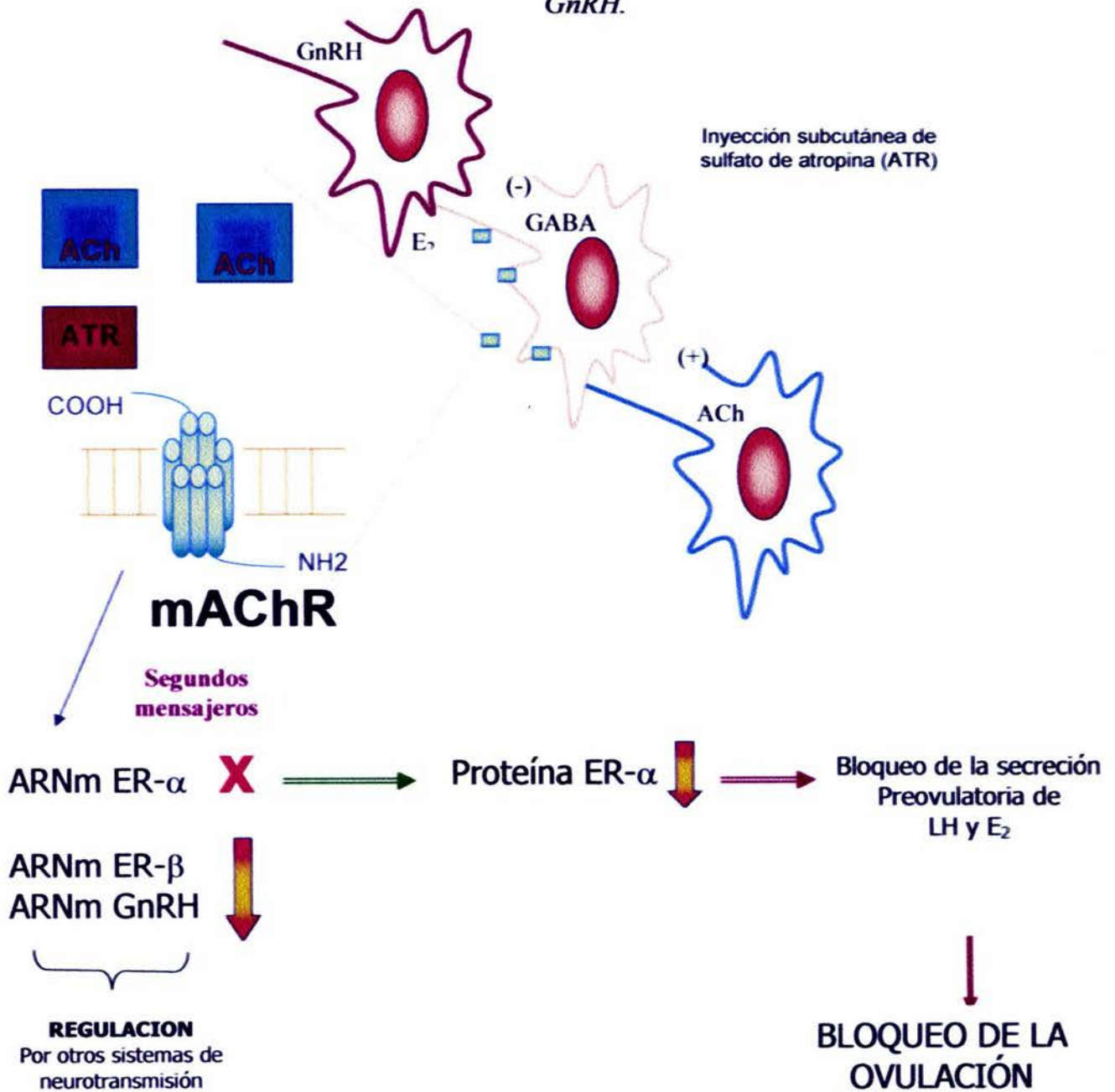
Así que, una explicación al hecho de que en el diestro-2 el lado determinante de la ovulación ya no sea el derecho, sino el izquierdo radicaría en la disponibilidad del RE β que estaría regulado por el mAChR.

Con base en resultados obtenidos en esta tesis, lo observado previamente al inyectar sulfato de atropina por vía subcutánea o por implantar cristales de atropina en POA-AHA, y los mostrados en la bibliografía relacionada con el tema, podemos plantear el siguiente modelo fisiológico sobre la participación del sistema colinérgico sobre la ovulación:

1. El mAChR presente en una interneurona (GABA, opioide) regularía la presencia del RE- α . La unión del estradiol a este receptor en esa inter-neurona tendría un efecto inhibitorio sobre su actividad.
2. La falta de esta señal inhibitoria sobre la neurona GnRH facilitaría su síntesis, la secreción de gonadotropinas que regulan el crecimiento folicular, la secreción preovulatoria de estradiol y de LH, lo que se refleja en la falta de ovulación.
3. El mAChR (del tipo metabotrópico) actuaría estimulando segundos mensajeros que se traducen en inducir la expresión del gen que codifica para el ER- α . La síntesis del ARNm se traduce 24 horas después en la presencia del receptor en las neuronas de POA-AHA.

MODELO GENERAL

□ **MODELO DE REGULACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A ESTRÓGENOS Y GnRH.**



CONCLUSIONES GENERALES

- La expresión del ARNm de ER- α en POA-AHA es asimétrica y presenta su máxima expresión en el lado derecho en el día del estro a las 17:00 hs.
- El bloqueo del sistema colinérgico empleando la dosis mínima en el día del diestro-1 inhibió la máxima expresión del ARNm de ER- α en POA-AHA.
- El bloqueo del sistema colinérgico empleando la dosis máxima en el día del estro inhibió la máxima expresión del ARNm de ER- α en POA-AHA.
- La expresión de la proteína de ER- α en POA-AHA es asimétrica y presenta su máxima expresión en el lado derecho en el día del diestro-1 a las 09:00 hs., casi 24 horas después que la máxima expresión del ARNm.
- El bloqueo del sistema colinérgico empleando la dosis máxima o mínima de antagonista disminuyo significativamente la máxima expresión de la proteína de ER- α en POA-AHA.
- El sistema colinérgico participa de manera estimulante en la expresión del ER- α , sin importar la dosis empleada.
- La expresión del ARNm de ER- β en POA-AHA es asimétrica y presenta su máxima expresión en el lado izquierdo en el día del diestro-2 a las 13:00 hs
- El bloqueo del sistema colinérgico empleando la dosis máxima o mínima de antagonista disminuyo significativamente la máxima expresión del ARNm de ER- β en ambos lados de POA-AHA.
- La expresión del ARNm de GnRH en POA-AHA es asimétrica y presenta su máxima expresión en el lado derecho en el día del diestro-2 a las 13:00 hs
- El bloqueo del sistema colinérgico empleando la dosis máxima o mínima de antagonista disminuyo significativamente la máxima expresión del ARNm de GnRH en ambos lados de POA-AHA.

- El sistema colinérgico participa de manera estimulante en la expresión del ARNm de ER- β y GnRH o bien al inhibir la expresión de ER- α la expresión de las dos anteriores se ve afectada.
- El sistema colinérgico representa una nueva vía de regulación de la expresión del ER- α .

PERSPECTIVAS

- Estudiar la expresión de la proteína del ER- β y GnRH en ambos lados de POA-AHA durante el ciclo estral.
- Evaluar los efectos de los implantes unilaterales de atropina en POA-AHA sobre la expresión de ER- α , ER- β y GnRH.
- Caracterizar que vía colinérgica pudiera estar participando.
- Estudiar la expresión del ARNm y de la proteína de los receptores muscarínicos en ambos lados de POA-AHA durante el ciclo estral.
- Estudiar que tipo de receptor muscarínico es el que esta participando en la regulación del ER- α .
- Caracterizar que segundos mensajeros pudieran ser afectados por el bloqueo de los receptores muscarínicos.
- Estudiar los efectos del bloqueo del ER- α sobre la expresión del ER- β y GnRH.

