



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos α y β
sobre la ovulación, el crecimiento folicular, el peso del
útero y los ovarios durante el ciclo estral de la rata

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
ELIZABETH CABRERA RUIZ

Directora de Tesis
Dra. María Esther Cruz Beltrán

México, D.F.

2009



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad de Investigación de Biología de la Reproducción

Laboratorio de Neuroendocrinología

Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos α y β sobre la ovulación, el crecimiento folicular, el peso del útero y los ovarios durante el ciclo estral de la rata

Autora:

Elizabeth Cabrera Ruiz

Directora de Tesis:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de por CONACyT 81898 y DGAPA- PAPIIT IN-214508.

Agradecimientos

A mis padres Silvia y Alejandro por su confianza, el apoyo y la educación que me han brindado.

A mis hermanas Alejandra y Claudia por estar a mi lado durante este proceso.

A mi directora de tesis la Dra. María Esther Cruz Beltrán por compartir su conocimiento, la confianza depositada y la gran dedicación a este trabajo.

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá por sus enseñanzas y las aportaciones a este trabajo.

A mis sinodales por su valiosa contribución para la elaboración de esta tesis:

Dra. Maria Elena Ayala Escobar

M en IBSH. Angélica Flores Ramírez

M. en C. Raúl Zavala Chavero

M. en Bra. Ma. Judith Villavicencio Macias

A mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por todo su apoyo y colaboración.

A la técnico María Luisa Illescas por su colaboración en la técnica histológica

A el Dr. Mario Cárdenas y el Biólogo Roberto Chavira del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su colaboración en la cuantificación de hormonal.

Índice

Resumen	1
Antecedentes	
Estrógenos	3
Estructura química	3
Biosíntesis	4
Teoría de la doble célula	4
Función de los estrógenos sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario .	7
Función de los estrógenos sobre el Útero	8
Receptores a estrógenos	9
Estructura química	9
Subtipos o isoformas de receptores	10
Efecto de la unión de los estrógenos al RE de acción genómica	11
Isoformas alfa y beta	13
Localización del RE α	15
Localización del RE β	16
Funciones del RE α y del RE β	18
Antagonistas selectivos de los REs	19
Ovario	20
Compartimentos	21
Atresia	23
Ovulación	23
Útero	24
Ciclo estral	25
Justificación del estudio	27
Hipótesis	28
Objetivos	29
Método	30
Resultados	
Efectos del bloqueo de los RE α y RE β durante el ciclo estral evaluados al estro esperado	33
Efectos del bloqueo de los RE α y RE β en diestro-1 evaluados en horas posteriores al tratamiento	39
Efectos del bloqueo de los RE α y RE β en la mañana del proestro evaluados ocho horas después al tratamiento	50
Discusión	53
Conclusiones	57
Referencias	58

Resumen

Los estrógenos son hormonas que al unirse a sus receptores desencadenan una serie de acciones sobre la célula blanco. En la reproducción su función es fundamental en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), las gonadotropinas y la ovulación. Se han descrito tres subtipos de receptores a estrógenos (REs), de los cuales los receptores alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$), son los más estudiados. En la rata, la localización específica y la cantidad de ambos receptores en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) cambia durante el ciclo estral. La función específica que desencadena el estradiol al unirse a cada receptor en los compartimentos del eje HHO no es aún clara. Por lo tanto, en este estudio se describen los resultados obtenidos al bloquear, por medio de antagonistas específicos, los $RE\alpha$ o $RE\beta$ sobre la ovulación, el crecimiento folicular, la concentración de estradiol, progesterona y gonadotropinas, el peso del útero y de los ovarios. Para ello se utilizaron ratas adultas cíclicas de la cepa CIIZ-V, inyectadas por vía subcutánea con 0.5 mg/kg peso de metil-piperidino-pirazol (MPP) antagonista del $RE\alpha$ o con cyclofenil antagonista del $RE\beta$; como grupo control o de operación simulada se utilizaron animales inyectados con dimetilsulfóxido (DMSO) vehículo de ambos antagonistas. Grupos de animales fueron inyectados con alguna de estas sustancias a las 09:00 horas de cada uno de los días del ciclo estral, y se sacrificaron en el día del estro esperado.

Ninguno de los tratamientos modificó el porcentaje de animales que ovularon. Los efectos del bloqueo de los REs se observaron principalmente en el número de ovocitos liberados: cuando los animales se inyectaron con MPP en el diestro-1, el número de ovocitos liberados aumentó (MPP: 16.5 ± 1.1 vs. DMSO: 13.2 ± 0.9 , $p < 0.05$) pero disminuyó cuando se inyectaron en proestro (MPP: 12.1 ± 0.7 vs. DMSO: 14.2 ± 0.7 , $p < 0.05$), y no se modificó el peso de ovarios ni del útero.

El bloqueo del $RE\beta$ en proestro disminuyó el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (5.5 ± 0.6 vs. 7.0 ± 0.4 $p < 0.05$), el peso de los dos ovarios, efecto que se reflejó en la masa ovárica (Cyclofenil: 19.1 ± 1.0 vs. DMSO: 22.9 ± 1.0 $p < 0.05$) y del útero (Cyclofenil: 108.4 ± 5.6 vs. DMSO: 120 ± 4.1 $p < 0.05$). Cuando el antagonista a $RE\beta$ se administró en diestro-2 sólo se observaron cambios en el peso del útero (135.9 ± 7.9 vs. 112.2 ± 6.7 $p < 0.05$).

Dado que el bloqueo de los $RE\alpha$ o $RE\beta$ en diestro-1 o en proestro provocó efectos significativos en el número de ovocitos liberados, grupos de animales tratados en diestro-1 fueron sacrificados a las 09:00 horas del diestro-2 ó a las 9:00 y 17:00 horas del Proestro. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

El bloqueo de los $RE\alpha$ en diestro-1 provocó disminución de la masa ovárica (19.5 ± 0.6 vs. 24.7 ± 0.6 $p < 0.05$), lo que se acompañó de un menor número de folículos, reflejo de la

disminución del número de folículos pequeños sanos en los animales sacrificados a las 9:00 horas del proestro (MPP: 67.8 ± 4.1 vs. DMSO: 84.0 ± 6.3 $p < 0.05$), 17:00 horas del proestro (MPP: 71.3 ± 3.5 vs. DMSO: 104.6 ± 2.1 $p < 0.05$) ó a las 09:00 horas del estro esperado (MPP: 72.5 ± 4.7 vs. DMSO: 113.3 ± 16.9 $p < 0.05$). La disminución en el número de folículos pequeños observado en la tarde del proestro y en la mañana del estro se acompañó del aumento del número de folículos medianos. Ninguno de los tratamientos modificó el número de folículos preovulatorios.

El bloqueo de los RE β en diestro-1 también disminuyó el número de folículos (181 ± 0.8 vs. 270 ± 21.7 $p < 0.05$), específicamente los pequeños (68.3 ± 2.7 vs. 113.3 ± 16.9 $p < 0.05$) cuando los animales se sacrificaron en la tarde del proestro.

Únicamente el bloqueo del RE β realizado en diestro-1 provocó el bloqueo del “pico” preovulatorio de estradiol (29.0 ± 6.3 vs. 63.5 ± 3.9 $p < 0.05$) y disminución de la concentración de hormona estimulante del folículo (FSH) en la mañana del proestro (0.5 ± 0.2 vs. 3.1 ± 0.5 $p < 0.05$). La concentración de progesterona y de hormona leuteinizante (LH) no fue modificada por el bloqueo ninguno de los receptores.

Cuando este estudio se llevó a cabo en los animales tratados en la mañana del proestro, sólo se observó que el bloqueo de los RE α aumentó del número de folículos medianos sanos y disminuyó la concentración de LH en la tarde del proestro (MPP: 29.2 ± 16 vs. DMSO: 102.8 ± 3.9 , $p < 0.05$).

Estos resultados nos permiten sugerir que los efectos de la unión del estradiol a los RE α o RE β dependen de la etapa del ciclo estral. Las dos etapas en las cuales los receptores a estrógenos modifican la ovulación son el diestro-1 y el proestro: En *diestro-1*, el estradiol por medio de los RE α regula de manera inhibitoria el crecimiento folicular y el número de ovocitos liberados, sin modificar la secreción de estradiol, progesterona, FSH y LH. Por el contrario, el estradiol por medio de los RE β regula la secreción de FSH y de estradiol y no afecta el crecimiento folicular. En *proestro*, el estradiol por medio de los RE α regula la secreción preovulatoria de la LH.

Antecedentes

Estrógenos

Los estrógenos son hormonas ampliamente distribuidas en el reino animal, que están presentes en hembras y machos. Estimulan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de sus células blanco (Ganong, 2004; Guyton y col., 2001; O'Malley y Strott, 2001).

En la hembra, la principal fuente de estrógenos son los ovarios. Los estrógenos también son sintetizados en órganos como el hígado, la médula ósea, la placenta, los tejidos; adiposo, nervioso, óseo y muscular (Carson-Jurica y col., 1990; Hinshelwood, 1999; Sánchez-Criado 2003).

Los ovarios de la rata secretan principalmente 17β -estradiol (estradiol) y pequeñas cantidades de estrona. La mayor proporción de estrona se sintetiza en otros tejidos a partir de los andrógenos androstendiona y testosterona, secretados por las adrenales y las células de la teca del folículo. El estriol es producto del estradiol y la estrona, cuya conversión se realiza en el hígado y la placenta (Brown, 1999; Jaffe, 2001).

Estructura química

Los estrógenos pertenecen al grupo de hormonas esteroideas derivadas del colesterol. La estructura química del núcleo básico del colesterol es el ciclopentano-perhidrofenantreno o "núcleo esteroide", el cual está constituido por 27 átomos de carbono, dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono (ciclobencénicos) denominados A, B, C, y un anillo de cinco átomos (ciclopentano) denominado D, una cadena de seis carbonos en el carbono 17, dos metilos en posición 10 y 13, un doble enlace Δ^5 y un grupo hidroxilo en el carbono 3 (Fig. 1) (O'Malley y col., 2001).

El colesterol es una molécula hidrófoba, al presentar una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción no polar, formada por el anillo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos (Hinshelwood, 1999; O'Malley y col., 2001).

El estradiol conserva el núcleo esteroide de 18 carbonos, por lo que se forma un anillo fenólico A (anillo aromático) con un grupo hidroxilo en la posición carbono 3 y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y la alta afinidad a receptores de estrógenos (Jordan y col., 1985; Duax y col., 1988; Sánchez-Criado, 2003; Smith, 1999).

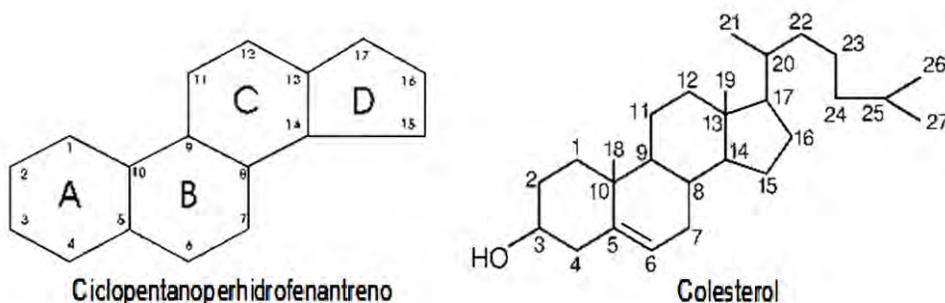


Fig. 1 Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno o núcleo esteroide y del colesterol. Modificado de Sánchez-Criado, 2003.

Biosíntesis

La biosíntesis de los estrógenos se realiza a partir de colesterol, que proviene de tres fuentes: 1) del plasma donde el colesterol es transportado unido a lipoproteínas de baja densidad, 2) del sintetizado por la célula a partir de acetato producto del ciclo de Krebs y 3) de ésteres de colesterol acumulados en el citoplasma de esa célula (O'Malley y col., 2001).

En la síntesis de estradiol participan dos células, una que a partir de colesterol sintetiza testosterona o androstendiona y otra con capacidad de aromatización que transforma esta hormona en un estrógeno (Fig. 2 y 3) (Hinshelwood, 1999; O'Malley y col., 2001).

Teoría de la doble célula

En las especies animales estudiadas, el folículo ovárico es el sitio más importante para la síntesis del estradiol. La biosíntesis de estrógenos en ésta glándula es explicada por la teoría de “las dos células” o “doble célula”, en la cuál se plantea la participación combinada de las células de la teca interna y de la granulosa (Fig. 2) (Brown, 1999; Sánchez-Criado, 2003).

La unión de la hormona luteinizante (LH) a su receptor membranal en las células de la teca interna, activa a la adenilciclasa (AC), enzima que estimula la formación del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosín trifosfato (ATP). El AMPc actúa como segundo mensajero, induce la activación del complejo enzimático de la desmolasa del colesterol, localizada en la membrana interna de la mitocondria (Sánchez-Criado, 2003).

La desmolasa es una oxidasa con funciones mixtas, miembro del grupo enzimático citocromo P-450, en el carbono 17 separa la cadena lateral de colesterol de seis carbonos, y en el carbono 20 introduce una función cetona, dando origen a la pregnenolona (constituida de 21 carbonos) (O'Malley y col., 2001).

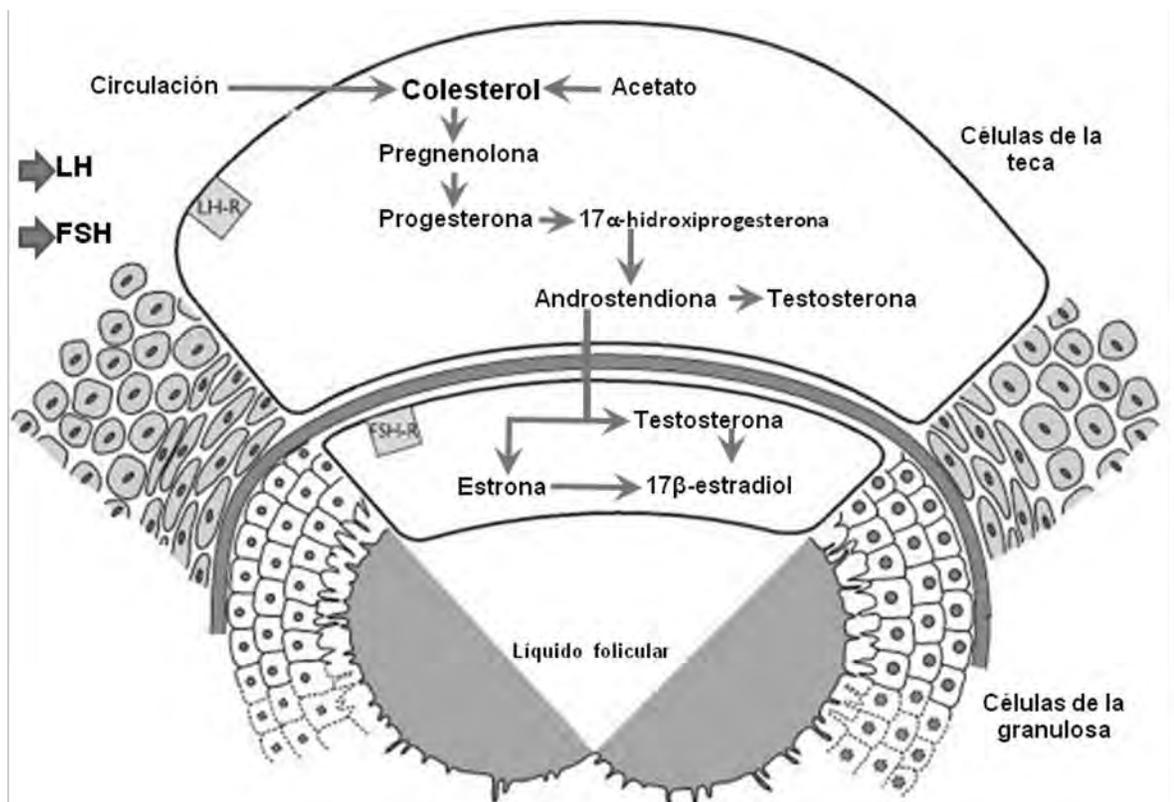


Fig. 2 Biosíntesis de esteroides en los compartimentos del ovario. Modificado de Sánchez-Criado, 2003.

La pregnenolona es el precursor de todas las hormonas esteroides. La transformación de pregnenolona a androstendiona y testosterona en los mamíferos sucede a través de dos vías metabólicas. Estas vías denominadas como “ Δ^5 ” y Δ^4 ”, según la localización del punto de insaturación (doble enlace) de los compuestos intermediarios. En la figura 3 se muestran las principales moléculas de ambas vías metabólicas (Gore-Langton y Armstrong, 1994; O’Malley y col., 2001).

Los andrógenos: androstendiona y testosterona, sintetizados en las células de la teca, atraviesan la membrana basal, y se difunden hasta las células de la granulosa cercanas, que contienen aromatasas (O’Malley y col., 2001; Sánchez-Criado, 2003).

La hormona estimulante del folículo (FSH) estimula la síntesis de la aromatasas. La conversión de los andrógenos en estrógenos requiere que ocurran tres oxidaciones consecutivas. El anillo A es aromatizado con la subsecuente remoción del carbono 18 (O’Malley y col., 2001; Sánchez-Criado, 2003).

Los estrógenos atraviesan libremente las membranas celulares por su constitución lipídica, por lo que su secreción se produce por difusión a favor de un gradiente de concentración, establecido por la velocidad de síntesis (Hinshelwood, 1999, O’Malley y col., 2001).

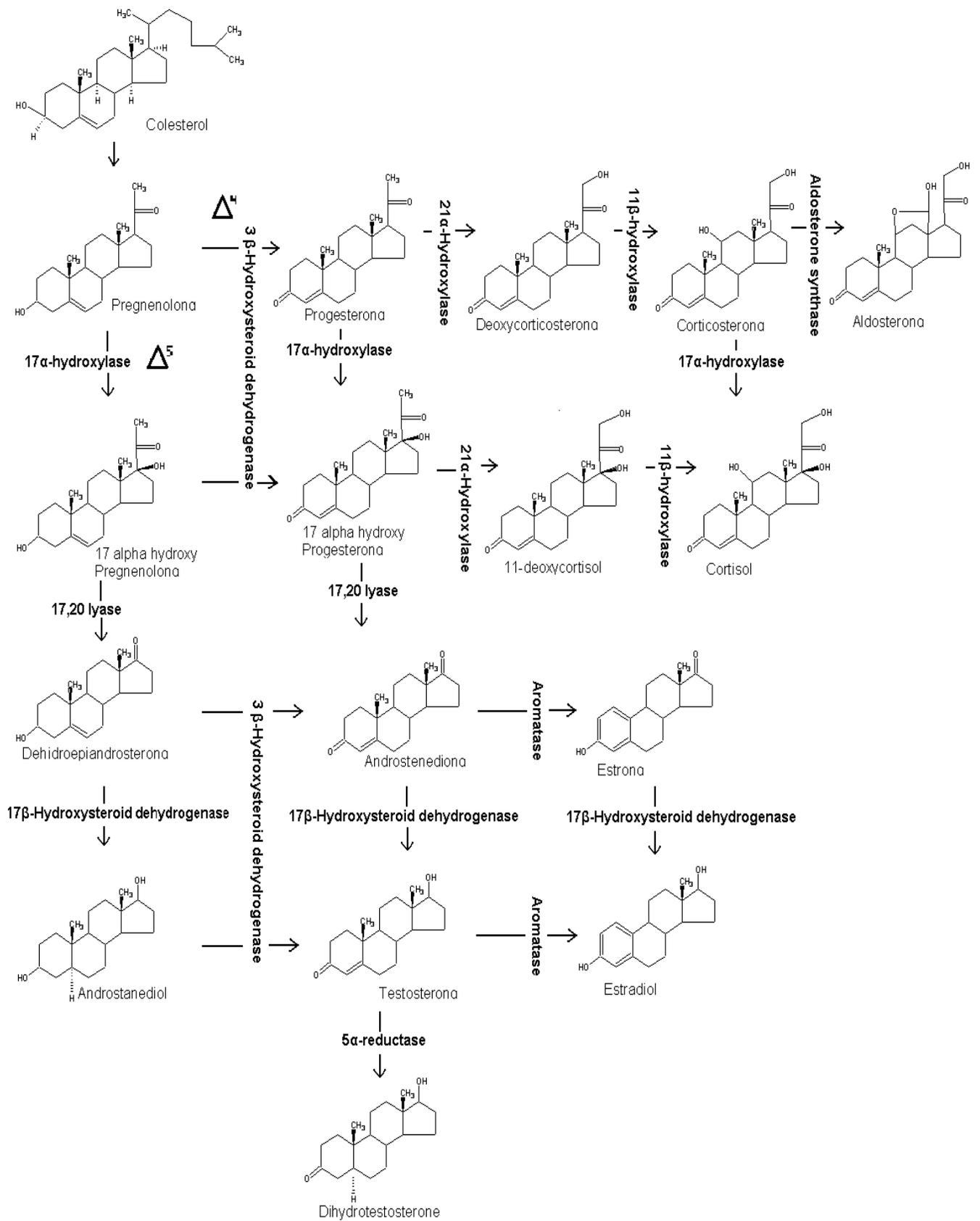


Fig. 3 Principales vías biosintéticas de los esteroides ováricos. Modificado de Sánchez-Criado 2003.

Función de los estrógenos sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

La función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) es regular los diferentes procesos involucrados con la reproducción (Fig. 4).

En la rata el hipotálamo los estrógenos regulan la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Silverman y col., 1998), al actuar directamente sobre la neurona GnRHérgica o indirectamente, por medio de neuronas que se vinculan con ella, localizadas principalmente en las áreas preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA). Esta neuro-hormona es secretada en forma de pulsos a la circulación porta-hipofisiaria, se une a sus receptores en la membrana de las células gonadotropas en la hipófisis anterior o adenohipófisis, y estimula la secreción de las gonadotropinas. La función estimulante o inhibitoria de los estrógenos, cambia durante el ciclo, como resultado de modificaciones en su concentración en la sangre. Lo que determina el patrón de secreción de la GnRH durante la edad adulta (Freeman, 1994; Funabashi y col., 2002; Herbison, 1998).

En la hipófisis anterior, los estrógenos estimulan la síntesis de receptores a la GnRH en los gonadotropos, fenómeno denominado sensibilización o imprimación hipofisiaria a GnRH. Este efecto regula la secreción masiva de las gonadotropinas (FSH y LH) antes de la ovulación, proceso conocido como secreción pre-ovulatoria de LH y FSH (Silverman y col., 1998; Yen, 2001).

