



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE
MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

**Laboratorio de Neuroendocrinología
UMIEZ**

**Efectos del bloqueo del RE- β de POA-AHA sobre la ovulación,
secreción de gonadotropinas y hormonas esteroideas.**

T E S I S

**Que para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

Presenta:

Deisy Rodríguez Alcocer





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad de Investigación de Biología de la Reproducción

Laboratorio de Neuroendocrinología

Efectos del bloqueo del RE- β de POA-AHA sobre la ovulación, secreción de gonadotropinas y hormonas esteroideas.

Autora:

Deisy Rodríguez Alcocer

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 Dios por darme salud y fortaleza.

A la Universidad Autónoma de México y a la Facultad de estudios Superiores Zaragoza por formarme profesionalmente.

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:

M.C. Carolina Sauer Ramírez

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán

Dr. Marco A. Rodríguez Medina

Dra. Ma. Teresa Corona Ortega

M. en C. Claudia F. Martínez Rodríguez

A mis padres Eliseo y Juanita por su confianza que han depositado en mi, su amor que me ha dado fortaleza y su ejemplo que me ha enseñado.

A mis hermanos Eliseo y José David por estar siempre conmigo, escucharme y apoyarme. Por que para ellos es este logro.

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

A todos las personas que en mi camino me han apoyado para terminar este proyecto y que me han compartido parte de su vida.

ÍNDICE

	<i>Páginas</i>
RESUMEN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	2
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.....	2
Hipotálamo.....	2
Hipófisis.....	8
GnRH y Neuronas GnRHérgicas.....	11
Citología de las neuronas GnRHérgicas.....	12
GnRH.....	14
Gen de GnRH.....	15
Síntesis de GnRH.....	16
Receptores a GnRH.....	18
Regulación de la secreción de GnRH.....	19
Importancia de la GnRH en las funciones reproductoras.....	20
Ciclo Estral de la Rata.....	20
FSH Y LH.....	24
Estructura y Síntesis de Hormonas Esteroides.....	26
Progesterona.....	28
Síntesis de progesterona.....	29
Acciones generales de la progesterona.....	30
Estrógenos.....	31
Estructura Química.....	32
Función de los Estrógenos sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis- Ovario y el Útero.....	35
Receptores a Estrógeno.....	36
Estructura Química.....	37
Subtipos o isoformas de receptores.....	39
Efecto de la unión de los estrógeno al RE de acción genómica.....	40
Isoforma alfa y beta.....	43
Localización de RE β	45
Funciones de RE β	47
Ciclofenil.....	48
Propiedades Químicas.....	48
Actividad Farmacológica.....	49
Tween.....	51
Propiedades Químicas.....	51
Actividad Farmacológica.....	51
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	54
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	55
MATERIAL Y MÉTODO.....	56
RESULTADOS.....	60
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	80
CONCLUSIONES.....	85
REFERENCIAS.....	86

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

El hipotálamo y la hipófisis conforman una unidad funcional cuya comunicación se establece por diversas hormonas peptídicas entre las cuales se encuentra, la hormona liberadora de la gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), cuya “secreción es modulada por hormonas esteroides, péptidos, opiodes, neurotransmisores y aminoácidos” (Yao y Bahr 1999). La GnRH es secretada por neuronas localizadas en el área preóptica (POA) y en el área hipotalámica anterior (AHA), cuyos axones establecen contacto con los capilares y venas del sistema porta hipotalámico-hipofisario, donde liberan la GnRH la que es transportada a la hipófisis anterior donde estimula de manera pulsátil la secreción de dos hormonas glucoproteicas: la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés).

Las gonadotropinas son glicoproteínas constituidas por dos subunidades; la alfa (α) y la beta (β). La actividad de estas hormonas requiere de la asociación de ambas subunidades, las que son sintetizadas y combinadas en los gonadotropos de la hipófisis anterior. (Ferin 1999, Schwartz 2000)

Las gonadotropinas actúan sobre el ovario, donde regulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos, la secreción de hormonas esteroides (estrógenos, progesterona y andrógenos) y péptidos (inhibina, activita, entre otros), la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. (Arimura 2000; Fink 2000; Halász 2000; Levine 2000)

HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una estructura bilateral que se localiza en la base del diencefalo, debajo del tálamo y está dividido por el tercer ventrículo en una porción izquierda y una derecha. Esta delimitado en la parte anterior por el quiasma óptico y en la parte posterior por los cuerpos mamilares (McGeer 1987), lateralmente está rodeado por el subtálamo, centralmente por la lámina terminal y en la parte dorsal por la comisura anterior. (Silverman 1994) (Figura 1 y 2).

El hipotálamo desempeña funciones nerviosas, endocrinas y vegetativas. Está constituido de células nerviosas o neuronas con sus prolongaciones, axones o dendritas, células gliales o de sostén y una rica red vascular. Las neuronas forman grupos celulares bien demarcados conocidos como núcleos, o agrupaciones no muy bien delimitadas conocidas como áreas. (Norris 1996; Palkovits 2000)

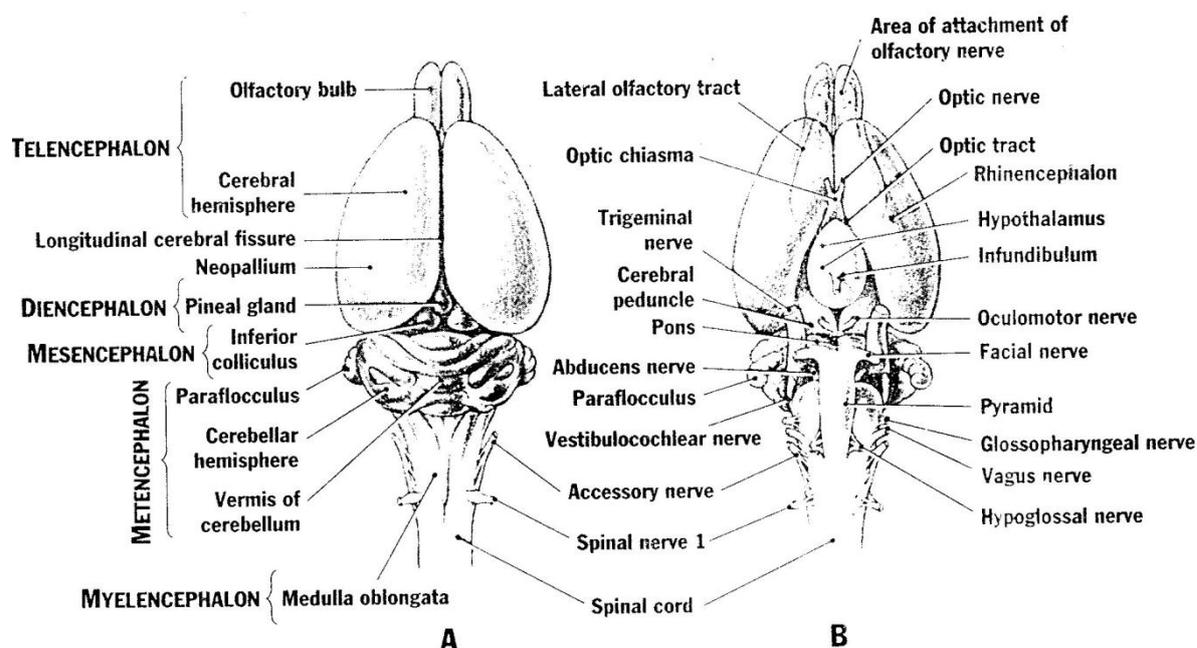


Figura 1. Cerebro de la rata. A) Vista dorsal y B) Vista Ventral

Paxinos G. The rat nervous system. 2ª ed. New York: Elsevier; 2004.

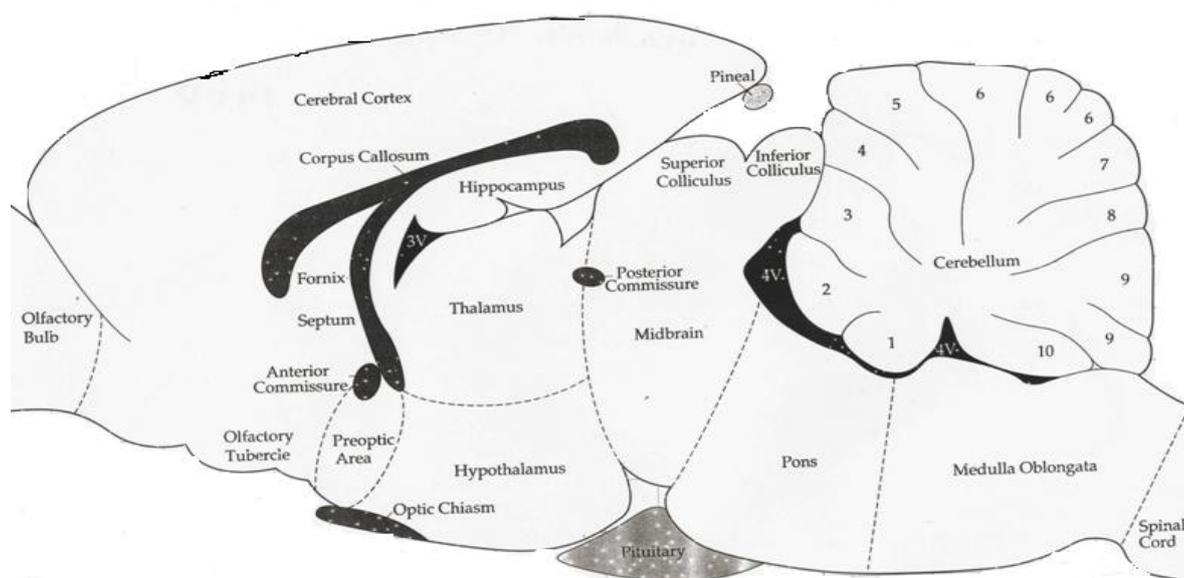


Figura 2. Esquema de la ubicación del hipotálamo

Paxinos and Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates: atlas. 4ª ed. San Diego California USA: Academic Press; 1990.

Según Palkovits, el hipotálamo se divide en cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente: el área preóptica (POA), el hipotálamo anterior, el hipotálamo medio y el hipotálamo posterior (Figura 3).

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

HIPOTÁLAMO ANTERIOR: Es una continuación del área preóptica. La parte medial está formada por los núcleos periventricular, supraquiasmático, hipotalámico anterior y paraventricular; la parte lateral contiene el núcleo supraóptico.

HIPOTÁLAMO MEDIO: En el hipotálamo medio se reconocen tres zonas: media basal, dorsal y lateral. La zona media basal incluye la eminencia media y los núcleos arcuato y ventromedial; la zona dorsal es ocupada completamente por el núcleo dorsomedial; al borde de la zona medial y lateral se localiza el núcleo perifornical.

La eminencia media situada en la base del tallo hipofisario en su capa externa recibe a los capilares del sistema portahipofisario, donde las neuronas parvicelulares depositan hormonas hipotalámicas que regulan el funcionamiento de la adenohipofisis, por lo que esta región también se le conoce como zona hipofisiotrófica.

HIPOTÁLAMO POSTERIOR: Representa una pequeña parte del hipotálamo y también se le conoce como región premamilar. Incluye los núcleos: Premamilar dorsal y ventral, tuberomamilar, supramamilar, hipotálamo posterior y núcleo arcuato.

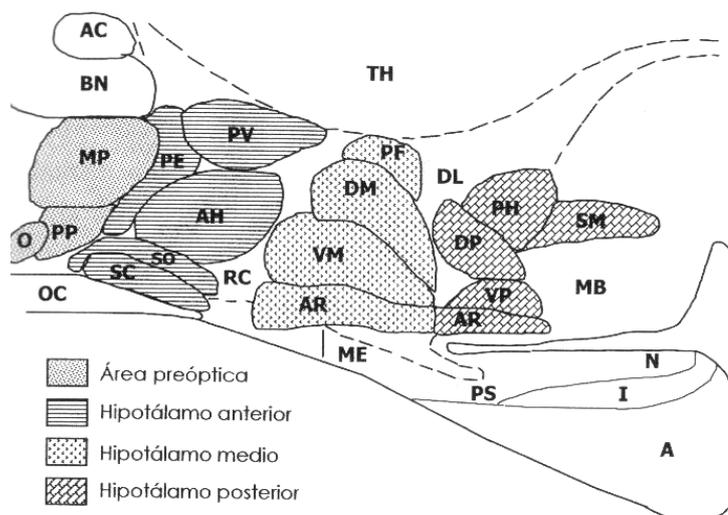


Figura 3. Corte sagital del cerebro de la rata, que muestra la distribución topográfica de los núcleos y áreas del hipotálamo. **A:** Hipófisis anterior, **AC:** Comisura anterior, **AH:** Núcleo hipotalámico anterior, **AR:** Núcleo arcuato, **Bn:** Base del núcleo de la estría terminal, **DL:** Área hipotalámica dorsolateral **DM:** Núcleo dorsomedial, **DP:** Núcleo dorsal premamilar, **I:** Lóbulo de la hipófisis intermedia, **LT:** Núcleo lateral tuberal, **MB:** Cuerpo mamilar, **ME:** Eminencia media, **MP:** Núcleo preóptico medial, **PE:** Núcleo hipotalámico periventricular, **PF:** Núcleo periformical, **PH:** Núcleo hipotalámico paraventricular, **PP:** Núcleo preóptico periventricular (medio), **PS:** Tallo hipofisiario, **PV:** Núcleo paraventricular, **RC:** Área retroquiásmática, **SC:** Núcleo supraquiásmático, **SM:** Núcleo supramamilar, **SO:** Núcleo supraóptico, **TH:** Tálamo, **VM:** Núcleo ventromedial, **VP:** Núcleo premamilar ventral (Palkovits 2000).

La porción del hipotálamo en la que nos enfocaremos en este estudio es el área POA-AHA, localizada en la parte rostral ó anterior del diencefalo. (Figura 4)

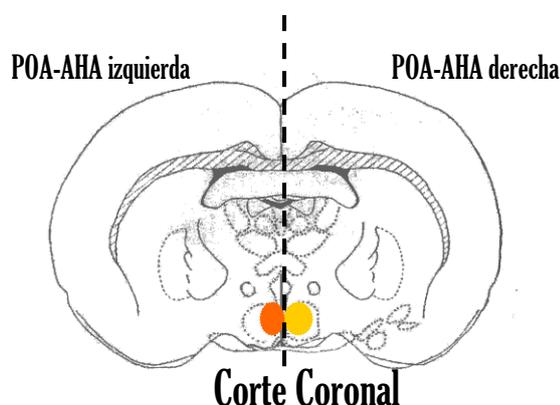


Figura 4. Zona de estudio: Área Preóptica Hipotalámica Anterior (POA-AHA), parte izquierda y derecha. König JF y Kilppel RA. The rat brain a stereoatatic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of Brain Stem. New York.: Krieger Publishing Co. Inc; 1967.

El hipotálamo tiene varias funciones, algunas de las cuales son: regular las funciones de la hipófisis, modular los mecanismos que regulan la temperatura corporal, los ritmos biológicos, el balance electrolítico, controlar las conductas emocionales (miedo, ira, euforia) y regular el hambre, sed, agresión y motivación sexual (*Brown 1994*). La comunicación neuroendocrina que mantiene con la hipófisis al secretar neurohormonas que actúan sobre las células de la adenohipófisis o que son acumuladas en las terminales que la inervan ¹.

Las neurohormonas liberadas por las neuronas del hipotálamo son: la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), hormona liberadora de la corticotropina (CRH), hormona liberadora de la tirotropina (THR), hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (GHIH) y el factor inhibidor de la liberación de la prolactina (PIF) (*Arimura 2000; Brown 1994; Halász 2000*).

Las hormonas hipotálamicas son transportadas a lo largo de los axones y liberadas de las terminales nerviosas dentro del plexo primario de los capilares del sistema de vasos portal hipofisarios (*Arimura 2000*). Estos capilares sanguíneos se conocen como sistema portal hipotálamo- hipofisario y derivan de las arterias hipofisarias superiores, se unen y forman las venas portales hipofisarias, que corren a través del tallo hipofisario, hasta llegar a la parte distal de la adenohipófisis, donde forman un plexo secundario de vasos llamado sinusoides hipofisarios (*Fink 2000*) (Figura 5). Una vez que las neurohormonas alcanzan la parte distal de la adenohipófisis interactúan con sus respectivos presentes en las células (*Arimura 2000*).

1. La neurosecreción consiste en la síntesis de neurohormonas o neurotransmisores en los ribosomas citoplasmáticos, el almacenamiento de los mismos en forma de gránulos en el aparato de golgi y transporte, mediante flujo axonal a la terminal nerviosa para secreción, ya sea a un vaso sanguíneo (neurohormona) o a otra neurona a través de una sinapsis (neurotransmisores).

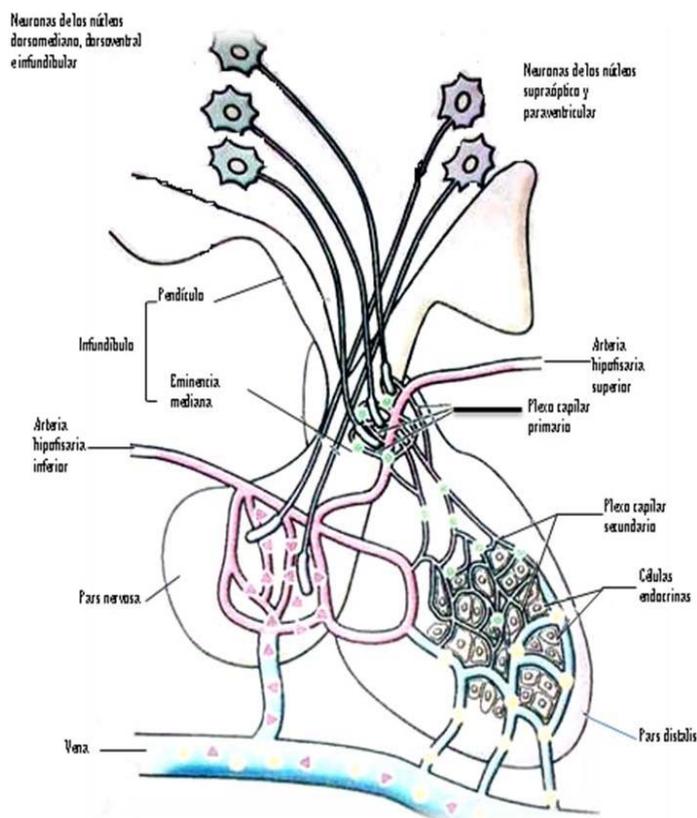
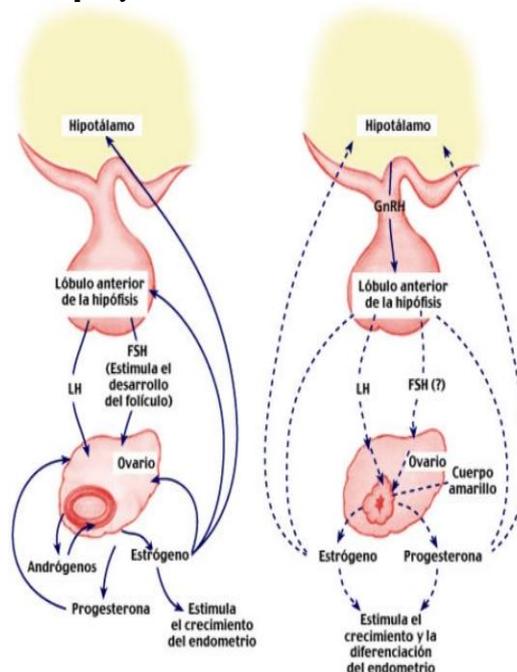


Figura 5. Sistema portal hipotálamo-hipofisiario. Snell, Richard. Embriología médica. 2º edición. Madrid: Nueva Editorial Interamericana;1976.