BIBLIOGRAFIA

1. **Abraham** IM, Han SK, Todman M, Korach K, Herbison AE. Estrogen receptor α mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons *in vivo*. J. Neuroscience In Press.
2. **Adelman** 1996
3. **Akema** T, Praputpittaya C, Kimura F. 1987 Effects of preoptic microinjection of neurotensin on luteinizing hormone secretion in unanesthetized ovariectomized rats with or without estrogen priming. *Neuroendocrinology*; 46: 345-349.
4. **Alexander** MJ, Dobner PR, Miller MA, Bullock BP, Dorsa DM, Leeman SE. 1989 Estrogen induces neurotensin/neuromedin N messenger ribonucleic acid in a preoptic nucleus essential for the preovulatory surge of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology*; 125: 2111-2117.
5. **Alexander** MJ, Leeman SE. 1992 Neurotensin gene expression in the rat preoptic area. Implications for the regulation of reproduction. *Ann N Y Acad Sci*; 668: 70-89.
6. **Allan** E. Herbison and Jean-Re´ mi Pape New Evidence for Estrogen Receptors in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons
7. **Armstrong** DM, Saper CD, Levey AI, Wainer BH, Terry RD 1983 Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* 1; 216(1):53-68
8. **Alreja** M, WuM, Liu W, Atkins JB, Leranath C, Shanabrough M 2000 Muscarinic tone sustains impulse flow in the septohippocampal GABA but not cholinergic pathway: implications for learning and memory. *J Neurosci* 20:8103-8110.
9. **Alves** SE, McEwen BS, Hayashi S, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S 2000 Estrogen-regulated progesterin receptors are found in the midbrain raphe but not hippocampus of estrogen receptor alpha (ER α) gene-disrupted mice. *J Comp Neurol* 427:185-195
10. **Aronica** SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS 1994 Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8517-8521.
11. **Attardi** B, Klatt B, Hoffman GE, Smith MS 1997 Facilitation or inhibition of the estradiol-induced gonadotropin surge in the immature rat by progesterone: regulation of GnRH and LH messenger RNAs and activation of GnRH neurons. *J Neuroendocrinol* 9:589-599
12. **Avissar** S, Egozi Y, Sokolovsky M. 1981 Studies on muscarinic receptors in mouse and rat hypothalamus: a comparison of sex and cyclical differences. *Neuroendocrinology*; 32(5):295-302.
13. **Bai** L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 2001; 276: 36764-36769.
14. **Bakalkin** GY, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID, Krivosheev OG. 1984 Lateralization of LHRH in rat hypothalamus. *Brain Research*; 296:361-364.

15. **Bakker J**, Baum MJ. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Front Neuroendocrinol* 2000; 21: 220-262.
16. **Barkhem T**, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J and Nilsson S(1998) Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists *Molecular Pharmacology* 54 105–112
17. **Barraclough CA**. 1983. The role of catecholamines in the regulation of gonadotropin secretion. *Acta Morphologica Hungarica*; 31:101-116.
18. **Barraclough CA**. 1992: Neural control of the synthesis and release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Ciba Symposium*; 68:233-251.
19. **Barraclough CA**. (1994) Neurotransmitter regulation of luteinizing hormone-releasing hormone neuronal function. *Acta Biol Hung*; 45: 189-206.
20. **Bauer-Dantoin AC**, Weiss P, Jameson JL 1995 Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 136:1014-1019
21. **Bazzett TJ**, Becker JB 1994 Sex differences in the rapid and acute effects of estrogen on striatal D dopamine receptor binding. *Brain Res* 637:163–172
- Bethea CL, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Gundlah CLZN 1999 Ovarian steroids and serotonin neural function. *Mol Neurobiol* 18:87–123
22. **Benoit J**.(1932) L'inversion sexuelle de la poule déterminé par l'ablation de l'ovaire gauche. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 73:1-112.
23. **Bergen H**, Leung PCK. 1987 Electrical stimulation of ventral versus dorsal mesencephalic tegmental areas in the conscious rat: Effects on luteinizing hormone release. *Neuroendocrinology*; 46: 117-124.
24. **Bergen H**, Leung PCK. 1988 Electrical stimulation of ascending noradrenergic tracts in the midbrain: Suppression of steroid-induced luteinizing hormone release. *Endocrinology*; 122(3): 899-905.
25. **Berk, ML**, Finkelstein JA. 1981. Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neuroscience*; 6:1601-1624.
26. **Billiar RB**, Kalash J, Romita V, Tsuji K, Kosuge T 1988 Neosurugatoxin: CNS acetylcholine receptors and luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Brain Res Bull* 20:315–322
27. **Blake, CA** (1974) Parallelism and divergence in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in nicotine-treated rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 145:716-720.
28. **Blejer WJ**, Ehteshami M (1981) Ovulation following unilateral ovariectomy in the California leaf-nosed bat (*Macrotus californicus*). *J. Reprod. Fertil.* 63:181-183.
29. **Bloch GJ**, Kurth SM, Akesson TR, Micevych PE. 1992 Estrogen-concentrating cells within cell groups of the medial preoptic area: sex differences and colocalization with galanin-immunoreactive cells. *Brain Res*; 595: 301-308.
30. **Bradshaw & Nettleton**. The nature of hemispheric specialization in man. *Behavioral and Brain Sciences*, 1981; 4:51-63
31. **Brinton RD** 2001 Cellular and molecular mechanisms of estrogen regulation of memory function and neuroprotection against Alzheimer's disease: Recent insights and remaining challenges. *Learn Memory* 8:121–133

32. **Britt** KL, Drummond AE, Dyson M, Wreford NG, Jones MEE, Simpson ER and Findlay JK (2001) The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 79 181–185
33. **Broca**, P. 1861. Remarques sur la siége de la faculté du langage articulé. *Bull.Soc.Anat. Paris, sér. 2,6:330-357.*
34. **Brown** RE (1994) Neurotransmitter control of hypothalamic, pituitary and other hormones. An introduction to neuroendocrinology. Cap. 6 Cambridge University Press. Gran Bretaña. Pp 88-112
35. **Bruce** McEwen Estrogen Actions Throughout the Brain
36. **Bourguignon** JP, Gerard ML, Alvarez Gonzalez M-L, Purnelle G, Franchi-mont P 1995 Endogenous glutamate involvement in pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone: evidence from effect of glutamine and developmental changes. *Endocrinology* 136:911–916
37. **Butcher** LL, Wolf NJ. 1984 En: Handbook of chemical neuroanatomy. Editores: A Björklund, T Hökfelt, RJ Kujar. vol. 13, Elsevier, Amsterdam, pp. 1-50.
38. **Butler** JA, Sjöberg M, Coen CW. 1999 Evidence for oestrogen receptor a-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J Neuroendocrinol*; 11: 331–335.
39. **Caraty** A, Fabre-Nys C, Dialeu B, Locatelli A, Bruneau G, Karsch FJ, Herbison A. 1998 Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*; 139: 1752-1760.
40. **Caraty** A, Skinner DC 1999 Dynamics of steroid regulation of GnRH secretion during the oestrus cycle of the ewe. *Ann Endocrinol (Paris)* 60:68–78
41. **Couse** JF and Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 20 358–417
42. **Caulfield** MP 1993 Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58:319–379
43. **Cavarretta** I, Magnaghi V, Ferraboschi P, Martini L, Melcangi RC. Interactions between type 1 astrocytes and LHRH-secreting neurons (GT1-1 cells): Modification of steroid metabolism and possible role of TGFβ1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 71; 41–47. 7.
44. **Clayton**, R.N. y Catt, K. 1981 Gonadotrophin-releasing hormone receptors: characterization physiological regulation and relationship to reproductive function. *Endocrinol. Rev.* 2:186-206.
45. **Colleen** A. Flanagan 1 , Robert P. Millar 1 and Nicola Illing Advances in understanding gonadotrophin-releasing hormone receptor structure and ligand interactions
46. **Conn**, PM. 1994 The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary. The physiology of reproduction. Cap.32, De. E.Knobil y J. Neill, et. al. Raven Press, Ltd.Ny, ppp 1349-1377.
47. **Conn** P.M. and Means A.R. 2000 Signaling Mechanism initiated by nuclear receptors. En Principles of Molecular Regulation. Humana Press. Pp. 351-395.
48. **Conn** P.M. and Freeman M.E. 2000 Neuroendocrinology in physiology and medicine. Humana Press.