En el ovario, los estrógenos regulan el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos durante el ciclo reproductivo, mediante la estimulación de la proliferación de las células de la granulosa de los folículos pequeños, incrementan las concentraciones de receptores a FSH (R-FSH) en las células de la granulosa. Por lo tanto, aumenta la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a las gonadotropinas. A su vez, el aumento en la concentración de estradiol e inhibina (producidos por el ovario) inhibe la secreción de FSH, impidiendo la maduración de otros folículos. También actúan en la modulación de la producción de progesterona por las células de la granulosa y la producción de andrógenos por las células de la teca, y la modulación de la capacidad esteroideogénica del cuerpo lúteo. Los estrógenos y las gonadotropinas coordinan la maduración del folículo y ejercen una retroalimentación estimulante sobre el eje hipotálamo-hipófisis, lo que induce la secreción preovulatoria de gonadotropinas (Freeman, 1994; Greenwald y Roy, 1994; McLean y col., 1989; Yao y Bahr, 1999; Yeh y Adashi, 2001).

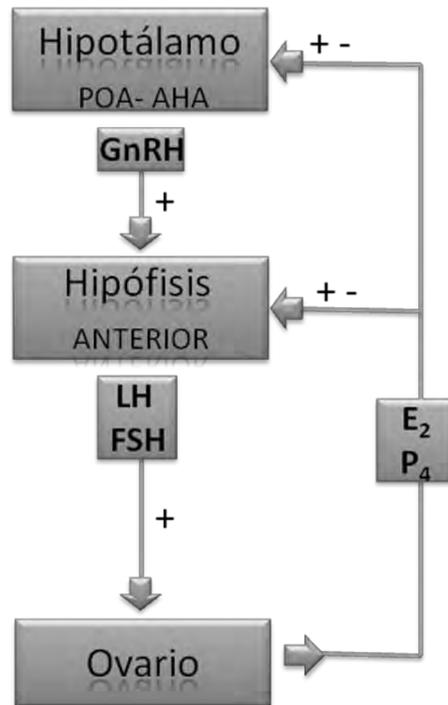


Fig. 4 Eje hipotálamo–hipófisis-ovario. Estradiol (E_2), Progesterona (P_4). Modificado de Ganong 2004.

Función de los estrógenos sobre el Útero

En el útero de la rata, los estrógenos están involucrados en la proliferación y muerte celular de los epitelios luminal y glandular. Estos eventos ocurren en relación a los cambios cíclicos de las concentraciones de hormonas esteroides durante el ciclo estral, que preparan al útero para la implantación del óvulo fecundado. También estimulan la síntesis de receptores a progesterona (Freeman 1994). A las cuatro semanas de realizar la ovariectomía, el epitelio presenta signos de apoptosis debido a la carencia de estrógenos (Gray y col., 2001; Sato y col., 1997). En las trompas uterinas estas hormonas estimulan el crecimiento del revestimiento mucoso, estimulan la proliferación de las células glandulares y de las células epiteliales ciliadas que revisten las trompas; también estimulan la actividad de los cilios, que batan en dirección del útero, lo cual ayuda a propulsar el óvulo hacia el útero (Carsten y Miller, 1990).

Las acciones biológicas de los estrógenos están mediadas por un proceso que implica la unión de la hormona con sus receptores específicos presentes en las células blanco (Brown, 1999; Carson-Jurica y col., 1990; Ing, 1999).

Receptores a estrógenos

Los receptores a estrógenos (ERs) son proteínas activadoras ligando-dependientes, con una configuración química específica para fijar a la hormona. Median la actividad de los estrógenos en las células que los poseen (Mangelsdorf y col., 1995; O'Malley y Strott, 2001; Pérez, 1995).

Estructura química

Son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de transcripción, los cuales comparten una estructura química en común, que incluye a los receptores a testosterona, progesterona, corticoides, hormona tiroidea, vitaminas A y D₃ y a un gran grupo de proteínas denominadas receptores “huérfanos”, de los que aún se desconocen sus ligandos específicos. (Anstead y col., 1997; Enmark y Gustafsson, 1996; Enmark y Gustafsson, 1999; O'Malley y Strott, 2001; Rollerova y Urbancikova, 2000).

Los REs constan de seis dominios funcionales: A/B, C, D, E y F (Fig. 5) (Rollerova y Urbancikova 2000).

El dominio A/B, localizado en el extremo amino terminal (*terminal-N*) es altamente variable en su secuencia y longitud, contiene una región que regula la actividad transcripcional, conocida como AF-1 (*Activation Function 1*) (Enmark y Gustafsson 1999; Rollerova y Urbancikova 2000).

El dominio C es el sitio de unión específico al ácido desoxirribonucleico (ADN), denominado “*DNA binding domain*” (DBD, por sus siglas en inglés), el cual constituye una sección hidrofílica del receptor y es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares. Esta formado por 66-68 aminoácidos, entre los cuales se encuentran cisteínas capaces de unir zinc las cuales forman dos proyecciones peptídicas de coordinación tetraédrica con el zinc, denominados dedos de zinc. Contiene dos dedos de zinc que tienen interacciones específicas con los elementos de respuesta a los estrógenos “*estrogen responsive elements*” (ERE, por sus siglas en inglés). La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de los aminoácidos Glu, Gly y Ala, localizada en el primer dedo de zinc, conocida como la caja proximal (*P-box*). En el segundo dedo de zinc, la secuencia de 5 a 6 residuos de cisteínas conforma la llamada caja distal (*D-box*), la cual discrimina entre los ERE con secuencias similares (Enmark y Gustafsson 1999; Rollerova y Urbancikova 2000; Taleisnik 2006).

El dominio D o región de bisagra (“*hinge*”) permite al receptor flexibilidad o alterar su conformación. Mediante la técnica de mapeo proteolítico del RE se ha mostrado que una porción de el dominio D es necesaria para unir un ligando con máxima afinidad. También se ha mostrado que participa en la unión a las proteínas chaperonas termo-inducibles hsp90 y hsp 70 (“*heat shock proteins*”), las cuales permanecen unidas al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo (Enmark y Gustafsson 1999; Rollerova y Urbancikova 2000).

El dominio E ó sitio de unión del esteroide o ligando “*ligand-binding domain*” (LBD, por sus siglas en inglés), consiste en una cadena de aproximadamente 250 aminoácidos, que forman una sección hidrofóbica, la cual determina la especificidad de la unión de la hormona al receptor. Es importante para la dimerización del receptor, la localización nuclear y las interacciones con co-activadores y co-represores transcripcionales. Contiene una de las dos regiones que regulan la actividad transcripcional el dominio AF-2 (*Activation Function 2*) (Enmark y Gustafsson, 1999; Rollerova y Urbancikova, 2000; Tamrazi y col., 2002).

El dominio F contiene alrededor de 42 aminoácidos, los cuales no están bien conservados entre los RE de los vertebrados. Es importante en la activación de la transcripción y la represión de las actividades de antiestrógenos. Las secuencias en el dominio F son inhibitorias para la señal de dimerización que están presentes en la región E (Enmark y Gustafsson, 1999; Rollerova y Urbancikova, 2000).

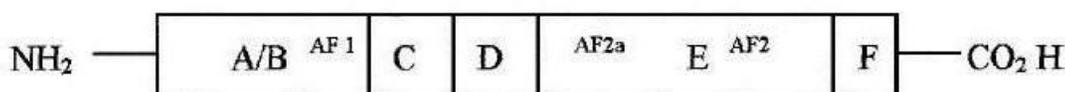


Fig. 5 Dominios de los REs y su localización. La estructura del RE puede ser dividida en seis dominios A-F. Modificado de Grandien y col., 1997; MacGregor y Jordan 1998; Weigel 1996.

Subtipos o isoformas de receptores

Se reconocen tres isoformas del receptor a estrógenos: el receptor alpha (ER α), el receptor beta (ER β) y el receptor gama (ER γ o ER β -2). Los receptores a estrógenos se clasifican en dos tipos dependiendo de donde se localicen en la célula, es decir los membranales y los citoplasmáticos, presentes en las membranas de los organelos o del núcleo (Rollerova y Urbancikova, 2000; Taleisnik, 2006; Watson y col., 1995).

Los receptores a estrógenos también se clasifican por su efecto en la célula como: no genómicos y genómicos. Los receptores de acción no genómica, implican un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de proteínas. Por ello son mediados por receptores membranales. El RE γ es considerado como un receptor de membrana, fue aislado y purificado del hígado de ratón, sin embargo ha sido poco estudiado (Pérez, 1995; Rao, 1998; Watson y col., 1995).

Los receptores denominados de acción genómica son aquellos que al unirse su ligando (la hormona esteroide) actúan como factor transcripcional. Las isoformas RE α y RE β son consideradas receptores intracelulares y sus acciones son sobre el genoma de la célula, por ello también son denominados receptores nucleares, por su localización y acción directa en el núcleo (Enmark y Gustafsson, 1999; Rollerova y Urbancikova, 2000).

Efecto de la unión de los estrógenos al RE de acción genómica

La unión del receptor con su ligando específico, provoca la disociación de las proteínas inhibitoras hsp90 y hsp 70, las cuales incapacitan al receptor para unirse al ADN mientras el receptor esta inactivo, hasta que se forma el complejo hormona-receptor. La adición de la hormona provoca la transformación del receptor de tal manera que los dominios funcionales quedan expuestos y permiten la unión del complejo al ADN (Rollerova y Urbancikova, 2000; Weigel, 1996).

El complejo hormona-receptor al estar dentro de la membrana celular requiere de un proceso de dimerización, es decir, proceso mediante el cual el receptor se capacita para asociarse con proteínas celulares llamadas "factores de transcripción", que consiste en la unión cooperativa de dos receptores a sus elementos de respuesta. Dos receptores se unen con mayor afinidad que una sola molécula (Enmark y Gustafsson, 1999; Rollerova y Urbancikova, 2000; Tamrazi y col., 2002; Weigel, 1996).

Los mecanismos por los cuales los REs regulan la eficiencia de la iniciación de la transcripción están bajo investigación, se han reportado tres diferentes procesos o "*pathways*" posibles (Fig. 6), por medio de los cuales pueden activar los genes diana (Rollerova y Urbancikova, 2000).

En las células que expresan solo uno de los dos subtipos de RE se forman homodimeros del RE α o del RE β . En las células que expresan ambos RE, se forma un heterodimero que contiene una molécula de cada uno. El complejo hormona-receptor se une generalmente a los

ERE como homodimero; la interfase de dimerización se encuentra en LBD y DBD. La repetición del ADN en los palíndromos impone una estructura simétrica que resulta en una disposición cabeza a cabeza de los DBD con cada DBD del homodimero haciendo contactos análogos con una mitad del sitio de unión (Rollerova y Urbancikova, 2000; Taleisnik, 2006; Tamrazi y col., 2002; Weigel, 1996).

Posteriormente el complejo hormona-RE es llevado al núcleo de la célula por señales de localización nuclear (NSL por sus siglas en inglés). La unión al ADN estimula la transcripción o supresión de algunos genes específicos dependiendo de la célula donde ocurra. Sin embargo al parecer, la hormona se requiere solamente antes de la activación del gen y no se requiere para la actividad transcripcional (Rollerova y Urbancikova, 2000; Weigel, 1996).

El complejo, ejerce sus efectos en el ADN por medio de la unión cooperativa de múltiples copias de los ERE que son genes de respuesta primaria, localizados en las regiones de regulación de los genes diana. Los ERE se unen a región LBD (Rollerova y Urbancikova, 2000; Taleisnik, 2006; Weigel, 1996).

La función final de los receptores es la de provocar efectos específicos a nivel transcripcional. Los receptores nucleares modifican la expresión de genes contactando a otros factores con el aparato basal de la transcripción, vía complejo activador. Los RE nucleares pueden asociarse con distintos grupos de cofactores dependiendo de su afinidad y relativa abundancia. Estos pueden ser co-activadores que activan la transcripción, o co-represores que inhiben la activación de genes y posiblemente desactivan genes activados (Fig. 6) (Rollerova y Urbancikova, 2000; Taleisnik, 2006).

Existen dos tipos de secuencias específicas en el ADN importantes para el inicio de la transcripción: la región promotora y la región aumentadora. La región promotora contiene tres regiones; la caja CAAT sitio de unión inicial de la ARN polimerasa al ADN, la caja TATA sitio donde se alinea la ARN polimerasa para iniciar la transcripción y la región de inicio de la transcripción. (Rollerova y Urbancikova, 2000; Taleisnik, 2006; Weigel, 1996).

Se ha mostrado que el complejo hormona receptor ocupa los sitios aceptores del ADN hasta por 12-16 horas. La salida del complejo receptor le hace lugar a otro complejo recién formado. La proteína receptora es sintetizada continuamente o reciclada del núcleo al citoplasma, por lo que el paso limitante está dado por el suministro de la hormona (Carson-Jurica y col., 1990; Taleisnik, 2006; Weigel, 1996).

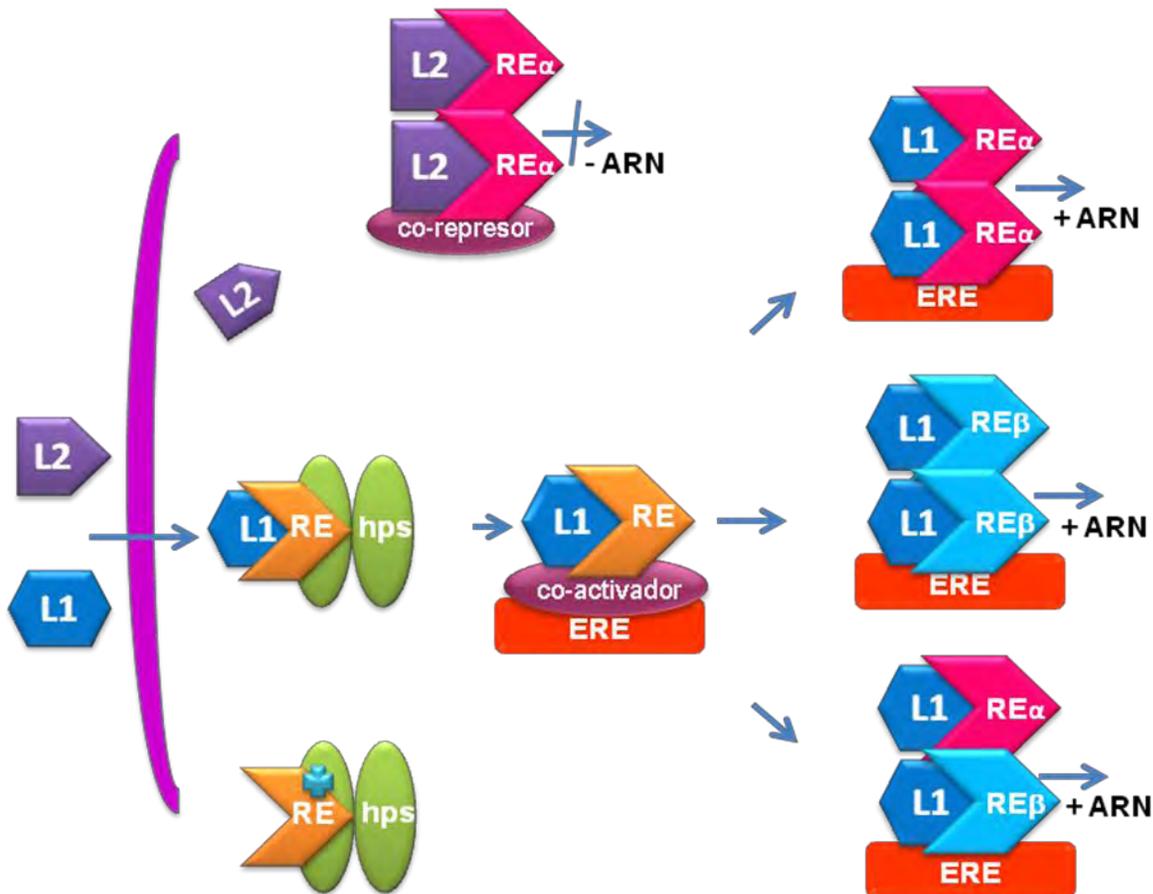


Fig. 6 Modelo de acción del RE. El RE sin ligando está representado por el heterocomplejo unido a las proteínas hsp, y otros chaperones. La unión cooperativa del antagonista (L2) induce la liberación del receptor del agregado o conjunto formado. La unión al agonista (L1) induce la unión de co-reguladores necesarios en la función del receptor, el cambio conformacional, la activación de la dimerización, la unión cooperativa de múltiples copias de EREs localizadas en las regiones reguladoras de los genes blanco. Modificado de: Rollerova y Urbancikova 2000.

Isoformas alfa y beta

En el año 1996, Kuiper y colaboradores clonaron un ácido desoxi-ribonucleico complementario (cDNA, por sus siglas en inglés) del RE de la próstata de rata, al cual denominaron RE subtipo β (RE β), para distinguirlo del que previamente en 1986 se había clonado proveniente del útero de la rata, al cual consecuentemente se denominó RE subtipo α (RE α). Los experimentos de unión o “binding” mostraron que ambos son específicos para los estrógenos (Koike y col., 1987; Kuiper y col., 1996).

Cada isoforma es expresada por un gen diferente. Los RE α y RE β tienen el mismo número de exones y los cDNAs clonados de humanos, ratas y ratones, también comparten secuencias homólogas, especialmente con los dominios de ligando y unión al ADN (Fig. 7) (Kuiper y col., 1996).

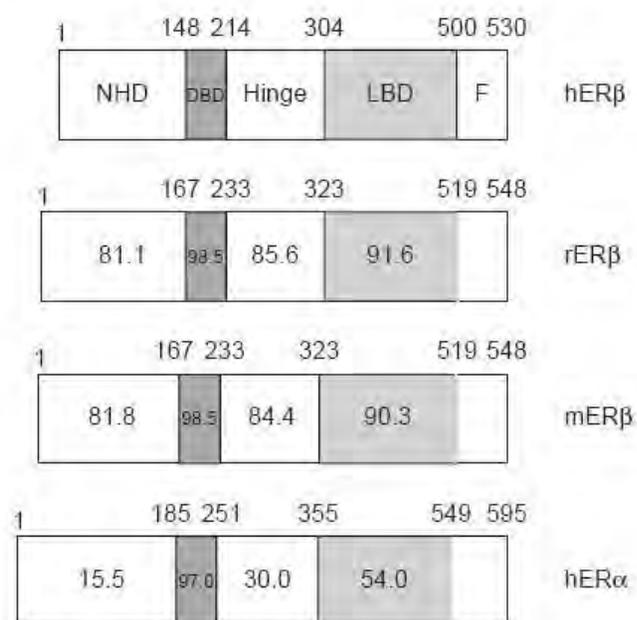


Fig. 7 Porcentaje de aminoácidos idénticos entre el RE β humano (hER β) y otros: RE β rata (rER β), RE β ratón (mER β) y RE α humano (hER α). Los números sobre las cajas representan el número de aminoácidos y los números dentro de cada una refieren el porcentaje de homología entre los RE. Tomado de Enmark y Gustafsson 1999.

En la rata la proteína del RE α consiste en 595 aminoácidos con un peso molecular de 66kDa., y el gen que los codifica está localizado en el cromosoma 6. El RE β es una proteína compuesta por 485 aminoácidos su peso molecular calculado que es de 54.2 kDa (MacGregor, 1998).

El RE β tiene una gran homología con el RE α especialmente en la región DBD (95% de homología) y en la LBD (55% de homología). Ambas proteínas son funcionalmente homólogas en su unión al estrógeno; la cual presenta muy alta afinidad, que se ha mostrado por medio de la técnica de análisis de saturación de unión-ligando (Kuiper y col., 1996; MacGregor, 1998).

La homología funcional del RE α y RE β también han sido determinada por la medida de la actividad de transcripción de RE β , mediante un sistema diseñado para evaluar la funcionalidad del RE α , lo que consiste en calcular la activación de la transcripción de un ERE “*vitellogenin A2*”, que en presencia o ausencia del estrógeno, el ER β es funcionalmente homólogo (Fig. 8) (MacGregor, 1998).

En la rata adulta, ambos REs han sido localizados en el ovario, la glándula mamaria, el útero, la próstata, el hígado, pulmón, hueso, la vejiga, en varias partes de la medula espinal y del cerebro, aunque el grado de expresión de cada uno ellos varía en los diferentes tejidos (Hegele-Hartung y col., 2004; Ing, 1999; Kuiper y col., 1996; Papka y col., 2001; Shughrue y col., 1998).

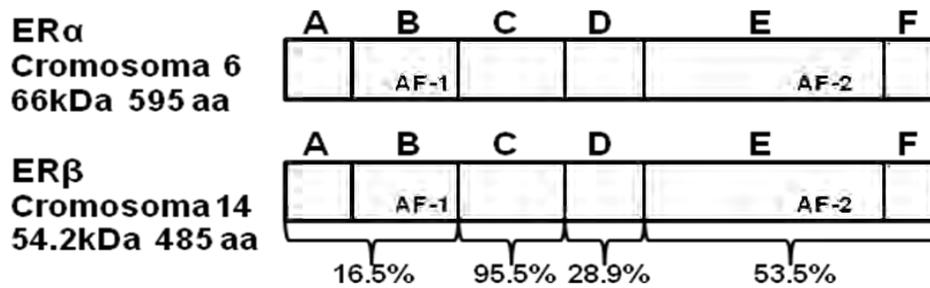


Fig. 8 Comparación entre los RE α y RE β de la rata. Porcentaje de la homología de los aminoácidos en las regiones funcionales Modificado de MacGregor 1998.

Localización del RE α

Hipotálamo: Mediante la detección del ARNm del RE α por hibridación *in situ* y la cuantificación del RE en neuronas GnRHérgicas por inmunohistoquímica el RE α no fue detectado, aunque si en neuronas adyacentes (Shughrue y col., 1998; Wintermantel y col., 2006).

Butler y colaboradores (1999) y Hrabovszky y colaboradores (2000) mostraron por medio de la técnica de inmuno-histoquímica de doble marcaje e hibridación *in situ*, un alto grado de co-localización del ARNm del RE α en la zona posterior de la estría terminal, el núcleo medial de la amígdala, el núcleo preóptico peri-ventricular e incluso el área preóptica (POA).

En POA-AHA de rata, la cantidad de ARNm para RE α alcanza un máximo en la tarde del estro (17:00 horas), que es seguido de un segundo aumento de menor magnitud al mediodía del diestro-2 (13:00 horas). Estas variaciones en la expresión del gen que codifica para el ARNm del RE α no sólo dependen del día del ciclo, sino que es asimétrica. Por medio de la técnica de inmuno marcaje, se mostró que la expresión del ARNm para el RE α de la tarde del estro está presente como proteína a las 09:00 horas del día del diestro-1 (Arteaga y col., 2003).