La participación del hipotálamo en la función reproductiva es por intermedio del dapeptido GnRH (pyro-Gu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) el cual regula la secreción de las gonadotropinas (FSH y LH) en la hipófisis (Fink 1988). Mediante técnicas de histofluorescencia e inmunohistoquímica se han identificado a los núcleos preóptico medial, anterior y arcuato, así como el septo y la estria terminal como las áreas donde se concentran las neuronas secretoras de GnRH (Figura 6).

Figura 6. Eje hipotálamo-hipofisis-ovario. El hipotálamo libera la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), y en la hipófisis estimula la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas gonadotropinas llegan a los ovarios y estimulan la secreción de progesterona (P₄), testosterona (T) y estradiol (E₂).

mondomedico.wordpress.com/2007/11/page/2/



En el hipotálamo se localizan dos centros de regulación de la secreción de las gonadotropinas, el centro tónico formado por las neuronas GnRHérgicas que se localizan en los núcleos ventromedial y arcuato, que regula la secreción continua de la hormona, y un centro fásico ubicado en el área preóptica, el núcleo supraquiasmático y el hipotálamo anterior, que regula la liberación cíclica preovulatoria de las gonadotropinas que ocurre el día del proestro en la rata adulta (Fink 1986,1988; Palkovits 2000).

HIPOFISIS

La hipófisis es una glándula que se localiza en la base del encéfalo, al que está unida por el tallo pituitario, está alojada en el hueso esfenoides y cubierta por la duramadre (Fink 2000).

Desde el punto de vista anatómico, en la hipófisis se describen cuatro zonas. 1) La pars anterior o distal, que junto con la pars intermedia forman la adenohipófisis, que es la que ocupa la mayor parte de la glándula, 2) la pars tuberalis, una proyección de la adenohipófisis que se extiende hacia arriba siguiendo la parte anterior y lateral del tallo pituitario, donde se observan los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisiario. 3) la pars intermedia, cuyo desarrollo varía en las especies estudiadas. 4) la pars posterior o nerviosa (neurohipófisis) cuya localización también varía con las especies estudiadas (Stevens y Steven 1995; Fink 2000; Ross 2005)(Figura 7).

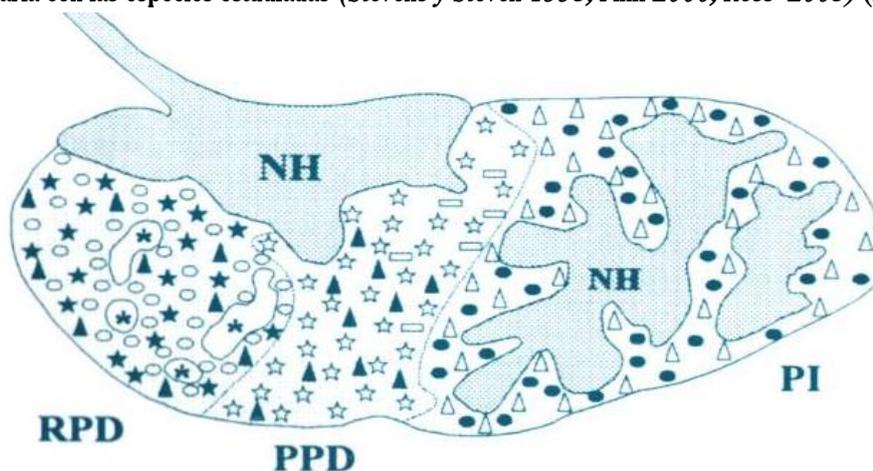


Diagrama esquemático de un corte sagital de la hipófisis de *Alosa sapidissima* donde se muestra la distribución de las distintas células adenohipofisarias.

RPD, rostral pars distalis; PPD, proximal pars distalis; PI, pars intermedia; NH, neurohipófisis.

Cavidades (★), Células de PRL (★), ACTH (○), GH (☆), GTH (▲), TSH (□), SL (●) y MSH (△)

Figura 7. Imagen tomada de Laiz Carrión (tesis de licenciatura, Universidad de Cádiz, 2009)

Las células de la parte distal sintetizan y secretan diferentes hormonas y reciben su nombre en función de la hormona que secretan: las adrenocorticotrópicas que secretan la ACTH, las tirotropas que secretan la tirotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH), las gonadotropas que secretan LH y FSH, las somatotropas que secretan la hormona de crecimiento (GH) y las mamotropas que secretan la prolactina (PRL). La parte intermedia sintetiza y secreta la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) y en la parte nerviosa se libera oxitocina y vasopresina (Ver tabla 1) (Brown 1994).

Tabla 1. Hormonas que secreta la hipófisis

Lóbulo	Hormona	Órgano Diana	Acción
Adenohipófisis	TSH	Tiroides	Estimula el Tiroides
	ACTH	Corteza suprarrenal	Estimulación de la corteza suprarrenal
	STH	Todos los órganos	Estimula el crecimiento
	LH	Gónadas	Estimula la secreción de testosterona y la ovulación.
	FSH	Gónadas	Maduración del folículo ovárico y formación de espermatozoides
	Prolactina	Mamas	Crecimiento de las mamas, secreción de leche
Neurohipófisis	Antidiurética	Riñones	Reduce la orina producida
	Oxitocina	Útero y mamas	Contracciones del útero en el parto y producción de leche en las mamas

En la adenohipófisis, la GnRH se une a receptores de membrana específicos que se localizan en los gonadotropos y estimula la síntesis y liberación de FSH y LH (*Stojilkovic 1994*). La liberación preovulatoria de las gonadotropinas ocurre por el incremento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH al sistema portal, así como el aumento progresivo de la sensibilización de los gonadotropos a este decapeptido, el cual es inducido por los estrógenos así como por la misma GnRH (*Fink 2000: Eve y Rett 1994*). (Figura 8)

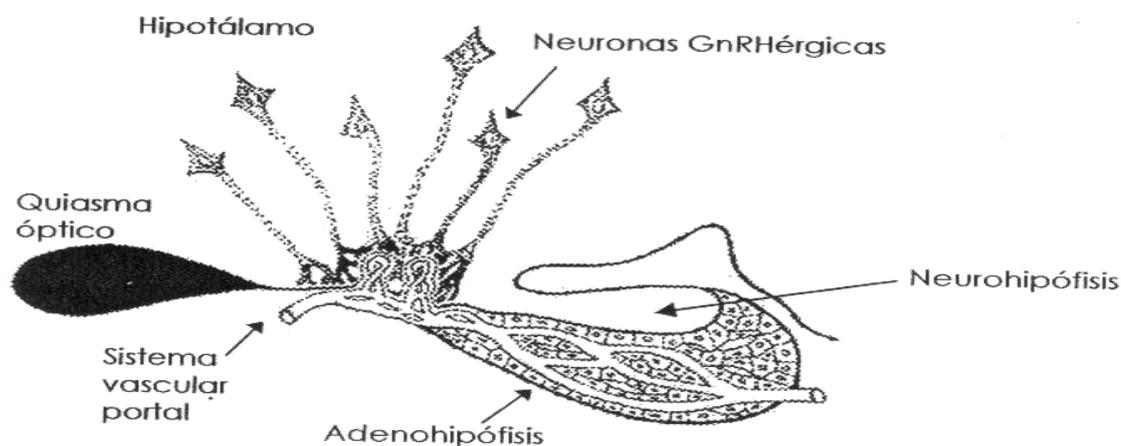


Figura 8. Esquema que muestra a la hipófisis y su conexión anatómica con el hipotálamo mediante el sistema portal de vasos sanguíneos, lugar donde se libera la GnRH que es sintetizada en el hipotálamo y de esta manera pasa a la hipófisis (Hálaz, 2000).

La GnRH interacciona con el receptor localizado en la membrana de los gonadotropos de la hipófisis anterior. Diversos estudios han mostrado que el número de receptores varía a lo largo del ciclo estral de la rata, encontrándose una mayor cantidad en la mañana del proestro, precediendo al pico de liberación de LH que se da en la tarde del mismo día.

Este aumento está determinado, en parte, por la misma GnRH, ya que se ha visto que su administración o su incremento en los animales castrados provoca un aumento en el número de receptores. También, el patrón de liberación es un factor importante, ya que el número de receptores disminuye al aumentar o disminuir la frecuencia de los pulsos normales de GnRH (*Katt 1985*).

Las señales hipofisiarias la FSH y LH modulan la síntesis y liberación del estradiol y la progesterona por los ovarios, que influyen directamente en estructuras cerebrales donde modulan la conducta y la fisiología reproductiva (Kalra 1983).

GnRH Y NEURONAS GnRHÉRGICAS

Localización

Las neuronas GnRHérgicas son células muy especializadas que representan la salida de información de una red neuronal integrada, que el cerebro utiliza para generar la secreción pulsátil de las gonadotropinas por la hipófisis.

Mediante técnicas de histofluorescencia e inmunocitoquímica se han identificado a los núcleos preóptico medial, anterior y arcuato, así como el septo y la estría terminal; como las áreas donde se concentran las neuronas secretoras de GnRH.

Este tipo de neuronas no forman agregados, sino redes laxas y difusas. La red más importante por su participación en el control de la secreción de las gonadotropinas se extiende desde la banda Diagonal de Broca hasta el área septal, atravesando el núcleo de la estría terminal y las áreas preóptica medial y lateral, hipotalámica anterior, el núcleo periventricular y la zona retroquiasmática del diencefalo. También forman parte de este continuo las neuronas secretoras de GnRH ubicadas en el hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico.

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

- ✚ La septo-preóptico infundibular
- ✚ La de la región pericomisural
- ✚ Las vías a órganos circunventriculares
- ✚ Las que proyectan a zonas extrahipotalámicas

Las neuronas GnRHérgicas del hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico, proyectan sus axones hacia la eminencia media por las vías septo-preóptica infundibular y septo preóptica. En todas las especies, la vía más importante de fibras GnRHérgicas es la septo-preópica infundibular, la cual es la vía común que participa en la regulación de la función secretora de la hipófisis. Este paquete se bifurca cerca del área preóptica (POA), donde principia el tercer ventrículo y proyectan sus axones por el fascículo retroflexo hacia áreas extrahipotalámicas como la amígdala, el complejo mamilar, el área tegmental ventral, el cerebro medio, el rafé y la región periacueductal (*Jennes 1985*).

Al parecer, estas proyecciones participarían en la regulación del comportamiento sexual de los roedores, ya que la administración de GnRH directamente en POA potencia el reflejo de lordosis. En los roedores, el número de neuronas GnRHérgicas es variable, yendo desde un promedio de 356 neuronas en el hámster hasta 560 o 300 células en la rata (*Yellon 1990*).

En la rata, la GnRH es sintetizada por neuronas GnRHérgicas que se localizan en la banda diagonal de Broca, en el área septual, el núcleo de la estría terminal y en algunas áreas del diencefalo, que incluyen el núcleo periventricular, el POA, media y lateral, el AHA y la zona retroquiasmática. Algunos grupos de neuronas GnRHérgicas se localizan en el hipotálamo lateral y en la parte dorsal del núcleo arcuato.

Citología de las neuronas GnRHérgicas

En la mayoría de las especies, las neuronas GnRHérgicas tienen forma de huso o fusiformes, con un diámetro máximo entre 10 y 20 μm . El proceso dendrítico se extiende sin ramificarse desde uno o ambos polos de la célula y los axones emergen directamente del soma o de una dendrita. (*Sokolovsky 1981*).

Estudios ultraestructurales de las neuronas GnRHérgicas de la rata muestran la existencia de dos tipos principales de neuronas, las de contorno liso, como las descritas anteriormente, y las espinosas, estas últimas se subdividen a su vez por el número de espinas que presentan. (Figura 9). (Jones RE 1990; Klein 1997; Xu 1982).

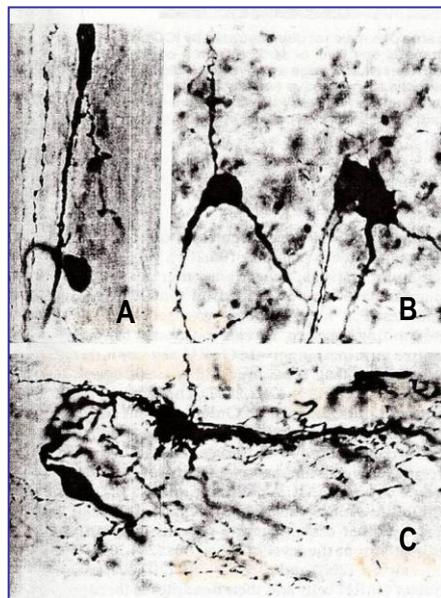


Figura 9. Esquema que muestra las tres diferentes morfologías de la neurona GnRHérgica. **A)** Muestra dos células lisas pequeñas de la banda de Broca en el cerebro del mono. **B)** Se aprecian tres células en el área preoptica, estas células tienen un número primario de dendritas y una apariencia triangular. **C)** del cerebro del mono se puede apreciar dos neuronas con dendritas que se extienden y son de forma irregular. (Tomada de Ann-Judith Siverman. *The Gonadotropin-Releasing Hormone*; 1994.)

Las neuronas GnRHérgicas tienen el núcleo localizado en el centro del soma rodeado por un borde delgado de citoplasma, que se alarga y extiende dando origen a los conos de las dendritas principales. El núcleo contiene uno o dos nucleolos, y la membrana nuclear generalmente está indentada. El citoplasma tiene varios sáculos de retículo endoplásmico rugoso y uno o los sáculos de Golgi y gránulos neurosecretores. En las terminales sinápticas, la GnRH se encuentra en gránulos de 120 nm unidos a la membrana plasmática (Sokolovsky 1981).

Las neuronas GnRHérgicas secretan a la GnRH de un manera sincronizada y pulsátil. Los axones de estas neuronas son proyectados a varias regiones del cerebro, donde el decapeptido actúa como neurotransmisor o neuromodulador de las funciones reproductivas (Ulloa-Aguirre y Timossi 2000).

GnRH

Estructura

La GnRH identificada en los mamíferos es un neuropéptido pequeño constituido por diez aminoácidos cuya secuencia es la siguiente (*Ulloa-aguirre y Timossi 2000*):



En diversas especies, se han identificado dos o más formas de GnRH. Una forma de origen hipotalámico (GnRH-I), la cual varía en estructura entre diferentes especies y una forma extra-hipotalámica que actúa como un neuro-modulador, y que actualmente se le conoce como GnRH II (*Flanagan 1997*).

En el cerebro medio de los vertebrados la molécula de GnRH-II se encuentra en cantidades significativamente mayores fuera del cerebro, hasta 30 veces más, y se ubica principalmente en el riñón, la médula ósea y la próstata (*Wise PM. 1981*). La secuencia de aminoácidos de la GnRH-II es la siguiente:



Esta forma de GnRH-II fue aislada originalmente del cerebro de la gallina, y junto con la GnRH-I regulan la liberación de las gonadotropinas en las aves. Al parecer, la GnRH-II es la isoforma más antigua identificadas hasta hoy y la más común entre los vertebrados (*Rainbow TC. 1980*).

Existen al menos 13 formas distintas de la GnRH que han sido aisladas en diferentes vertebrados, una sola especie posee de dos a tres formas de GnRH que podrían tener distintas funciones a la de estimular la liberación de las gonadotropina (*Parthar 2002*).

Gen de la GnRH

La secuencia del gen de la GnRH fue aislada por primera vez en 1984 a partir de una biblioteca de ácido desoxirribonucleico (DNA) genómico humano y ha aislado el ARNm de la rata, del ratón y del hombre.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) revela que el decapeptido GnRH deriva del procesamiento postraduccional de una gran molécula precursora, la prepro GnRH. La prepro GnRH consiste en 92 aminoácidos con una estructura tripartida: el decapeptio es precedido por un péptido señal de 23 aminoácidos y seguido por una secuencia Gly-Lys-Arg (posición 11 a 13) esencial para el procesamiento proteolítico y la activación del C terminal de las moléculas de GnRH. El último residuo de 56 aminoácidos se conoce como péptido asociado con la GnRH (GAP), el cual puede tener propiedades inhibitorias de la prolactina.

La GnRH es codificada a partir de un gen único localizado sobre el brazo corto del cromosoma 8. El gen humano contiene 4 exones (*Figura 10*). El exón 2 codifica la proGnRH, el exón 3 y una parte del exón 2 y el exón 4 codifican la proteína GAP y una larga región 3' no traducida también es codificada en el exón 4.