49. **Couse JF, Korach KS.** 1999 Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol (Paris)*. Jul;60(2):143-8. Review.
50. **Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS.** 1999 Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*. Dec 17;286(5448):2328-31.
51. **Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, Smithies O and Korach KS** 1995 Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene *Molecular Endocrinology*9 1441-1454
52. **Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA and Korach KS** 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse *Endocrinology*138 4613-4621
53. **Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ and Korach KS** 1999a Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta *Science*286 2328-2331
54. **Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW and Korach KS** 1999b Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse *Endocrinology*140 5855-5865
55. **Crowley WR y Kalra, SP** 1989 Regulation of preovulatory luteinizing hormone secretion by hormone-monoamine-neuropeptide interactions in the rat. En: neural control of reproductive function. De. Lakoski, Perez-Polo y Rassin. Alan R. Liss, Inc., Nueva York, pp 79-93
56. **Cruz ME, Arteaga PR, De la Huerta M, Sánchez M, Domínguez R.** 1998 Differences in acetylcholine content and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Medical Science Research*; 25:823-825.
57. **Cruz ME, Castro J, Domínguez R.** 1992 A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Endocrinology*; 133:205-210.
58. **Cruz ME, Chávez R, Rosas P, Lujambio VM, Morán JL, Domínguez R.** 1990 Diurnal changes in hypothalamic acetylcholinesterase activity during the oestrous cycle of the rat. *Medical Science Research*; 18:137-138.
59. **Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R.** 1989 Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of Endocrinology*; 24:739-742.
60. **Culler MD, Negro-Vilar A.** (1986) Evidence that pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*; 118(2):609-612.
61. **Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF and Korach KS** (1996) Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to

- epidermal growth factor Proceedings National Academy of Sciences USA93 12 626–12 630
62. **Curtis SW**, Clark J, Myers P and Korach KS (1999) Disruption of estrogen signaling does not prevent progesterone action in the estrogen receptor or knockout mouse uterus Proceedings National Academy of Sciences USA96 3646–3651
 63. **Curran-Rauhut MA**, Petersen SL. Regulation of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 gene expression by ovarian steroids: Identification of two functionally distinct populations of GABA neurons in the preoptic area. *J. Neuroendocrinology* 2002; 14: 310- 317.
 64. **Chang KSF**, Hsu FK, Chan ST, Chan YB. (1969) Scrotal asymmetry and handedness. *J. Anat.* 94:543-548.
 65. **Charles N**, Rudick, Robert B. Gibbs, and Catherine S. Woolley A Role for the Basal Forebrain Cholinergic System in Estrogen-Induced Disinhibition of Hippocampal Pyramidal Cells
 66. **Chappell PE**, Lee J, Levine JE. 2000 Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. II. Role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Endocrinology*; 141: 1486-1492.
 67. **Chavez R**, Cruz ME, Dominguez R.(1987) Differences in the ovulation rate of the right and left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effects of ipsi- and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinol.* 113:397-401.
 68. **Chen ZG**, Yu KL, Zheng HM, Dong KW. 1999 Estrogen receptor-mediated repression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) promoter activity in transfected CHO-K1 cells. *Mol Cell Endocrinol*; 158: 131–142.
 69. **Chen A**, Zi K, Laskar-Levy O, Koch Y. 2002 The transcription of the hGnRH-I and hGnRH-II genes in human neuronal cells is differentially regulated by estrogen. *J Mol Neurosci*; 18: 67-76.
 70. **Chen Z**, Zheng H, Dong KW. 2001 Identification of negative and positive estrogen response elements in human GnRH upstream promoter in the placental JEG-3 cells. *Mol Cell Endocrinol*; 184: 125-134.
 71. **Ching M**. Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus. Effect of anaesthetics. *Neuroendocrinology* 1982; 34: 279–285.
 72. **Chongthammakun S**, Terasawa E. Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys. *Endocrinology* 1993; 132: 735–743.
 73. **Denenberg**, V.H. Hemispheric laterality in animals and the effects of early experience. *Behavioral and Brain Sciences*, 1981, 4:1-50
 74. **Dhandapani KM**, Brann DW. 2000 The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system. *Biochem Cell Biol*; 78: 165-179. 108.
 75. **Dhillon H**, Dunn AM, Esquivel E, Hamernik DL, Wise ME. 1997 The estradiol-induced luteinizing hormone surge in the ewe is not associated with increased gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels. *Biol Reprod*; 57: 107-111.60.

76. **Diamond**, MC, Dowling, GA y Johnson RE. Morphological cerebral assymetry in male and female rats 1980
77. **Dluzen** DE, Ramirez VD 1986 *In vivo* LH-RH output of ovariectomized rats following estrogen treatment. *Neuroendocrinology* 43:459–465
78. **Dohanich** GP, Witcher JA, Weaver DR, Clemens LG. 1982 Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Research*; 241(2):347-350.
79. **Domínguez** R, Riboni L, Zipitria D, Revilla R. 1982 Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat? *Journal of Endocrinology*; 95:175-180.
80. **Domínguez** R. Cruz ME, Chavez R.(1989) Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En *Growth factors and the ovary*. Anne M. Hirshfield (Ed.) Plenum Press Nueva York. Pp. 321-325.
81. **Donoso** AO, Seltzer AM, Navarro CE, Cabrera RJ, Lopez FJ, Negro-Vilar A 1994. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by hypothalamic amino acids. *Braz J Med Biol Res*; 27: 921-932.
82. **Drouva** SV, Laplante E, Gautron J-P, Kordon C. 1984 Effects of 17 β -estradiol on LH-RH release from rat mediobasal hypothalamic slices. *Neuroendocrinology*; 38: 152–157.
83. **Dubal** DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. 1999 Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: A potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*; 19: 6385–6393.
84. **Dupont** S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P and Mark M 2000 Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes *Development* 127 4277–4291
85. E. Ronald de Kloet y W. Zutanto. (1994) Steroids Receptors. In *Neurobiology of Steroids*. Section II. Pp.3-67
86. E. Ronald de Kloet y W. Zutanto. (1994) Molecular Effects of Steroids. In *Neurobiology of Steroids*. Section III. Pp.245-342
87. E. Ronald de Kloet y W. Zutanito. (1994) Cellular Effects of Steroids. In *Neurobiology of Steroids*. Section IV. Pp.359-468
88. **Eckenstein** F, Brade YA, Thoenen H. 1981 Production of specific antibodies to choline acetyltransferase purified from pig brain. *Neuroscience*; 6:993-1000.
89. **Eckenstein** F, Thoenen H. 1982 Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons *EMBO J*; 1:363-368.
90. **Eddy** EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB and Korach KS (1996) Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility *Endocrinology* 137 4796–4805
91. **Egozi** Y, Kloog Y, Sokolovsky M. 1986 Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrous cycle. *Brain Research*; 383:310-313.
92. **Egozi** Y, Kloog Y. 1985 Muscarinic receptors in the preoptic area are sensitive to 17 beta-estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology*; 40(5):385-92.

93. **El Majdoubi M, Sahu A, Plant TM.** Effect of estrogen on hypothalamic transforming growth factor alpha and gonadotropin-releasing hormone and other hypothalamic peptides in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Neuroendocrinology* 1998; 67: 228-235.
94. **Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M and Gustafsson JA** (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 4258-4265
95. **Evans NP, Dahl GE, Glover BH, Karsch FJ.** Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the pre-ovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology* 1994; 134: 1806-1811.
96. **Everett J, Sawyer CH.** (1950) A 24h periodicity in the "LH release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*; 46:198-216.
97. **Everett JW, Sawyer CH, Markee JE.** (1949) A neurogenic timing factor in the control of the ovulation discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology*; 44:234-250.
98. **Everett JW, Sawyer CH.** (1949) A neural timing factor in the mechanism by which progesterone advances ovulation in the cyclic rat. *Endocrinology*; 45:581-594.
99. **Everett JW.** (1948) Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*; 43:389-405.
100. **Eyigor O, Jennes L.** Identification of glutamate receptor subtype mRNAs in gonadotropin-releasing hormone neurons in rat brain. *Endocrine* 1996; 4: 133-139.
101. **Eyigor O, Jennes L.** Expression of glutamate receptor subunit mRNAs in gonadotropin-releasing hormone neurons during the sexual maturation of the female rat. *Neuroendocrinology* 1997; 66: 122-129.
102. **Fan NC, Peng C, Krisinger J, Leung PC** 1995 The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol Cell Endocrinol* 107:R1-R8
103. **Favaretto AI, Valenca MM, Picanco-Diniz D, Antunes-Rodrigues JA.** (1993) Inhibitory role of cholinergic agonists on testosterone secretion by purified rat Leydig cells. *Archives Int Physiology, Biochemistry and Biophysics*; 101:333-335.
104. **Fekete C, Strutton PH, Cagampang FRA, Hrabovszky E, Kallo I, Shughrue PJ, Dobo E, Mihaly E, Baranyi L, Okada H, Panula P, Merchenthaler I, Fink G.** Serotonergic 5-HT_{2A} receptors important for the oestradiol-induced surge of luteinising hormone-releasing hormone in the rat. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 63-69.
105. **Fiorindo RP, Martini L** 1975 Evidence for a cholinergic component in the neuroendocrine control of luteinizing hormone (LH) secretion. *Neuroendocrinology* 18:322-332
106. **Fisher CR, Graves KH, Parlow AF and Simpson ER** (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted

- disruption of the *cyp19* gene Proceedings National Academy of Sciences USA 95:6965-6970
107. **Ferris CF**, Pan JX, Singer EA, Boyd ND, Carraway RE, Leeman SE. Stimulation of luteinizing hormone release after stereotaxic microinjection of neurotensin into the medial preoptic area of rats. *Neuroendocrinology* 1984; 38: 145-151.
 108. **Finn PD**, Steiner RA, Clifton DK. 1998 Temporal patterns of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), c-fos, and galanin gene expression in GnRH neurons relative to the luteinizing hormone surge in the rat. *J Neurosci*; 18: 713-719.
 109. **Fleur L**, Strand 1999 *Neuropeptide Families: the regulatory role of neuropeptides*. En: *Neuropeptides*. MIT Press Cambridge. Pp. 165-507.
 110. **Flugge G**, Oertel WH, Wuttke W. 1985 Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology*; 43:1-5.
 111. **Frankel A.**, Chapman JC, Book B.(1989) Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *J. Endocrinol.* 122: 485-488.
 112. **Frankfurt M**, Gould E, Wolley C, McEwen BS 1990 Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: a Golgi study in the adult rat. *Neuroendocrinology* 51:530-535
 113. **Frazer A**, Hensler JG. 1993 Serotonin, En: *Basic Neurochemistry*. Editores GJ Sigel, BW Agranoff, RN Albers y PB Molinoff. Raven Press, New York, pp. 283-308.
 114. **Freeman ME**. 1994 The neuroendocrine control of the rat estrous cycle. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 2, cap. 46, Raven Press, Nueva York, pp. 613-658.
 115. **Fukuda M**, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y. 1984 Hypothalamic laterality in regulating gonadotrophic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroscience Letters*; 51:367-370.
 116. **Gallo RV**. 1981 Pulsatile LH release during periods of low-level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biology of Reproduction*; 24:771-779.
 117. **Gallo RV**. 1981 Pulsatile LH release during the ovulatory surge on proestrus in the rat. *Biology of Reproduction*; 24:100-104.
 118. **Gazzaniga MS**, Sperry RW. (1967) Lenguaje after section section of the cerebral commissures. *Brain* 90:131-148.
 119. **Geschwind N**, Levitsky W. (1968) Left-Right asymmetry in temporal speech region. *Science* 161:186-187.
 120. **Gerendai I**, Halász B. 1997 Neuroendocrine asymmetries. *Frontiers in Neuroendocrinology*; 18:354-381.
 121. **Gerendai I**, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. 1978 Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neuroscience Letters*; 9:333-336.

122. **Gerendai I.** 1986 Laterality in the neuroendocrine system. En: Duality and unity of the brain. Editor O Ottonson. MacMillan, Estocolmo, pp.17-28.
123. **Gharib SD,** Wierman ME, Shupnik MA and Chin WW 1990 Molecular biology of the pituitary gonadotropins *Endocrine Reviews* 11 177-199
124. **Gundlach C,** Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Bethea CL 1999 Ovarian steroid effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. *Mol Brain Res* 63:325-339
125. **Gibbs RB** 1996 Fluctuations in relative levels of choline acetyltransferase mRNA in different regions of the rat basal forebrain across the estrous cycle: effects of estrogen and progesterone. *J Neurosci* 16:1049-1055.
126. **Gibbs RB** 1997 Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons vary as a function of dose and duration of treatment. *Brain Res* 757:10-16.
127. **Gibbs RB** 2000 Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience* 101:931-938.
128. **Gibbs RB** 2002 Basal forebrain cholinergic neurons are necessary for estrogen to enhance acquisition of a delayed matching-to-position T-maze task. *Horm Behav* 42:245-257.
129. **Gibbs RB,** Hashash A, Johnson DA 1997 Effects of estrogen on potassium-stimulated acetylcholine release in the hippocampus and overlying cortex of adult rats. *Brain Res* 749:143-146.
130. **Giguere V,** Yang N, Segui P, Evans RM. 1988 Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*; 331: 91-94.
131. **Giguere V.** To 2002 ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab*; 13: 220-225..17
132. **Glick,** Meibach, Cox y Maayani 1979 Multiple and interrelated functional asymmetries in rat brain. *Life sciences*, 1979; 25:395-400
133. **Glick,** Jerussi y Zimmernberg. Behavioral and neuropharmacological correlates of nigrostriatal asymmetry in rats. En S. Harnad, RW Doty, L.Goldstein, J. Jaynes y G Krauthamer(Eds) *Lateralization in the nervous system*, New York, Academic Press, 1977.
134. **Gore AC,** Roberts JL. 1995 Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*; 136(3):889-896.
135. **Gore AC,** Roberts JL. 1997 Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro. *Frontiers in Neuroendocrinology*; 18(2):209-245.
136. **Gore AC.** 2001 Gonadotropin-releasing hormone neurons, NMDA receptors, and their regulation by steroid hormones across the reproductive life cycle. *Brain Res Brain Res Rev*; 37: 235-248.
137. **Gore AC,** Wu TJ, Rosenberg JJ, Roberts JL. 1996 Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. *J Neurosci*; 16: 5281-5289.
138. **Gore AC,** Oung T, Woller MJ. Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene

- expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 300-309.
139. **Gore-Langton** RE, Armstrong DT. 1994 Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 2, cap. 11, Raven Press, Nueva York, pp.571-627.
 140. **Goubillon** M-L, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE. Identification of neurokinin B-expression neurons as an highly estrogen receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology* 2000; 141: 4218-4225.
 141. **Green** PS, Bishop J, Simpkins JW 1997 17 β -Estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci* 17:511-515.
 142. **Greene** GL, Sobel NB, King WJ, Jensen EV 1984 Immu-nochemical studies of estrogen receptors. *J Steroid Bio-chem* 20:51-56
 143. **Greenwald** GS, Roy SK. (1994) Follicular development and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 1, cap. 12, Raven Press, Nueva York, pp. 629-724.
 144. **Hall** JM and McDonnell DP (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER alpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens *Endocrinology* 140 5566-5578
 145. **Harris** TG, Robinson JE, Evans NP, Skinner DC, Herbison AE. 1998 Gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression changes before the onset of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*; 139: 57-64..19
 146. **Hart** SA, Patton JD, Woolley CS (2001) Quantitative analysis of ER β and GAD colocalization in the hippocampus of the adult female rat. *J Comp Neurol* 440:144-155.
 147. **Heape** W. (1990) The "sexual season" of mammals and relation of the pro-oestrus to menstruation. *Q. J. Micr. Sci.* 44: 1-70, citado en: Freeman ME (1994) The ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 2, cap. 46, Raven Press, Nueva York, pp. 613-658.
 148. **Herbison** AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 1998; 19: 302-330.
 149. **Herbison** AE, Skynner MJ, Sim JA. Lack of detection of estrogen receptor- α transcripts in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2001; 42: 493.
 150. **Herbison** AE. Electrical properties of postnatal GnRH neurons in the mouse and their regulation by gonadal steroids. In *Neuroplasticity, Development and Steroid Hormone Action*. Boca Raton: CRC Press, 2001:177-190.
 151. **Herbison** AE, Pape J-R, Simonian SX, Skynner MJ, Sim JA. Molecular and cellular properties of GnRH neurons revealed through transgenics in the mouse. *Mol Cell Endocrinol* 2001
 152. **Hewitt** SC and Korach KS (2000) Progesterone action and responses in the α ERKO mouse *Steroids* 65 551-557