En la mañana del diestro-1, el número de células inmuno reactivas al RE α en POA-AHA es en promedio de 3688, mientras que en el proestro es de 1040. (Mendoza-Garcés y col., 2007).

Hipófisis: Por medio de inmunocitoquímica e hibridación *in situ*, el RE α ha sido localizado en la mayoría de las células secretoras en la hipófisis anterior. En los lóbulos intermedio y posterior no se observó ningún marcaje (Pelletier y col., 2000; Shughrue y col., 1998). Sin embargo Hrabovszky y colaboradores (2000) no detectaron el ARNm del RE α en las células de LH, en la rata ovariectomizada con reemplazo hormonal.

Ovario: Por *Northern blotting*, se mostró que las células del ovario expresa el gen para el RE α . Por *Western Blot* el anticuerpo anti-RE α mostró inmunoreactividad. Por hibridación *in situ* e inmunocitoquímica se mostró que el ARNm del RE α se expresa en baja concentración en todo

el ovario pero no se mostró su existencia en un compartimento celular particular (Byers y col., 1997; Hiroi y col., 1999; Pelletier y col., 2000). El contenido de ARNm del RE α en todo el ovario fue claramente detectado por RT-PCR, y no cambia durante el ciclo estral (Byers y col., 1997).

Sar y Wellsch (1999) y Pelletier y colaboradores (2000) mostraron que el RE α se localiza en el epitelio germinal, en células de la glándula intersticial y en células de la teca. El ARNm del RE α fue observado en las células del estroma del ovario y en algunas células dispersas entre las células de la granulosa (Shughrue y col., 1998; Wang y col., 2000).

Útero: El núcleo de las células glandulares, musculares, del estroma y del epitelio luminal del útero son inmuno-reactivas al RE α (Hiroi y col., 1999; Sar y Welsch, 1999; Pelletier y col., 2000). El ARNm del RE α es abundante en el estroma y en las células epiteliales del endometrio (Shughrue y col., 1998). El RE α es el subtipo dominante en el útero, el oviducto y cervix/vagina. La distribución del ARNm del RE α y la inmunoreactividad del receptor en el estroma, el epitelio y en el miometrio, es del doble en el día del proestro que en diestro-1, y no cambia en las otras dos fases del ciclo estral (Wang y col., 2000).

Localización del RE β

Hipotálamo: Shughrue y colaboradores (1998) mostraron que la mayoría de las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE β . Otros investigadores mostraron que también en las áreas rostrales del cerebro anterior (estría terminal, núcleo medial de la amígdala y el núcleo preóptico peri-ventricular e incluso el área preóptica) hay neuronas GnRHérgicas que expresan el ARNm del RE β (Butler y col., 1999; Hrabovszky y col., 2000).

En POA-AHA, la máxima expresión del ARNm del RE- β se observó en el día del diestro-2. Estas variaciones en la expresión del gen que codifica para el ARNm del RE no sólo dependen del día del ciclo, sino que son asimétricas. En el lado derecho de estas áreas la expresión del ARNm del RE- β ocurre a las 13:00 horas del diestro-2, mientras que la expresión del ARNm del RE α alcanza su pico a las 17:00 hrs. del día del estro. Sin embargo en el lado izquierdo, la expresión del ARNm del RE- β ocurre a las 9:00 horas del mismo día, mientras que la expresión del ARNm del RE α alcanza su pico en el día del proestro a las 13:00 horas (Arteaga y col., 2003).

Hipófisis: Ni por la técnicas de inmunocitoquímica e hibridación *in situ*, se observaron células hipofisarias inmunoreactivas al RE β (Pelletier y col., 2000). Sin embargo Shughrue y col., 1998 mostraron que el ARNm del RE β esta presente en el lóbulo intermedio y anterior. Hrabovszky y colaboradores (2000) mostraron que las neuronas de LH expresan el ARNm del RE β .

Ovario: Byers y colaboradores (1997) mostraron que el RE β el receptor predominante. Durante el ciclo estral, el ARNm RE β fue mas o menos constante excepto en la noche del proestro cuando la cantidad de ARNm del RE β decrece. Por hibridación *in situ* se mostró que las células de la granulosa de folículos pequeños, en crecimiento y preovulatorios son inmuno-reactivas al ARNm del RE β . En cambio, la expresión del ARNm RE β es débil en el cuerpo lúteo; los autores sugieren que la disminución en la cantidad de ARNm RE β durante la noche del proestro es atribuible a la secreción preovulatoria de LH.

Sar y Welsch (1999), Hiroi y colaboradores (1999) mostraron que la marca del anticuerpo anti-RE β se localiza en el núcleo de las células de la granulosa de folículos primarios, secundarios y maduros. El marcaje para el RE β en el ovario cambia durante el ciclo estral, el cual es mayor durante el día del estro (Hiroi y col., 1999).

En folículos atrésicos las células mostraron poca o ninguna reactividad. Estos autores sugieren que la presencia del RE β en las células de la granulosa implica que este subtipo de RE media algunos efectos de la acción de los estrógenos en la regulación del crecimiento y maduración de los folículos ováricos. Otros autores han detectado el ARNm para el RE β en las células de la granulosa de folículos en crecimiento (Pelletier y col., 2000; Shughrue y col., 1998; Wang y col., 2000). Poca expresión del ARNm para el RE β se ha observado en cuerpo lúteo recién formado (Wang y col., 2000).

Útero: Shughrue y colaboradores (1998) mostraron una muy débil señal del ARNm del RE β en el endometrio. Se ha mostrado que únicamente en el núcleo de las células del epitelio glandular expresan el RE β (Hiroi y col., 1999). Sin embargo Sar y Welsch (1999) y Pelletier y colaboradores (2000) no observaron inmunoreactividad para RE β en el útero ni en el oviducto. Por otra parte, Wang y colaboradores (2000) mostraron que la expresión del ARNm del RE β se presenta en los diferentes compartimentos del útero y del cervix/vagina, y que esto cambia durante el ciclo estral pero en menor proporción con respecto al RE α . En el oviducto se observaron pocas células dispersas que contenían el ARNm del RE β .

Funciones del RE α y del RE β

Aún se desconoce cuál es el papel específico del RE α y del RE β en las funciones reproductivas. Hegele-Hartung y colaboradores, (2004) en ratas de 24 días de edad, hipofisectomizadas, con reemplazo de gonadotropinas, GnRH y estradiol, mostraron que un agonista del RE β 8-vinylestra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol estimuló las primeras etapas de la foliculogénesis, disminuyó la atresia folicular, indujo la expresión génica del ovario, estimuló el crecimiento folicular e incrementó en el número de ovocitos liberados. Por el contrario, el agonista al RE α 3,17-dihydroxy-19-nor-17-pregna-1,3,5(10)-triene-21,16-lactone tuvo poco o ningún efecto en los anteriores parámetros, lo que implica que los efectos directos del estrógeno en el desarrollo folicular son mediados por el RE β .

En ratas intactas la inyección de estradiol o de agonista al RE α inhiben la ovulación y estimulan el crecimiento del útero, lo que depende de la dosis utilizada. Mientras que el agonista del RE β no estimula el crecimiento del útero. Los autores sugieren que la falta de ovulación y la estimulación del útero son mediadas por el RE α pero no por el RE β (Hegele-Hartung y col., 2004).

Herbison (1998) ha propuesto que tanto el RE α como el RE β están involucrados en los efectos de retroalimentación inhibitoria de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica. Dicha función del estradiol ocurriría por medio de mecanismos transinápticos indirectos, dependientes de las células gliales, las cuales expresarían el RE α . Por medio del uso de ratones “knockout”, en los que el RE α y β se desactivaron, se ha mostrado que el RE α es necesario y suficiente para que el estrógeno realice el efecto de retroalimentación estimulante o positiva sobre la neurona GnRH. Mediante el uso de un ligando selectivo para el RE α se mostró que este receptor no sólo es necesario, sino que es suficiente para estimular la secreción preovulatoria de LH (Wintermantel y col., 2006).

En ratas adultas ovariectomizadas, la inyección de tamoxifen (antagonista no selectivo para el RE α y el RE β), en la mañana del diestro-1, provoca el bloqueo de la ovulación en el día del estro esperado, inhibe la secreción preovulatoria de LH, estradiol y progesterona (Garrido-Gracia y col., 2007). Con base en estos resultados, los autores proponen que el papel estimulante de los estrógenos sobre la secreción de LH podría ser modulada por ambos receptores.

Sin embargo, el papel regulador de la unión del estradiol al RE α y β cambia durante el ciclo estral, La inyección subcutánea de tamoxifen a las 09:00 horas del día del diestro-1 bloquea

la ovulación y la secreción preovulatoria de ambas gonadotropinas (Carrillo y col., 2005). En el día del diestro-2, el bloqueo de los receptores bloquea la ovulación sólo en el 30% de los animales, mientras que en el proestro, el 80% de los animales ovulantes (Martínez y col., 2005).

Antagonistas selectivos de los REs

Entre los fármacos selectivos para el RE β , el cyclofenil es el más utilizado en la terapia del cáncer de mama y de infertilidad (Watts y Sutherland 1987; Yong y col., 1992). Hasta el 2003, el cyclofenil fue catalogado como un antagonista selectivo para el RE β (Muthyala y col., 2003); tiene una afinidad de unión relativa de 151/100 veces respecto a 100 de estradiol (Tamrazi y col., 2002).

Cuando aún no se clasificaba al cyclofenil como un antagonista selectivo para el RE β , Bowman y colaboradores en 1982 inyectaron el cyclofenil en ratas adultas ovariectomizadas, 24 horas después se observó aumento del peso del útero y del número de RE, en comparación de los tratados con estradiol o benzoato de estradiol. También evaluaron la inducción de la receptividad sexual la cual no fue estimulada por el cyclofenil. Los autores sugirieron que el cyclofenil poseía una alta actividad estrogénica, la cual sería mediada probablemente vía estrógeno-receptor.

En la rata el cyclofenil tiene una actividad estrogénica sobre el peso del útero de 1/8110 veces mayor con respecto al benzoato de estradiol, de 1/1660 y 1/550 veces mayor sobre la inhibición de la secreción de LH y FSH, respectivamente. Los autores sugieren que esta sustancia tiene una mayor actividad estrogénica sobre estructuras nerviosa centrales que periféricas (Celotti y col., 1984)

En ratas intactas, el cyclofenil reduce la concentración de β -endorfinas en el hipotálamo, por lo que se sugiere que los estrógenos estimulan la síntesis de β -endorfinas y que las neuronas que las sintetizan son células blanco de esta hormona (Genazzani y col., 1990).

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

La información acerca de los efectos del bloqueo de los RE α sobre la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es escasa al utilizar el MPP. Sin embargo, se sabe que el MPP incrementa el porcentaje de apoptosis en células del endometrio de mujer mantenidas en cultivo y en la línea celular del endometrio de ovino (oLE), cuando se compara con los efectos del estradiol. En ratones ovariectomizados, el MPP aumenta el peso del útero y la proliferación del endometrio (Davis y col., 2006). En ratas ovariectomizadas a los 15 días de la castración, la inyección de MPP por 6 días consecutivos provoca disminución de la concentración de LH en la hipófisis y en el suero (Garrido-Gracia y col., 2007). Los autores sugieren que la acción de los estrógenos sobre la secreción de LH en la rata es ejercida por el RE α .

Ovario

El ovario es el órgano primario del sistema reproductor cuyas funciones son producir gametos y la secreción de hormonas esteroideas y peptídicas (Espey, 1999; Domínguez y col., 1991; Guyton, 2001; Yao y Bahr, 1999).

Se presentan en órganos pares, que se localizan contra la pared pélvica en ambos lados de la cavidad pélvica superior (Yeh y Adashi, 2001). El ovario está recubierto por un epitelio cúbico simple derivado del peritoneo, debajo del cual se encuentra la túnica albugínea, una capa escasamente formada de tejido conectivo denso y debajo de este se encuentra la corteza (Sánchez-Criado, 2003).

El ovario está constituido por un tejido en constante transformación, que se divide macroscópicamente en:

- Corteza es la capa externa, contiene a los folículos en diferentes estadios de crecimiento y maduración embebidos en el estroma y la glándula intersticial.
- Médula es la capa interna, se compone por el estroma, nervios, abundantes vasos sanguíneos arteriales y venosos con poco tejido conectivo y la glándula intersticial. Entre la corteza y la médula no existe línea clara de demarcación.
- Hilio es el sitio donde se encuentra la salida y entrada de la arteria y vena ovárica (o arteria útero-ovárica), la rama de la aorta abdominal que llega al ovario a lo largo del mesovario los vasos linfáticos, las terminales nerviosas y células intersticiales (Ganong, 2004; Yao y Bahr, 1999; Yeh y Adashi, 2001).

El ovario está formado por tres compartimientos: el luteal, intersticial y folicular. En este último compartimiento se engloban a los folículos en crecimiento, que son la unidad anatómico-funcional de la gónada y a partir de los cuales se originan los otros dos compartimientos (Fig. 9) (Ganong, 2004).

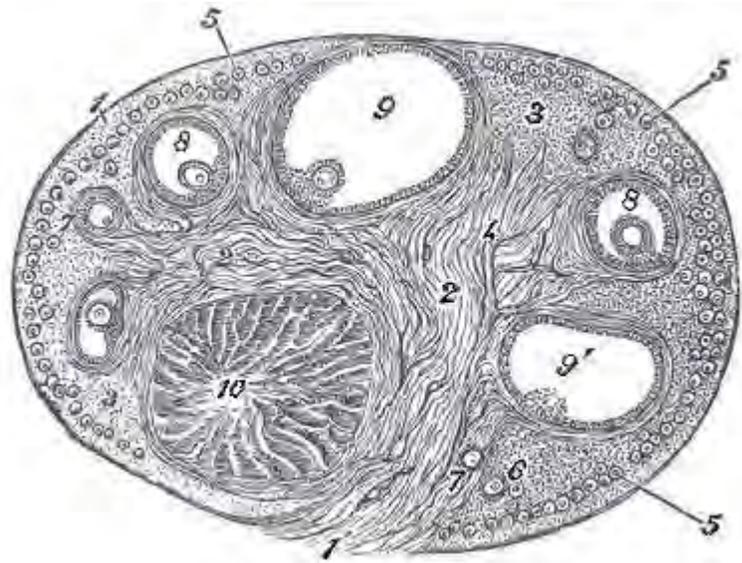


Fig. 9 Esquema de las diferentes etapas del desarrollo folicular del ovario. 1) Epitelio germinal. 1') Hilio 2) Medula 3) Corteza 4) Vasos sanguíneos 5) Folículos primarios 6, 7, 8) Folículos secundarios en diferentes estadios 9) Folículo preovulatorio 9') Folículo roto, del cual se ha liberado un ovocito 10) Cuerpo lúteo. Modificado de Sánchez-Criado 2003.

Compartimentos

Luteal o cuerpo lúteo

Se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsan al ovocito, por el estímulo de LH. Secreta principalmente progesterona (Espey, 1999; Ross y col., 1997).

Intersticial o glándula intersticial

Incluye tanto a las células teco-intersticiales de los folículos en crecimiento y las células de la teca de los folículos atrésicos, y representa la unidad productora de andrógenos (Sánchez-Criado, 2003; Yao y Bahr, 1999).

Folicular

Esta formado por folículos que se encuentran en la corteza del ovario, en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento, como son los primordiales, primario, secundario, terciario, y preovulatorios (Ross y col., 1997; Domínguez y col., 1991).

El folículo esta formado por el ovocito I, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y las células de la teca; estas últimas conforman la denominada teca interna. Además de las células de la granulosa y las tecales, el folículo esta rodeado por un complejo sistema de fibras colágenas, células del tejido conectivo,

sustancia fundamental y fibras musculares lisas, todo lo que recibe el nombre de teca externa (Domínguez y col., 1991).

Los folículos se clasifican según su complejidad celular en:

Folículo primordial, formado por un ovocito primario con núcleo redondo, uno o más nucléolos grandes y una capa de células foliculares aplanadas (Domínguez y col., 1991; Hirshfield, 1997).

Folículo primario, el ovocito es de mayor tamaño y las células foliculares adquieren un aspecto granular y de forma cubica, por lo que reciben el nombre de células de la granulosa. El ovocito continúa creciendo, queda separado por las células de la granulosa adyacentes, por una estrecha hendidura en la que se proyectan microvellosidades y prolongaciones más grandes. En este espacio se acumula una glucoproteína que se condensa gradualmente y forma la zona pelúcida. El estroma circundante forma la teca folicular (Schwartz, 2000). La proliferación de las células de la granulosa es estimulada por la FSH y los estrógenos, que actúan de manera sinérgica (Van, 1999). La FSH, a su vez, estimula la síntesis de sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que permite que su número se incremente conforme el folículo madura y también estimula la síntesis de los receptores a LH (Domínguez y col., 1991; Ulloa-Aguirre, 1991).

Folículo secundario, continúa la proliferación de células de la granulosa, se forman varias capas circundantes al ovocito. Después, entre las células de la granulosa se forman zonas que contienen líquido, que al aumentar de tamaño y fusionarse forman una cavidad llamada antro folicular, el ovocito adopta una posición excéntrica y lo rodean células de la granulosa formando el *cumulus oophorus*. Se diferencian la teca interna y externa. La teca interna esta muy vascularizada, son células que secretan andrógenos y expresan receptores a LH. Los andrógenos son transportados a las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos por acción del complejo enzimático aromatasa (Gor-Langton y Armstrong, 1994; Van, 1999; Yao y Barh, 1999). La teca externa compuesta por colágeno, células de tejido conectivo, fibras musculares lisas, vasos sanguíneos y fibras nerviosas (Domínguez y col., 1991).

En licor folicular se encuentran proteínas, polipéptidos, FSH, LH, prolactina, progesterona, andrógenos (DHT, 5 α -androstano-3-17-diona, androsterona y epiandrosterona), estrógenos, gonadocrininas y noradrenalina, cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral de la rata (Domínguez y col., 1991).

Folículo preovulatorio, constituido por un ovocito que alcanza su tamaño máximo, un antro desarrollado completamente y lleno de líquido folicular, y varias capas de células de la granulosa denominadas corona radiada (Hirshfield, 1997). Los vasos sanguíneos al igual que los nervios sólo llegan a la teca interna, ya que no penetran a la granulosa. Algunos de las fibras nerviosas terminan en el músculo liso presente en la teca externa y estos nervios regulan la

contractibilidad de las mismas lo que influiría en el mecanismo de la ovulación. En el ovario de la rata los folículos llegan a este estadio de desarrollo 17 a 19 días después de haber iniciado el crecimiento (Domínguez y col., 1991; Yao y Bahr, 1999).

El crecimiento y la diferenciación del folículo finalizan con su ruptura y la expulsión del ovocito II (la ovulación) o con la atresia (Espey y Lipner, 1994).

Atresia

Es la degeneración de un folículo, puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo (Centola, 1983). Los folículos atrésicos se distinguen morfológicamente al presentar descamación y picnosis de las células de la granulosa especialmente las que se encuentran en contacto con el antro, mayor número de capas en las células de la teca y alteraciones en el ovocito como involución, degeneración y fragmentación (Oliver y col., 1999; Van, 1999).

Ovulación

Es la expulsión de un ovocito capaz de ser fecundado. En los folículos preovulatorios, ocurre en respuesta al incremento brusco de la concentración en plasma de las gonadotropinas. La FSH y LH estimulan la secreción de enzimas proteolíticas como el activador del plasminógeno (Hirshfield y Midgley 1978; Tsafirri y Reich, 1999; Ulloa-Aguirre, 1991). La LH también estimula otras enzimas proteolíticas como plasmina y metalproteinasas, las cuales contribuyen a la degradación de la matriz perifolicular y principalmente de las fibras de colágeno que forman la pared folicular. Estos cambios se acompañan del incremento en el flujo sanguíneo, en la permeabilidad vascular y en el volumen folicular. Los cambios vasculares y de la actividad proteolítica son estimulados, además de la LH, por mediadores locales como son: el factor de crecimiento endotelial vascular, interleucina 1, eicosanoides (prostaglandina y leucotrienos), el factor activador de plaquetas y óxido nítrico (Tsafirri, 1995; Tsafirri y Reich, 1999).

Desde el momento del nacimiento, los ovocitos primarios persisten en la etapa de Diploteno hasta el momento de la ovulación, momento en el que prosigue la meiosis y se forma el primer cuerpo polar y se expulsa (Yeh y Adashi, 2001). Cuando se lleva a cabo la ovulación, el ovocito es un ovocito secundario u ovocito II, ya que justo antes de salir culmina la primera división meiótica e inicia la segunda división que se detiene en metafase. La segunda meiosis culmina sólo si el ovocito es fecundado (Ross y col., 1997; Espey y Lipner, 1994).

Durante la ovulación, el ovocito secundario y las células de la granulosa circundantes son expulsados del folículo e ingresan a la trompa de Falopio (Drucker, 2005).

El ovario puede ser considerado como una glándula maestra, cuyas funciones están reguladas por los otros dos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Tanto la ovulación como la secreción de hormonas esteroides (funciones del ovario) se encuentran reguladas por mecanismos neuroendócrinos que cambian durante el ciclo estral (Yen, 2001).

Útero

Es parte del tracto genital interno de la hembra. En los mamíferos consiste en: un par de oviductos, el útero, el cervix y la vagina. Se origina en los conductos paramesonéfricos, que pueden o no fusionarse. La porción no fusionada se diferencia en las trompas uterinas y la fusionada dará lugar al útero. En el caso de los roedores, la fusión es caudal poco antes de conectar con la vagina, originando un útero bicorne (Bartol, 1999).

Histológicamente el útero está compuesto por tres capas: el endometrio, miometrio y perimetrio (Bartol, 1999; Gray y col., 2001):

El Endometrio.- Es la mucosa que cubre la cavidad uterina; está constituido por un epitelio superficial cilíndrico simple, que se invagina dando lugar a numerosas glándulas tubulares simples desarrolladas dentro del estroma endometrial. El estroma lo constituye un tejido conjuntivo laxo con células que presentan características mesenquimales (células irregularmente estrelladas con núcleos alargados u ovoides) y abundantes de fibras reticulares. Tanto los estrógenos como la progesterona tienen efectos complementarios pero diferentes en el grado de diferenciación de las glándulas y el estroma. Durante la fase postovulatoria, los estrógenos regulan el desarrollo glandular, mientras que la progesterona actúa sobre el estroma (Bloom y Fawcett, 1995; Gray y col., 2001).

El Miometrio.- Es la capa muscular gruesa, continua con la capa muscular de las trompas uterinas y de la vagina. Las fibras musculares lisas también se extienden dentro de los ligamentos que se asocian al útero (Bartol, 1999).