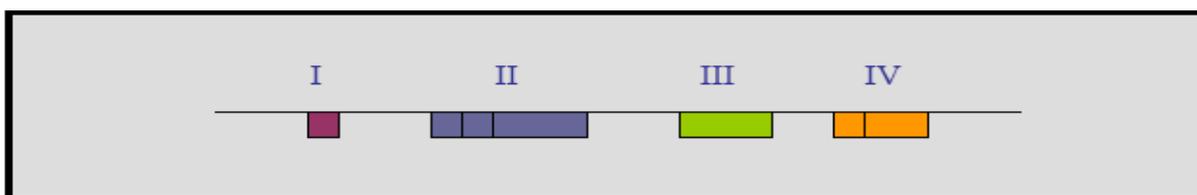


Figura 10. Esquema del gen que codifica para la GnRH

(Tomado de Adelman, 1996)

Síntesis de GnRH

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

Con el empleo de sondas de ácido nucleico para la hibridación in situ del ARNm de la preproGnRH así como de antisueros específicos del precursor y específicos del GAP se observa que el procesamiento molecular en el interior de las neuronas de GnRH ocurre fundamentalmente en el núcleo del cuerpo celular (soma). La síntesis se inicia con la transcripción del ARNm en los ribosomas adosados al retículo endoplásmico rugoso, dicha transcripción forma un péptido precursor (pre-pro-GnRH) de aproximadamente 10,000 daltones. El precursor de la GnRH se corta por acción enzimática en el retículo endoplásmico y da origen a la pro-GnRH, que se transfiere al aparato de Golgi, donde se produce la ruptura proteolítica de la cadena y la eliminación del par de aminoácidos básicos. En esta estructura se realiza el proceso de activación, que consiste en la ciclización enzimática de la glutamina N-terminal, la ruptura del enlace gly¹¹-gly¹⁰ y la amidación de la glicina en el carbono terminal (*Busby 1987; Charli 1991*). Posteriormente, la GnRH y su péptido asociado (GAP) son almacenados en las vesículas de secreción. (Figura 11).

En la rata, la expresión máxima del gen de la GnRH ocurre al medio día de la fase de Diestro-2 del ciclo estral y la expresión del ARNm es mayor en el lado derecho de POA-AHA que en el izquierdo (*Arteaga López 2003*)

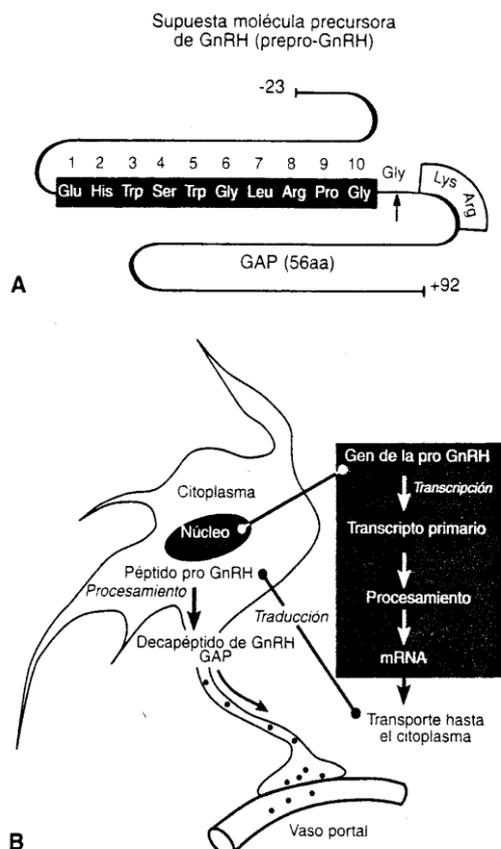


Figura 11. Gen de la GnRH y procesamiento de pre-pro-GnRH

- A. Representación esquemática de la estructura y la secuencia de 92 aminoácidos de pre-pro- GnRH. El decapéptido (aminoácidos 1-10) ocupa un lugar intermedio entre el péptido señal y la secuencia Gly-Lys-Arg. La flecha indica el sitio del procesamiento proteolítico y la amidación C-terminal de la molécula de GnRH.
- B. Procesamiento molecular del decapéptido de GnRH. En el núcleo el gen de pro-GnRH es procesado a RNAm después de la transcripción; el RNAm es transportado hasta el citoplasma del cuerpo celular (soma) donde se genera el péptido pro-GnRH, después de la traducción. Un mayor procesamiento conduce a la generación del decapéptido de GnRH y del péptido asociado con GnRH (GAP). Luego la GnRH y el GAP son transportados hasta las terminaciones nerviosas y secretados en la circulación. (Imagen tomada de Samuel. S.C Yen, MD, Sci Robert et. al. Endocrinología de la reproducción, 4^a ed. Buenos Aires: Panamericana; 2001)

Una vez sintetizado el péptido, es transportado en la vesícula hasta la terminal sináptica que finaliza en la eminencia media, y ahí es liberado en los vasos del sistema portal hipotalámico-hipofisario. La liberación de esta hormona se realiza por exocitosis en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de los canales de Ca^{+2} dependientes del voltaje (Sities1993). Como resultado de la entrada de Ca^{+2} se activan las enzimas proteolíticas que degradan la membrana plasmática, de tal forma que el péptido es liberado (Charli 1991).

En la adenohipofisis, la GnRH se une a sus receptores membranales en los gonadotropos y activa a la adenilato ciclasa y a la fosfolipasa C. Como resultado de la activación de estos sistemas enzimáticos, se forman moléculas que actúan como segundos mensajeros, entre los que se encuentran la adenosina mono- fosfatada cíclica (AMPc), el fosfatidil inositol (IP), el diacil glicerol (DAG), así como la movilización de calcio extra e intracelular.

Estos mensajeros activan el sistema de proteínas cinasas C, lo que se traduce como estímulo en la síntesis de la FSH y LH (*Conn 1993; Fink 1998*).

En la rata, la cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es significativamente mayor que en el izquierdo. Es posible que esta asimetría esté definida por el momento y el tipo de participación de los diversos sistemas de neuro-secreción que regulan la síntesis y liberación de la GnRH (*Gerendai 1979*).

Receptores a GnRH

Los receptores a GnRH son proteínas de membranas con un peso molecular de 136.356 daltones. Consta de 7 dominios transmembranales y se caracterizan por movilizar calcio. El número de receptores a GnRH cambia durante el ciclo estral pero no su afinidad. El número máximo de estos receptores en la hipófisis se da inmediatamente antes del “pico” preovulatorio de gonadotropinas para disminuir posteriormente.

La gonadectomía puede aumentar el número de receptores cuando la conexión hipotálamo- hipófisis se mantienen integras; en ausencia de la señal hipotálmica, el estradiol puede aumentar el número de receptores (*Conn 1999, Shivers 1983*).

La GnRH liberada en la circulación portal se une a su receptor de GnRH (GnRH-R) en la superficie celular de los gonadotropos con alta afinidad ($K_j = 0,3 \text{ Nm}$). La presencia de cambios en la concentración de receptores de GnRH presentes en la superficie de los gonadotropos suele correlacionarse con alteraciones en la respuesta del gonadótropo a la GnRH. Un buen ejemplo de ello es el incremento evidente de la sensibilidad a los gonadotropos a la GnRH que lleva al desarrollo del pico de LH y FSH.

Regulación de la Secreción de GnRH

La liberación pulsátil espontánea de GnRH de célula neuronales GT-1, expresan una amplia variedad de receptores y canales regulados por ligandos, con base a su respuesta se ha deducido que la secreción de GnRH es regulada por neurotransmisores (acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina), aminoácidos (ácido gama amino butírico (GABA), ácido glutámico, aspartato, glicina), opiodes, péptidos y hormonas esteroides (*Norris 1997*).

En roedores, el esteroide con mayor actividad biológica que regula la secreción de la GnRH es el 17 β -estradiol. En las hembras, pueden tener un efecto estimulante o inhibitorio sobre la secreción de GnRH en función de la etapa del ciclo estral, aunque en gran parte del ciclo los estrógenos tienen efectos inhibitorios dando como resultado la disminución en la secreción de LH. (*Charles 1984, Ching 1982; Drouva 1984; Evans N.P 1994; Krajewski 2003*). El efecto estimulante sobre la secreción de GnRH provoca la liberación preovulatoria de las gonadotropinas lo que se refleja en un máximo en las concentraciones plasmáticas de LH y FSH. (*Krajewski 2003; Legan 1975; Tatcher 1987*).

Algunas de las neuronas que sintetizan estas sustancias hacen contacto sináptico con la neurona GnRH. En el órgano vascular de la lámina terminal, las terminales GnRHérgicas establecen contactos sinápticos con fibras serotoninérgicas. En las áreas preóptica hipotálamica anterior (POA-AHA) existe una comunicación con terminales nerviosas dopaminérgicas, GABAérgicas, noradrenérgicas, colinérgicas, serotoninérgicas, histaminérgicas, ácido gama aminobutírico, de péptidos como sustancia P, somatostatina, neurotensina, neuropéptido Y, péptido YY, péptido pancreático, galanina, oxitocina, vasopresina, TRH, CRF, colecistoquinina, angiotensina II, bradiquinina, bombesina, polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), GRH y opiodes (*Jennes 1985*).

Importancia de la GnRH en las funciones reproductoras

La importancia de la GnRH en las funciones reproductoras radica en que las neuronas GnRHérgicas integran el control de estas funciones en ambos sexos. La liberación episódica de GnRH desde las terminales nerviosas localizadas en la eminencia medial del hipotálamo hacia el sistema portal de la adenohipofisis cae en un patrón pulsátil de secreción de la hormona leutinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (*Barraclough 1992; Chen Z. 2001; Karla S.P. 1997; Egozi Y. 1986*). Esta secreción es originada por el efecto que tiene la GnRH sobre los gonadotropos de la adenohipofisis al actuar sobre su receptor.

Las fluctuaciones cíclicas en amplitud y frecuencia en la secreción de GnRH, son responsables de cambios marcados en el perfil de la secreción de LH y FSH, ya que altas frecuencias de GnRH estimulan la secreción de LH, mientras que las frecuencias bajas estimulan la secreción de FSH. (*Benoit J. 1932; Gallo R.V. 1981; Levine J.E. 1994; Levine J.E. 1980; Levine J.E. 1991; López F.J. 1991, Suter K.J. 2000; Terasawa E. 1995*).

Estos cambios son importantes para el funcionamiento de los ovarios, así como para la generación de un aumento en la concentración de LH, el cual es conocido como secreción preovulatoria de LH, necesaria en el proceso de la ovulación. (*Baur-Danoïn A.C. 1995, Cruz M.E. 1989; Everett J. W. 1948; Bai L. 2001; Bakker J. 2000; Leipheimer R. E. 1984*). Según la especie de mamífero en estudio, los mecanismos que culminan con la ovulación ocurren cíclicamente. Para el caso de la rata suceden cada cuatro días, a este período se le dio el nombre de ciclo estral, el cual se explica a continuación.

CICLO ESTRAL DE LA RATA

El ciclo estral es una cascada de eventos conductuales y hormonales que son progresivos, sincronizados y repetitivos que depende de la liberación cíclica de la gonadotropinas y las hormonas ováricas (*Domínguez, 1991*).

Durante el ciclo estral existe una interrelación de señales que provienen del medio ambiente (visual, olfatoria, auditiva, etc.), el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y los órganos sexuales accesorios que están bajo el control del sistema nervioso central (SNC). La longitud del ciclo estral depende de las condiciones de luz y oscuridad en las que se mantienen los animales (*Knobil E. 1980*).

La receptividad sexual de la rata hembra se presenta cada cuatro o cinco días y el intervalo entre cada día de receptividad recibe el nombre de ciclo estral. Lo mismo ocurre entre cada proceso de ovulación y en este caso se habla del ciclo ovulatorio, que tiene la misma duración. A lo largo del ciclo estral hay cambios hormonales y conductuales, progresivos, altamente sincronizados y repetitivos, que incluyen una etapa en la que la hembra es receptiva al macho, denominada etapa de celo. Su duración es regulada por variaciones en la cantidad de horas luz, por la ingesta de alimento, la temperatura y la presencia del macho (*Fink G. 1988*).

El termino “estro” proviene del latín *Oestrus* y éste a su vez, del griego oistros, que significa tábano, aguijón o frenesí. Para su estudio, al ciclo se le dividió en cuatro etapas: Diestro-1 o metaestro, Diestro-2, Proestro y Estro.

✚ **Diestro-1 (metaestro):** Esta etapa se presenta después de la ovulación y se le describe como una etapa progestacional, ya que existe un incremento en la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo. Las concentraciones de FSH, LH y estradiol en el suero son bajas.

Se observan folículos en diferentes etapas de crecimiento y se localizan cuerpos lúteos. En el frotis vaginal el tipo celular predominante son los leucocitos, aunque también se observan algunas células cornificadas o escamadas (figura 12).

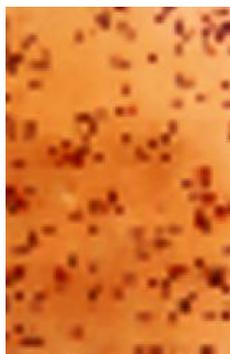


Figura 12. Diestro 1

✚ **Diestro-2:** Si no se presenta la fecundación, en esta etapa hay una rápida involución funcional o lisis del cuerpo lúteo. La concentración de progesterona disminuye en la sangre. Durante la tarde de este día, las concentraciones plasmáticas de FSH y LH se mantienen bajas pero las de estradiol comienzan a aumentar en la tarde de este día, debido al estímulo de la enzima aromatasa inducido por la FSH en las células de la granulosa en el ovario.

Sólo se presentan folículos pequeños, cuerpos lúteos viejos grandes, producto de las ovulaciones anteriores. La citología vaginal muestra leucocitos y aparecen algunas células epiteliales nucleadas, con moco muy delgado (figura 13).

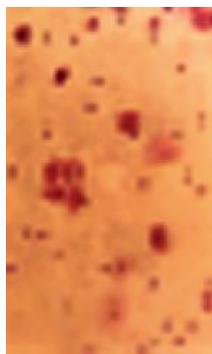


Figura 13. Diestro 2

✚ **Proestro:** En la mañana de este día se observa un aumento significativo de la concentración de estradiol, estímulo fundamental de la secreción de la GnRH (14:00 a 15:00 horas), lo que resulta en el aumento de la liberación de FSH y LH, que ocurre en la tarde (17:00-19:00 horas). En esta secreción preovulatoria la LH induce la ovulación. Al igual que la LH, la FSH presenta su máxima liberación por la tarde (17:00-19:00 horas). En esta etapa se inicia el incremento en la concentración de progesterona, lo que favorece la ovulación y facilita el comportamiento sexual, el celo y la cópula en la noche de este día.

Varios folículos maduran simultáneamente y alcanzan su tamaño máximo en este día del ciclo. En el frotis vaginal se observan predominantemente células epiteliales nucleadas y ocasionalmente escamas, sin la presencia de leucocitos (figura 14).

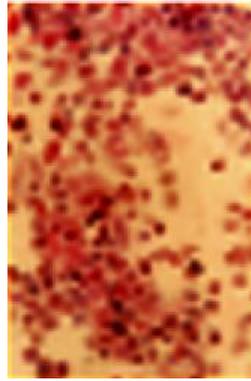


Figura 14. Proestro

✚ **Estro:** En esta fase del ciclo ocurre la ovulación (en las primeras horas del día). La concentración de estradiol y progesterona en sangre se encuentran basales, mientras que la de FSH muestran un segundo aumento en la mañana de este día, cuyo papel es el reclutar a los folículos que ovularán en los siguientes ciclos.

En la rata se lleva a cabo la ovulación en las primeras horas de este día. En el ovario se pueden observar folículos de más de 1000 μm que no ovularon y que entraron en la fase de atresia, así como cuerpos lúteos recién formados. En el frotis vaginal se observan predominantemente células epiteliales cornificadas y el útero incrementa su tamaño (Figura 15).

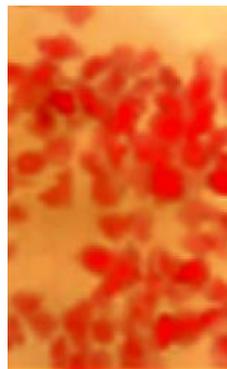


Figura 15. Estro

FSH y LH

La GnRH estimula la secreción de las gonadotropinas, las cuales llegan a las gónadas por el torrente sanguíneo y se unen a sus receptores de membrana presentes en algunas de las células que conforman a los ovarios y testículos. En el ovario, la FSH estimula el crecimiento y la diferenciación de los folículos, mientras que la LH induce la ruptura del folículo con la liberación del ovocito (ovulación) y la formación del cuerpo lúteo. Ambas gonadotropinas participan en la regulación de la esteroidogénesis (*Fink 1986, 1988; Everett, 1994*).

La FSH y LH son hormonas glicoprotéicas sintetizadas por la adenohipofisis y están formadas por dos cadenas polipeptídicas (Subunidad α y β) cuya síntesis es codificada por genes diferentes (*Haisenleder y col., 1994*). La cadena α es idéntica en ambas gonadotropinas, mientras que la β es específica para cada hormona (*Pierce y Parsins 1981*).

En la rata, el contenido del ARNm de la cadena α aumenta a las 8:00 horas en el Diestro- 2 y alcanza su valor máximo a las 20:00 horas, declina abruptamente a la media noche y permanece bajo durante las etapas del proestro, estro y diestro-1 (*Zmeili 1986., Haisenleder y col., 1994*). En cambio, el contenido en ARNm de la cadena β de LH es bajo en el día del estro y diestro-1, incrementa a las 8:00 horas del diestro-2, después disminuye y permanece así hasta la mañana del proestro (*Zmeili y col. 1986*). A las 14:00 horas del proestro se presenta un segundo aumento que alcanza la máxima concentración a las 17:00 horas y después declina rápidamente. A las 22:00 horas del proestro la concentración de ARNm es similar a las del estro y diestro-1. El contenido en ARNm de la cadena β de FSH aumenta a partir de las 20:00 horas del día del proestro, alcanza el máximo a las 2:00 horas del estro, retorna a concentraciones basales a las 8:00 horas, permanece bajo hasta las 20:00 horas y aumenta a partir de las 23:00 horas del mismo día y permanece elevado hasta la tarde del diestro-1, mientras que en el diestro-2 las concentraciones son menores que las observadas en los días del proestro y estro (*Haisenleder y col. 1994*).

Después de la síntesis del ARNm que codifica para las subunidades β de FSH y LH, así como la subunidad α común, la síntesis de las hormonas polipeptídicas se lleva a cabo en los ribosomas. La estructura polipeptídica resultante es transportada al aparato de Golgi, donde suceden las modificaciones post-traduccionales que consisten en la glicosilación (adición de ácido siálico, entre otros carbohidratos, a las subunidades proteicas α y β) específica de cada gonadotropina y la sulfatación en el caso de la subunidad β de la LH. La adición de ácido siálico a los carbohidratos terminales de las moléculas se realiza en la región “trans” del aparato de Golgi por un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de las glicosiltransferasas, denominadas sialiltransferasas (*Baenzigr y Green 1988*).

Tanto la FSH como la LH presentan isoformas que se explican por la presencia de grandes cantidades de ácido siálico (monosacáridos con carga eléctrica negativa), lo que ocasiona diferencias en el punto isoeléctrico y el peso molecular. Esta heterogeneidad en las isoformas moleculares influye en su vida media, en la capacidad de interactuar con su receptor y en el potencial biológico evaluado in vivo e in Vitro (*Dufau y Veldhuis 1987; Wilson y col.1990; Ulloa- Aguirre y col. 1995*).