153. **Hewitt SC**, Goulding EH, Eddy EM and Korach KS (2002) Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biology of Reproduction* 67: 1268–1277
154. **Hillier SG**, Withelaw, PF and Smith CD (1994) Follicular oestrogen synthesis: The two cell, two gonadotropin. Model revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100:51-54
155. **Horacio O. de la Iglesia**, Jennifer Meyer, and William J. Schwartz Lateralization of Circadian Pacemaker Output: Activation of Left- and Right-Sided Luteinizing Hormone–Releasing Hormone Neurons Involves a Neural Rather Than a Humoral Pathway
156. **Horvath TL**, Leranath C, Kalra SP, Naftolin F 1995 Galanin neurons exhibit estrogen receptor immunoreactivity in the female rat mediobasal hypothalamus. *Brain Res* 675: 321–324
157. **Hrabovszky E**, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. 2000 Detection of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid and 125 I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*; 141: 3506–3509.
158. **Hrabovszky E**, Steinhäuser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z. 2001 Estrogen receptor- β immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*; 142: 3261–3264.
159. **Hrabovszky E**, Kallo I, Hajszan T, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Liposits Z 1998 Expression of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology* 139:2600–2604
160. **Hrabovszky E**, Steinhäuser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z. (2001) Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*; 142: 3261-3264.
161. **Hrabovszky E**, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan I, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. (2000) Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125 I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*; 141: 3506-3509.
162. **Inase Y**, Machida T. Differential effects of right sided and left sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Res.* 1992; 580:338-340)
163. **Jarjour LT**, Handelsman DJ, Raum WJ, Swerdloff RS. (1986) Mechanism of action of dopamine on the in vitro release of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*; 119(4):1726-1732.
164. **Jarry H**, Leonhardt S, Wuttke W. Preoptic rather than mediobasal hypothalamic amino acid neurotransmitter release regulates GnRH secretion during the estrogen-induced LH surge in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 1992; 62: 479-486

165. **Jarry H, Perschl A, Wuttke W.** Further evidence that preoptic anterior hypothalamic GABAergic neurons are part of the GnRH pulse and surge generator. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 1988; 118: 573-579.
166. **Jarry H, Hirsch B, Leonhardt S, Wuttke W.** Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 133-140.
167. **Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME.** (1985) Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons. *Journal of Comparative Neurology*; 232:534-547.
168. **Jennes L.** (1989) Prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone-containing systems in rat brain. *Brain Research*; 482(1):97-108.
169. **Johnson MD, Crowley WR.** (1983) Acute effects of estradiol on circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations and on serotonin turnover in individual brain nuclei. *Endocrinology*; 113:1934-1941.
170. **Jung H, Shannon EM, Fritschy JM, Ojeda SR.** Several GABAA receptor subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats. *Brain Res* 1998; 780: 218-229.
171. **Kakar SS** 1997 Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 137:183-192
172. **Kalash J, Romita V, Billiar RB** 1989 Third ventricular injection of alpha-bungarotoxin decreases pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 49:462-470
173. **Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW** 2001 Oestrogen receptor α -immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 13:741-748
174. **Kalra SP.** Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocrine Reviews* 1993; 14: 507-538.
175. **Kalra SP, Kalra PS** 1983 Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr Rev* 4:311-351
176. **Kalra SP, Horvath T, Naftolin F, Xu B, Pu S, Kalra PS** 1997 The interactive language of the hypothalamus for the gonadotropin releasing hormone (GnRH) system. *J Neuroendocrinol* 9:569-576
177. **Kato A, Hiruma H, Kimura F** 1994 Acute estradiol modulation of electrical activity of the LHRH pulse generator in the ovariectomized rat: restoration by naloxone. *Neuroendocrinology* 59:426-431
178. **Kawakami M, Arita J, Kimura F, Hayashi R.** (1979) The stimulatory roles of catecholamines and acetylcholine in the regulation of gonadotropin release in ovariectomized estrogen-primed rats. *Endocrinologica Japonica*; 26(2):275-284.
179. **Kelly MJ, Levin ER.** 2001 Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*; 12: 152-156.
180. **Kelly MJ, Wagner EJ** 1999 Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* 10:369-374

181. **Kelly M, Moss R, Dudley C** 1977 The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res* 30:53–64
182. **Kim K, Lim IS, Cho BN, Kang SS, Lee BJ, Choi KH, Chung CH, Lee CC, Cho WK, Wuttke W.** (1993) A partial blockade of catecholaminergic neurotransmission with 6-hydroxydopamine decreases mRNA levels of gonadotropin-releasing hormone in male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*; 58:146-152.
183. **King JA, Millar RP.** (1995) Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Molecular Neurobiology*; 15:5-23.
184. **Kizer JS, Palkovits M, Tappaz J, Kebabian J, Brownstein MJ** 1976 Distribution of releasing factors, biogenic amines, and related enzymes in the bovine median eminence. *Endocrinology* 98:685–695
185. **Klangkalya B, Chan A.** (1988) Inhibition of hypothalamic and pituitary muscarinic receptor binding by progesterone. *Neuroendocrinology*; 47(4):294-302.
186. **Koren D, Egozi Y, Sokolovsky M** 1992 Muscarinic involvement in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Mol Cell Endocrinol* 90:87–93
187. **Kordon C, Glowinski J.** (1972) Role of hypothalamic monoaminergic neurons in gonadotropin release-regulating mechanisms. *Neuropharmacology*; 11:153-162.
188. **Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G, Weiner RI.** (1994) Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 1, cap. 27, Raven Press, Nueva York, pp. 1621-1677.
189. **Koren D, Egozi Y, Sokolovsky M.** (1992) Muscarinic involvement in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Molecular Cell Endocrinology*; 90(1):87-93.
190. **Köning JF, Klippel RA.** (1963) *The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
191. **Kovacs M, Koppan M, Mezo I, Teplan Y.** (1994) Diverse effects of a potent LH-RH antagonist on the LH and FSH release. *Acta Biologica Hungarica*; 45(2-4):285-296
192. **Kow L-M, Pfaff DW** 1988 Transmitter and peptide actions on hypothalamic neurons *in vitro*: Implications for lordosis. *Brain Res Bull* 20:857– 861
193. **Krajewski SJ, Abel TW, Voytko ML, Rance NE.** Ovarian steroids differentially modulate the gene expression of gonadotropin-releasing hormone neuronal subtypes in the ovariectomized cynomolgus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 655-662
194. **Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, SarM, Korach KS, Gustafsson JA and Smithies O** (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 95 15 677–15 682

195. **Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Catt KJ** 1996 Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release and its regulation. *Trends Endocrinol Metab* 7:56–59
196. **Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Mertz LM, Tomic M, Catt KJ** 1993 Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuro-peptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3908–3912
197. **Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Arora KK, Catt KJ** 2003 An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuro-peptide secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2969–2974
198. **Kuiper GGM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA.** 1996 Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:5925–5930.
199. **Kuiper GGM, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson J-A** 1998 The estrogen receptor – beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19:253–286
200. **Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S.** Expression and neuro-peptidergic characterization of estrogen receptors (ERa and ERb) throughout the rat brain: Anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol* 1998; 36: 357–378.
201. **Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ.** 1995 Estradiol-17 b and m-opioid peptides rapidly hyper-polarize GnRH neurons: A cellular mechanism of negative feedback. *Endocrinology*;136: 2341–2344.
202. **Lapchak PA, Araujo D.M, Quirion R, Beaudet A.** (1990) Chronic estradiol treatment alters central cholinergic function in the female rat: effect on choline acetyltransferase activity, acetylcholine content, and nicotine autoreceptor function. *Brain Research*; 525:249-255.
203. **Lauber AH, Whalen RE.** (1988) Muscarinic cholinergic modulation of hypothalamic estrogen binding sites. *Brain Research*; 443(1-2):21-26.
204. **Lazar Z, Krsmanovic, Nadia Mores, Carlos E. Navarro, S. Abdul Saeed, Krishan K. Arora, and Kevin J. Catt** (1998) Muscarinic Regulation of Intracellular Signaling and Neurosecretion in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons *Endocrinology* 139: 4037–4043.
205. **Lee E, Moore CT, Hosny S, Centers A, Jennes L.** 2000; Expression of estrogen receptor- a and c-Fos in adrenergic neurons of the female rat during the steroid-induced LH surge. *Brain Res* 875: 56–65.
206. **Lee SJ, McEwen BS** 2001 Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:569–591
207. **Legan SJ, Coon GA, Karsch FJ.** Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 1975; 96: 50–56.
208. **Legan SJ, Callahan WH.** Suppression of tonic luteinizing hormone secretion and norepinephrine release near the GnRH neurons by estradiol in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70: 237–245.