El Perimetrio.- Es la capa serosa externa o la cubierta peritoneal visceral del útero, el perimetrio se continua con el peritoneo pélvico y abdominal y está compuesto por mesotelio y una capa de tejido conjuntivo laxo. Cubre toda la superficie posterior del útero pero solo una parte de la anterior (Bartol, 1999; Ross y col., 2005).

Ciclo estral

El término estral se deriva de la palabra en latín “*oistros*” que significa “frenesi”; y corresponde con la etapa en la que la hembra acepta sexualmente al macho (llamada “calor” o celo) (Kilen y Schwartz, 1999). En nuestro modelo de estudio, la rata de laboratorio, el ciclo estral es de 4 ó 5 días, dependiendo la cepa que se utilice y del periodo luz/oscuridad en que sean mantenidos los animales (Schwartz, 2000). En la rata, el ciclo estral se divide en cuatro fases: *estro*, *metaestro* o *diestro-1*, *diestro* o *diestro-2* y *proestro* (Kilen y Schwartz, 1999).

El día del ***estro***, Heape lo describe como el tiempo en que la hembra es receptiva al macho (Freeman, 1994). El frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas y sin núcleo, (Kilen y Schwartz, 1999). En la madrugada del este día ocurre la ovulación. La concentración de estradiol, progesterona y LH son las más bajas del ciclo estral (basales), pero la de FSH vuelve a aumentar nuevamente en la mañana de este día, cuya función es reclutar los folículos que empezarán a crecer y ovularán en ciclos posteriores (Fig. 10) (Schwartz, 2000; Freeman, 1994).

La etapa de ***diestro-1*** o *metaestro* es un periodo de “recuperación” (Freeman, 1994). La citología vaginal se caracteriza por presentar una gran cantidad de leucocitos. El cuerpo lúteo secreta progesterona por varias horas, lo que provoca que la concentración de esta hormona alcance un segundo “pico” hacia el medio día. En algunas cepas de ratas la secreción de progesterona se prolonga, lo que conducen a ciclos de 5 días. Las concentraciones de estradiol, LH y FSH son basales durante este día del ciclo. (Schwartz, 2000; Kilen y Schwartz, 1999).

En el día siguiente, ***diestro-2***, en el frotis vaginal se observan una menor cantidad de leucocitos. La concentración de estradiol empieza a aumentar paulatinamente desde la tarde de este día (Fig. 10) (Schwartz, 2000; Kilen y Schwartz, 1999).

En el día del ***proestro***, el frotis vaginal se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas. En la mañana de este día, la concentración de estradiol alcanza el valor máximo del ciclo, evento llamado “pico” de estrógenos. La disminución progresiva de esta concentración, induce el aumento de la concentración de LH y de FSH, esta concentración máxima de ambas hormonas en la sangre, recibe el nombre de secreción preovulatoria, que ocurre en la tarde de este día (entre las 17:00 y 19:00 horas según la cepa). La secreción preovulatoria de LH estimula la secreción de progesterona, que alcanza un primer “pico” en la noche de este día (Fig.10) (Kilen y Schwartz, 1999, Schwartz, 2000; Freeman, 1994).

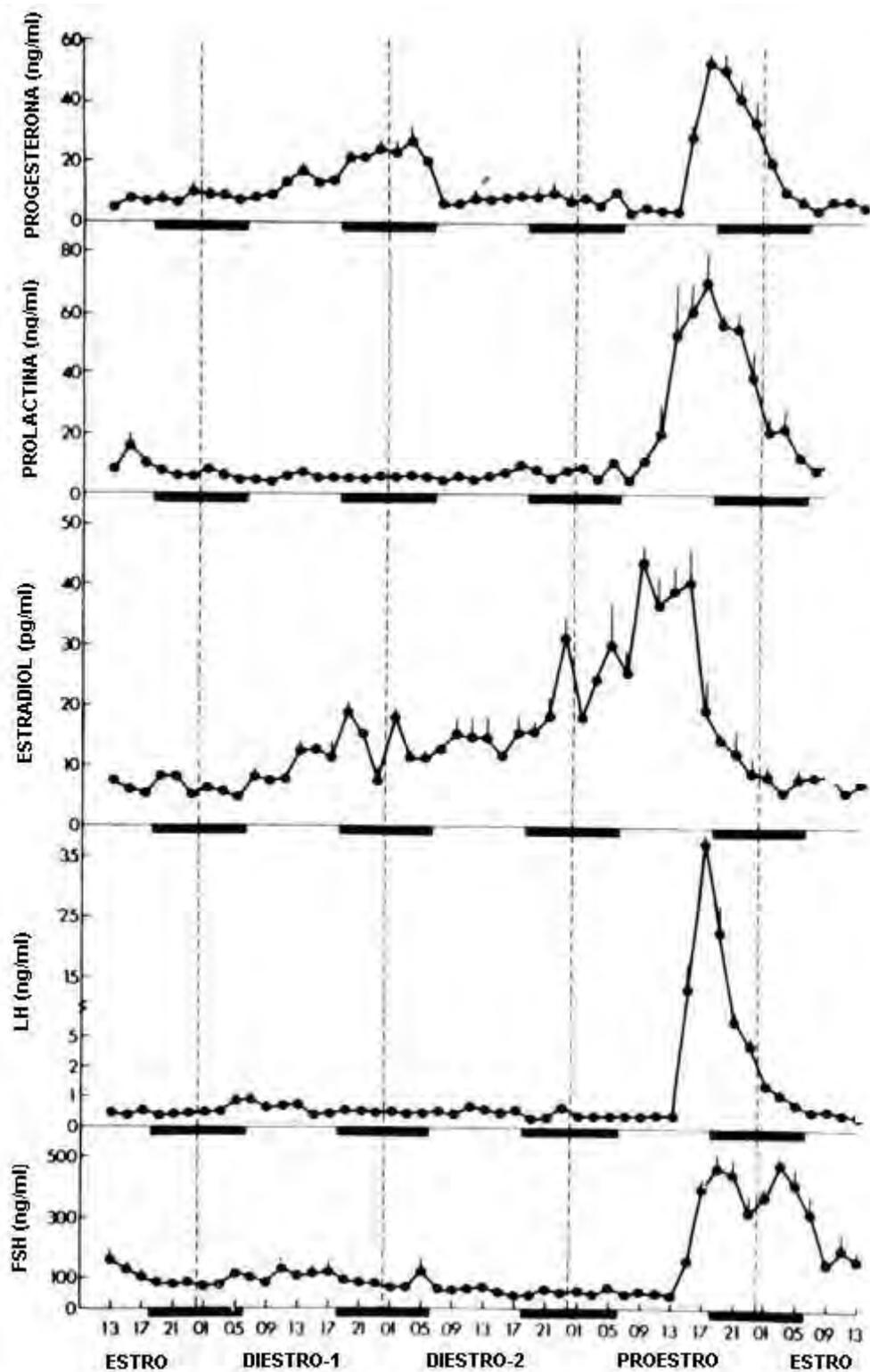


Figura 10 Concentración de LH, FSH, progesterona, prolactina y estradiol obtenido del plasma periférico cada 2 horas en cada día del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de la concentración de hormona de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan intervalos de oscuridad en el cuarto del animal (Tomada de Freeman, 1994).

Justificación

En la rata las funciones del ovario (la secreción de hormonas esteroides, el crecimiento y la diferenciación de los folículos y ovulación) son reguladas por las gonadotropinas y el 17β -estradiol. Este estrógeno actúa de manera estimulante o inhibitoria sobre el hipotálamo y la hipófisis según el día del ciclo estral que se analice, ya que sus concentraciones en la sangre cambian y generan de esta forma un ambiente endocrino diferente durante el ciclo.

Los efectos del estradiol sobre sus diferentes órganos blanco depende de la presencia o ausencia de sus receptores (RE). A la fecha se reconocen dos tipos: el alfa (α) y el beta (β). Ambos receptores se han localizado en el sistema nervioso central pero en mayor proporción en el hipotálamo. Mediante el uso de ratones transgénicos, en los que se ha desactivado uno u otro receptor, se ha planteado que ambos están involucrados en efectos de retroalimentación inhibitorios sobre la secreción de las gonadotropinas. Sin embargo, se ha descrito que las neuronas GnRH expresan el RE β y no el RE α , por lo que se plantea que éste último actuaría por medio de otras neuronas que expresan el RE α . Otros autores sugieren que es el RE α el que está implicado en el efecto de retroalimentación estimulante de los estrógenos. Por otra parte la expresión del ARNm para el RE α y para el RE β en el área preóptica e hipotalámica anterior cambia durante el ciclo estral.

En el ovario el RE β se encuentra en las células de la granulosa de folículos en crecimiento principalmente y que tanto la proteína del RE β como el ARNm para el mismo se encuentra en mayor cantidad del RE α , por lo que se sugere que el RE β estaría implicado en el desarrollo folicular. Por otra parte la expresión del RE β en el ovario cambia durante el ciclo estral. Sin embargo la función de ambos receptores no es clara.

Dada la controversia que a la fecha existe sobre la función del estradiol al unirse a uno u otro de sus receptores sobre la función reproductora, en este estudio se decidió analizar los efectos del bloqueo específico del RE α ó RE β , mediante la inyección subcutánea de antiestrógenos selectivos, MPP antagonista selectivo del RE α o cyclofenil antagonista selectivo del RE β , realizada en la mañana de cada día del ciclo estral de la rata, sobre la ovulación, el peso de los ovarios y del útero, así como sobre la distribución de la población folicular en el día del proestro y la secreción de estradiol, progesterona y gonadotropinas

Hipótesis

Dado que el estradiol actúa al unirse a dos tipos de receptores, el RE α y RE β , cuya presencia depende de la célula blanco y del día del ciclo estral, entonces el bloqueo específico de uno u otro receptor en cada fase del ciclo, provocará diferentes efectos sobre la ovulación, el crecimiento folicular, el peso del útero, de los ovarios y la secreción de progesterona, estradiol y gonadotropinas.

Objetivo General:

Analizar el papel de los RE α o RE β sobre las funciones del eje hipófisis-ovario durante el ciclo estral de la rata.

Objetivos Particulares:

1. Estudiar los efectos del bloqueo de los RE α o RE β en cada fase del ciclo estral sobre la ovulación espontánea
2. Estudiar los efectos del bloqueo de los RE α o RE β en cada fase del ciclo estral sobre el crecimiento folicular
3. Estudiar los efectos del bloqueo de los RE α o RE β en cada fase del ciclo estral sobre el peso de los ovarios y del útero.
4. Estudiar los efectos del bloqueo de los RE α o RE β en cada fase del ciclo estral sobre la secreción de progesterona, estradiol, FSH y LH.

Método

Diseño experimental

Se utilizaron ratas hembras adultas de tres meses de edad, vírgenes de la cepa CIIZ-V, con pesos corporales entre 200-250g, mantenidas en caja de policarbonato, en las que se colocaron 6 animales por caja en condiciones controladas de iluminación (luz de 05:00 a 19:00 hrs.) con libre acceso al alimento (Purina S.A., México) y al agua.

Estudio del Ciclo estral

A todos los animales se les realizó el estudio del ciclo estral mediante la toma diaria de frotis vaginales, a las 10:00 hrs. Con el uso de un asa de cultivo humedecida en un vaso de precipitado con agua, se introdujo en la vagina de cada rata, cuya muestra se colocó en un portaobjeto, se tiñó con hematoxilina-eosina y se observó al microscopio. Sólo se utilizaron animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración.

Grupos experimentales

A las 09:00 horas de cada uno de los días del ciclo estral (diestro-1, diestro-2, proestro o estro), grupos de 8-10 animales fueron inyectados por vía subcutánea con una dosis de 0.5mg/kg peso corporal (p.c.) de metil-piperidino-pyrazol (MPP) (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, Mex.) [antagonista al $RE\alpha$] o con Cyclofenil [antagonista de $RE\beta$] (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, Mex), diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, Mex) en una relación 1:1 (peso/volumen).

Los grupos de animales tratados se sacrificaron por decapitación a las 9:00 horas del día del estro esperado, con la finalidad verificar la presencia o ausencia de ovocitos liberados en las trompas uterinas y realizar su conteo. También de disecar los ovarios y el útero, los cuales fueron pesados.

En los grupos experimentales tratados con el fármaco en los días del diestro-1 o proestro, en los cuales el tratamiento modificó en el número de ovocitos liberados, grupos de animales en las mismas condiciones se inyectaron los mismos tratamientos a las 9:00 del horas el diestro-1 o del Proestro, y fueron sacrificados a las 09:00 del diestro-2, a las 9:00 y 17:00 horas del proestro esperado, con la finalidad de analizar la población folicular y llevar a cabo la cuantificación de estradiol, progesterona y gonadotropinas.

Como grupo control se utilizaron ratas inyectadas con DMSO en el mismo volumen que se administró el fármaco. El grupo de referencia absoluto (Intacto) correspondió a ratas sin

tratamiento; ambos grupos experimentales fueron sacrificadas a las mismas horas y día del ciclo que los otros grupos tratados con los fármacos.

Análisis de la población folicular

Los ovarios izquierdo y derecho de tres animales de cada tratamiento se fijaron en solución de Bouïn durante 24 horas, se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones transversales a 10µm y de manera seriada, de tal forma que se obtuvieron todos los cortes de cada ovario y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Con la ayuda de un microscopio óptico y de un ocular micrométrico, en cada folículo en el que se observaba el núcleo y el nucleólo, se registraron dos medidas, el diámetro mayor y su perpendicular (el diámetro menor). Los diámetros medidos se utilizaron para calcular el diámetro promedio de cada folículo, mediante la siguiente fórmula:

$$D_p = \frac{D_1 + D_2}{2}$$

Todos los folículos se clasificaron por tamaño con base en los criterios propuestos por Hirshfield y Midgley (1978):

- folículos pequeños: diámetro menor de 391 µm
- folículos medianos: diámetro entre 391 a 500 µm
- folículos preovulatorios: diámetro mayor de 500 µm

Aquellos folículos que presentaron células de la granulosa descamadas en el licor folicular, núcleos picnóticos en las células de la granulosa o alteración en el ovocito, fueron clasificados como folículos atrésicos.

Cuantificación hormonal

La sangre recogida del tronco se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero se almacenó a -20°C, hasta la cuantificación de estradiol, progesterona, LH y FSH por radio-inmuno-análisis (RIA). La cuantificación de las concentraciones plasmáticas estradiol y progesterona, se realizó por RIA mediante el uso de estuches comerciales marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA), que contienen tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (¹²⁵I-Progesterona, ¹²⁵I-Estradiol) y calibradores para la realización de la curva patrón (progesterona: 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.0, 20.0 y 40.0 ng/ml; estradiol: 0.0, 10.0, 20.0, 50.0, 150.0, 250.0, 500.0 y 900.0 pg/ml). A cada tubo del estuche se le adicionaron 100 µl de suero problema más 1000 µl de la hormona marcada (¹²⁵I-Progesterona, ¹²⁵I-Estradiol). Los

tubos se agitaron durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas; posteriormente se decantaron y limpiaron, finalmente con la ayuda de un contador de centelleo gama, se cuantificó la cantidad de la hormona problema. Los datos de la concentración de estradiol se expresaron en pg/ml y los de progesterona en ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 5.3% y 9.87 para progesterona, 6.9% y 10.8% para estradiol. El límite de detección para progesterona fue 0.003 ng/ml y para estradiol 0.00213 ng/ml.

La cuantificación de LH y FSH se realizó por RIA con el anticuerpo rLH-RP3 (NIAMDD-Rat), para la cuantificación de LH y rFSH-RP2 (NIAMDD-Rat) para el caso de FSH, proporcionados por la Nacional Hormona and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). A 100 μ l de suero se le adicionó 100 μ l de hormona marcada con 125 I y 100 μ l del primer anticuerpo de suero de borrega para LH o para FSH, y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se le agregaron 100 μ l del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubaron durante dos horas; los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a -4 °C por 30 min. El sobrenadante se decantó, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en un contador de centelleo gama para su análisis. Los datos de la concentración de cada hormona se expresaron en ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fue 7.91% y 5.74% para LH y 9.3% y 6.82% para FSH. El límite de detección de LH y FSH fue de 0.05 y 0.01 ng/ml, respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados del número de ovocitos liberados se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de "U" de Mann-Witney. Los resultados del peso de los ovarios y del útero fueron analizados por un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey, mientras que los resultados de la población folicular fueron analizados por la prueba de χ^2 . Para los casos en los que se compararon los resultados de dos muestras, se utilizó la prueba de "t" de Student. En todos los casos se aceptó como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue ≤ 0.05 .

Resultados

Efectos del bloqueo de los RE α y RE β durante el ciclo estral evaluados al estro esperado

Porcentaje de Animales Ovulantes

La inyección subcutánea de DMSO (vehículo), MPP (antagonista del RE α) o cyclofenil (antagonista del RE β), en los días del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro no modificó significativamente el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado (Tabla 1).

Tabla1. Efectos de la inyección del vehículo dimetilsulfóxido (DMSO), del metil-piperidino-pirazol ó antagonista del RE α (MPP) o del cyclofenil (antagonista del RE β) durante el ciclo estral, sobre el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado

Tratamiento	Estro	Diestro-1	Diestro-2	Proestro
Intacto	100	100	100	100
DMSO	90	100	100	100
MPP	100	100	100	100
Cyclofenil	90	100	100	100

Número de Ovocitos Liberados

Efectos del bloqueo de los RE α por la inyección de MPP

En el día del diestro-1, la inyección de MPP aumento el número total de ovocitos liberados respecto al grupo inyectado con DMSO (16.5 ± 1.1 vs. 13.2 ± 0.9 , $p < 0.05$) (Gráfica 1), este efecto sólo fue significativo en el ovario derecho (8.9 ± 0.6 vs. 6.4 ± 0.6 , $p < 0.05$) (Gráfica 2).

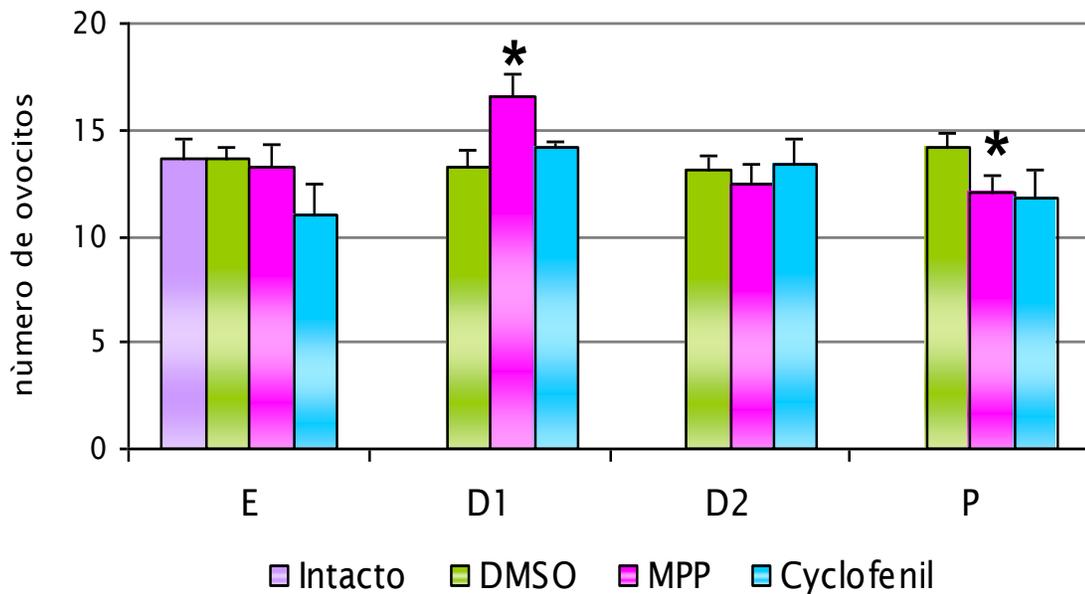
En el día del proestro, el bloqueo de RE α disminuyó el número total de ovocitos liberados (12.1 ± 0.7 vs. 14.2 ± 0.7 , $p < 0.05$) (Gráfica 1); efecto que nuevamente sólo fue significativo, en el ovario derecho (6.1 ± 0.3 vs. 7.2 ± 0.4 $p < 0.05$) (Gráfica 2).

En los días del estro y del diestro-2 no se observaron modificaciones en el número de ovocitos liberados (Gráfica 2).

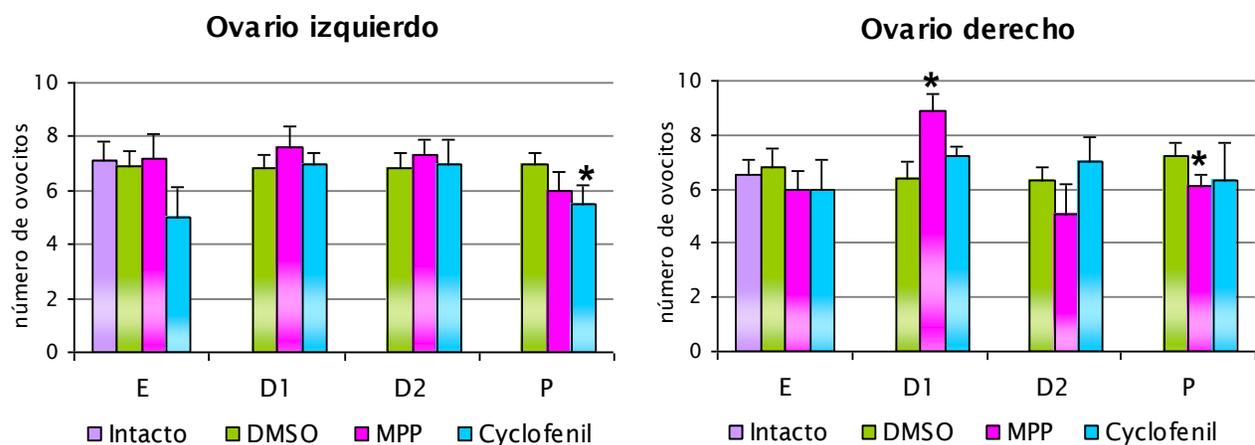
Efectos del bloqueo de los RE β por la inyección de cyclofenil

La inyección de cyclofenil en el día del proestro disminuyó el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (5.5 ± 0.6 vs. 7.0 ± 0.4 $p < 0.05$) y no modificó los liberados por el derecho (6.3 ± 1.5 vs. 7.2 ± 0.4) (Gráfica 2).