Las isoformas ácidas de la FSH y LH predominan en la circulación sanguínea cuando la concentración de esteroides gonadales es baja, como ocurre en los animales castrados y en las mujeres menopáusicas. Estas formas ácidas tienen una actividad biológica baja y una vida media larga. Las isoformas básicas de las gonadotropinas predominan en la etapa preovulatoria y tienen mayor afinidad, pero son eliminadas más rápidamente. (*Ulloa-Aguirre y col.1995*).

En la rata hembra los pulsos de amplitud baja de GnRH elevan los ARNm de la subunidades β de la FSH o LH, mientras que los pulsos con amplitud alta incrementan el ARNm de subunidad α (*Haisenleder y col. 1994*).

ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS

Las hormonas esteroideas pertenecen al grupo de hormonas derivadas del colesterol. El colesterol posee un núcleo químico básico, el ciclopentanoperhidrofenantreno 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 (Figura 16) (*O'Malley BW 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* (*O'Malley BW y col 2001*).

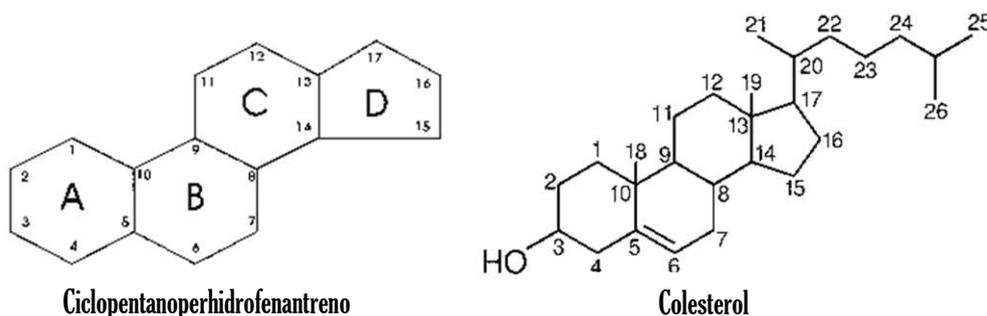


Figura 16. Estructura química del Ciclopentanoperhidrofenantreno o núcleo esteroide y Colesterol (modificado de Sánchez-Criado, 2003).

Las células obtienen al colesterol por medio de tres fuentes: 1) del plasma donde el colesterol es transportado unido a lipoproteínas de alta y 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 BW y col 2001*).

Las hormonas esteroides se clasifican según su estructura química y su actividad biológica en: andrógenos y estrógenos los cuales tienen un núcleo esteroide compuesto de 21 átomos de carbono, agrupados en cuatro anillos aromáticos, tres ciclohexanos y un ciclopentano (*Brown 1999*).

El andrógeno con más actividad biológica es la testosterona, la cual tiene un núcleo esteroide androstano, que es un compuesto orgánico con 19 átomos de carbono, con un átomo de oxígeno con doble enlace en la posición C3 y un grupo hidroxilo en la posición C1 (*Brown 1999, Burris 1999*).

Los estrógenos comprenden la estrona y estradiol; este último es el de mayor actividad biológica. El estradiol tiene un núcleo esteroide estrano que es un compuesto que contiene 18 carbonos, tiene un grupo hidroxilo en la posición C3 como en C17. (*Smith 1999*).

En la biosíntesis de esteroides participan células de la granulosa, de la teca interna, del cuerpo luteo y la glándula intersticial; se inicia con la transferencia del colesterol al interior de la mitocondria que es realizada por el StAR (proteína reguladora de la estereidogénesis aguda). En las membranas mitocondriales de las células de la teca interna, la LH induce la transformación de colesterol a pregnenolona por la enzima citocromo P450_{scc} (20,22 desmolasa). A partir de la cual la biosíntesis sigue dos vías diferentes: Δ_4 y Δ_5 .

En la vía Δ_4 la pregnenolona es transformada a progesterona por la enzima 3 β -HSD; la progesterona es convertida a la 17 α -hidroxilasa por la enzima citocromo P450_{scc} (20,22 desmolasa), la cual es convertida en androstenediona. Este metabolito es transformado en testosterona por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Las células teco-intersticiales de los folículos son la principal fuente de andrógenos ováricos y ambos andrógenos (androstenediona y testosterona) atraviesan la membrana basal y son incorporados al citoplasma de las células de la granulosa.

En estas células la FSH incrementa la actividad del complejo enzimático aromatasas, lo que provoca que los andrógenos sean aromatizados a estrógenos. (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

En la vía Δ_5 la pregnenolona es transformada en 17α -hidroxipregnenolona, por efecto del complejo 17α -hidroxilasa. Después, la C_{17-20} liasa (enzima P450 $C_{17\alpha}$), transforma en la 17α -hidroxipregnenolona en dehidroepiandrosterona (DHEA); esta a su vez es transformada a androstenediona por la enzima 17β -HDS. A partir de la androstenediona sigue la ruta Δ_4 . (Yao y Bahr, 1999).

PROGESTERONA

Generalidades de la progesterona

La progesterona (P_4) (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides, su nombre se deriva del latín: *pr: a favor y gestare: llevar*, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción.

Estructura Química

La estructura química de la P_4 y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es el hidrocarburo pregnenano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21); figura 17. Al igual que otros esteroides, la progesterona se compone de cuatro hidrocarburos cíclicos interconectados, contiene cetona y grupos funcionales oxigenados, así como dos metilos.

Síntesis de la progesterona

La P_4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo, durante el ciclo menstrual (*Hsueh 1984; Hutchison 1986*); otros órganos donde también se ha demostrado su síntesis son la corteza adrenal, la placenta, el testículo y el cerebro (*Zwain y Yen 1999; Ukena 1999*).

La síntesis de P_4 se inicia con la Pregnenolona, un derivado del colesterol. Esta conversión se lleva a cabo en dos fases. El grupo 3-hidroxi se convierte en un grupo ceto y el doble enlace se traslada al C-4 de C-5 (Figura 17).

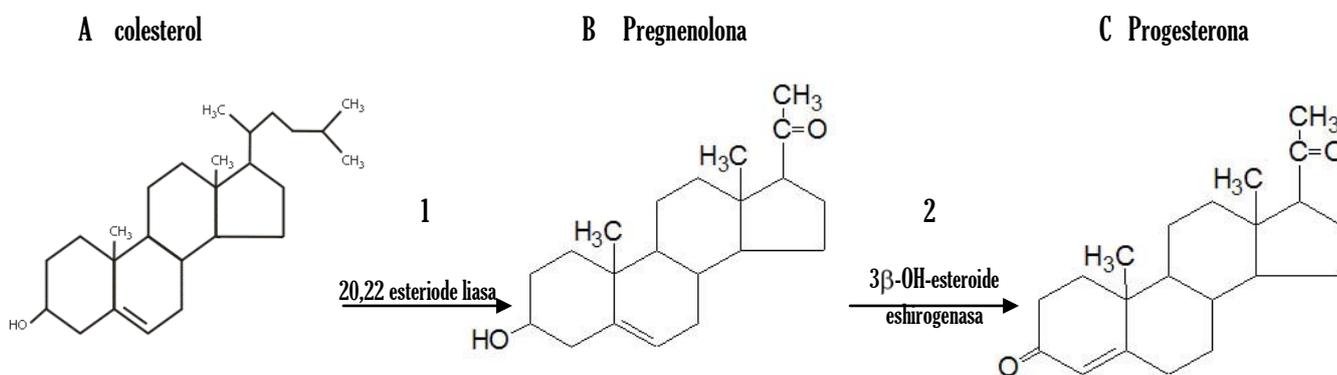


Figura 17. Biosíntesis de la P_4 . La biotransformación de colesterol a P_4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 por medio de la enzima 20, 22 esteroide liasa(1), b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3 por medio de la enzima 3β-OH- esteroide deshidrogenasa (2) y C) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A.1) (*Gore-Langton, 1988*).

Una vez que la P_4 y sus metabolitos han llevado cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1.- La reducción en el carbono 20 lo que da lugar a la formación de 20α y 20β dihidroprogesterona (con actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la progesterona); posteriormente se reduce el anillo A en los carbonos 3 y 5 dando lugar a la formación de ocho pregnandiolos o pregnantrioles.

2.- La reducción de los pregnandioles forma glucurónidos, lo que incrementa la polaridad de la molécula formándose así compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción en la orina.

Acciones generales de la progesterona

La P₄ participa en muchas de las actividades biológicas de diferentes tejidos (tabla 2). Sus efectos pueden ser estimuladores, como en el caso de la liberación de la GnRH, de la dopamina, en la inducción de la lordosis que es una conducta de receptividad sexual durante la cual la hembra flexiona su espina dorsal en forma de arco al ser montada por un macho para darle acceso a la cavidad vaginal; en la síntesis de uteroglobina, en la reacción acrosomal y en el fluido de Ca⁺² en el espermatozoide. Los efectos de la P₄ también pueden ser inhibidores, como en la contractilidad uterina.

Tabla 2. Acciones Fisiológicas de la progesterona

Tejido	Función
Útero/ Ovario	Liberación del ovocito Facilitación de la implantación Mantenimiento del embarazo Estimulación de la regeneración del estroma.
Cerebro	Regulación de la respuesta sexual Regulación de la excitabilidad neuronal y aumento de sueño Neuroprotección.

La progesterona ejerce su acción principalmente a través del receptor intracelular de progesterona, la membrana del receptor de progesterona obligado también se ha postulado. La progesterona tiene una serie de efectos fisiológicos que son amplificados por la presencia de estrógeno.

ESTRÓGENOS

Los estrógenos son hormonas ampliamente distribuidas en el reino animal, que están presentes en hembras y machos. Los estrógenos estimulan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de las células que los reconocen (Guyton y col. 2001; O'Malley y Strott 2001).

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

Los ovarios secretan 17β -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 ovárica. El estriol es el producto oxidativo del estradiol y de la estrona, cuya conversión se realiza en el hígado y la placenta (Figura 18) (Brown 1999).

En comparación con el 17β -estradiol y la estrona, el estriol es un estrógeno débil. La potencia estrogénica evaluada por el aumento de peso del útero de una rata castrada, del 17β -estradiol es 12 veces mayor que la de la estrona y 80 veces que la del estriol. Considerando estas potencias relativas, el efecto estrogénico del 17β -estradiol es mayor que el de los otros estrógenos juntos. Por esta razón se considera que el 17β -estradiol es el principal estrógeno (Guyton y col. 2001; Smith 1999).

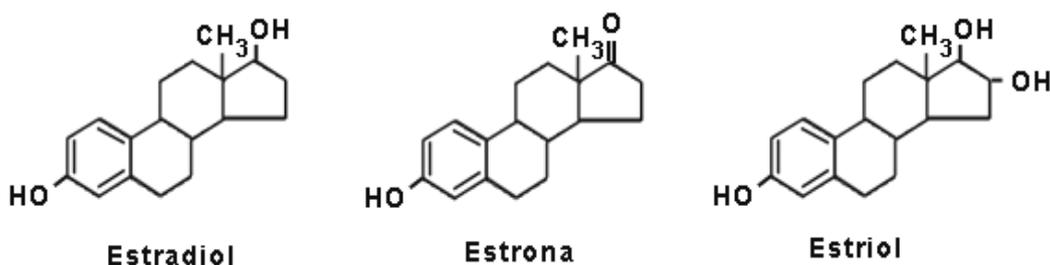


Figura 18. Estructura química de los estrógenos (modificado de Guyton y col. 2001.)

Estructura química

El 17β -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 C3 y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición C17 del anillo D (Fig. 16). El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y la alta afinidad a receptores de estrógenos. (Sánchez-Criado 2003; Smith 1999).

Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario.

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. La conversión de colesterol se logra por modificaciones estructurales que incluyen hidroxilaciones, pérdida de las cadenas laterales y la transformación del anillo "A" (con un doble enlace característico de los andrógenos) en el anillo aromático (fenólico) de los estrógenos. (O'Malley BW y col. 2001).

En las especies animales que se han estudiado, el folículo ovárico es el sustrato anatómico más importante para la síntesis del 17β -estradiol. La biosíntesis de estrógenos en esta glándula es explicada por la teoría de "las dos células" o "doble célula", en la cual se plantea la participación combinada de las células de la teca interna y las células de la granulosa (Figura 19) (Brown 1999; Sánchez-Criado 2003).

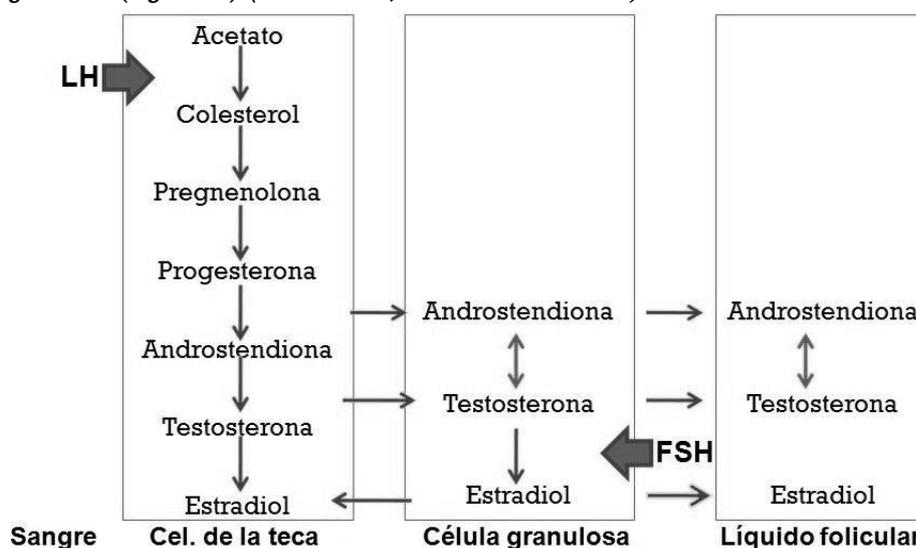


Figura 19. Biosíntesis de esteroides en los compartimentos del ovario

La unión de la LH a su receptor membranal en las células de la teca interna, 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, que separa la cadena lateral de colesterol del carbono 17, convirtiendo el colesterol en pregnenolona (constituida de 21 carbonos), por la pérdida de un fragmento de 6 carbonos (reacción que requiere NADPH y oxígeno molecular) (*O'Malley BW y col. 2001*).

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 diferentes vías metabólicas. Estas vías se han designado como " Δ^5 " y " Δ^4 ", según la localización del punto de insaturación (doble enlace) de los compuestos intermediarios (Figura 20) (*Gore-Langton y Armstrong 1994; O'Malley BW 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 BW y col. 2001; Sánchez-Criado 2003*).

La FSH estimula el proceso de aromatización. La conversión de los andrógenos en estrógenos requiere que ocurran tres oxidaciones consecutivas, cada una de las cuales consumen un mol de oxígeno y un mol de NADPH. El proceso inicia con hidroxilación enzimática en el carbono 19, que constituye el paso limitante, y se cataliza por medio de la 19-esteroide hidroxilasa. A continuación se introduce un segundo grupo hidroxilo, con la consecuente eliminación estereoespecífica de un átomo de hidrógeno y por la pérdida de una molécula de H_2O , el diol formado se transforma en un 19-aldehído. Finalmente el anillo A es aromatizado con la subsecuente remoción del carbono 19 (*O'Malley BW y col. 2001; Sánchez-Criado 2003*).

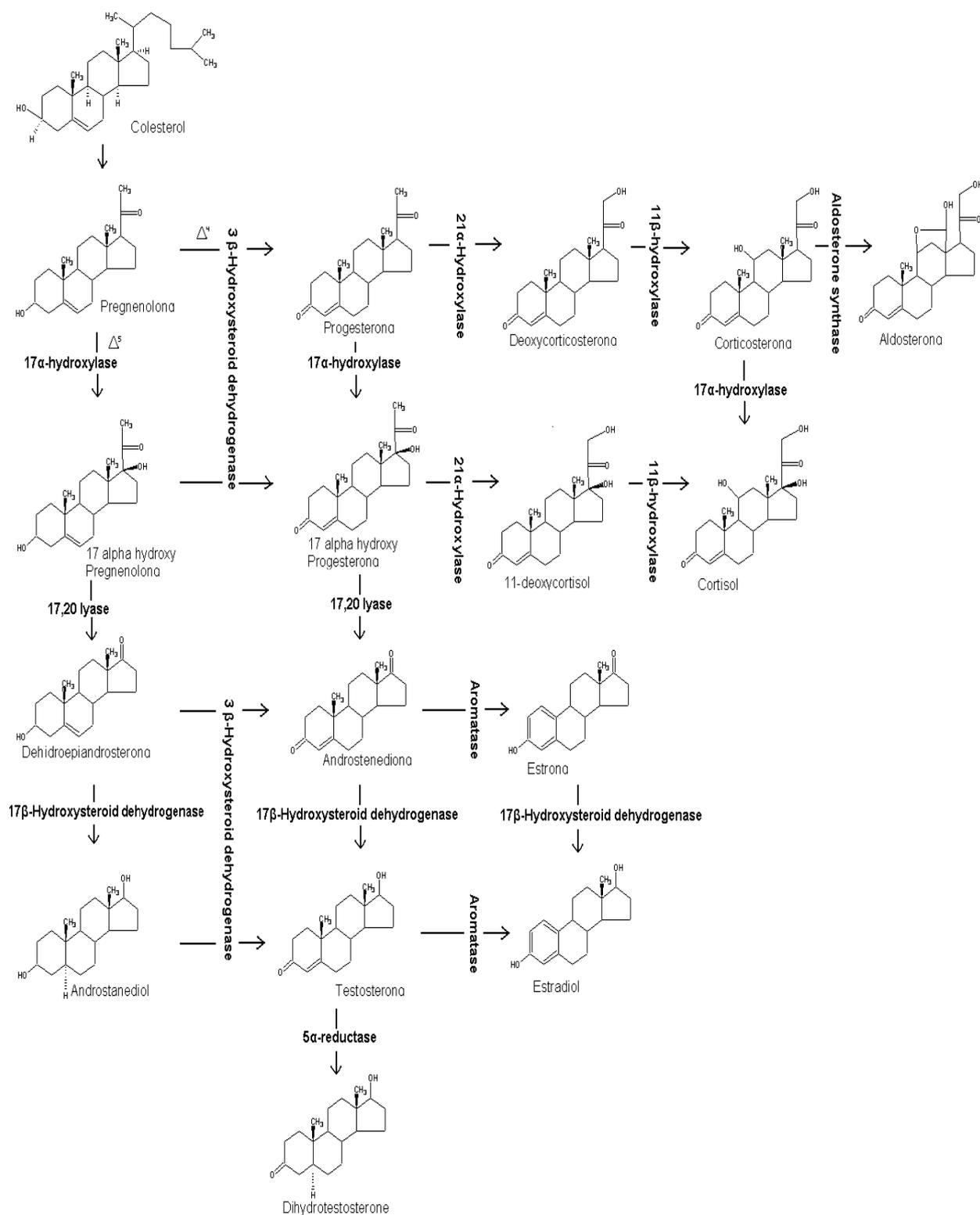


Fig. 20. Principal vía biosintética de los esteroides ováricos (modificado de Sánchez-Criado 2003).