209. **Leipheimer** RE, Bona-Gallo A, Gallo RV. (1984) The influence of progesterone and estradiol on the acute changes in the pulsatile luteinizing hormone release induced by ovariectomy in diestrus 1 in the rat. *Endocrinology*; 114:1605-1612.
210. **Leonardelli** J, Dubois MP, Poulain P. (1974) Effect of exogenous serotonin on LH-RH secreting neurons in the guinea pig hypothalamus as revealed by immunofluorescence. *Neuroendocrinology*; 15:69-72.
211. **Leonhardt** S, Seong JY, Kim K, Thorun Y, Wuttke W, Jarry H. (1995): Activation of central GABA_A-but not GABA_B-receptors rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*; 61:655-662.
212. **Levine** JE, Ramirez VD. (1980) In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology*. 107(6), 1782-1790.
213. **Levine** (1994) Pulsatility in neuroendocrine systems. Academic Press U.S.A.
214. **Levine** JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Conaghan LA, Legan SJ, Meredith JM, Strobl FJ, Urban JH, Vogelsong KM, Wolfe AM. Neuroendocrine regulation of luteinizing hormone pulse generator in the rat. *Recent Prog Horm Res* 1991; 47: 97-153.
215. **Levin** ER 2002 Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67:471-475
216. **Libertum** C, McCann SM. (1973) Blockade of the release of gonadotropins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats. *Endocrinology*; 92:1714-1724.
217. **Libertun** C, McCann SM 1976 Blocade of the postorchidectomy increase in gonadotropins by implants of atropine into the hypothalamus. *Proc Soc Exp Biol Med* 152:143-146
218. **Lipostis** Z, Setalo G, Flerko B. (1984) Application of the silver-gold intensified 3,3'-diaminobenzidine chromogen to the light and electron microscopic detection of the luteinizing hormone-releasing hormone system of the rat brain. *Neuroscience*; 13:513-525.
219. **Lopez** FJ, Merchenthaler IJ, Moretto M, Negro-Vilar A 1998 Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell Mol Neurobiol* 18:125-146
220. **López** E, Cruz ME, Domínguez R. (1997) Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the rat. *Archives of Medical Research*; 28(3):343-348.
221. **López** FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG y Negro-Vilar A. (1991) Galanin: a hypothalamic hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*; 88:4508-4512.
222. **Lubahn** DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS and Smithies(1993) Alteration of reproductive function but not prenatal

- sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 90:1162-1166.
223. **Luine V**, Park DJ, Reis D, McEwen B. (1980) Immunohistochemical demonstration of increased choline acetyltransferase concentration in rat preoptic area after estradiol administration. *Brain Research*; 191:273-277.
224. **Luine VN** (1985) Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. *Exp Neurol* 89:484-490.
225. **Maggi R, Pimpinelli F, Martini L, Piva F** 1995 Inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone secretion by delta-opioid agonists in GT1-1 neuronal cells. *Endocrinology* 136:5177-5181
226. **Mahesh VB**, Brann DW. Neuroendocrine mechanisms underlying the control of gonadotropin secretion by steroids. *Steroids* 1998; 63: 252-256.
227. **Markee JE, Everett JW, Sawyer CH** 1952 The relationship of the nervous system to the release of gonadotropin and regulation of the sex cycle. *Recent Prog Horm Res* 7:139-157
228. **Marks DL**, Lent KL, Rossmanith WG, Clifton DK, Steiner RA. Activation-dependent regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat. *Endocrinology* 1994; 134: 1991-1998.
229. **Martinez de la Escalera G**, Choi AL, Weiner RI 1992 Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1852-1855
230. **McCann SM**, Rettori V. 1986 Gamma amino butyric acid (GABA) controls anterior pituitary hormone secretion. *Adv Biochem Psychopharmacol*; 42: 173-189.
231. **McCann SM**, Marubayashi U, Sun HQ, Yu WH. 1993 Control of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release by hypothalamic peptides. *Annals of the New York Academy of Science*; 28:687:55-59.
232. **McCann SM**, Mizunuma H, Samson WK, Lumpkin MD. 1983 Differential hypothalamic control of FSH secretion: a review. *Psychoneuroendocrinology*; 8(3):299-308.
233. **McEwen BS**, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999; 20:79-307.
234. **McKenna NJ**, Lanz RB, O'Malley BW 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344
235. **Miller MM**, Silver J, Reinhart B. 1984 Effects of gonadal steroids on the in vivo binding of [¹²⁵I]α-bungarotoxin to the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*; 290:67-75.
236. **Miller, WL** 1988 Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9:295
237. **Mittwoch V.** (1975) Lateral asymmetry and gonadal differentiation. *Lancet* 1:401-402.
238. **Morley B**, Rodríguez-Sierra J, Clough R. (1983) Increase in hypothalamic nicotinic acetylcholine receptors in prepubertal female rats administered estrogen. *Brain Research*; 278:262-265

239. **Mukherjee, A., Snyder, G. y McCann, S.M.** 1980 Characterization of muscarinic cholinergic receptors on intact rat anterior pituitary cells. *Life Sciences* 27:475-477.
240. **Nance DM, Moger WH;** Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemicastration. *Brain Res. Bull* 1983; 10:353-355).
241. **Nisticó G, Müller EE.** 1989 Neurotransmitters, Neuromodulators and Neuromediators. En: Brain messengers and the pituitary, 2da. edición, Academic Press, Nueva York, pp. 15-228.
242. **Norden Ej, Yahr P.** Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science* 1982; 218:391-393)
243. **Norris O. D.** 1997 Vertebrate Endocrinology. Academic Press, Nueva York, 3rd Edition.
244. **Olsen KL, Edwards E, Schechter N, Whalen RE.** 1988 Muscarinic receptors in preoptic area and hypothalamus: effects of cyclicity, sex and estrogen treatment. *Brain Research*; 448(2):223-229.
245. **Paola R. Arteaga-López, Roberto Domínguez, Marco A. Cerbón, Carmen A. Mendoza-Rodríguez and María Esther Cruz.** 2003 Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*, 21(3):251-260.
246. **Paxinos G** (1995) The rat nervous system. San Diego: Academic.
247. **Prevot V, Bouret S, Croix D, Alonso G, Jennes L, Mitchell V, Routtenberg A, Beauvillain J-C.** Growth-associated protein-43 messenger ribonucleic acid expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 2000; 141: 1648-1657.
248. **Rainbow TC, Dejroff V, Luine V, McEwen B.** (1980) Estradiol-17 β increase the number of muscarinic receptors in hypothalamic nuclei. *Brain Research*; 198:239-243.
249. **Richardson SB, Prasad JA, Hollander CS** 1982 Acetylcholine, melatonin, and potassium depolarization stimulate release of luteinizing hormone-releasing hormone from rat hypothalamus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2686-2689
250. **Robinson, RG.** Differential behavioral and biochemical effects of right and left hemispheric cerebral infarction in the rat, *Science*; 1979, 205: 707-710
251. **Ronnekleiv OK, Kelly MJ.** Luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system during the estrous cycle of the female rat: Effects of surgically induced persistent estrus. *Neuroendocrinology* 1986; 43: 564-576.
252. **Rosen G.D, Sherman GF, Galaburda AM.** Biological substrates of anatomic asymmetry. *Progr Neurobiol*, 1992; 39:507-515.)
253. **Rosie R, Thomson E, Fink G** 1990 Oestrogen positive feedback stimulates the synthesis of LHRH mRNA in neurones of the rostral diencephalon of the rat. *J Endocrinol* 124:285-289
254. **Rogers L.** Lateralization in the avian brain. *Bird Behav.*, 1980 2:1-12