En los días del estro, del diestro-1 y del diestro-2 no se observaron modificaciones en el número



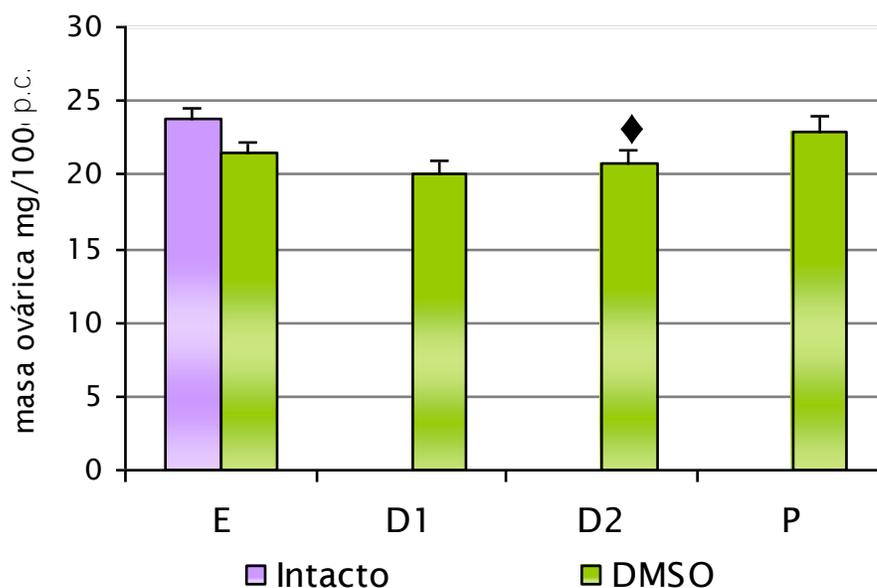
Gráfica 1. Media + e.e.m. del número total de ovocitos liberados en animales inyectados con DMSO (vehículo), MPP o cyclofenil durante el ciclo estral y sacrificados en el día del estro esperado. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.



Gráfica 2. Media + e.e.m. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho, de animales inyectados con DMSO (vehículo), MPP o cyclofenil durante el ciclo estral y sacrificados en el día del estro esperado. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.

Peso de los Ovarios

Solamente en el día del diestro 2, la masa ovárica disminuyó en el grupo animales inyectados con DMSO (20.8 ± 0.8 vs. 23.7 ± 0.8 $p < 0.05$) (Gráfica 3). En el día del diestro-1, la inyección del DMSO provocó disminución del peso del ovario izquierdo con respecto al grupo de animales intactos (9.8 ± 0.4 vs. 12.2 ± 0.5 , $p < 0.05$) (Gráfica 5), efecto que no se reflejó en la masa ovárica (sumatoria del peso del ovario izquierdo con el derecho). En los días del estro o del proestro no se observaron modificaciones en el peso de los ovarios (Gráfica 3).



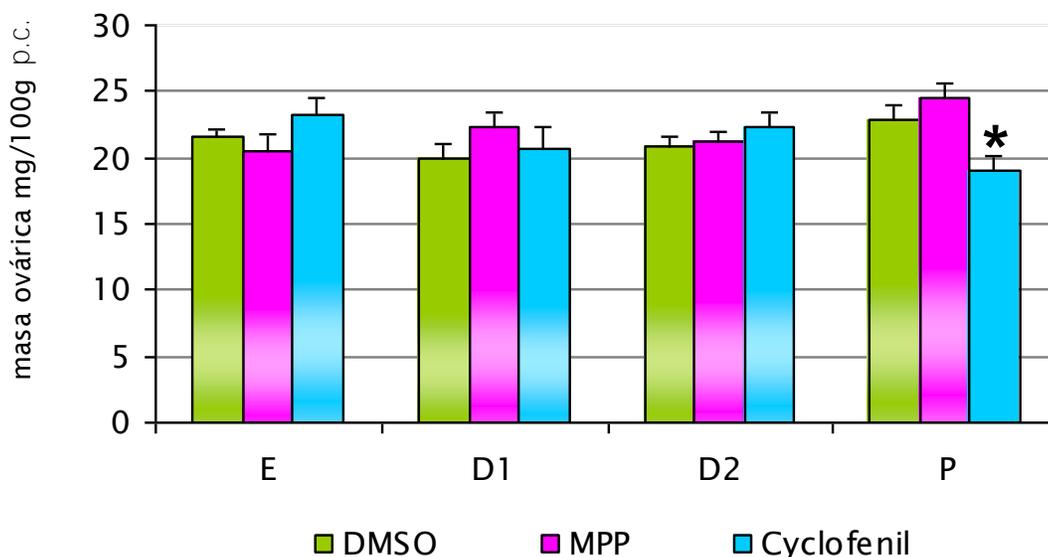
Gráfica 3 Media + e.e.m. de la masa ovárica de animales intactos o inyectados con vehículo (DMSO), durante el ciclo estral que ovularon en el día del estro esperado.
 ♦ $p < 0.05$ vs. grupo con Intacto.

Efectos del bloqueo de los RE α por la inyección de MPP

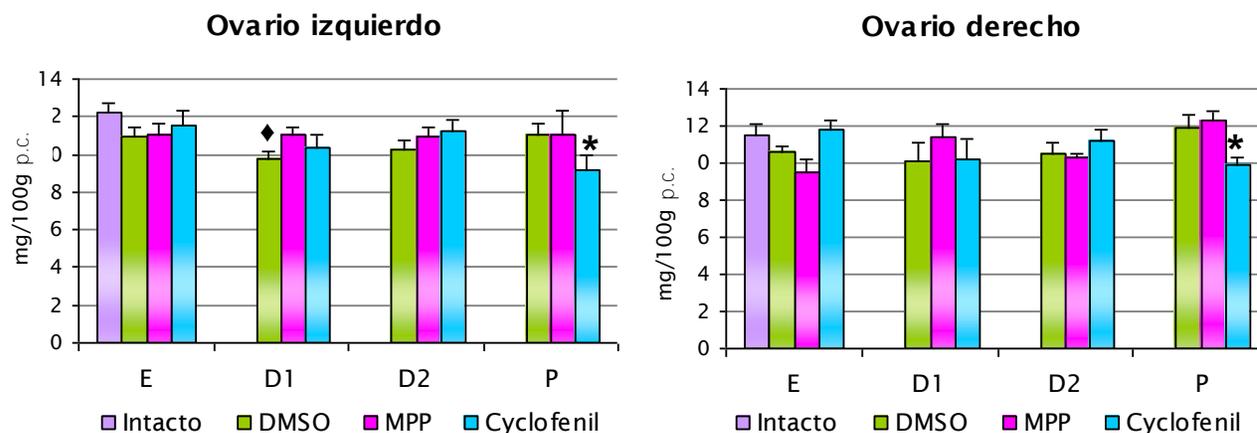
El bloqueo de los RE α , no modificó el peso de los ovarios (Gráficas 4 y 5).

Efectos del bloqueo de los RE β por la inyección de cyclofenil

En el día del proestro, el bloqueo del RE β disminuyó el peso de los dos ovarios (izquierdo: 9.2 ± 0.8 vs. 10.9 ± 0.5 ; derecho: 9.8 ± 0.4 vs. 10.6 ± 0.3 $p < 0.05$) (Gráfica 5), efecto que se reflejó en la masa ovárica (19.1 ± 1.0 vs. 22.9 ± 1.0 $p < 0.05$) (Gráfica 4).



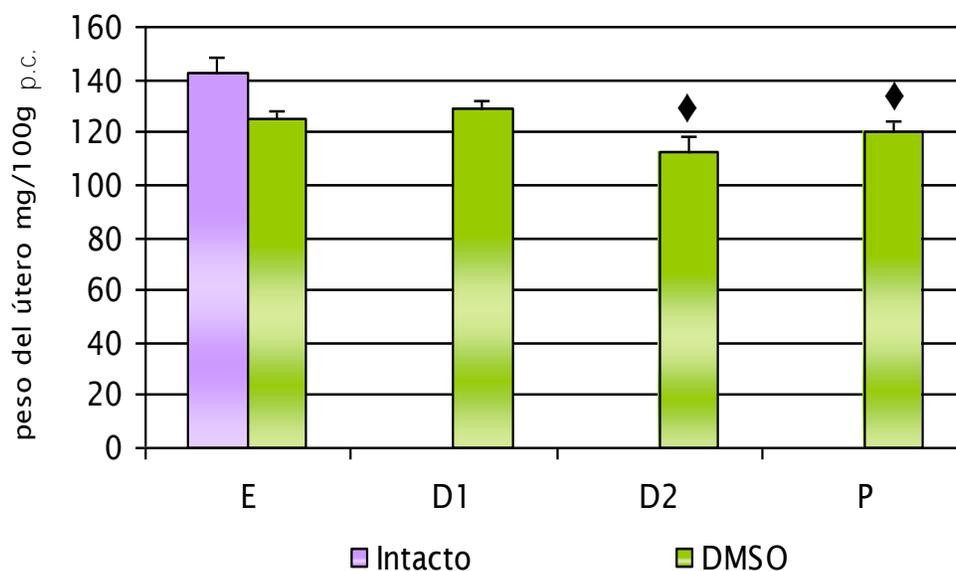
Gráfica 4 Media + e.e.m. de la masa ovárica de animales inyectados con DMSO (vehículo), MPP o cyclofenil durante el ciclo estral que ovularon en el día del estro esperado. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.



Gráfica 5 Media + e.e.m. del peso del ovario izquierdo o derecho, de animales inyectados con DMSO (vehículo), MPP o cyclofenil durante el ciclo estral que ovularon en el día del estro esperado. * $P < 0.05$ vs. grupo con DMSO. ♦ $p < 0.05$ vs. grupo con Intacto.

Peso del útero

En los días del diestro-2 (112.2 ± 6.7 vs. 143.7 ± 5.1 $p < 0.05$) y del proestro (120 ± 4.1 vs. 143.7 ± 5.1 $p < 0.05$), la inyección de DMSO provocó disminución del peso del útero con respecto al grupo de animales intactos (Gráfica 6).



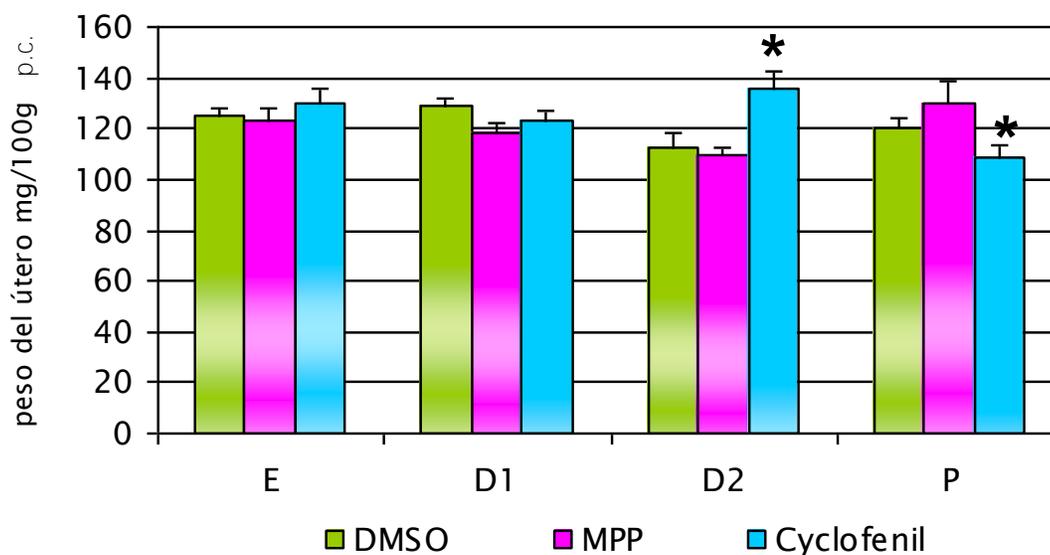
Gráfica 6. Media + e.e.m del peso de útero de animales intactos o inyectados con vehículo (DMSO), durante el ciclo estral evaluado en el día del estro esperado. ♦ $p < 0.05$ vs. grupo con Intacto.

Efectos del bloqueo de los RE α por la inyección de MPP

El bloqueo de los RE α , no modificó el peso del útero (Gráfica 7).

Efectos del bloqueo de los RE β por la inyección de cyclofenil

En el día del diestro-2 el bloqueo del RE β aumentó el peso del útero (135.9 ± 7.9 vs. 112.2 ± 6.7 $p < 0.05$). En el día del proestro, el bloqueo de este receptor disminuyó el peso de éste órgano (108.4 ± 5.6 vs. 120 ± 4.1 $p < 0.05$) (Gráfica 7).



Gráfica 7. Media + e.e.m. del peso de útero de animales inyectados con MPP o cyclofenil durante el ciclo estral evaluado en el día del estro esperado. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.

Tabla 2. Resumen de resultados de los efectos del bloqueo de los $RE\alpha$ y $RE\beta$ durante el ciclo estral evaluados al estro esperado

	% animales ovulantes	No. ovocitos liberados	Peso de los Ovarios	Peso del útero
Estro	\approx	\approx	\approx	\approx
Diestro-1	\approx	\uparrow $RE\alpha$	\approx	\approx
Diestro-2	\approx	\approx	\downarrow vehículo	\downarrow vehículo \uparrow $RE\beta$
Proestro	\approx	\downarrow $RE\alpha$ \downarrow $RE\beta$	\downarrow $RE\beta$	\downarrow vehículo \downarrow $RE\beta$

Efectos del bloqueo de los RE α y RE β en diestro-1 evaluados en horas posteriores al tratamiento.

Dado que el bloqueo de los receptores α o β en los días del diestro-1 o proestro provocó efectos significativos en el número de ovocitos liberados, grupos de animales tratados en diestro-1 fueron sacrificados en la mañana del diestro-2 a las 09:00 o en el proestro a las 9:00 y 17:00 horas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

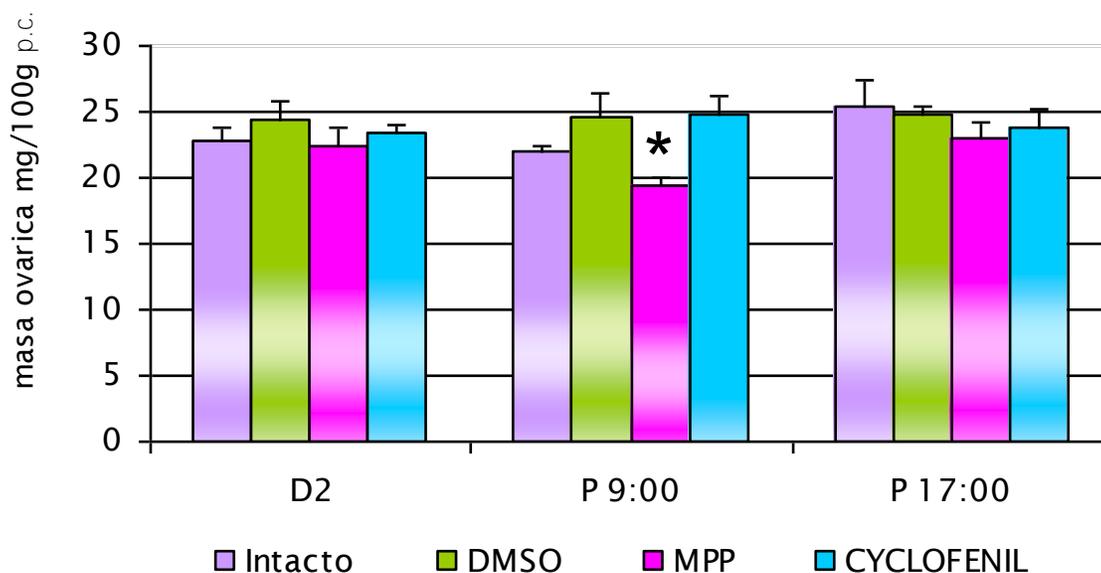
Peso de los Ovarios

Efectos del bloqueo de los RE α por la inyección de MPP

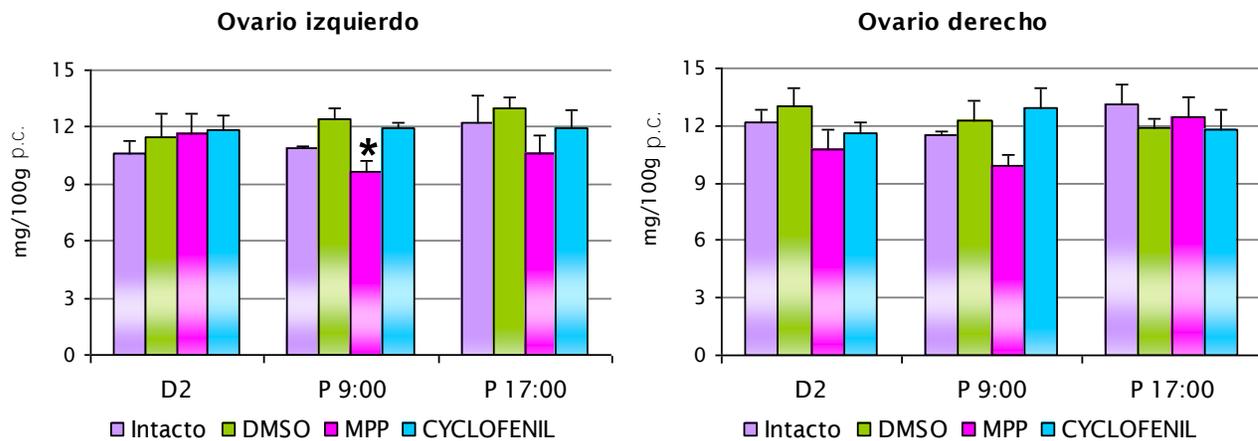
El bloqueo de los RE α en diestro-1 disminuyó el peso del ovario izquierdo (9.6 ± 0.6 vs. 12.9 ± 0.6 , $p < 0.05$), pero no el del derecho (9.8 ± 0.4 vs. 12.9 ± 1.2) (Gráfica 8) con respecto al grupo inyectado con vehículo sacrificado a las 9:00 horas del proestro; este efecto se reflejó en la masa ovárica (19.5 ± 0.6 vs. 24.7 ± 0.6 $p < 0.05$) (Gráficas 8 y 9).

Efectos del bloqueo de los RE β por la inyección de cyclofenil

El bloqueo de los RE β en diestro-1 no modificó el peso de los ovarios en ninguna de las horas estudiadas (Gráfica 9).



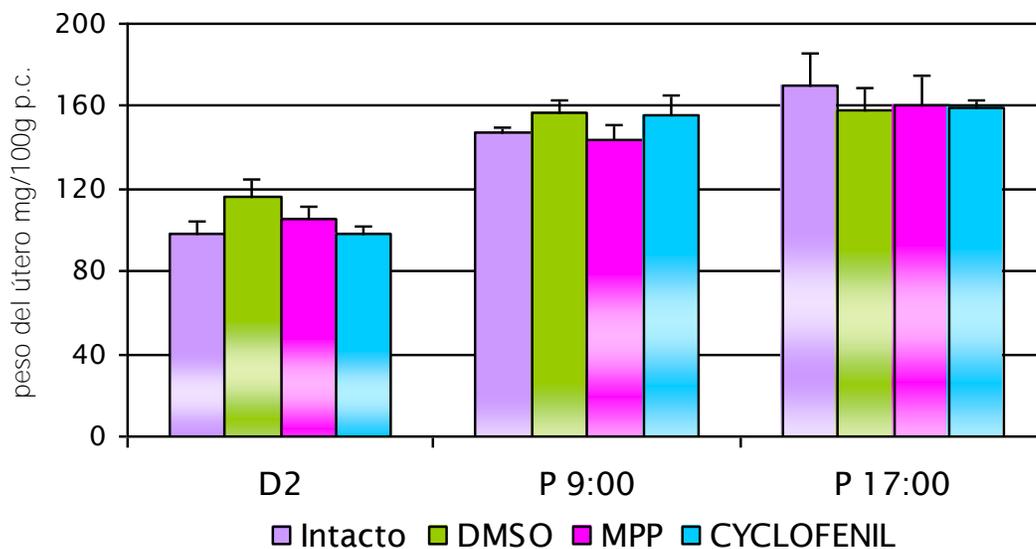
Gráfica 8. Media + e.e.m. de la masa ovárica, de animales intactos o inyectados con vehículo, MPP o cyclofenil en el día del diestro 1 y sacrificados en horas posteriores. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.



Gráfica 9 Media + e.e.m. del peso del ovario izquierdo o derecho, de animales intactos o inyectados con vehículo, MPP o cyclofenil en el día del diestro 1 y sacrificados en horas posteriores. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.

Peso del útero

El peso del útero no se modificó por ninguno de los tratamientos realizados en diestro-1 (Gráfica 10).



Gráfica 10. Media + e.e.m. del peso de útero de animales inyectados con MPP o cyclofenil durante el ciclo estral y evaluado en el día del estro esperado.