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

La función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es regular los diferentes procesos involucrados con la reproducción. Los estrógenos regulan la secreción de la 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 POA-AHA. La función estimulante o inhibitoria de los estrógenos (efectos de retroalimentación), cambia durante el ciclo, como resultado de modificaciones en su concentración en la sangre. Hecho 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 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*).

En el útero de la rata, los estrógenos provocan cambios morfológicos significativos que incluyen la proliferación y la muerte celular en ambos epitelios (luminal y glandular). Estos eventos ocurren en correlación a los cambios cíclicos de las concentraciones de hormonas esteroides durante el ciclo estral; cambios 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 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 (RE) específicos presentes en las células blanco (Brown 1999; Carson-Jurica y col. 1990; Ing 1999).

RECEPTORES A ESTRÓGENOS

En 1986 se clonó el primer receptor a estrógenos proveniente del útero de la rata (RE- α). Diez años después se clonó un nuevo miembro de los receptores nucleares en la próstata de la rata (RE- β). Los experimentos de unión o “binding” mostraron que ambos son específicos para los estrógenos, así que fueron llamados Receptor a Estrógeno alfa (RE- α) y beta (RE- β) respectivamente. Ambos son productos de diferentes genes y exposición de tejidos y células de tipo específico de expresión

RE- α y RE- β pertenecen a la superfamilia de los factores nucleares de transcripción ligando-dependientes, con una configuración química específica para fijar a la hormona. Ambos desempeñan un papel fundamental en múltiples procesos que intervienen en la regulación central y periférica de la producción y liberación de gametos, el comportamiento reproductivo y el desarrollo de características sexuales secundarias en los mamíferos. (*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. La cual incluye a los receptores de la testosterona, la progesterona, los corticoides, la hormona tiroidea, las vitaminas A y D₃ y a un gran grupo de proteínas denominadas receptores “huérfanos”, de los que aun 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 RE constan de seis dominios funcionales: A/B, C, D, E y F (Figura 21). 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 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. Está 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 (*“fingé”*) permite al receptor flexibilidad o alterar su conformación. Mediante la técnica de mapeo proteolítico del RE se ha mostrado que una porción del dominio D es necesaria para unir un ligando con máxima afinidad. También se ha mostrado que participa en la unión a la proteína chaperona de golpe de calor hsp90 (*heat shock protein 90*), la cual permanece unida 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 alta 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 (*Enmark y Gustafsson 1999; Rollerova y Urbancikova 2000; Tamrazi y col. 2002*).

El dominio F contiene alrededor de 42 aminoácidos, los cuales no son 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*).

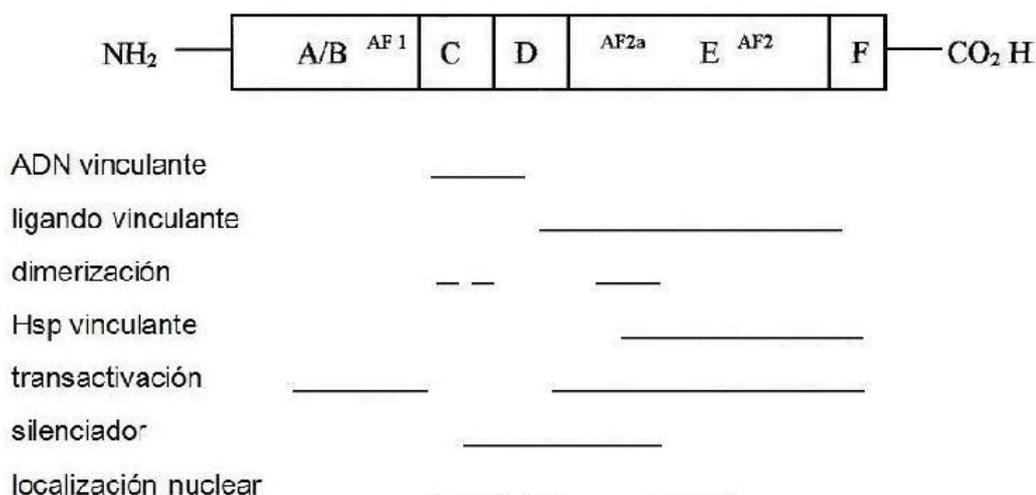


Figura 21. Función de los dominios de los receptores a estrógenos RE y su localización. La estructura del RE puede ser dividida en seis dominios A-F. Las líneas indican la función de cada dominio. AF2a función de transactivación único para RE. Modificado de: Grandien y col. 1997; MacGregor y Jordan 1998; Weigel 1996.

Subtipos o isoformas de receptores

Se reconocen tres isoformas del receptor a estrógenos: el receptor alpha ($ER\alpha$), el receptor beta ($ER\beta$) y el receptor gama ($ER\gamma$ o $ER\beta$ -2). Los receptores a estrógenos se pueden clasificar 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 en el citosol. (Rollerova y Urbancikova 2000; Taleisnik 2006; Watson y col. 1995).

Los receptores a estrógenos también pueden clasificarse 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 $ER\gamma$ es considerado como un receptor de membrana, fue aislado y purificado del hígado de ratón, sin embargo ha sido poco estudiado (Pérez EP. 1995, Rao 1998; Watson y col. 1995).

Los receptores denominados de acción genómica son aquellos que al unirse a 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 inhibidoras termo-inducibles (hsp90 y hsp 70 “*heat shock proteins*”), las cuales incapacitan al receptor para unirse al ADN mientras el receptor esta inactivo y 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 “path ways” posibles (Figura 22), 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 homodímeros del RE α o del RE β . En las células que se expresan ambos RE, puede formarse un heterodímero que contiene una molécula de cada uno. El complejo hormona-receptor se une generalmente a los ERE como homodímero; 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 homodímero 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 (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 (*Rollerova y Urbancikova 2000; Taleisnik 2006*).

Existen dos tipos de secuencias específicas en el DNA 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 DNA, 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 esta dado por el suministro de la hormona (*Carson-Jurica y col. 1990; Taleisnik 2006; Weigel 1996*).

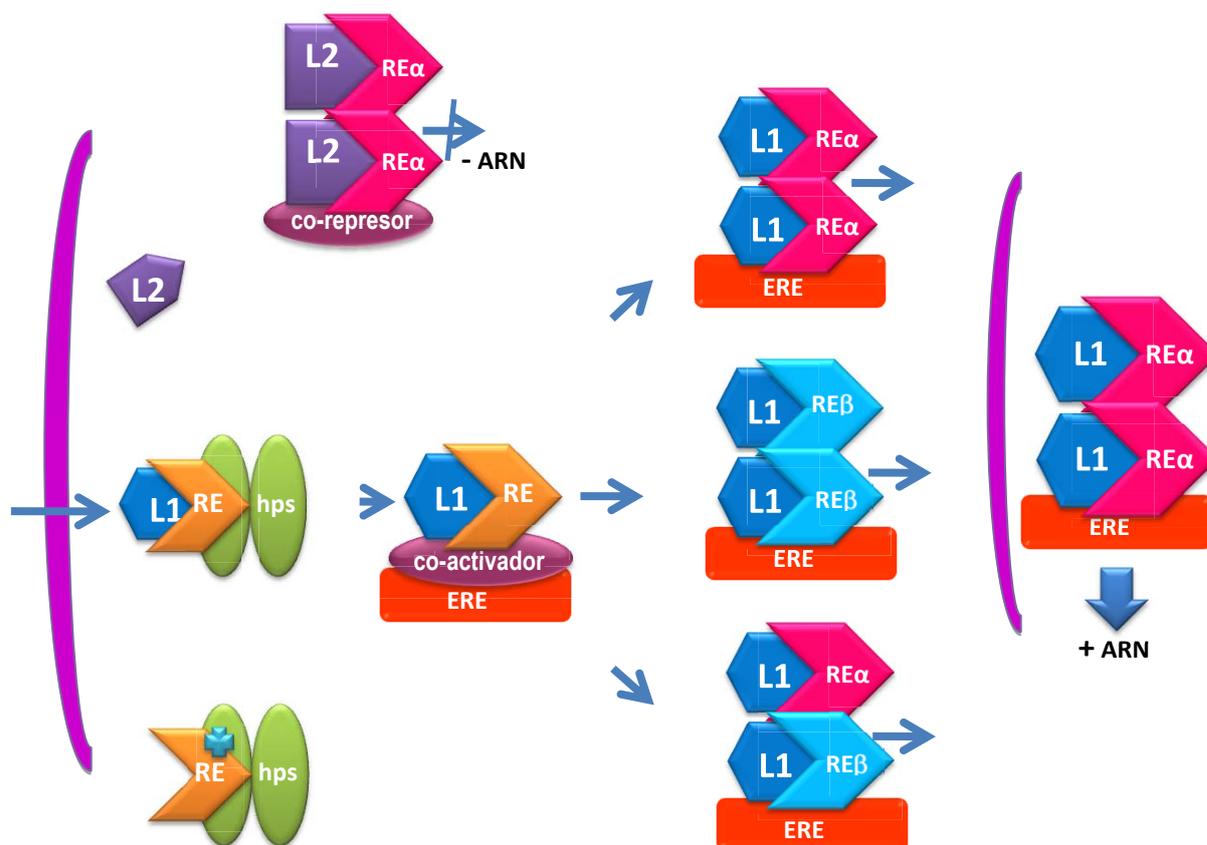


Figura 22. Modelo de acción del RE. El RE sin ligando esta representado por el heterocomplejo unido a las proteínas hsp, las inmunofilinas y otros chaperones. La unión cooperativa del antagonista (L2) induce a la liberación del receptor del agregado o conjunto formado. La unión al agonista (L1) induce a el cambio conformacional; la activación de la dimerización, la unión cooperativa de múltiples copias de EREs localizados en la regiones reguladoras de los genes blanco. La señal generada por el receptor en la membrana celular, activa la reacción de la Proteína Kinasa (PK), señal de la transducción que induce el proceso de fosforilación de receptores y la unión de a co-reguladores necesarios en la función del receptor. La presencia de co-reguladores es suficiente en el eficiente control transcripcional, dependiendo del tipo de célula y la promoción específica de acción del ligando. Modificado de: Rollerova y Urbancikova 2000.

Isoformas alfa y beta

En el año 1996, Kuiper y col, clonaron un ácido desoxi-ribonucleico complementario (DNAc) del *RE* de la próstata de rata, al cual denominaron *RE* subtipo β ($RE\beta$), para distinguirlo del que previamente en 1986 se había clonado proveniente del útero de la rata, al cual consecuentemente se denominó *RE* subtipo α ($RE\alpha$). 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 $RE\alpha$ y $RE\beta$ tienen el mismo número de exones y los cDNAs (ADN complementario, por sus siglas en inglés) clonados de humanos, ratas y ratones, también comparten secuencias homólogas, especialmente con los dominios de ligando y unión al ADN (Fig. 23) (Kuiper y col. 1996).

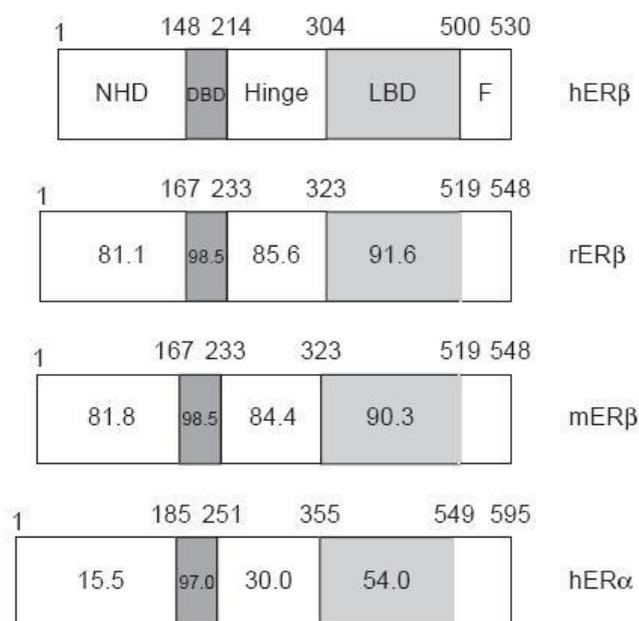


Fig. 23. Porcentaje de aminoácidos identificados de receptores a estrógenos: $RE\beta$ humano (hER β), $RE\beta$ rata (rER β), $RE\beta$ ratón (mER β) y $RE\alpha$ humano (hER α). Los números por encima de las cajas representan el número de aminoácidos, mientras que los números dentro de cada una refieren el porcentaje de homología entre los RE. Tomado de Enmark y Gustafsoon 1999.

En la rata la proteína del RE α consiste en 595 aminoácidos con un peso molecular de 66kDa y el RE se localiza en el cromosoma 6. El RE β es una proteína compuesta por 485 aminoácidos su peso molecular calculado que es de 54.2kDa.

El RE β tiene una substancial homología con el RE α especialmente en la región DBD (95%) y en la LBD (55%), ambas proteínas son funcionalmente homologas en su unión al estrógeno, con alta afinidad que se ha mostrado en análisis de saturación de unión-ligando.

La funcional homología del RE α y RE β también ha sido determinada por la medida de la actividad transcripcional de RE β en un sistema designado para evaluar la funcionalidad del RE α . Esto ha sido determinado por la activación de la transcripción de un ERE “*vitellogenin A2*”, donde en la presencia o ausencia del estrógeno, el ER β es funcionalmente homologo (Figura 24) (MacGregor 1998).

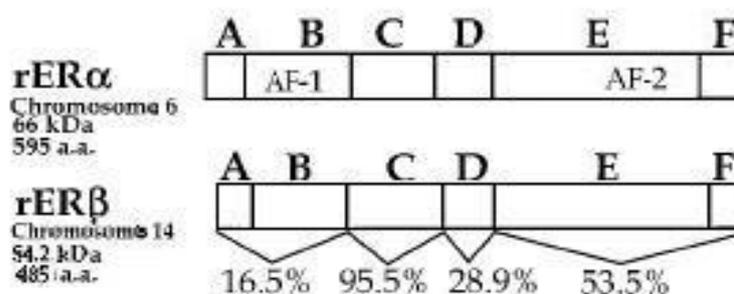


Figura 24. Comparación de las proteínas RE α y del RE β de la rata. Porcentaje de la homología de los aminoácidos en las regiones funcionales.

En la rata adulta, ambos REs han sido localizados en el ovario, la glándula mamaria, el útero, la próstata, el hígado, el pulmón, el hueso, la vejiga, en varias partes de la medula espinal y del cerebro, sin embargo 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).

LOCALIZACIÓN DEL RE β

Hipotálamo

Shughrue y col. (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 es 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 horas 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 en los lóbulos hipofisarios (*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 col (2000) mostraron que los gonadotropos qu sintetizan LH expresan el ARNm del RE β .

Ovario

Byers y col. (1997) mostraron que el RE β es la forma predominante de receptor a estrógenos presente durante el ciclo estral, el ARNm RE β fue mas o menos constante excepto en la noche del proestro cuando decrece. Por hibridación *in situ* se mostró que las células de la granulosa de folículos pequeños, en crecimiento y preovulatorios son immuno-reactivas al ARNm del RE β . En cambio, la expresión del ARNm RE β es débil en el cuerpo luteo; estos autores sugieren que la disminución en la cantidad de ARNm RE β durante la noche del proestro es atribuible al mensajero de los folículos pre-ovulatorios.

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

Funciones del RE β

Aún se desconoce cuál es el papel específico del RE α y del RE β en las funciones reproductivas de cada uno de los tejidos que los expresan.

Hegele-Hartung y col., (2004) en ratas de 24 días de edad, hipofisectomizadas, con reemplazo de gonadotropinas, GnRH y E₂, mostraron que la estimulación de los RE β estimuló las primeras etapas de la foliculogénesis, disminuyó la atresia folicular, indujo la expresión génica, estimuló el crecimiento folicular e incrementó en el número de ovocitos liberados. Por el contrario, el agonista al RE α 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 .

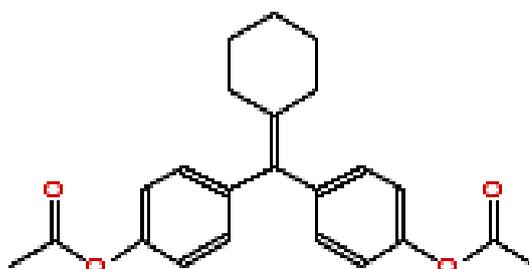
En ratas intactas el E₂ y el agonista al RE α inhiben la ovulación y estimulan el crecimiento del útero, lo que depende de la dosis utilizada. Mientras que el agonista del RE β , no estimula el crecimiento del útero (*Hegele-Hartung y col, 2004*). Estos autores sugieren que la falta de ovulación y la 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 “feedback” inhibitorios 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 “feedback” estimulante o de retroalimentación positiva sobre la neurona GnRH. Mediante el uso de un ligando selectivo para el RE α se ha mostrado que este receptor no solo 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 $RE\alpha$ y el $RE\beta$), en la mañana del diestro-1, provoca el bloqueo de la ovulación en el día del estro esperado, inhibe la secreción preovulatoria de LH, E_2 y P_4 (Garrido-Gracia y col. 2007). Con base en estos resultados, estos investigadores proponen que el papel estimulante de los estrógenos sobre la secreción de LH podría ser modulada por ambos receptores (Garrido-Gracia y col. 2007).

Sin embargo, el papel regulador de la unión del estradiol al $RE\alpha$ y $RE\beta$ 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).