255. **Sánchez** MA, López-García JC, Cruz ME, Tapia R, Domínguez R. (1994) Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrus cycle of the rat. *Neuroreport*; 5: 433-434.
256. **Sánchez** MA, Domínguez R. (1994) Asimetrías en el sistema nervioso, inmune y endócrino. *Arch. Inst. Nac. Neurol. Neuroscir. (MEX)* 9:66-72.
- 257.
258. **Sargent** PB 1993 The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann Rev Neurosci* 16:403-443
259. **Sarkar** DK, Chiappa SA, Fink G, Sherwood NM. Gonadotropin-releasing hormone surge in prooestrous rats. *Nature* 1976; 264: 461-463.
260. **Sawyer** CH, Markee JE, Townsend BF. (1949) Cholinergic and adrenergic components in the neurohumoral control of the release of LH in the rabbit. *Endocrinology*; 44:18-37.
261. **S. C. Hewitt** and K. S. Korach (2003) Oestrogen receptor knockout models illustrate roles of ERs in reproduction. *Society for Reproduction and Fertility* 1470-1626 2003.144
262. **Schneider** H, McCann S. (1970) Monoamine and indolamines and control of LH secretion. *Endocrinology*; 86:1127-1133.
263. **Schomberg** DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE and Korach KS (1999) Targeted disruption of the estrogen receptor- α gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult *Endocrinology* 140 2733-2744
264. **Sandhu** S, Cooke P, Diamond MC. Rat cerebral cortical estrogen receptors: male female, right-left. *Exp. Neurol*, 1986 92:186-196)
265. **Shivers** BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 1983; 304:345-347.
266. **Shughrue** PJ, Merchenthaler I 2001 Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 43:64-81
267. **Shughrue** PJ, Lane MV, Merchenthaler I 1999 Biologically active estrogen receptor- α : evidence from in vivo autoradiographic studies with estrogen receptor- α -knockout mice. *Endocrinology* 140:2613-2620
268. **Shughrue** PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 507-25 1997; 388: 507-525.
269. **Shughrue** PJ, Scrimo PJ, 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.
270. **Silverman** AJ, Livne I, Witkin JW. (1994) The gonadotropin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 1, cap. 28, Raven Press, Nueva York, pp. 1638-1709.

271. **Silverman** AJ, Witkin JW. (1994) Biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle: a cellular analysis. *Neuroendocrinology*; 59(6):545-551.
272. **Simonovic** I, Motta M, Martini L 1974 Acetylcholine and the release of the follicle-stimulating hormone-releasing factor. *Endocrinology* 95:1373-1379
273. **Smith** MS, Freeman ME, Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226
274. **Smith** MJ, Wise PM. Neurotensin gene expression increases during proestrus in the rostral medial preoptic nucleus: potential for direct communication with gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2001; 142: 3006-3013.
275. **Smith** MJ, Jennes L. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 2001; 122: 1-10..24
276. **Skynner** MJ, Sim JS, Herbison AE. Detection of estrogen receptor α and β messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 1999;140: 5195-5201.
277. **Sokolovsky** M, Egozi Y, Avissar S. (1981) Molecular regulation of receptors: interaction of beta-estradiol and progesterone with the muscarinic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 78(9):5554-5548.
278. **Sullivan**,KA; Witkin,JW; Ferin,M; Silverman,AJ. (1995) Gonadotropin-releasing hormone neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Research*; 685:198-200.
279. **Suter** KJ, Song WJ, Sampson TL, Wuarin J-P, Saunders JT, Dudek FE, Moenter SM. Genetic targeting of green fluorescent protein to gonadotropin-releasing hormone neurons: Characterization of whole-cell electrophysiological properties and morphology. *Endocrinology* 2000;141: 412-419.
280. **Suzuki** M, Nishihara M, Takahashi M. (1995) Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrous cycle. *Endocrine Journal*; 42(6):789-796.
281. **Sylvia** Curtis Hewitt and Kenneth S. Korach Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors α and β in reproductive tissues
282. **Tasaka** K, Miyake A, Sakumoto T, Aono T. (1985) Dopamine decreases release of luteinizing hormone releasing hormone from superfused rat mediobasal hypothalamus. *Journal of Endocrinology Investigation*; 8:373-376.
283. **Tatcher** R.W. Walker R.A. Giudice S. Human cerebral hemispheres develop at different rates and ages. *Science* 1987; 236:1110-1113.
284. **Terasawa** E 2001 Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: mechanism of pulsatile LHRH release. *Vitam Horm* 63:91-129
285. **Terasawa** E, Rodriguez-Sierra JF, Dierschke DJ, Bridson WE, Goy RW 1980 Positive feedback effect of progesterone on luteinizing hormone (LH) release in cyclic female rhesus monkeys: LH response occurs in two phases. *J Clin Endocrinol Metab* 51:1245-1250

286. **Terasawa E.** Control of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generation in nonhuman primates. *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15: 141-164.
287. **Thoyama M.** and Takatsuji K. (1998) *Neuroactive Systems*. En: Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat. Oxford University Press, Tokio. Pp. 20-318
288. **Weiner RI** 1996 Cellular basis of the GnRH pulse generator. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 48:573-577
289. **Wetsel WC,** Valenca MM, Merchenthaler I, Liposits Z, Lopez FJ, Weiner RI, Mellon PL, Negro-Vilar A 1992 Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4149-4153
290. **Wierman ME,** Kepa JK, Sun W, Gordon DF, Wood WM. Estrogen negatively regulates rat gonadotropin releasing hormone (rGnRH) promoter activity in transfected placental cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 86: 1-10.
291. **Wuttke W,** Jarry H, Feleder C, Moguilevsky J, Leonhardt S, Seong JY, Kim K. The neurochemistry of the GnRH pulse generator. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 1996; 56:707-713.
292. **Wray S,** Zoeller RT, Gainer H. Differential effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in slice explant cultures prepared from specific rat forebrain regions. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1197-1206.
293. **Witkin JW,** Demasio KA. (1990) Ultrastructural differences between smooth and thorny GnRH neurons. *Neuroscience*; 34:777-783.
294. **Xia L,** Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M. A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1992; 131: 2812-2820.
295. **Yu WH,** Karanth S, Walczewska A, Sower SA, McCann SM. (1997) A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*; 94(17):9499-9503.
296. **Zoeller RT,** Seeburg PH, Young WSI. *In situ* hybridization histochemistry for messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding gonadotropin-releasing hormone (GnRH): Effect of estrogen on cellular levels of GnRH mRNA in female rat brain. *Endocrinology* 1988;122: 2570-2577.

*≈El tiempo es el mejor actor:
siempre encuentra un final perfecto.
Charles Chaplin*

APÉNDICE

APÉNDICE 1

FROTIS VAGINALES DE RATA. HEMBRAS ADULTAS

Se emplearon ratas hembras adultas de la cepa CII-ZV, las cuales se agruparon en seis animales por caja y se les mantuvo en condiciones controladas de iluminación con libre acceso al alimento y agua.

Cada rata fue marcada en la oreja dándole un número consecutivo, por lo general se ciclaban grupos de 100 ratas por mes de experimentación. A cada rata se le tomó el frotis vaginal utilizando un asa de cultivo modificada, de manera que la introducción del asa no lastimara la vagina del animal. Una vez tomado el frotis, el material se depositaba sobre un portaobjetos limpio que previamente había sido fechado para tener un mejor control del periodo en que se tomaron los frotis. Los frotis se tomaron diariamente durante dos semanas a la misma hora del día.

Diariamente, al portaobjetos con los frotis se le realizaba un proceso de tinción con hematoxilina-eosina, el cual consistía en sumergir los frotis primero en hematoxilina durante cinco minutos, después se enjuagaban en agua otros cinco minutos, posteriormente se sumergían en eosina durante tres minutos y por último se enjuagaban con alcohol. Una vez teñidos se dejaban secar al aire libre y después se observaban al microscopio las características celulares que presentaba el frotis de cada rata, una vez clasificado el día del ciclo estral en que se encontraba la rata, este se registraba en una lista que contenía los números de cada una de ellas.

Cuando se terminaban las dos semanas que se empleaban para tomar los frotis, solamente eran utilizadas aquellas ratas que presentaban tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración cada uno.