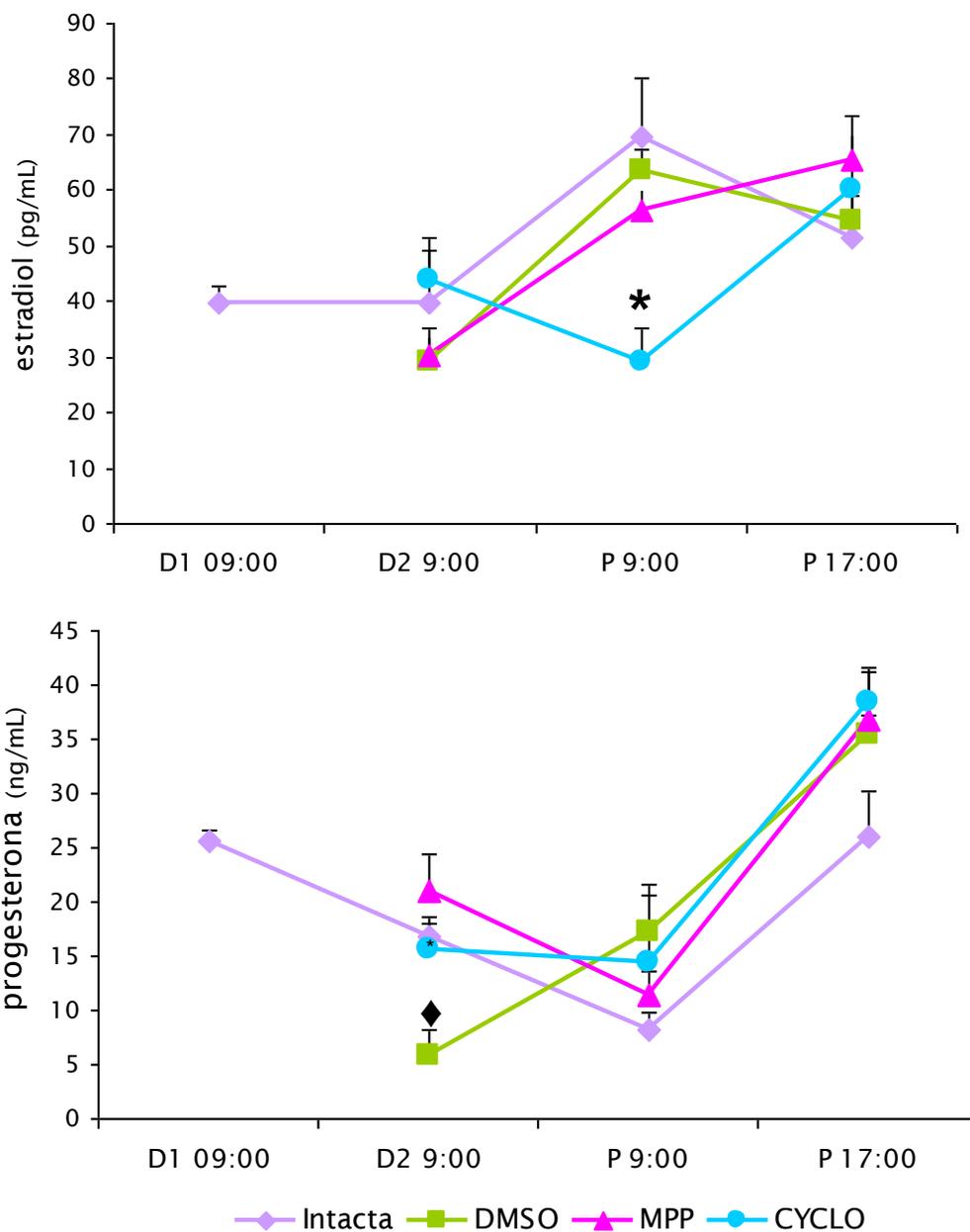
Cuantificación hormonal

Estradiol

El bloqueo de los RE α llevado a cabo en el día del diestro-1 no modificó la concentración de estradiol, mientras que el bloqueo de los RE β bloqueó el “pico” preovulatorio de estradiol (09:00 h del proestro) (29.0 ± 6.3 vs. 63.5 ± 3.9 $p < 0.05$) (Gráfica 11).

Progesterona

La inyección del vehículo en la mañana del diestro-1 disminuyó la concentración de progesterona a las 24 hrs. (5.8 ± 2 vs. 16.8 ± 1.2 $p < 0.05$) grupo vs. Intacto, y no se observaron modificaciones posteriores a este tiempo. Este efecto no fue modificado por el bloqueo de los $RE\alpha$ o β (Gráfica 12).



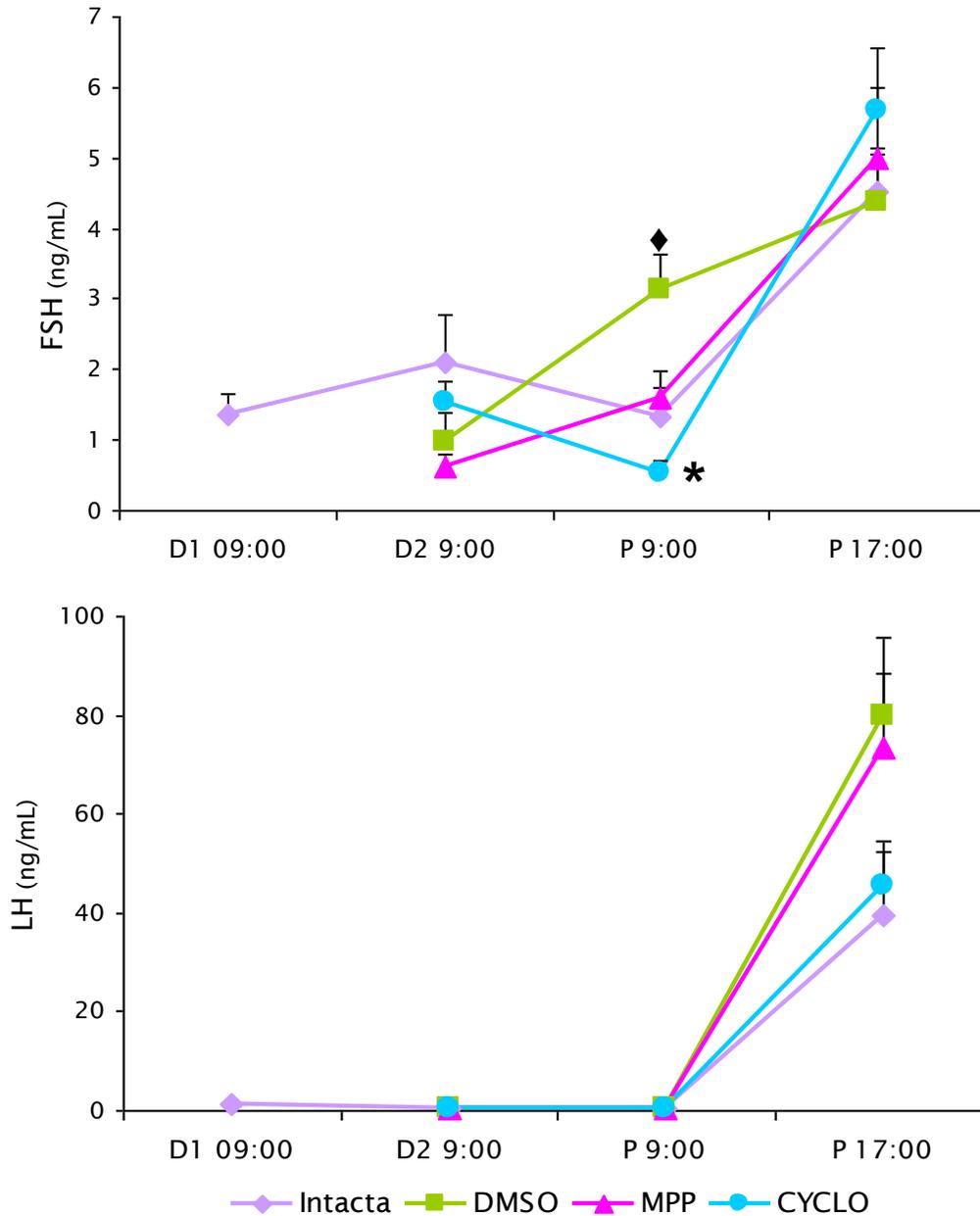
Gráficas 11 y 12. Media + e.e.m. de la concentración de estradiol o progesterona en animales inyectados con vehículo, MPP o cyclofenil en la mañana del diestro-1 y sacrificados en horas posteriores. ♦ $p < 0.05$ vs. grupo con Intacto. (ANDEVA seguida de Tukey).

Hormona estimulante del folículo.

La inyección de vehículo, en el día del diestro-1 incrementó la concentración de FSH a las 09:00 hrs del proestro (3.1 ± 0.5 vs. 1.3 ± 0.4 $p < 0.05$), efecto que fue bloqueado por la inyección del cyclofenil (0.5 ± 0.2 vs. 3.1 ± 0.5 $p < 0.05$) (Gráfica 13).

Hormona Luteinizante

Cuando los experimentos se realizaron en la mañana del diestro-1, la concentración de LH no se modificó por ninguno de los tratamientos realizados (Gráfica 14).



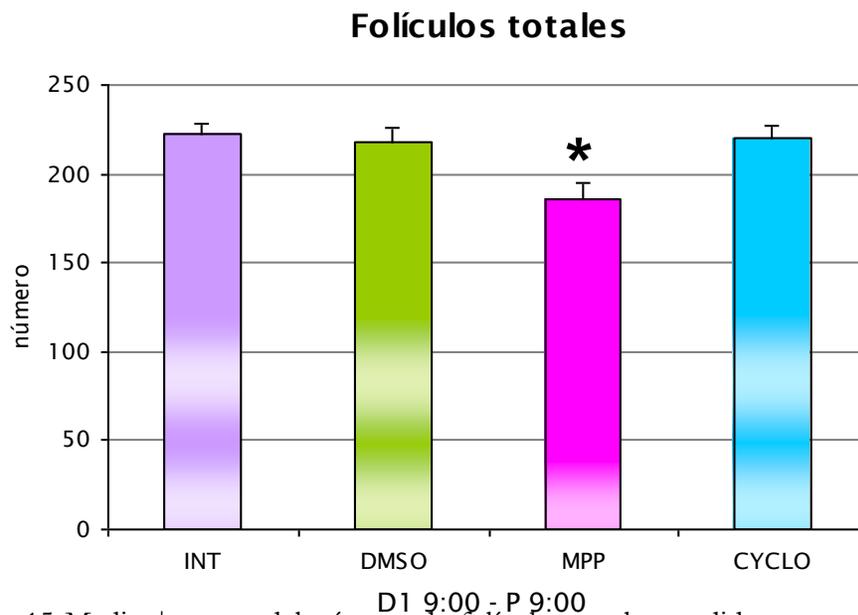
Gráficas 13 y 14. Media + e.e.m. de la concentración de la hormona estimulante del folículo o de la hormona luteinizante, de animales inyectados con vehículo, MPP o cyclofenil en la mañana del diestro-1 y sacrificados en horas posteriores.* $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO, ♦ $p < 0.05$ vs. grupo con Intacto (ANDEVA seguida de Tukey).

Dado que el bloqueo de los receptores α o β en los días del diestro-1 o del proestro provocaron efectos significativos en el número de ovocitos liberados, en los animales tratados en el día del diestro-1 se analizó la población folicular a las 09:00 ó 17:00 horas del proestro ó a las 09:00 horas del estro.

Análisis de la población folicular

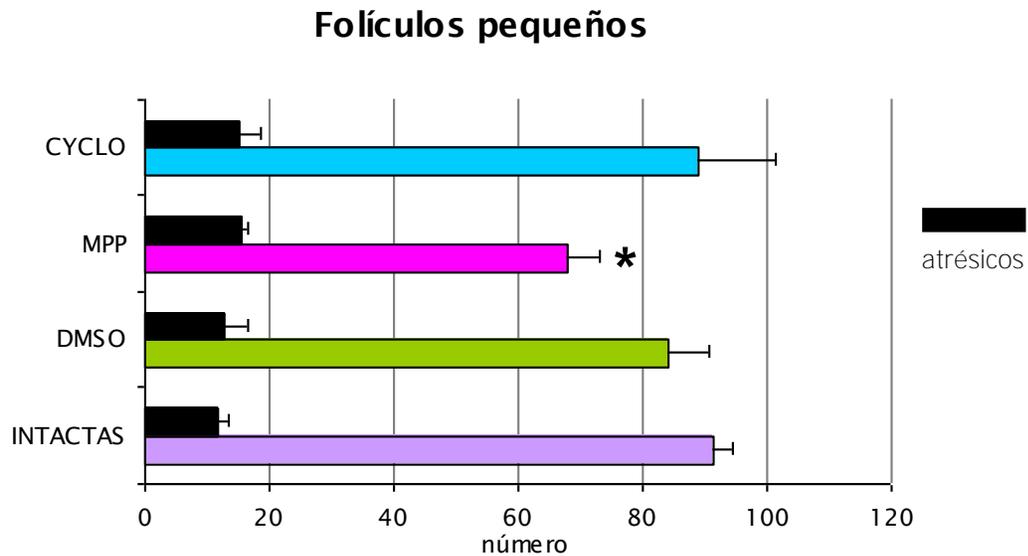
Efectos del bloqueo de los RE α o β en la mañana del diestro-1

Cuando los animales fueron sacrificados en la **mañana del proestro**, solamente el bloqueo de los RE α (por la inyección de MPP) provocó disminución del número de folículos totales con respecto a la cantidad observada en los animales inyectados con DMSO (185 ± 10.4 vs. 217 ± 8.8 $p < 0.05$) (Gráfica 15).



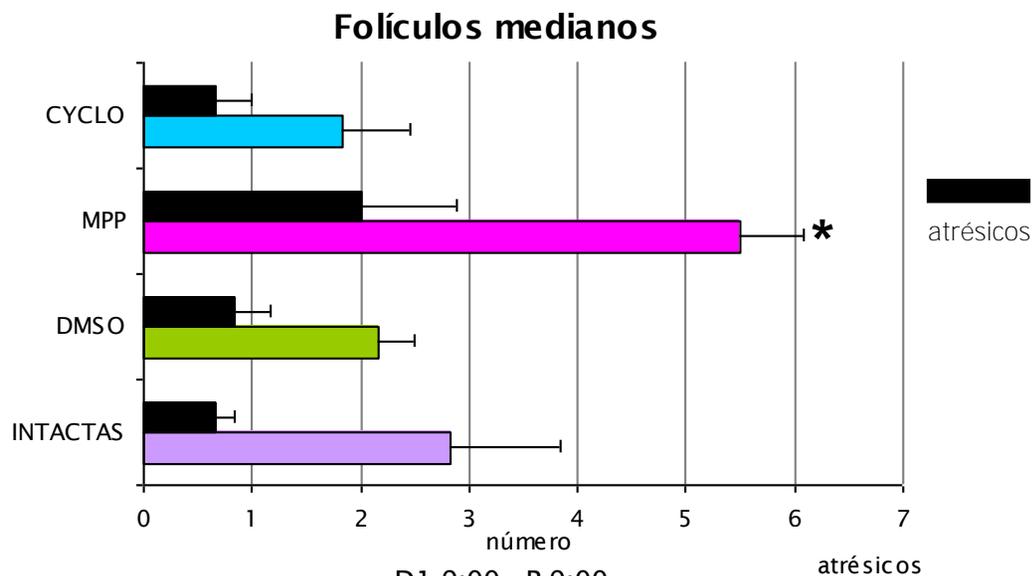
Gráfica 15 Media \pm e.e.m. del número de folículos totales medidos en ambos ovarios de ratas intactas o inyectadas en la mañana del diestro-1 con DMSO, MPP ó cyclofenil y sacrificadas en la mañana del proestro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.

Este efecto del bloqueo de los RE α ocurrió por disminución del número de folículos pequeños sanos (67.8 ± 4.1 vs. 84.0 ± 6.3 $p < 0.05$), sin modificaciones en el número de folículos pequeños atrésicos (Gráfica 16). No se observaron modificaciones en la población folicular de los otros grupos experimentales.



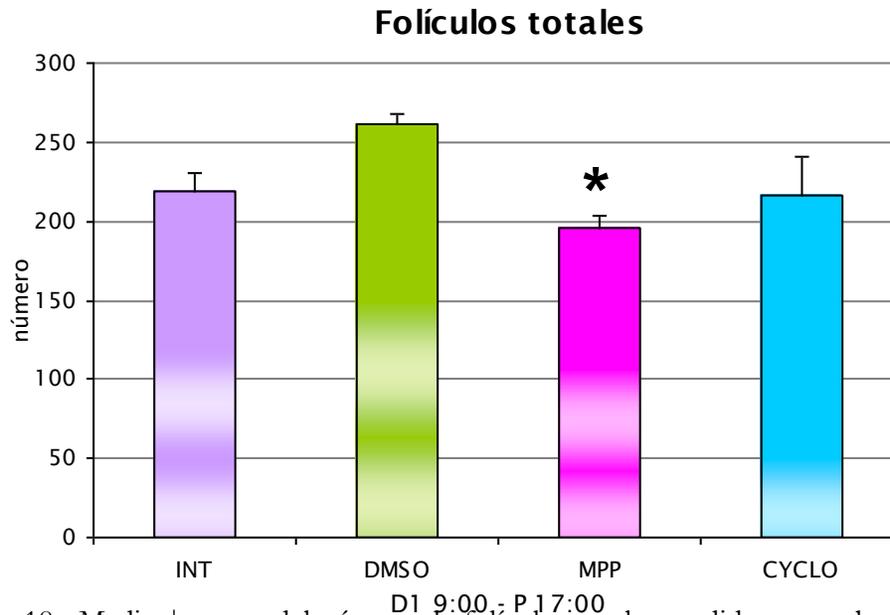
Grafica 16. Media \pm e.e.m. del número total de folículos pequeños sanos o atrésicos medidos en ambos ovarios de ratas intactas o inyectadas con DMSO, con MPP o con cyclofenil en la mañana del diestro-1 y sacrificadas en la mañana del proestro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.

En cambio, este tratamiento provocó aumento del número de folículos medianos sanos, con respecto a la cantidad observada en los animales inyectados con DMSO (5.5 ± 0.5 vs. 2.1 ± 0.3 $p < 0.05$) (Gráfica 17), sin modificaciones en los folículos medianos atrésicos. Este tratamiento no modificó el número de folículos preovulatorios (Tabla 3).



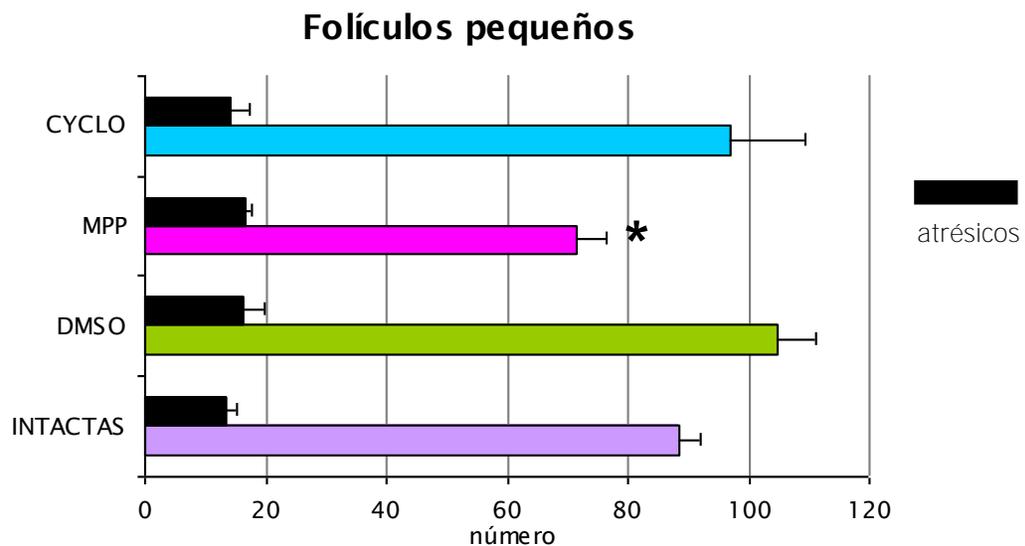
Grafica 17. Media \pm e.e.m. del número total de folículos medianos sanos o atrésicos medidos en ambos ovarios de ratas intactas o inyectadas con DMSO, con MPP o con cyclofenil en la mañana del diestro-1 y sacrificadas en la mañana del proestro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.

Cuando los animales fueron sacrificados en la **tarde del proestro**, el número total de folículos disminuyó con la inyección de MPP con respecto al grupo de animales inyectados con DMSO (261 ± 6.8 vs. 196 ± 7.5 $p < 0.05$) (Gráfica 18).



Gráfica 18. Media \pm e.e.m. del número de folículos totales medidos en ambos ovarios de ratas intactas o inyectadas en la mañana del diestro-1 con DMSO, MPP ó cyclofenil y sacrificadas en la tarde del proestro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.

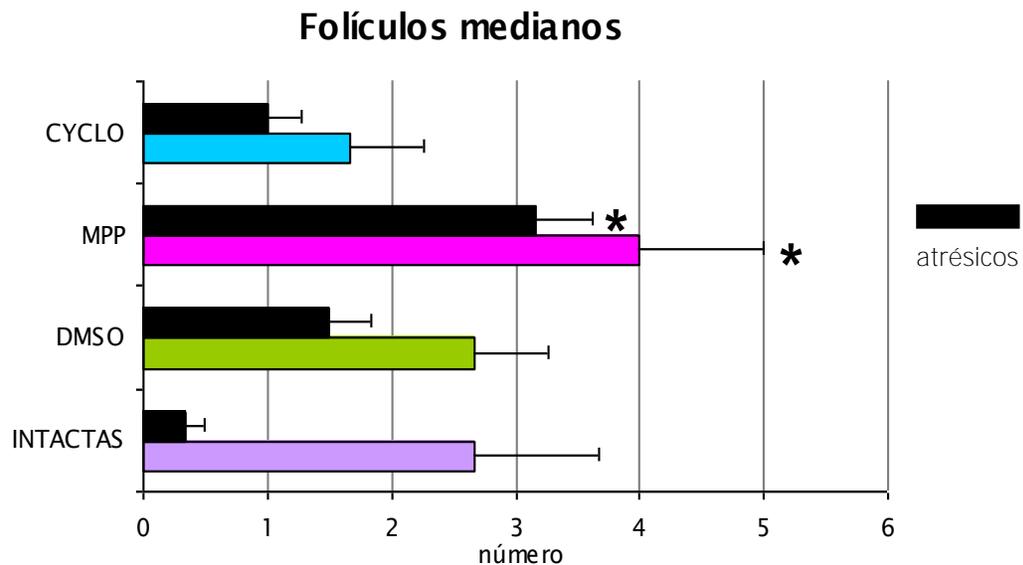
Este efecto del bloqueo de los RE α ocurrió por disminución del número de folículos pequeños sanos (71.3 ± 3.5 vs. 104.6 ± 2.1 $p < 0.05$). Sin modificaciones en el número de folículos atrésicos pequeños. (Gráfica 19).



Gráfica 19. Media \pm e.e.m. del número de folículos pequeños medidos en ambos ovarios de ratas intactas o inyectadas en la mañana del diestro-1 con DMSO, MPP ó cyclofenil y sacrificadas en la tarde del proestro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO.

En este día del ciclo estral, el bloqueo de los RE α aumentó el número de folículos medianos sanos (4 ± 1 vs. 2.6 ± 0.6 , $p<0.05$) y atrésicos (3.1 ± 0.4 vs. 1.5 ± 0.3 , $p<0.05$) con respecto a la cantidad observada en los animales inyectados con DMSO (Gráfica 20).