CICLOFENIL: ANTAGONISTA SELECTIVOS DEL $RE\beta$



Propiedades químicas:

Nombre común: Ciclofenil

UIPAC: [4-[(4-acetoxycyclohexylidene)methyl]phenyl] acetate

Sinónimos: bis(*p*-acetoxycyclohexylidene)methane, 4,4'-Cyclohexylidene-methylenediphenol; 4-(Cyclohexylidene-methylene)-bis-phenol

Nombres comerciales: Ondogyne y Sexovid

Formula condensada: $C_{23}H_{24}O_4$

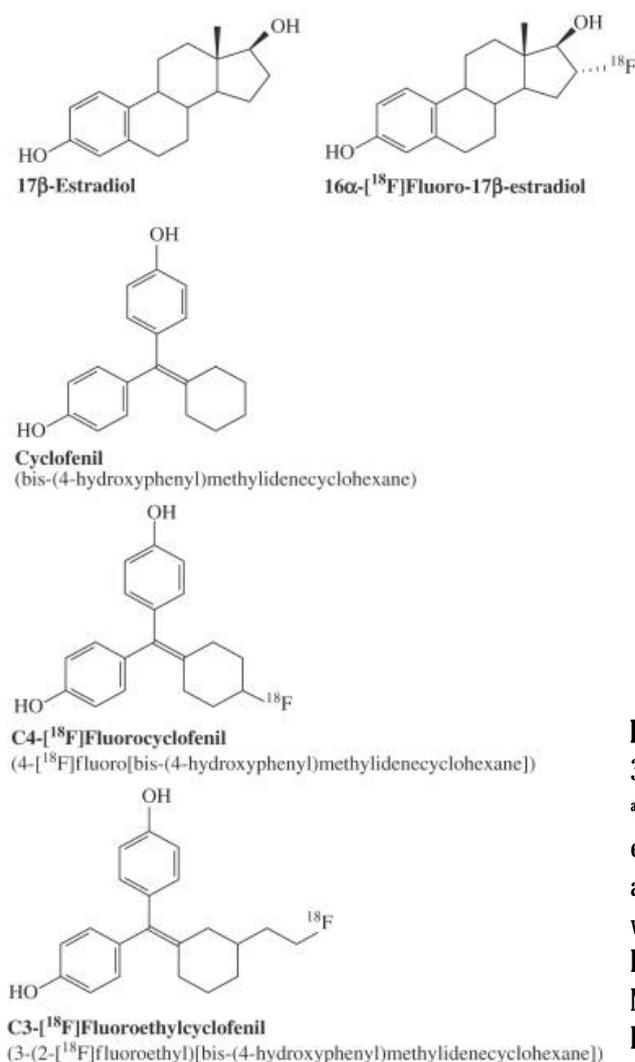
Masa Molecular: 364.434 g/mol

Actividad Farmacológica

Es un estimulante gonadal e inductor de la ovulación. Es utilizado en el tratamiento de la infertilidad y la amenorrea, pero es menos eficaz que el clomifeno.

Es un modulador selectivo de receptor de estrógeno. El ciclofenil 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 ciclofenil fue catalogado como un antagonista selectivo para el ER β ; tiene una afinidad de unión relativa por este receptor de 150 respecto al estradiol (figura 25) (*Tamrazi y col. 2002*).



Compd. No.	RBA ^a		β/α ratio
	ER α	ER β	
1 (cyclofenil)	120	290	2.4
2 (FCF) [18 F]FCF 6	27	62	2.3
3 (FECF) [18 F]FECF 9	120	130	1.1

Figura 25. Binding affinity of cyclofenil (1), 4-fluorocyclofenil (FCF, 2) and 3-fluoroethylcyclofenil (FECF, 3) to ER α and ER β

^aRelative Binding Affinity (RBA) where estradiol is 100%. The K_d value of estradiol is 0.2 nM for ER α and 0.5 nM for ER β . Values represent the average of multiple determinations. Competitive radiometric binding assays were done with purified full length human ER α and ER β (PanVera/Invitrogen Inc), using 10 nM [3 H]estradiol as tracer, as previously described [33].

Nucl Med Biol. Author manuscript; available in PMC 2007 August 13.

Published in final edited form as:

Nucl Med Biol. 2007 May; 34(4): 383–390.

Published online 2007 March 30. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2007.01.010.

Copyright notice and Disclaimer

Cuando aún no se clasificaba al ciclofenil como un antagonista selectivo para el RE β , en ratas adultas ovariectomizadas, el ciclofenil después de 24 horas de inyectarlo, altera a los receptores citoplasmáticos a estrógenos de similar manera, en cerebro, hipófisis y útero. En el útero los RE medidos fueron incrementados, y la concentración del receptor citoplasmático a progesterona también incremento, en comparación del los tratados con 17 β - estradiol o benzoato de estradiol.

Incrementa el peso del útero de manera similar que la dosis de E₂. El ciclofenil no es activo en la inducción de la receptividad sexual. Los autores sugirieron que el ciclofenil posee una alta actividad estrogénica, la cual es mediada probablemente vía estrógeno-receptor (*Bowman y col. 1982*).

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

En ratas intactas, el ciclofenil 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 gonadal (*Genazzani y col. 1990*).

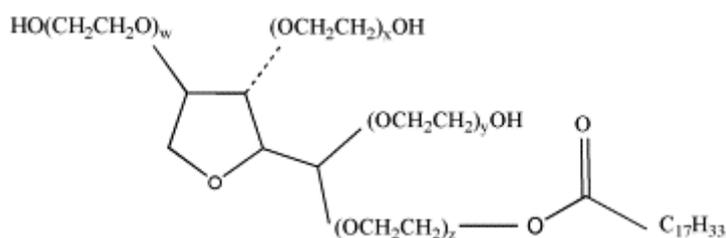
TWEEN**Propiedades químicas:**

Figura 26. Estructura del tween 80 en donde $w + x + y + z = 20$. (Marc D. Wenger^a, Amy M. Bowman^a, Marc V. Thorsteinsson^a, Kristine K. Little^a, Leslie Wang^a, Jinglin Zhong^b, Ann L. Lee^c and Peter DePhillips. Department of Biologics Development and Engineering, Merck Research Laboratories, Merck & Co., Inc., WP42A-20, West Point, PA 19486, USA. ^bVaccine Biometric Research, Merck & Co., Inc., West Point, PA 19486, USA)

Nombre común : Tween 20

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

Formula condensada: C₅₈H₁₁₄O₂₆

Masa Molecular: 1227.54 g/mol

Densidad: 1.1 g/mL

Punto de ebullición: >100°C

Actividad Farmacológica

El polisorbato 20 (comercialmente conocido como tween 20) es un surfactante no ionico que se utiliza principalmente en la fabricación de cosméticos, productos del cuidado de piel, en alimentos y productos farmacéuticos. El polisorbato se compone de un grupo central sorbitan con cuatro cadenas óxido de polioxi-etileno de lado, cuando estas cadenas se esterifican con un ácido oleoso (figura 26) y con ácido láurico dependiendo de la longitud variable de las cadenas, pueden obtener 1500 estructuras posibles. Ya que si las cadenas de polioxi-etileno son más cortas se forman agregados muy grandes es muy viscosa la solución.

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

La dosis oral reportada de Tween 20 para ratas adultas es de $> 30\text{ml/Kg}$ y la intravenosa de 0.7ml/Kg , por su bajo toxicidad el tween se a considerado bastante seguro para la preparación de alimentos y productos farmacéuticos. (Bartsch, W.1984)

Sin embargo los detergentes no ionicos también se utilizan para la solubilización de membranas y como un medio solvente para proteínas de membrana (figura 27), generalmente el detergente óptimo para cierta proteína de membrana o membrana se tiene que encontrar empíricamente y puede depender del tipo del experimento que uno quiere hacer.

Los detergentes no iónicos no poseen ningún grupo cargado. El carácter hidrófilo de estos detergentes se debe al grupo hidroxilo, disuelve los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína, mientras que las interacciones proteína-proteína no resultan afectadas. De este modo se conserva la estructura nativa de las proteínas. Además, el detergente sustituye a los lípidos, que normalmente están unidos a la parte hidrófoba de las proteínas, con lo que crean un entorno de tipo lípido y pueden estabilizar proteínas solubilizadas.

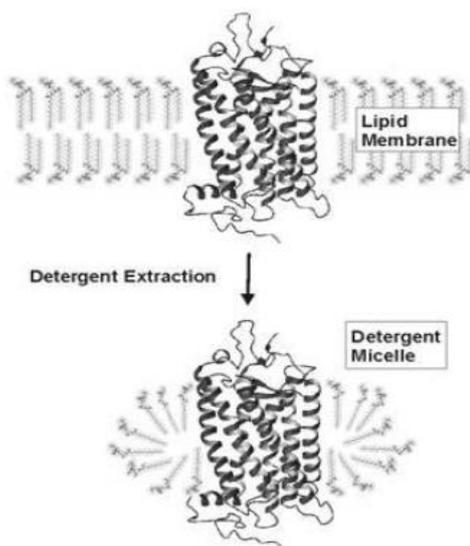


Figura27 Solubilización de proteínas por detergentes no ionicos.

Properties of Detergents 1 by Ari Helenius, Darrell R. Mccaslin, Erik Fries, and Charles Tanford).

Es importante tener presente que los lípidos y proteínas de una membrana nativa actúan recíprocamente uno con el otro de una manera compleja que diferirá con todo detalle de membrana a membrana.

Estudios han establecido que el tween por ser un detergente no iónico es usado para estudiar la estructura de las subunidades de proteínas de membrana y las interacciones de proteínas de membrana con estructuras externas ya que no desnaturizan a las proteínas por que débilmente desnaturizante y no alteran la carga de las proteínas a las que se unen (figura 28).

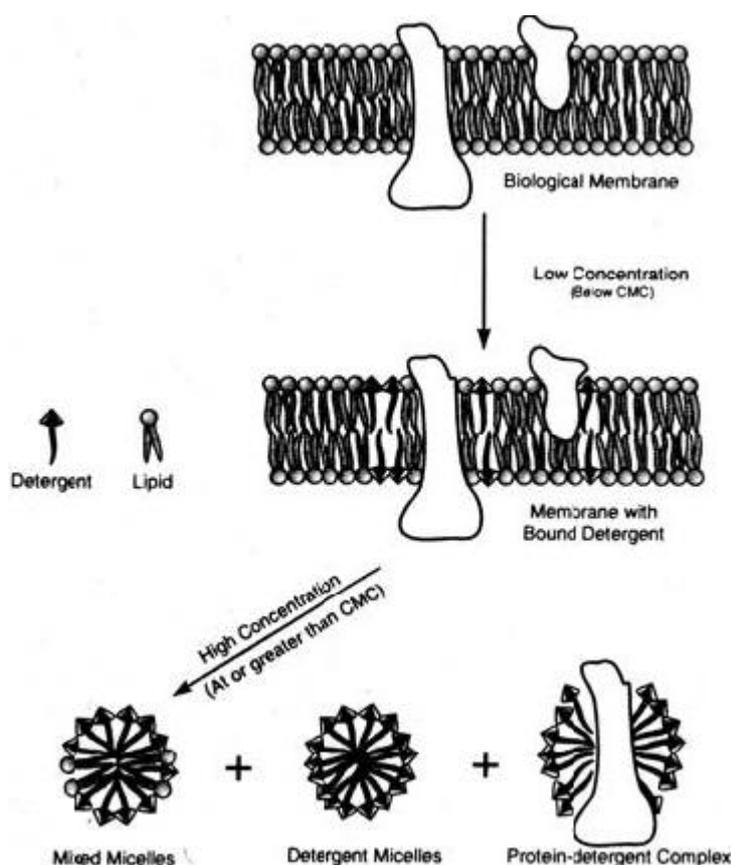


Figura 28 -Properties of Detergents 1 by Ari Helenius, Darrell R. Mccaslin, Erik Fries, and Charles Tanford).

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

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la rata, el 17β -estradiol es una de las señales que regulan la función del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Existen dos tipos de receptores a estrógenos: el RE- α y el RE- β . En el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) se han identificado ambos RE (Butler JA. 1999); sin embargo sólo el RE- β ha sido identificado en las neuronas GnRHérgicas y se ha sugerido que tanto el RE- α como el RE- β están involucrados en los efectos de “feedback” inhibitorios de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH y las gonadotropinas. Por medio del uso de ratones “knockout”, en los que el RE- α o RE- β son desactivados, se ha sugerido que el RE- α pero no el RE- β es necesario y suficiente para que se manifieste el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH y en consecuencia estimular la secreción preovulatoria de LH (Wintermantel, Tim M.1998).

Sin embargo, los resultados obtenidos con este tipo de modelos experimentales no son concluyentes, ya que limitan el estudio de las interacciones fisiológicas entre el RE- α y el RE- β en la regulación de la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación, por derivarse de un modelo experimental en el que la desactivación génica de uno u otro receptor está presente en todos los órganos blanco del 17β -estradiol; así que se trabaja con un animal anti-fisiológico.

Por lo tanto, en este proyecto de tesis se estudiaron los efectos del bloqueo de los RE- β de POA-AHA durante el ciclo estral así como los cambios hormonales que ocurren cuando el bloqueo de los RE- β se realiza en las fases de estro y proestro, sobre la secreción de gonadotropinas, progesterona, estradiol y la ovulación. La lección del ciclo para llevar a cabo esta investigación radica en el hecho que el máximo número de células ir-RE β en POA-AHA se observa a las 13:00 horas del proestro y del estro (Mendoza-Garcés L. 2007).

HIPÓTESIS

Dado que la neuronas GnRHérgicas expresan el RE β y que en el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) el número de células inmunoreactivas a este receptor es mayor en los días del proestro y del estro, entonces el bloqueo de los RE β bloqueará la secreción preovulatoria de las gonadotropinas y la ovulación

OBJETIVO GENERAL:

- ✚ Estudiar los efectos del bloqueo unilateral de los RE β del área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) sobre el eje hipotálamo- hipófisis- ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ✚ Evaluar los efectos del bloqueo unilateral de los RE β del lado izquierdo o derecho de POA-AHA durante el ciclo estral, sobre la ovulación, el peso de los ovario y el útero; así como en la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, progesterona y estradiol en el día del proestro.
- ✚ Analizar los efectos del bloqueo unilateral de los RE β del lado izquierdo o derecho de POA-AHA durante el ciclo estral, sobre la ovulación, el peso de los ovario y el útero; así como en la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, progesterona y estradiol en el día del estro.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes (190-230 gr) cíclicas de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso al alimento (Purina S.A., México) y agua.

Diseño experimental donde se muestran los tratamientos realizados, así como horas y días en que fueron sacrificados los animales.

	ESTRO LD y LI de POA-AHA Intactas, Tween y Ciclofenil
ESTRO	8:30-930 a.m.
DIESTRO 1	8:30-930 a.m.
DIESTRO 2	8:30-930 a.m.
PROESTRO	8:30-930 a.m.

	ESTRO	DIESTRO 1	DIESTRO 2	PROESTRO
ESTRO LD y LI de POA-AHA(Intactas, Tween y Ciclofenil)	11:00 17:00	11:00 17:00	11:00 17:00	11:00 17:00
PROESTRO LD y LI de POA-AHA (Intactas, Tween y Ciclofenil)				11:00 17:00

A todos los animales se les realizó el estudio del ciclo estral mediante la toma diaria de frotis vaginales, a la misma hora del día (10:00 horas). Mediante un asa de cultivo que se ha humedecido con agua, se introdujo en la vagina de cada rata, la muestra obtenida se colocó en un portaobjeto, se tiñó con hematoxilina-eosina y posteriormente se observó al microscopio. Sólo se utilizaron animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración.

GRUPOS EXPERIMENTALES

Entre las 8:30 y 9:30 horas del día del proestro, estro, diestro-1 ó del diestro-2, grupos de 9 a 10 animales fueron anestesiados con (40 mg/kg p.c.) de pentobarbital sódico por vía intra-peritoneal. Una vez anestesiados se colocaron en un aparato estereotáxico para ubicar la zona de estudio con base a las coordenadas del Atlas del Cerebro de la Rata de König y Klippel (*König JFR, Klippel RA.1963*). Una vez en la zona de estudio, las ratas fueron micro-inyectadas en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA con 25µg de ciclofenil (antagonista al RE-β, Sigma-Aldrich, México) disuelto en 1 µL de una solución de 100 µL de tween 20 en 10 mL de agua (vehículo), durante un minuto. Como grupos control se utilizaron animales inyectados con vehículo (un µl durante un minuto). Los grupos de referencia correspondieron a animales sin tratamiento sacrificados en las mismas horas que los grupos experimentales.

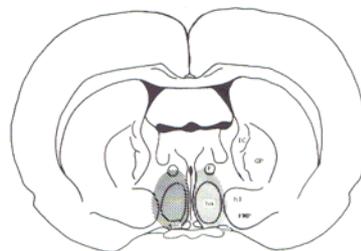


Figura 28. Zona de estudio: Área Preóptica Hipotálmica Anterior (POA-AHA), parte izquierda y derecha.
Konig JF y Kilppel RA. The rat brain a stereoatatic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of Brain Stem. New York.: Krieger Publishing Co. Inc; 1967.

La figura 28 muestra un corte coronal del cerebro de la rata donde se muestra el lado izquierdo y derecho de POA-AHA. Las coordenadas correspondientes al corte son: antero-posterior 0.4 mm, lateral \pm 0.6 mm y vertical 0.86mm con respecto al punto de Bregma (*König y Klippel, 1963*).

Estos animales fueron sacrificados en el día del estro esperado por decapitación, se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados, los ovarios y el útero para pesarlos y el cerebro para verificar la zona donde se inyectó el fármaco o el vehículo.

Con la finalidad de conocer las causas endocrinas por las que los animales no hayan ovulado como resultado del bloqueo de los RE- β , grupos de animales se volvieron inyectar en el día del proestro y Estro bajo el mismo procedimiento y fueron sacrificados a las 11:00 y 17:00 horas de los días del estro (mismo día de la inyección), del diestro-1, del diestro-2 y/o del proestro. Los animales inyectados en proestro fueron sacrificados a las 11:00 y 17:00 horas del mismo día. (Tabla 1)

Como grupos testigo absoluto se utilizaron animales intactos sacrificados a las mismas horas que los tratados con cicofenil .

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación, 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 E₂, P₄, LH y FSH por radio-inmuno-análisis (RIA) y se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados en los animales matados al estro esperado; así mismo los ovarios y el útero para pesarlos en todos los grupos

CUANTIFICACIÓN HORMONAL

La cuantificación de las concentraciones plasmáticas E₂ y P₄, 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 (P: 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.0, 20.0 y 40.0 ng/ml; E₂: 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 ($^{125}\text{I-P}$, $^{125}\text{I-E}_2$). 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 E_2 se expresaron en pg/ml y los de P_4 en ng/ml . Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 5.3% y 9.87 para P_4 , 6.9% y 10.8% para E_2 . El límite de detección para P_4 fue 0.003 ng/ml y para E_2 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 National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). A 100 μl de suero se le adicionó 100 μl de hormona marcada con ^{125}I y 100 μl 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 μl del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubaron durante dos horas; los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 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.