A continuación se muestran esquemas que representan la morfología celular de los frotis vaginales en cada uno de los días del ciclo estral.

CICLO ESTRAL DE
LA RATA



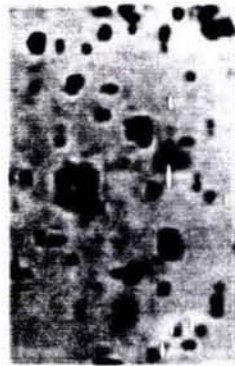
PROESTRO



ESTRO



DIESTRO-1



DIESTRO-2

APÉNDICE 2

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS CEREBRALES Y SUERO SANGUÍNEO

Para la obtención de muestras de tejido cerebral así como de sangre, se emplearon ratas cíclicas las cuales fueron sacrificadas por decapitación. Primero se agruparon según el día del ciclo en que estaban, después se seleccionaron grupos de seis ratas que estaban en el mismo día del ciclo para ser sacrificadas a las 09:00, 13:00 ó 17:00 horas.

Una vez que la rata se decapitaba, la sangre del tronco se recolectaba en tubos de ensayo empleando embudos de plástico. La sangre en los tubos de ensayo se dejó a temperatura ambiente durante 15 o 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min., después el sobrenadante (suero) se recolectó y se distribuyó en alícuotas de 300 μ l las cuales se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente estos tubos se almacenaron en congelación hasta su posterior procesamiento por radioinmunoanálisis para cuantificar las concentraciones hormonales de estrógenos y progesterona.

Con lo que respecta a la extracción del tejido cerebral, primero se extrajo el cerebro entero y se enjuagó con solución salina estéril fría, después se disecó POA-AHA por la técnica de Palkovits () para lo cual se utilizó material de disección limpio y estéril. Una vez que se disecó POA-AHA se procedió a dividirla en la parte izquierda y derecha. Cada fragmento de tejido se depositó en tubos de ensayo nuevos y estériles que contenían solución de TRIzol para la extracción inmediata de RNA total.

APÉNDICE 3

EXTRACCION DE ARN TOTAL DE POA-AHA IZQUIERDA Y DERECHA

- En tubos de ensayo nuevos y estériles se homogeneizo el tejido cerebral con TRIzol a 4°C. Para esta fase experimental se empleo un politrón con cuchillas especiales para tejido cerebral.
- Una vez homogeneizado, el tejido se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml nuevos y estériles.
- Después se agrego cloroformo grado biología molecular, en una proporción de 1:5. Se taparon los tubos eppendorf que contenían el homogenizado con el cloroformo y se agitaron manualmente por 30 segundos aproximadamente.
- Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos, después se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El ARN quedo en la fracción acuosa, mientras que el ADN y las proteínas quedaron en la interfase y en la fase orgánica.
- La fase acuosa que contenía al ARN se transfirió a otro tubo eppendorf nuevo y esterilizado. Una vez transferido se agrego un volumen igual de isopropanol para precipitar el ARN. La muestra se mantuvo en refrigeración a 4°C durante toda la noche.
- Posteriormente se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. El ARN se precipito formando una pastilla blanca amarillenta.
- Después se removió el sobrenadante y se lavo la pastilla con etanol al 80%, posteriormente se centrifugo a 7500 rpm durante 8 min. a 4 °C.
- Una vez centrifugada y enjuagada, se removió el sobrenadante de la pastilla de ARN. Los tubos con la pastilla se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril y, dejándose así a temperatura ambiente hasta que el alcohol con el que se enjuago la pastilla se evaporara.
- Por ultimo se disolvió la pastilla de ARN en 50 µl de H₂O-DEPC. Se hicieron diluciones de ARN con agua en las siguientes proporciones 2:750 y 3:750. Posteriormente en un detector UV se leyeron las absorbencias de estas muestras a las siguientes longitudes de onda: 260 y 280 nm, todo esto con el objetivo de calcular las concentraciones de ARN, para lo cual se empleo la siguiente fórmula: 1 unidad de absorbancia a 260 nm= 40µg de RNA por ml. También se determinó la pureza del ARN por medio de la relación de absorbencias obtenida a 260 y 280 nm (260\ 280 nm).

APÉNDICE 4

PROCESO DE RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN α COPLADO A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN (RT)

Se realizó la retrotranscripción (RT) del ARN total para obtener el ADN complementario (ADNc). Se utilizaron los siguientes reactivos:

RNA total	2 μ g
Buffer RT	50 mM
Tris-HCl	pH 8.3
DTT	10mM
dNTPs	0.5 mM de cada dNTP
RT M-MLV	400 unidades
Oligo dT	0.05 μ g
H ₂ O	c.b.p. 10 μ l

Se mezclaron todos los reactivos en un tubo eppendorf y se incubaron a 37°C por una hora. El control negativo consistió en una muestra de agua en sustitución de ARN.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Por medio de la técnica de PCR, se amplificó un fragmento de los genes para el ER- α y ER- β , así como para la GnRH. Se utilizó GAPDH como gen de control interno. Se utilizaron los siguientes reactivos:

Producto de RT	2 μ g
Buffer PCR	
Mg ²⁺	15Mm
dNTPs	1.0 mM de cada dNTP
Taq polimerasa	1000 unidades
Oligo sense y antisense	0.05 μ g c/u
H ₂ O	c.b.p.10 μ l

Cabe señalar que antes de iniciar los experimentos con las ratas control y tratadas con atropina, primero se estandarizaron las temperaturas de anealing así como el número de ciclos de PCR optimas para cada gen. (Fig.)

Los resultados fueron los siguientes:

Gen	Tm	No de ciclos
GnRH	65°C	
ER- α	58°C	
ER- β	54°C	
GAPDH	60°C	

Por ultimo se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%. Los geles con el producto de PCR fueron visualizados con un transiluminador de luz UV, posteriormente se digitalizaron las imágenes de los geles de agarosa utilizando el sistema EDAS-Kodak 256.

Los resultados densitométricos se obtuvieron al analizar las imágenes obtenidas con el programa SCION Image 2002.

APÉNDICE 5

PROCESO DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA "FREE FLOATING SECTIONS", DE RECEPTOR A ESTRÓGENOS ALFA.

1. Se extrajo el cerebro de las ratas, los cuales fueron fijados en paraformaldehído durante 24 hs.
2. Se colocaron en solución de KPBS-sacarosa al 10% durante 24 hs.
3. Se cortó el cerebro en un criostato a -21°C obteniendo cortes coronales de $30\ \mu\text{m}$ de grosor.
4. Los cortes fueron depositados en celdas de cultivo de 6×4 que contenían solución anticongelante. Se almacenaron a -20°C hasta su uso.
5. Los cortes cerebrales se procesaron por medio de la técnica de inmunohistoquímica por flotación (free floating sections) para lo cual se utilizó el siguiente protocolo:
 - Lavar con KPBS dos veces diez minutos
 - Lavar con solución de peróxido de hidrógeno al 1% por 10 min.
 - Lavar con KPBS dos veces diez minutos.
 - Lavar con solución de borohidruro de sodio al 1% por 8 min.
 - Lavar con KPBS hasta que el borohidruro de sodio sea enjuagado (ausencia de burbujas)
 - Incubar el tejido con el anticuerpo primario a una dilución de 1:50 por 48H hs. a 4°C
 - Lavar con KPBS 10 min. dos veces
 - Incubar los tejidos con el complejo avidina-biotina por 2 hs. a temp. ambiente.
 - Lavar en KPBS dos veces por diez minutos.
 - Revelar con solución de DAB a temp. Ambiente de 2 a 5 min.
 - Inactivar la reacción con agua destilada.
 - Posteriormente los cortes fueron colocados en portaobjetos tratados con poli-L-lisina, se secaron a 37°C por 2 hs.
 - Una vez montados, los cortes fueron deshidratados con lavados de 15 seg. Cada uno en agua destilada, etanol al 50, 70,90,96 y 100%. Solución de etanol-xilol 1:1, y xilol 100%.
 - Una vez deshidratados y secos se cubrieron con resina de Canadá y se protegieron con un cubreobjetos bien limpio.
 - Por último se observaron al microscopio óptico y se cuantificó el número de receptores en el área de interés utilizando el analizador de imágenes modelo KS300 (Karl Zeiss).

correo electrónico

parteaga_lopez@hotmail.com