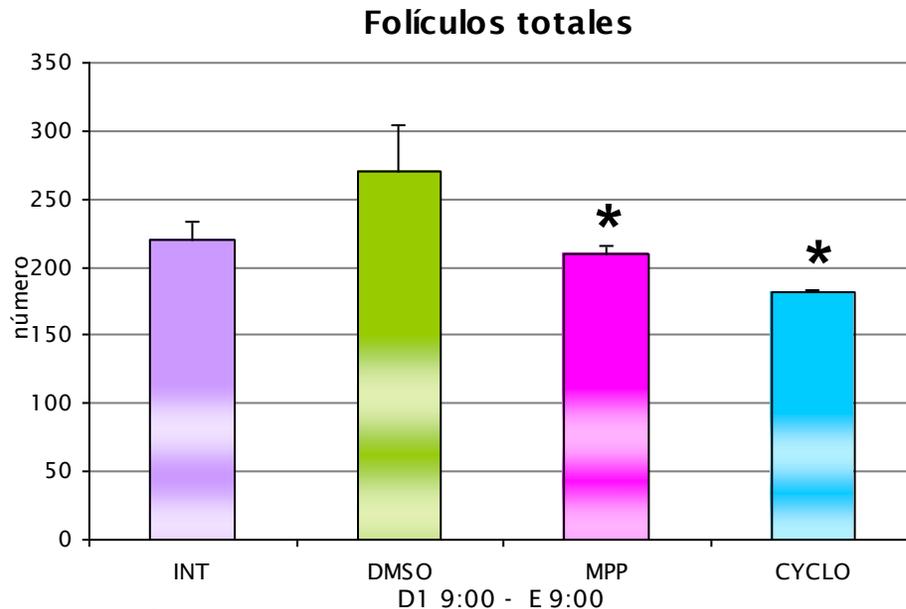
Ninguno de los tratamientos modificó el número de folículos preovulatorios (Tabla 3).



Gráfica 20 Media \pm e.e.m. del número de folículos medianos medidos en los ovarios de ratas intactas o inyectadas en la mañana del diestro-1 con DMSO, MPP ó cyclofenil y sacrificadas en la tarde del proestro. * $p<0.05$ vs. grupo con DMSO.

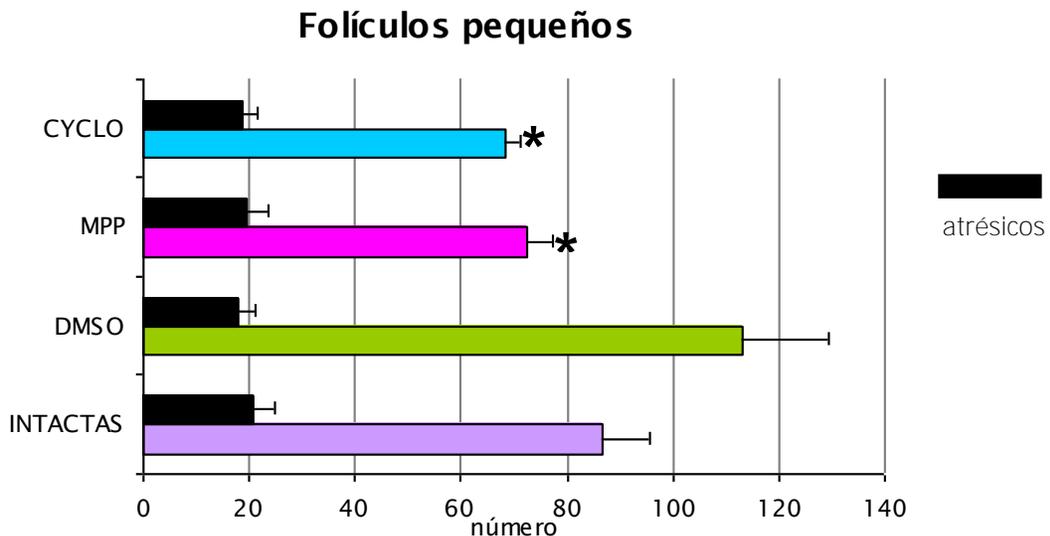
Cuando los animales fueron sacrificados en la **mañana del estro**, se observó disminución del número de folículos del número de folículos totales por el bloqueo del RE α , por la inyección de MPP (209 ± 5.8 vs. 270 ± 21.7 $p<0.05$), ó por el bloqueo de los RE β , por la inyección de cyclofenil (181 ± 0.8 vs. 270 ± 21.7 $p<0.05$ con respecto a los animales inyectados con DMSO (Gráfica 21).

Este efecto del bloqueo de los RE α ocurrió por disminución del número de folículos pequeños sanos (72.5 ± 4.7 vs. 113.3 ± 16.9 $p<0.05$) (Gráfica 22).



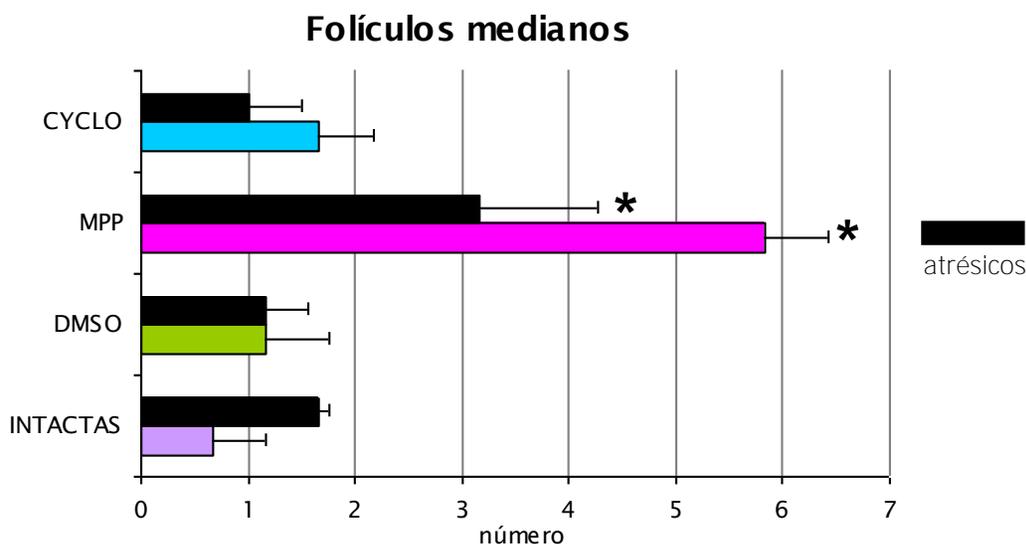
Gráfica 21 Media \pm e.e.m. del número de folículos totales medidos en ambos ovarios de ratas intactas o inyectadas en la mañana del diestro-1 con DMSO, MPP ó cyclofenil y sacrificadas en la mañana del estro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO

Hasta la mañana del estro, se observó que el bloqueo de los RE β en la mañana del diestro-1, también disminuyó el número de folículos sanos pequeños (68.3 ± 2.7 vs. 113.3 ± 16.9 $p < 0.05$) con respecto a la cantidad observada en los animales inyectados con DMSO. Ninguno de estos tratamientos modificó el número de folículos atrésicos (Gráfica 22).



Gráfica 22 Media \pm e.e.m. del número de folículos pequeños medidos en ambos ovarios de ratas intactas o inyectadas en la mañana del diestro-1 con DMSO, MPP ó cyclofenil y sacrificadas en la mañana del estro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO

En este día del ciclo estral, el bloqueo de los RE α aumentó el número de folículos medianos sanos (5.8 ± 1 vs. 1.1 ± 0.4 , $p < 0.05$) y atrésicos (3.1 ± 0.6 vs. 1.1 ± 0.6 , $p < 0.05$) con respecto a la cantidad observada en los animales inyectados con DMSO (Gráfica 23).



Gráfica 23 Media \pm e.e.m. del número de folículos medianos sanos y atrésicos de ratas intactas o inyectadas en la mañana del diestro-1 con DMSO, MPP ó cyclofenil y sacrificadas en la mañana del estro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO

Con respecto a los animales intactos, solamente en el ovario derecho, la inyección de DMSO en la mañana del diestro-1 provocó aumento del porcentaje de folículos preovulatorios sanos cuantificados en la mañana del estro. El bloqueo del RE α y del β disminuyó el porcentaje de folículos preovulatorios sanos del ovario derecho con respecto a los inyectados con DMSO (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos de la inyección de DMSO, MPP o cyclofenil en la mañana del diestro 1, sobre el *porcentaje* de folículos sanos preovulatorios de animales sacrificados a las 9:00 y 17:00 hrs del proestro y a las 9:00 hrs del estro. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO

Día	Proestro 9:00			Proestro 17:00			Estro 9:00		
	O I	O D	Total	O I	O D	Total	O I	O D	Total
Intacto	94	77	85.5	92	77	84.5	50	0	25
DMSO	76	61	68.5	70	61	65.5	50	100	75
MPP	67	72	69.5	67	72	69.5	56	61*	58.5
Cyclofenil	67	82	74.5	57	82	69.5	67	50*	58.5

Tabla 4. Resumen de resultados de los efectos del bloqueo de los RE α y RE β en diestro-1 evaluados en horas posteriores al tratamiento.

	Peso de los ovarios	Peso del útero	Estradiol	Progestinona	FSH	LH	Folículos			
							Totales	Pequeños	Medianos	Preovulatorios
Diestro-2 9:00 hrs.	≈	≈	≈	↓ vehículo	≈	≈	/	/	/	/
Proestro 9:00 hrs	↓ RE α	≈	↓ RE β	≈	↑ vehículo ↓ RE β	≈	↓ RE α	↓ RE α	↑ RE α	↑ RE α
Proestro 17:00 hrs	≈	≈	≈	≈	≈	≈	↓ RE α	↓ RE α	↑ RE α	≈
Estro 9:00 hrs	≈	≈	≈	≈	≈	≈	↓ RE α	↓ RE α	↑ RE α	↓ RE α
							↓ RE β	↓ RE β		↓ RE β

Efectos del bloqueo de los RE α y RE β en la mañana del proestro evaluados ocho horas después al tratamiento.

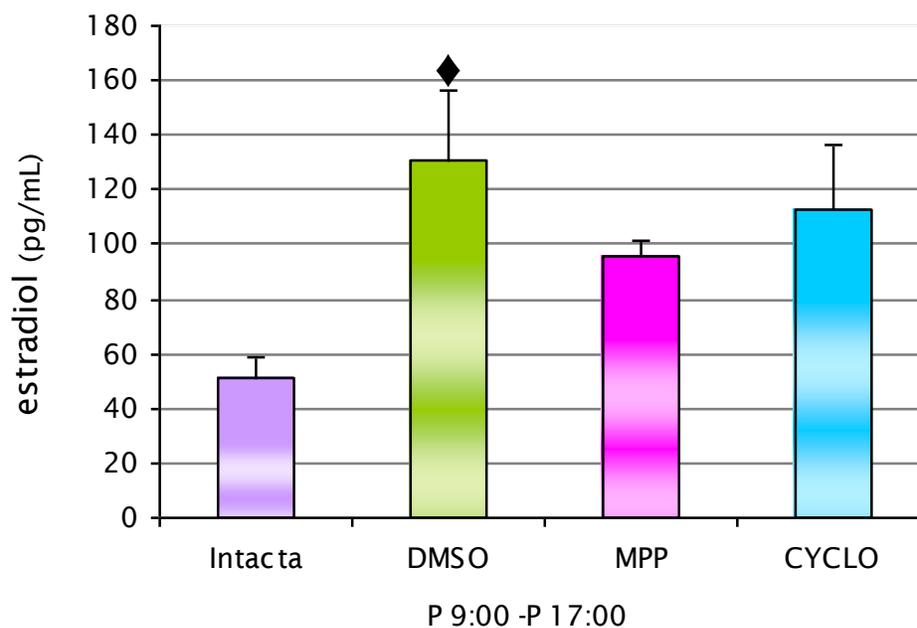
Dado que el bloqueo de los receptores α o β en el día del proestro provocó efectos significativos en el número de ovocitos liberados, grupos de ratas fueron inyectados a las 09:00 horas del proestro y sacrificados a las 17:00 horas del mismo día. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

El peso de los ovarios y peso del útero no se modificaron por ninguno de los tratamientos.

Cuantificación hormonal

Estradiol

El bloqueo de los REs llevado a cabo en la mañana del proestro no modificó la concentración del estradiol, solo el vehículo provocó aumentó en la concentración de estradiol ocho horas después de su inyección (17:00 h del proestro) (131.1 ± 26 vs. 51.6 ± 7.2 , $p < 0.05$) (Gráfica 24).

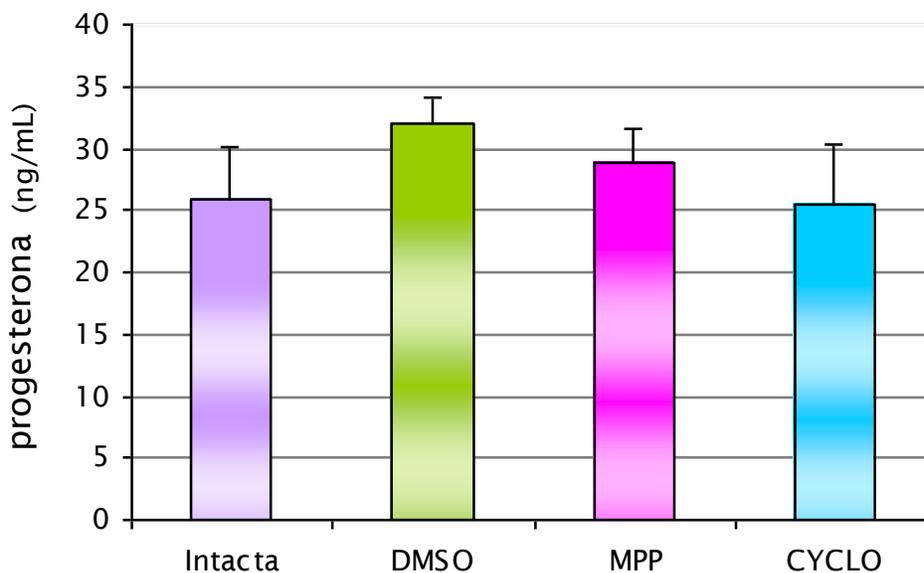


Gráfica 24. Media + e.e.m. de la concentración de estradiol, de animales inyectados en la mañana del proestro con vehículo, MPP o cyclofenil y evaluados ocho horas posteriores.

◆ $p < 0.05$ vs. grupo con Intacto.

Progesterona

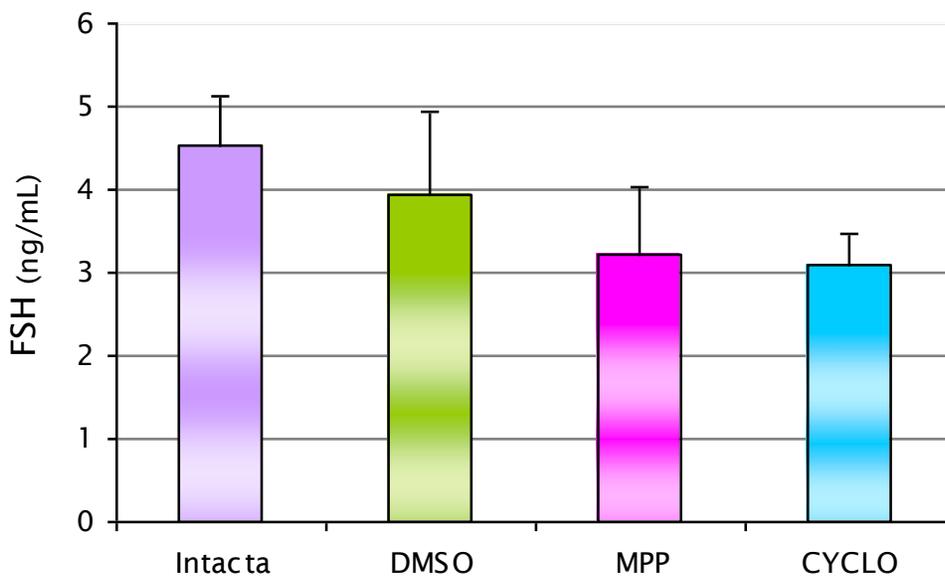
Ninguno de los tratamientos llevados a cabo en la mañana del proestro modificaron la concentración de progesterona en la tarde de este día (Gráfica 25)



Gráfica 25. Media + e.e.m. de la concentración de progesterona, de animales inyectados en la mañana del proestro, con vehículo, MPP o cyclofenil y evaluados en ocho horas posteriores.

Hormona estimulante del folículo

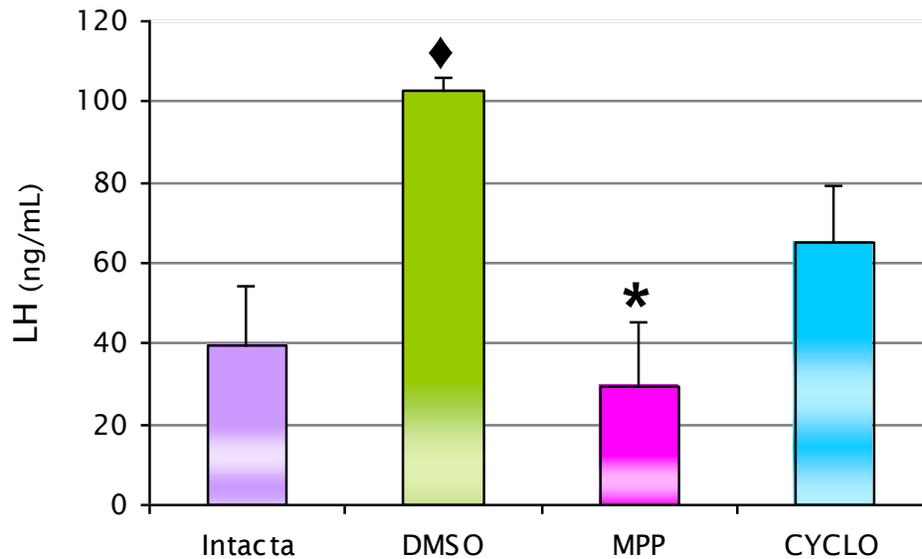
La inyección de DMSO, MPP o cyclofenil en la mañana del proestro no modificó la concentración de FSH en la tarde de este día (Gráfica 26).



Gráfica 26. Media + e.e.m. de la concentración de la hormona estimulante del folículo, de animales inyectados en la mañana del proestro con vehículo, MPP o cyclofenil evaluados en ocho horas posteriores.

Hormona Luteinizante

En la mañana del proestro, la inyección del vehículo incrementó la concentración de la LH a las ocho horas (102.8 ± 3.9 vs. 39.4 ± 15 , $p < 0.05$), efecto que fue bloqueado por el tratamiento con MPP (29.2 ± 16 vs. 102.8 ± 3.9 , $p < 0.05$) (Gráfica 27).



Gráfica 27. Media + e.e.m. de la concentración de la hormona luteinizante, de animales inyectados en la mañana del proestro con vehículo, MPP o cyclofenil y evaluados en ocho horas posteriores. * $p < 0.05$ vs. grupo con DMSO, ♦ $p < 0.05$ vs. grupo con Intacto.

Tabla 5. Resumen de resultados de los efectos del bloqueo de los $RE\alpha$ y $RE\beta$ en la mañana del proestro evaluados ocho horas después al tratamiento.

Peso de los ovarios	Peso del útero	Estradiol	Progesterona	FSH	LH
≈	≈	↑ vehículo	≈	≈	↑ vehículo ↓ $RE\alpha$

Discusión

En la rata adulta, la unión del estradiol a los RE α controla la ovulación de manera diferente durante el ciclo estral. En las fases de diestro-1, el estradiol inhibe el crecimiento folicular y la ovulación al unirse a RE α , mientras que, en el proestro su función sería estimulante. En cambio, el estradiol al unirse al RE β auto-regula de manera estimulante su secreción y no participa en el crecimiento y desarrollo de los folículos.

El RE α ha sido identificado por medios inmuno-histoquímicos en las células de la teca de los folículos en las diferentes etapas de desarrollo, en las células de la glándula intersticial y del estroma (Sar y Wellsch, 1999; Peletier, 2000), en algunas células dispersas entre las células de la granulosa (Shughrue y col, 1998; Wang y col, 2000), así como en el epitelio germinal (Sar y Wellsch, 1999). La LH estimula la síntesis de andrógenos al actuar sobre las células de la teca (Freeman 1994). Estos andrógenos son aromatizados a estradiol en las células de la granulosa. Dado que el estradiol regula la síntesis de los receptores a FSH y a su vez la FSH estimula la división mitótica de las células de la granulosa (Freeman 1994), es posible que la unión del estradiol al RE α en las células de la teca regule de manera inhibitoria la síntesis de andrógenos, por lo que no se alteraría la atresia en los folículos, hecho que favorecería la expresión de los receptores a FSH y por tanto la división mitótica de las células de la granulosa. Se ha sugerido que el RE β es necesario para modular y mantener la salud de los folículos (Fitzpatrick y col., 1999), lo que explicaría que en los animales inyectados con el antagonista-RE α , la atresia de los folículos no se altera. Por otra parte, la unión del estradiol al RE β no estaría involucrado en la regulación de la esteroidogénesis, ya que en estos grupos experimentales la concentración de estradiol y progesterona no se modificó respecto al grupo inyectado con DMSO o al de ratas intactas pero sí se altera la atresia folicular, ya que ésta aumenta en folículos preovulatorios, lo que apoyaría la idea propuesta por Fitzpatrick y colaboradores (1999).

Aparentemente, el estradiol al unirse al RE α regularía de manera asimétrica el crecimiento folicular y por lo tanto el número de ovocitos liberados, ya que en el día del sacrificio, el día del estro, disminuyó el número de folículos preovulatorios y aumentó el número de ovocitos liberados sólo en el ovario derecho de las ratas tratadas con el antagonista al RE α . Se desconoce cómo es regulada la expresión de los RE α en el ovario pero es posible que sea por señales nerviosas diferenciales entre uno y otro ovario, lo que explicaría el efecto asimétrico antes señalado. Toht y col. (2007) muestran que hay mayor número de conexiones entre el cerebro y el ovario izquierdo que con el derecho.

Este papel funcional asimétrico del RE α parecería ser constante ya que también se observó en los animales inyectados con el antagonista al RE α en el día del proestro, lo que

apoyaría la idea de diferente manifestación de este receptor entre los ovarios, expresada como cantidad de receptores, afinidad o función. Esta asimetría quizá se manifieste por la disminución en la concentración de la LH en la tarde del proestro en comparación con los animales inyectados con el DMSO.

Con base en los resultados obtenidos por el bloqueo de los RE β sugerimos que en diestro-1, la activación de este receptor regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de estradiol. Dado que la caída en la concentración de estradiol cuantificada en la mañana del proestro (09:00 horas) no altero la secreción preovulatoria de ambas gonadotropinas en la tarde de este día, podemos pensar que el “pico” preovulatorio de estradiol se retrasó.

Este hecho nos lleva a sugerir que el ciclofenil actuó principalmente sobre los RE β del ovario. Por estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, se ha mostrado que este receptor esta presente en las células de la granulosa de folículos en crecimiento pero dicha inmunoreactividad es mayor en los folículos preovulatorios (Byers y col, 1997, Wang y col, 2000). Con base en estos resultados sugerimos que los RE β regularían de manera estimulante la secreción de estradiol, quizá al regular la síntesis de receptores a la FSH, la cual en turno regularía la actividad aromataasa de las células en la granulosa.