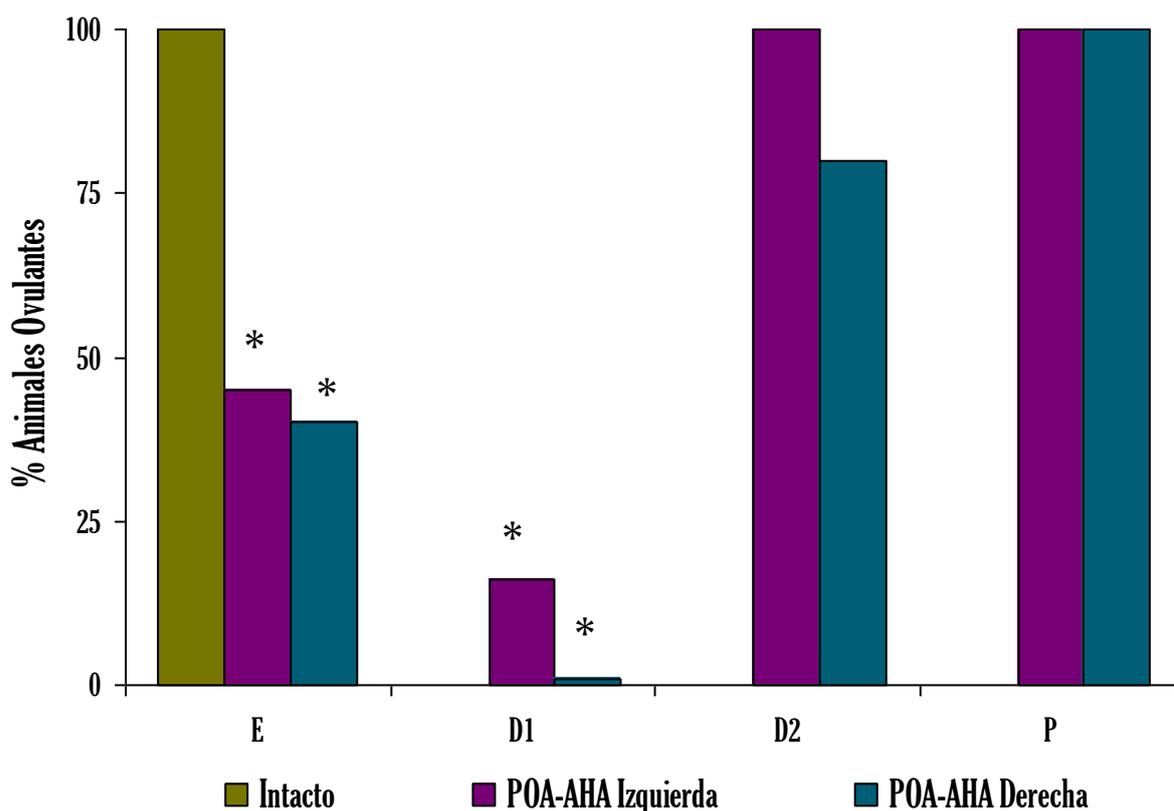
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del número de animales ovulantes se analizó por la prueba de Fisher, los del número de ovocitos liberados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de “U” Mann-Withney. Los datos de las concentraciones séricas de las hormonas esteroides y proteicas fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA), seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizo por medio de la prueba de “t” de Student. En todos los casos se aceptó como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fuese ≤ 0.05 .

RESULTADOS

EFFECTOS DEL TWEEN.

Animales Ovulantes. En el día del estro, la microinyección de tween en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, provocó que sólo el 50% de los animales tratados ovularan en el estro esperado. En el día del diestro-1, el 16% de los animales ovularon cuando se inyectaron del lado izquierdo y ninguno lo hizo cuando se inyectaron en el lado derecho. En los días del diestro-2 o proestro, la inyección del tween en uno u otro lado de POA-AHA no modificó esta variable (Gráfica 1).

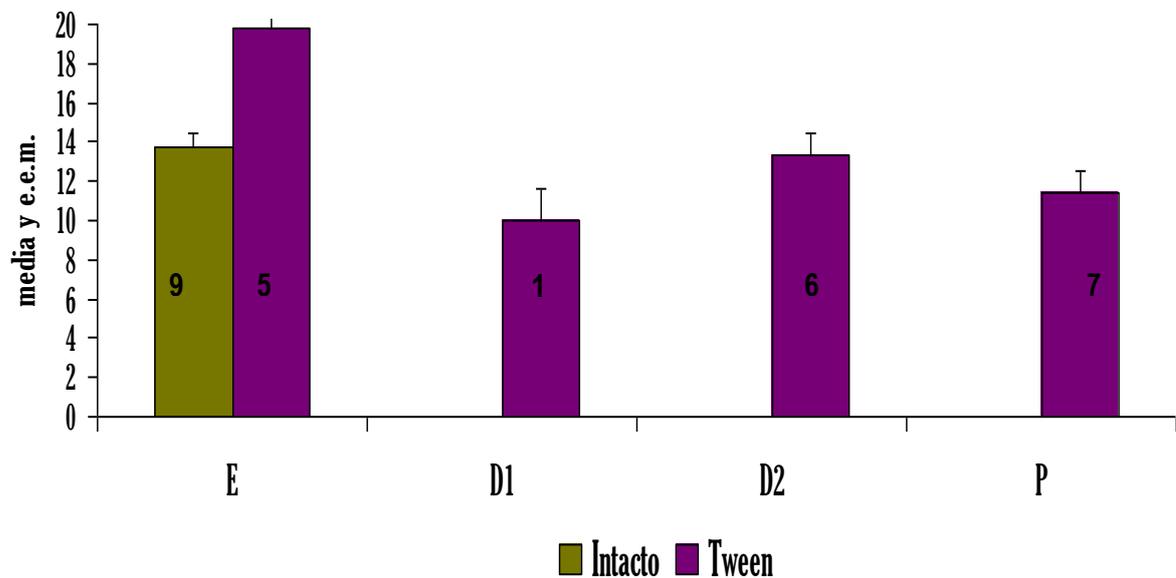


* $p < 0.05$ vs. Intactos (Prueba de χ^2)

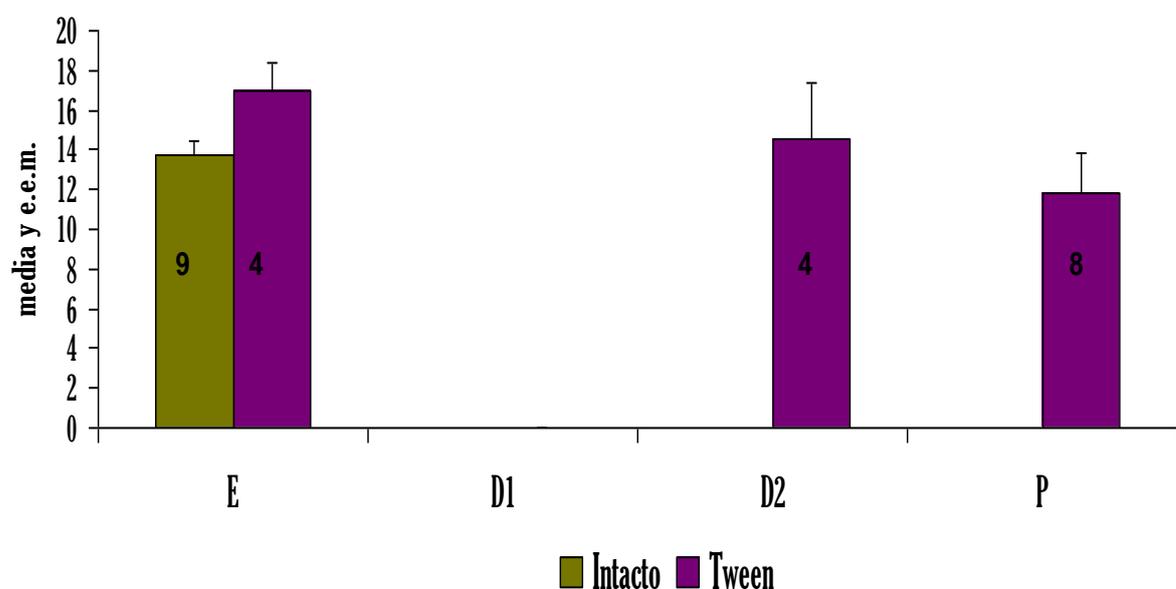
Gráfica 1. Efectos de la microinyección de tween en lado izquierdo o derecho de POA-AHA, en uno de los días del ciclo estral, sobre el porcentaje de animales que ovularon el día del estro esperado.

Número de Ovocitos Liberados: La microinyección de tween en el lado izquierdo o derecho POA-AHA en alguno de los días del ciclo estral, no modificó el número total de ovocitos liberados por los animales que ovularon. (Gráfica 2). *El número dentro de a barra indica el número de animales que ovularon.*

POA-AHA Izquierdo



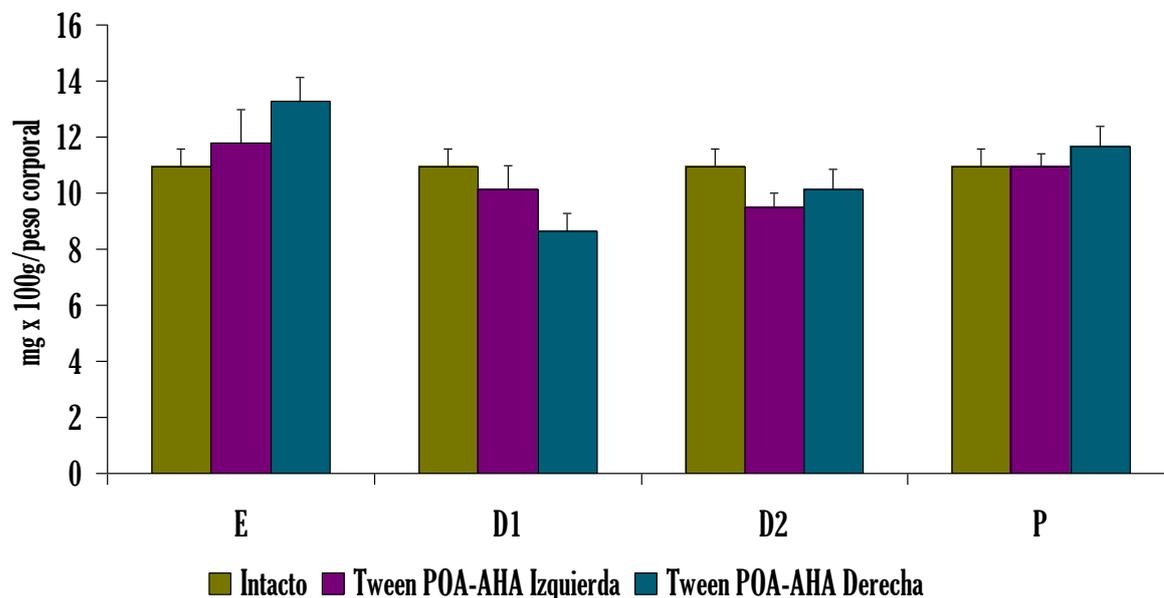
POA-AHA Derecha



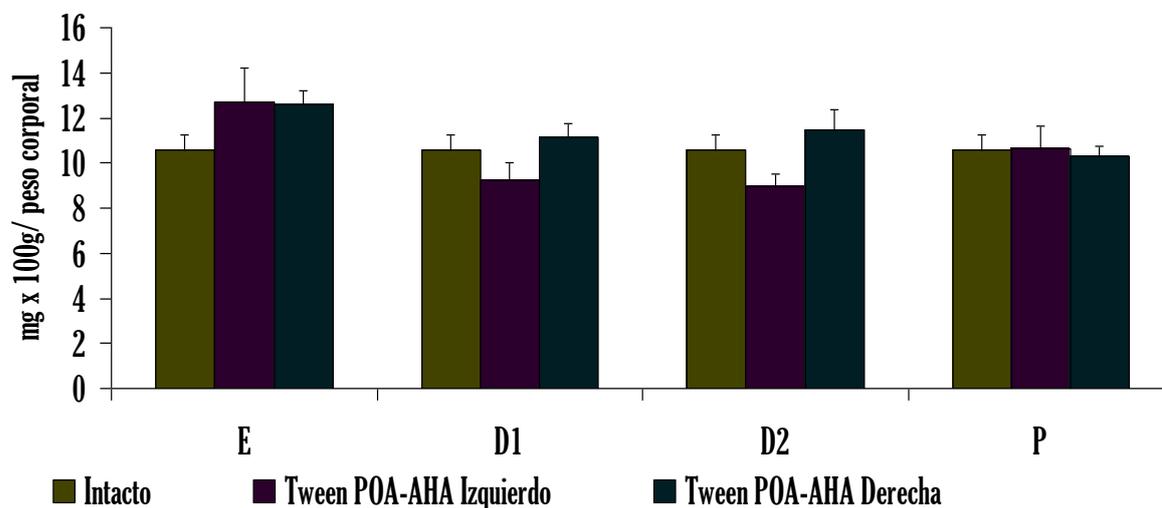
Gráfica 2. Efectos de la microinyección de tween en lado izquierdo o derecho de POA-AHA, durante el ciclo estral, sobre el número de ovocitos liberados por los animales que ovularon en el día del estro esperado.

Peso de ovarios. La microinyección de tween en el lado izquierdo ó derecho de POA-AHA en alguno de los días del ciclo estral, no modificó el peso de los ovarios respecto al grupo de animales intactos. (Gráfica3)

Ovario Izquierdo

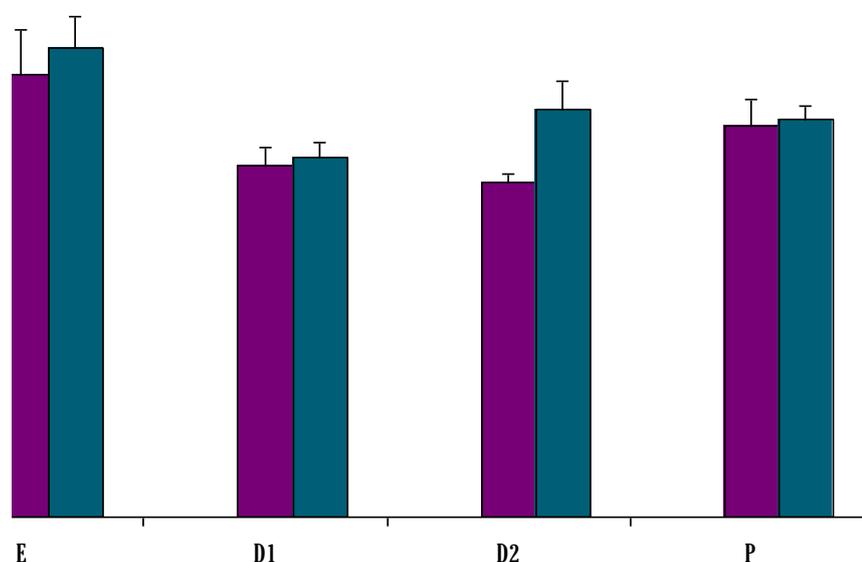


Ovario Derecho



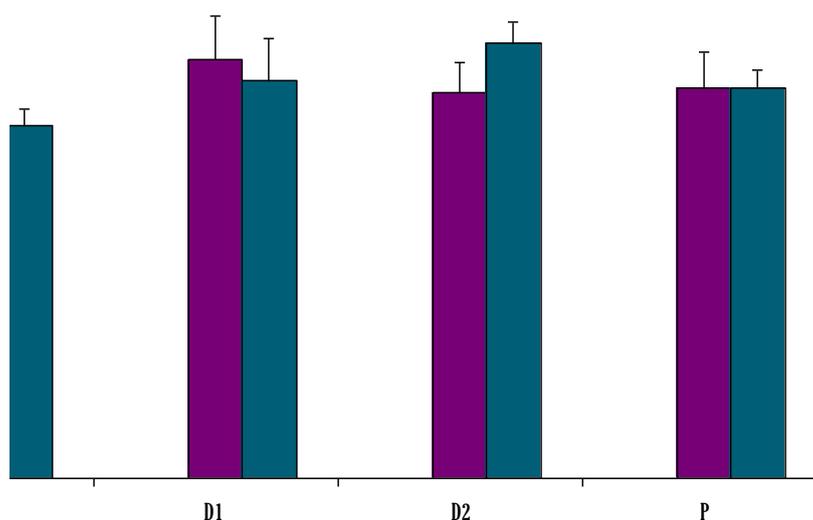
Gráfica 3. Efectos de la microinyección de tween en lado izquierdo o derecho de POA-AHA, en cada uno de los días del ciclo estral, sobre el peso de los ovarios de los animales que ovularon en el día del estro esperado.

Masa ovárica. La microinyección de tween en el lado izquierdo ó derecho de POA-AHA en alguno de los días del ciclo estral, no modificó la masa ovárica. (Gráfica 4)



Gráfica 4. Efectos de la microinyección de tween en lado izquierdo o derecho de POA-AHA, en cada uno de los días del ciclo estral sobre la masa ovárica de los animales que ovularon en el día del estro esperado.

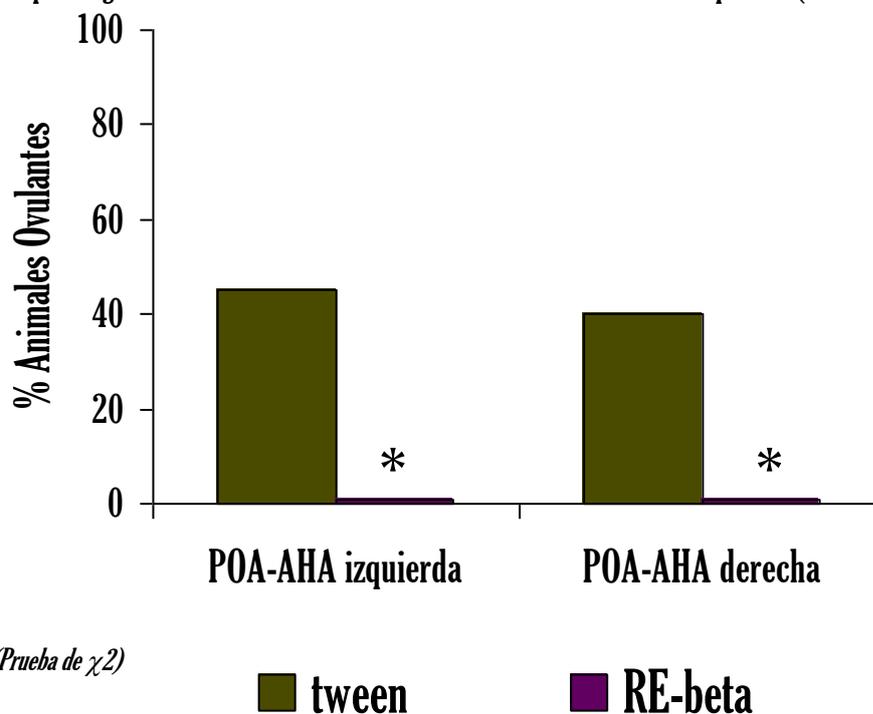
Peso del útero. La microinyección de tween en el lado izquierdo POA-AHA ó derecho de POA-AHA de alguno de los días del ciclo estral, no modificó el peso del útero. (Gráfica 5)



Gráfica 5. Efectos de la microinyección de tween en lado izquierdo o derecho de POA-AHA, en cada uno de los días del ciclo estral, el peso del útero de los animales que ovularon en el día del estro esperado.