La distribución de los folículos en los animales inyectados en diestro-1 con el antagonista a los RE β no cambio significativamente sino hasta la mañana del estro esperado; día en que disminuyeron los folículos pequeños. Es posible que la falta de actividad del RE β en las células de la granulosa regulara a la alta la síntesis del RE α y, en consecuencia se detuviera el crecimiento de estos folículos. Se ha mostrado que después de secreción preovulatoria de la LH en el día del proestro, la expresión del ARNm del RE β disminuye en los folículos de la granulosa de los folículos preovulatorios (Byers y col, 1997).

Se ha sugerido que debido a que el RE β está presente exclusivamente en las células de la granulosa, el estradiol por medio de este receptor regularía el crecimiento y maduración de los folículos (Sar y Welsch, 1999). Nuestros resultados no apoyan esta hipótesis.

El bloqueo de los RE β en proestro no modificó ninguno de los parámetros estudiados cuando los animales son sacrificados en la tarde de este día, sin embargo en la mañana del estro, se observó disminución del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, del peso de ambos ovarios y del útero. Una posible explicación a estos cambios es que el RE β regule mecanismos relacionados con el proceso ovulatorio y con la expresión de receptores a FSH en los folículos que entrarán en crecimiento como resultado del estímulo provocado por el pico de FSH que se da en el día del estro (Freeman 1994). La disminución del peso del útero podría estar relacionado con el retraso del “pico” de estradiol que suponemos haya ocurrido, ya que este órgano refleja de forma paralela los cambios en la concentración del estradiol. Por medio de

hibridación *in situ* en úteros de ratas en las diferentes etapas del ciclo estral, se mostró que la expresión del ARNm para el RE α es del doble en el día del proestro que en diestro-1, y no cambia en las otras dos fases del ciclo, mientras que el ARNm del RE β se mantiene constante durante el ciclo estral (Wang y col, 2000). Aún cuando por estudios inmuni-histoquímicos se mostró que en el útero la expresión del RE α se manifiesta en las células glandulares, musculares, del estroma y epiteliales del endometrio, mientras el RE β se localiza en el endometrio y en el núcleo en las células del epitelio glandular, es posible que el papel que ejerce el estradiol al unirse al RE α no este relacionado con sus funciones proliferativas sobre el útero, como ocurriría con el RE β , ya que al bloquear este receptor en diestro-2 o en proestro se observaron cambios en el peso de este órgano.

A partir de los resultados obtenidos por la inyección del vehículo en el día del diestro-1, sugerimos que la inyección del DMSO estimula la liberación ambas gonadotropinas. Dicho efecto estimulante sobre la liberación de FSH se manifiesta hasta la mañana del proestro, sin que se modifique la secreción preovulatoria de la tarde de este día. El efecto estimulante del DMSO sobre la LH ocurre durante la secreción preovulatoria, ya que la concentración de esta hormona en los animales inyectados con DMSO es el doble de la observada en el intacto, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Estos resultados nos permiten sugerir que este vehículo podría estar actuando en tres sitios del eje reproductor: sobre el hipotálamo, sobre la eminencia media, sobre la hipófisis o todos a la vez. Para analizar si sus efectos son en el hipotálamo, se sugiere medir el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH en el área preóptica-hipotalámica anterior a las mismas horas del diseño experimental. Esta estimulación de la secreción de gonadotropinas no afecta las funciones del ovario, ya que en el día del proestro, la concentración de estradiol y progesterona no se modificaron, ni el número de ovocitos liberados, ni el peso de los ovarios ni del útero.

En el día del proestro, el DMSO estimuló la secreción de estradiol y de LH, ya que cuando estas hormonas se cuantificaron a las 17:00 horas del proestro, ambas hormonas aumentaron 150% de la concentración del grupo de animales intactos. Este efecto estimulante del DMSO podría ser explicado por medio del siguiente mecanismo:

En el ovario, al estimular la síntesis de estradiol, la que aparentemente se prolongó hasta la tarde del proestro, ya que en esta cepa de ratas, la concentración de estradiol aumenta de las 09:00 a las 13:00 horas de este día del ciclo (Domínguez-González, 1998). Sin embargo, otra posibilidad es que se haya retrasado el “pico” de estradiol hasta las 17:00 horas del proestro por efecto de la inyección del DMSO.

Esta secreción de estradiol estimularía la frecuencia y amplitud de los pulsos de liberación de LH desde la hipófisis, ya que se ha mostrado que el estradiol que es secretado en este día, aumenta la frecuencia y la amplitud de los pulsos de LH (Freeman, 1994), o que este efecto en la hipófisis sea consecuencia del aumento en la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH, ya que pulsos de GnRH menores a 60 min estimula la síntesis del ARNm de la cadena β -LH (Freeman, 1994), lo que facilitaría la síntesis de LH.

Dado que el antagonista del RE α disminuyó significativamente los efectos provocados por el DMSO sobre la secreción de la LH, llevando las concentraciones de esta gonadotropina a valores semejantes a los observados en animales intactos, sugerimos que en la mañana del proestro, el estradiol unido a los RE α regula de manera estimulante la expresión de los receptores a GnRH en la hipófisis (efecto de imprimación del estradiol sobre los gonadotropos), ya que se ha señalado que pulsos de secreción de GnRH cada 30 min provocan altas concentraciones del receptor a la GnRH en la hipófisis y síntesis del ARNm de la cadena β de la LH, mientras que pulsos de baja frecuencia, cada 2 horas, resulta en bajas concentraciones del receptor de GnRH y síntesis de la cadena β de la FSH (Jeong y Kaiser, 2006). En cambio, el ciclofenil no parece participar en los mecanismos de regulación de la secreción de las gonadotropinas.

La disminución del peso del útero observada en los animales inyectados con DMSO en diestro-2 o proestro indicarían alteración en esteroidogénesis en el ovario, ya que el útero es un órgano blanco tanto de progesterona como de estradiol que ejercen efectos tróficos sobre el tejido de éste órgano (Gray y col., 2001). Además este hecho confirma la idea de que los efectos producidos por cualquier manipulación experimental dependen del día del ciclo estral en que se lleven a cabo.

Considerando los efectos producidos por el DMSO y con base en los resultados obtenidos por la inyección subcutánea del antagonista a los RE α en el día del diestro-1, sugerimos que la activación de estos receptores por la unión del estradiol detiene el crecimiento de los folículos pequeños, lo que se reflejara en el número los ovocitos liberados, ya que cuando se bloquearon estos receptores observamos disminución del número total de folículos medidos y una correlación entre disminución de los folículos pequeños ($<390 \mu\text{m}$), aumento de los medianos (391 a $500 \mu\text{m}$) y aumento del número de ovocitos liberados. El inicio del crecimiento de los folículos primordiales es independiente del efecto modulador de las gonadotropinas, es decir que su diferenciación y crecimiento depende de factores como el factor de crecimiento β (TGF- β), el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) (Adashi y col. 1989), el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Greenwald y Roy, 1994).

Conclusiones

1. El número de ovocitos liberados es regulado por estradiol al unirse al RE α , efecto que cambia durante el ciclo estral.
2. En la fase del diestro-1, el estradiol por medio de su unión a los RE α regula de manera inhibitoria el crecimiento folicular y el número de ovocitos liberados. Por el contrario, en proestro, el estradiol unido a los RE α estimula el número de ovocitos liberados.
3. En la fase del diestro-1, el estradiol al unirse a los RE β estimula la secreción preovulatoria de estradiol. Mientras unido a los RE α no la modifica.
4. En la fase de diestro-2, el estradiol al asociarse al RE β regula de manera inhibitoria el peso del útero; mientras que en el proestro su papel es estimulante.
5. En el día del proestro, el bloqueo de los RE α inhibe la secreción preovulatoria de la LH pero no la de la FSH.

Referencias

- Adashi E, Resnick C, Hernandez E, Svoboda M, Hoyt E, Clemmons D, Lund P, Van J. 1989. Rodent Studies on the Potential Relevance in Insuline-Like Growth Factor (IGF-I) to Ovarian Physiology. En: *Growth Factors and the Ovary*. New York. 125-136.
- Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. 1996. The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*. 62: 268-303.
- Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza CA, Cruz ME. 2003. Differential mRNA Expression of Alpha and Beta Estrogen Receptor Isoforms and GnRH in the Left and Right Side of the Preoptic and Anterior Hypothalamic Area During the Estrous Cycle of the Rat. *Endocrine*. 21(3): 251–260.
- Bartol F. 1999. Uterus, Nonhuman. En: *Encyclopedia of reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. Academic Press: EUA. 4:950-960.
- Bloom, Fawcett DW. 1995. Tratado de Histología. 2ª. Ed. Interamericana: México. Págs. 886-904.
- Bowman SP, Leake A, Morris ID. 1982. Biological activity and steroid receptor interactions of Cyclofenil with the oestrogen target tissues of the brain, pituitary gland and uterus of the rat. *Journal of Reproduction and Fertility*. 65:355-366.
- Brown TR. 1999. Steroid Hormones, Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. Academic Press: EUA. 4:634-644.
- Butler JA, Sjoberg M, Coen CW. 1999. Evidence for estrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *Journal of Neuroendocrinoly*. 11: 331-335.
- Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. 1997. Estrogen Receptor- β mRNA Expression in Rat Ovary: Down-Regulation by Gonadotropins. *Molecular Endocrinology*. 11:172-182.
- Carrillo VM, Martínez SR, Ayala ME, Monroy JM, Matsumara PD, Cruz ME, Domínguez RC. 2004. Efecto de la administración de Tamoxifen (TX) en el diestro-1 (D1), sobre la concentración de gonadotropinas en la rata adulta. 47 Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. C-107.
- Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. 1990. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrine Reviews*. 11:201-222.
- Carsten ME, Miller JD. 1990. Uterine function: Molecular and cellular aspects. Plenum: New York. 605 p.
- Celotti F, Avogadri N, Melcangi RC, Milani S, Negri-Cesi P. 1984. Cyclophenil, a non-steroidal compound with a higher central than peripheral oestrogenic activity: study of its effects on uterine growth and on some central parameters in castrated female rats. *Acta Endocrinologica*. 107(3):340-5.
- Centola GM. 1983. Atrésia. En: *The Ovary. Structural Changes*. Ed. Martini L. Raven Press: New York. Págs: 113-120.

- Davis AM, Ellersieck MR, Grimm KM, Rosenfeld CS. 2006. The Effects of the Selective Estrogen Receptor Modulators, Methyl-Piperidino-Pyrazole (MPP), and Ramoxifene in Normal and Cancerous Endometrial Cell Lines and the Murine Uterus. *Molecular Reproduction and Development*. 73:1034-1044.
- Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. 1991. La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos selectos de Biología de la reproducción. Ed. Domínguez R. Miguel Ángel Porrua: México. Págs. 164-192.
- Domínguez-González, Damian-Matsumura P, Timossi C, Cruz ME, Domínguez R. 1998. Characterization of monoamine neural activity of the preoptic anterior hypothalamic area and medial basal hypothalamus during proestrus day, and its relation with gonadotrophin and sexual steroid hormone plasma levels. *Medical Science Research* 26 (4): 275-278.
- Drucker C. 2005. Fisiología médica. Manual Moderno: México. Págs. 595-599.
- Duax WL, Griffin JF, Weeks CM, Wawrzak Z. 1988. The mechanism or action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *Journal of Steroid Biochemistry*. 31(4B): 481-492.
- Enmark E, Gustafsson JA. 1996. Orphan nuclear receptors, the first eight years. *Molecular Endocrinology*. 10: 1293-1307.
- Enmark E, Gustafsson JA. 1999. Oestrogen receptors - an overview. *Journal Internal Medicine*. 246:133-138.
- Espey LL. 1999. Ovulation. En: *Encyclopedia of reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. Academic Press: EUA. 3:605-615.
- Espey LL, Lipner H 1994. Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. Raven Press: New York. 1: 725-780.
- Fitzpatrick SL, Funkhouser JM, Sindoni DM, Stevis PE, Deecher DC, Bapat AR, Merchenthaler I, Frail DE. 1999. Expression of estrogen receptor-beta protein in rodent ovary. *Endocrinology*. 140(6):2581-91.
- Freeman ME. 1994. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD.: New York. 2: 613-658.
- Funabashi T, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K, Kimura F. 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. *Progress Brain Research*. 141:165-73.
- Ganong W.2004. Fisiología médica. El Manual Moderno: México. Págs. 472-483.
- Garrido-Gracia JC, Gordon A, Bellido C, Aguilar R, Barranco I, Millan Y, de las Mulas JM, Sánchez-Criado JE. 2007. The integrated action of oestrogen receptor isoforms and sites with progesterone receptor in the gonadotrope modulates LH secretion: evidence from tamoxifen-treated ovariectomized rats. *Journal of Endocrinology*. 193, 107-119.
- Genazzani AR, Petraglia F, Mercuri N, Brilli G, Genazzani AD, Bergamaschi M, DeRamundo BM, Volpe A. 1990. Effect of steroid hormones and antihormones on hypothalamic beta-endorphin concentrations in intact and castrated female rats. *Journal of endocrinological investigation*. 13(2):91-6.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT. 1994. Follicular Steroidogenesis and Its control. En: *The physiology of reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. Raven Press: New York. 1:571-627.
- Grandien K Berkenstam A, Gustafsson JA. 1997. The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29(12):1343-69.

- Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. 2001. Developmental Biology of Uterine Glands. *Biology of reproduction*. 65:1311–1323.
- Greenwald GS, Roy SK. 1994. Follicular development and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E, JD Neill. Raven Press: New York. 1:629-724.
- Guyton A, Hall J. 2001. Tratado de Fisiología Médica. 10ª. Edición. McGraw-Hill Interamericana: México. Págs 1115-1123.
- Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, Kosemund D, Müller G, Hillisch A, Walker A, Kraetzschmar, Fritzscheier KH. 2004. Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93: 5129-5134.
- Herbison AE. 1998. Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology Review*. 19: 302-330.
- Hinshelwood MM. 1999. Steroidogenesis, Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill J. Academic Press: EUA. 4:644-653.
- Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Momoeda M, Tsutsumi O, Taketani Y, Muramatsu M. 1999. Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. *Journal of Molecular Endocrinology*. 22: 37-44.
- Hirschfield AN. 1997. Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. *Environmental and molecular mutagenesis*. 29: 10-15.
- Hirschfield AN, Midgley AR. 1978. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction*. 19: 597-605.
- Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. 2000. Detection of Estrogen Receptor-B Messenger Ribonucleic Acid and ^{125}I -Estrogen Binding Sites in Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons of the Rat Brain. *Endocrinology*. 141:3506-3509.
- Ing NH. 1999. Steroid hormone receptors Overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Eds. Knobil E, Neill J. Academic Press. EUA. 654-661.
- Jaffe RB. 2001. Regulación neuroendocrinometabólica del embarazo. En: *Endocrinología de la Reproducción*. 4ª. Edición. Eds. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. Editorial Médica Panamericana: México. Págs. 119-143.
- Jeong KH, Kaiser U. 2006. Gonadotropin Releasing Hormone Regulation of Gonadotropin Biosynthesis and Secretion. En: *Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. Raven Press: EUA. 31:1635-1700.
- Jordan VC, Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman ME. 1985. Structure-activity relationships of estrogens. *Environmental Health Perspect*. 61:97-110.
- Kilen SM, Schwartz NB. 1999. Estrous cycle. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil E, Nelly JD. Academic Press. USA. 2:127-136.
- Koike S, Sakai M, Muramatsu M. 1987. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Research*. 15(6):2499-513.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JÅ. 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93: 5925-5930.

- MacGregor JI, Jordan VC. 1998. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological reviews*. 50(2):151-96.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Shultz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Manuel M, Chambon P, Evans RM. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83: 835–839.
- Martínez-Reyes S. 2005. Efecto de la administración de Tamoxifen en los días del diestro 2 o proestro sobre la ovulación espontánea de la rata adulta. Tesis de Licenciatura de Biólogo. FES. Zaragoza México.
- McLean MP, Khan I, Puryear TK, Gibori G. 1989. Estradio-Induced Synthesis and Translation of Specific Proteins in the Corpus Luteum. En: *Growth Factors and the Ovary*. Ed. Hirshfield AN. Plenum: New York. 363-368.
- Mendoza-Garcés L, Arteaga-López P, Domínguez R, Cerbón M., Arrieta-Cruz, Flores A, Cruz ME. 2007. Changes in the number of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells on POA-AHA during the estrous cycle of the rat. 40th *Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*. Texas. Abstract 128:106.
- Muthyala RS, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. 2003. Exploration of the bicyclo[3.3.1]nonane system as a template for the development of new ligands for the estrogen receptor. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 15;13(24):4485-4488.
- Oliver RH, Chen GD, Yeh J. 1999. Follicular Atresia. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neil J. Academic Press: EUA. 2:373-375.
- O'Malley BW, Strott AC. 2001. Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En: *Endocrinología de la Reproducción*. 4ª. Edición. Eds. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. Editorial Médica Panamericana: México. Págs. 119-143.
- Papka RE, Storey-Workley M, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Collins JJ, Usip S, Saunders PT, Shupnik M. 2001. Estrogen receptor- α and - β immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. *Cell Tissue Res* 304:193–214.
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F. 2000. Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology*. 165: 359-370.
- Pérez EP. 1995. Infertilidad, Esterilidad y Endocrinología de la Reproducción, un toque integral. *Ciencia y Cultura Latinoamericana*: México. 287-325.
- Rao BR. 1998. Isolation and characterization of an estrogen binding protein which may integrate the plethora of estrogenic actions in non-reproductive organs. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 65:3-41.
- Rollerova E, Urbancikova. 2000. Intracellular Estrogen Receptor, their characterization and function (Review). *Endocrine Regulations*. 34: 203-218.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. 2005. *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular*. 4º ed. Médica Panamericana, México, 728-788.
- Ross MH, Lynn JR, Kaye GI. 1997. *Histología texto y atlas color*. 3º ed, Médica Panamericana, México, 674-690.
- Sánchez-Criado JE. 2003. Fisiología del ovario. En: *Fisiología humana*. Ed. Tresguerres J.A. 2ª Ed. McGraw-Hill Interamericana: México. 1036-1048.
- Sar M, Welsch F. 1999. Diferencial Expresión of Estrogen Receptor- β and Estrogen Receptor- α in the Rat Ovary. *Endocrinology*. 140: 963-971.

- Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y. 1997. Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *Anatomical Record*. 248: 76-83.
- Schwartz NB. 2000. Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicality. En: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Eds PM Conn, Freeman M. Raven Press: EUA. 135-145.
- Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ, Merchenthaler I. 1998. Comparative distribution of estrogen receptor- α (ER α) and β (ER β) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids*. 63: 498-504.
- Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I. 1998. Evidence for the colocalization of estrogen receptor- β mRNA and estrogen receptor- α immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology*. 139: 5267- 5270
- Silverman AJ, Levine I, Within JW. 1998. The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. Raven Press, Nueva York. 1:1683-1709.
- Smith CL. 1999. Estrogen Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill J. Academic Press. EUA. 2:119-126.
- Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Jun Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. 2000. Pyrazole Ligands: Structure-Affinity/Activity Relationships and Estrogen Receptor- α -Selective Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 43:4934-4947.
- Sun J, Meyers M. J, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. 1999. Novel Ligands that Function as Selective Estrogens or Antiestrogens for Estrogen Receptor- α or Estrogen Receptor- β . *Endocrinology*. 140(2):800-804.
- Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. 2002. Antagonists Selective for Estrogen Receptor α . *Endocrinology*. 143(3):941-947.
- Taleisnik S. 2006. Receptores celulares y la transducción de señales. Edit. Brujas. Argentina. Pp.272.
- Tamrazi A, Carlson EK, Daniels JR, Hurth KM, Katzenellenbogen JA. 2002. Estrogen Receptor Dimerization: Ligand Binding Regulates Dimer Affinity and Dimer Dissociation Rate. *Molecular Endocrinology*. 16:2706–2719.
- Tóth IE, Wiesel O, Boldogkoi Z, Bálint K, Tapasztó Z, Gerendai I. 2007. Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microscopy research and technique*. 70(8):710-8.
- Tsafiri A. 1995. Ovulation as a tissue remodeling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 377:121-40
- Tsafiri A, Reich R. 1999. Molecular aspects of mammalian ovulation. *Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes*. 107(1): 1-11.
- Ulloa-Aguirre A. 1991. Aspectos Bioquímicos-Funcionales de la Hormona Estimulante del Folículo .En *Temas Selectos de Biología de la Reproducción*. Domínguez R. Edit. Porrúa. México.
- Van BJ. 1999. Follicular development. En: *Encyclopedia of reproduction*. Eds. Knobil E, Neill J. Academic Press: EUA. 2 :376-388.
- Wang H, Eriksson H, Sahlin L. 2000. Estrogen Receptors α and β in the Female Reproductive Tract of the Rat During the Estrous Cycle. *Biology of Reproduction*. 63: 1331–1340

-
- Watson CS, Pappas TC, Gametchu B. 1995. The Other Estrogen Receptor in the Plasma Membrane: Implications for the Actions of Environmental Estrogens. *Environ Health Perspect.* 103(7): 41-50.
 - Watts CK, Sutherland RL. 1987. Studies on the ligand specificity and potential identity of microsomal antiestrogen-binding sites. *Molecular Pharmacology.* 31(5):541-51.
 - Weigel NL. 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochemical Journal.* 319(3):657-67.
 - Wintermantel TM, Campbell RP, Bock D, Gröne HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schütz, Herbison AE. 2006. Definition of Estrogen Receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone. *Neuron.* 52(19): 271-280.
 - Yao HH, Bahr JM. 1999. Ovary, overview. En: *Enciclopedia of reproduction.* Eds. Knobil E, Neill J. Academia Press: EUA. Págs. 590-595.
 - Yeh J, Adashi EY. 2001 El ciclo ovárico. En: *Endocrinología de la Reproducción.* Yen S, Jaffe R, Barbieri R.. Editorial Médica Panamericana. 4ª. Edición. México. Págs. 164-202.
 - Yen SS. 2001. Neuroendocrinología de la reproducción. En: *Endocrinología de la reproducción.* Yen S, Jaffe R, Barbieri R. Editorial Médica Panamericana. 4ª. Edición. México. Págs. 31-85.
 - Yong EL, Glasier A, Hillier H, Ledger W, Caird L, Beattie G, Sweeting V, Thong J, Baird DT. 1992. Effect of cyclofenil on hormonal dynamics, follicular development and cervical mucus in normal and oligomenorrhoeic women. *Human Reproduction.* 7(1):39-43.