EFFECTOS DEL CICLOFENIL:

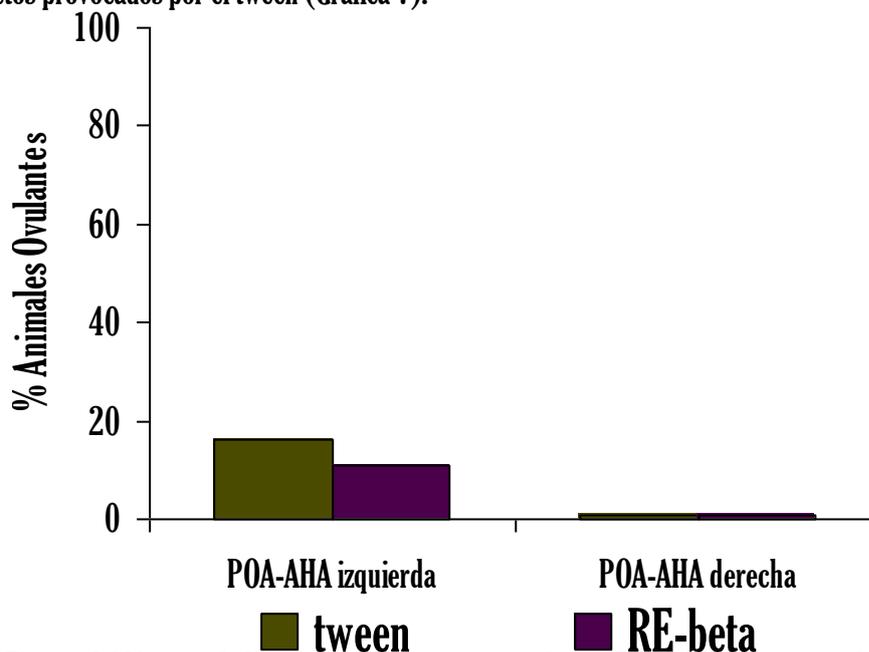
Animales Ovulantes: En el día del estro, la microinyección de ciclofenil en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA provocó que ninguno de los animales tratados ovulara en el día del estro esperado (Gráfica 6).



* $p < 0.05$ vs. tween (Prueba de χ^2)

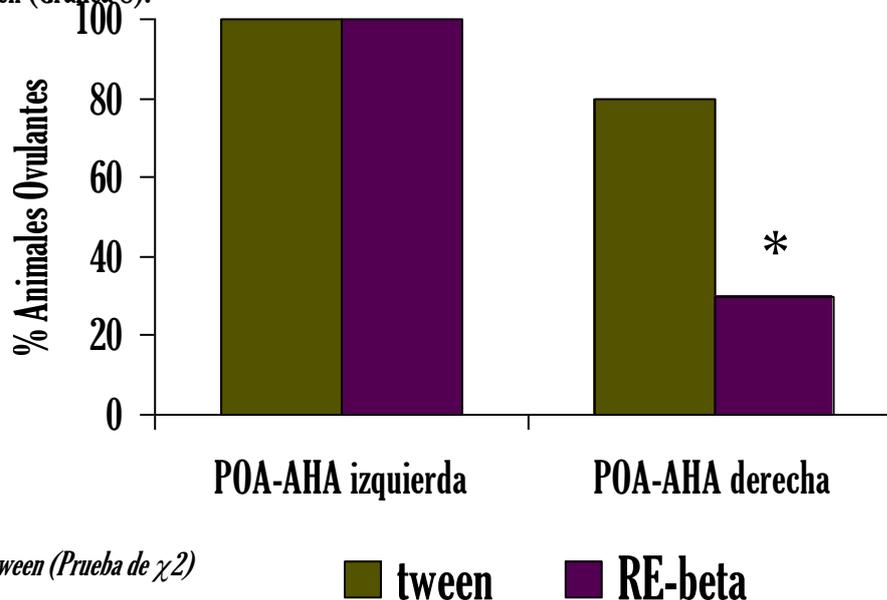
Gráfica 6. Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos beta ($RE\beta$) del lado izquierdo o derecho de POA-AHA, realizado en el día del estro, sobre el porcentaje de animales ovulantes en el día del estro esperado.

En el día del Diestro-1, la microinyección de ciclofenil en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, no modificó los efectos provocados por el tween (Gráfica 7).



Gráfica 7. Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos beta ($RE\beta$) del lado izquierdo o derecho de POA-AHA, realizado en el día del Estro, sobre el porcentaje de animales ovulantes al día del Diestro-1 esperado. 64

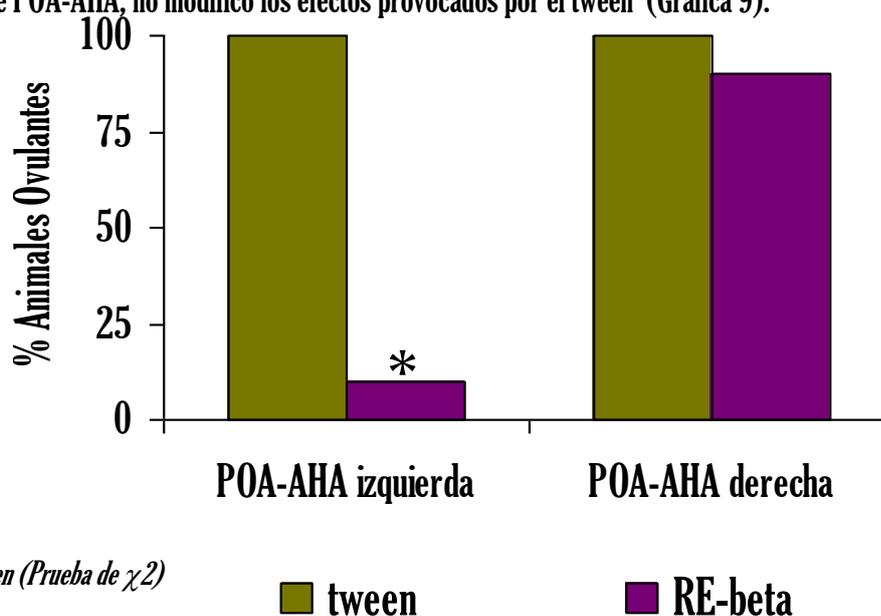
En el día del diestro-2, la microinyección de ciclofenil en el lado izquierdo de POA-AHA, no modificó los efectos provocados por el tween (vehículo), en cambio, la microinyección del fármaco en el lado derecho de POA-AHA, disminuyó el porcentaje de animales que ovularon al día del estro esperado, respecto al grupo de animales tratados con tween (Gráfica 8).



* $p < 0.05$ vs. tween (Prueba de χ^2)

Gráfica 8. Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos beta ($RE\beta$) del lado izquierdo o derecho de POA-AHA, realizado en el día del estro, sobre el porcentaje de animales ovulantes al día del diestro-2 esperado.

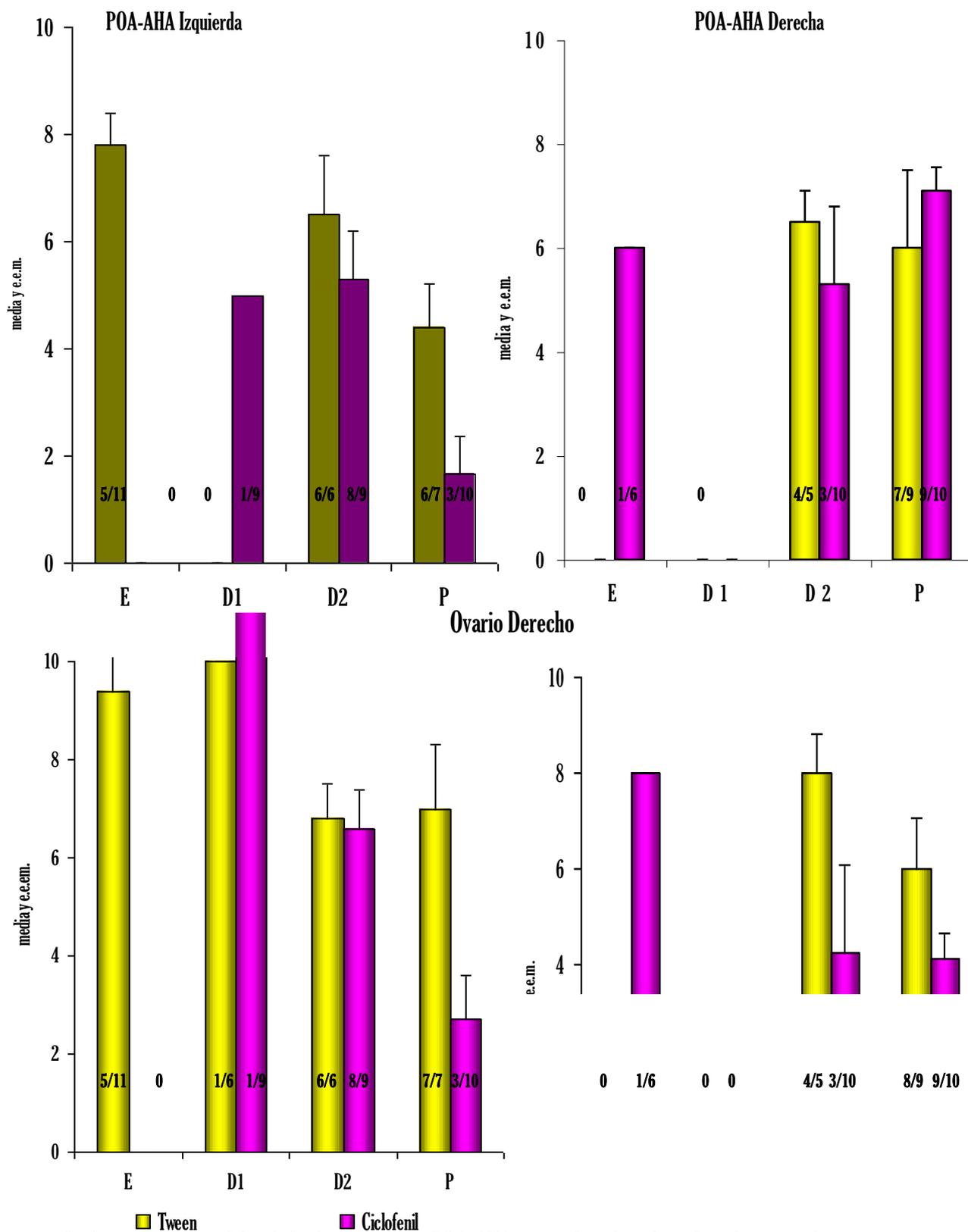
En el día del proestro, la microinyección de ciclofenil en el lado izquierdo de POA-AHA, disminuyó el porcentaje de animales que ovularon al día del estro esperado, mientras que, la microinyección del fármaco en el lado derecho de POA-AHA, no modificó los efectos provocados por el tween (Gráfica 9).



* $p < 0.05$ vs. tween (Prueba de χ^2)

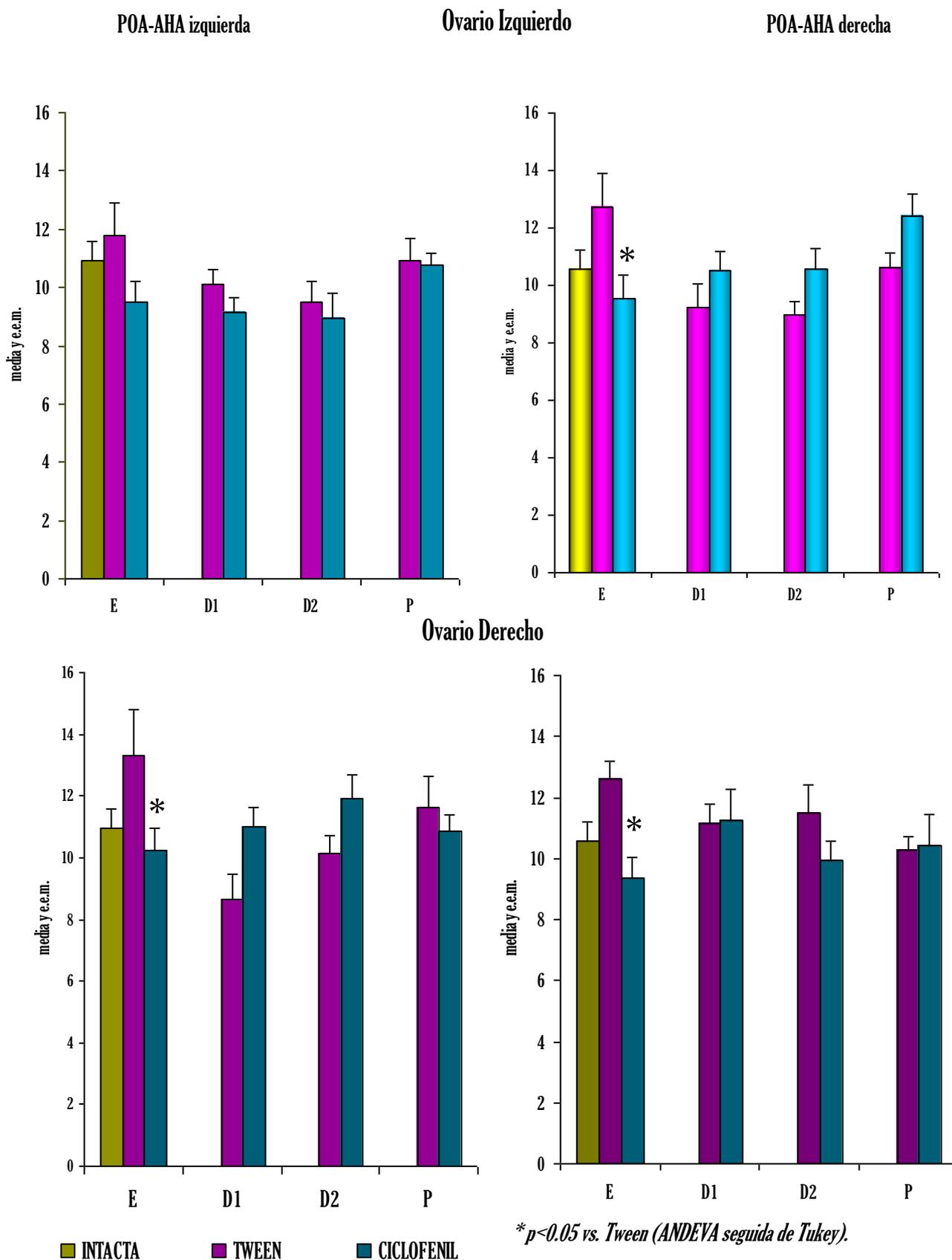
Gráfica 9. Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos beta ($RE\beta$) del lado izquierdo o derecho de POA-AHA, realizado en el día del proestro sobre el porcentaje de animales ovulantes al día del estro esperado.

Número de ovocitos liberados. Sólo la microinyección de ciclofenil en el lado izquierdo de POA-AHA, realizada en el día del proestro provocó disminución del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y por el derecho con respecto a los animales inyectados con tween (Gráfica 10). *El número dentro de a barra indica el número de animales que ovularon.*



Gráfica 10. Efectos del ciclofenil inyectado en POA-AHA izquierda o derecha sobre el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho

Peso de los ovarios. La inyección unilateral de ciclofenil en el día del estro, disminuyó el peso de ambos ovarios en el día del estro esperado con respecto a los grupos inyectados con tween (Gráfica 11).



Gráfica 11. Efectos del ciclofenil inyectado en POA-AHA izquierda o derecha sobre el peso (mg/100 g peso) del ovario izquierdo o derecho.

Masa Ovarica: La microinyección de ciclofenil en el lado izquierdo ó derecho de POA-AHA en alguno de los días del ciclo estral, no modificó la masa ovárica. (Tabla 1)

Tabla 1. Media \pm eem de la masa ovárica de animales inyectaos con tween o ciclofenil en POA-AHA izquierda o derecha durante el ciclo estral. * $p < 0.05$ vs tween (Prueba "t" de Student).

Día del ciclo	POA-AHA Izquierda		POA-AHA Derecha	
	Tween	Ciclofenil	Tween	Ciclofenil
E	24.4 \pm 2.4	19.0 \pm 1.3*	25.8 \pm 1.7	19.5 \pm 1.4*
D1	19.3 \pm 1.0	19.6 \pm 0.6	19.8 \pm 0.8	23.1 \pm 1.8
D2	18.4 \pm 0.5	19.4 \pm 1.4	22.4 \pm 1.6	21.8 \pm 1.0
P	21.5 \pm 1.5	23.1 \pm 0.6	21.9 \pm 0.7	21.3 \pm 1.4

Peso de Útero: La inyección unilateral en POA-AHA de ciclofenil , en uno de los días del ciclo estral, no modificó el peso del útero en el día del estro esperado con respecto a los grupos inyectados con tween (Tabla 2)

Tabla 2. Media \pm eem del peso del útero de animales inyectaos con tween o ciclofenil en POA-AHA izquierda o derecha durante el ciclo estral.

Día del ciclo	POA-AHA Izquierda		POA-AHA Derecha	
	Tween	Ciclofenil	Tween	Ciclofenil
E	125.8 \pm 7.4	145.1 \pm 10.9	115.1 \pm 5.4	120.7 \pm 10.1
D1	136.9 \pm 14.4	151.8 \pm 8.0	129.9 \pm 13.7	129.5 \pm 14.6
D2	125.9 \pm 10.10	133.0 \pm 8.5	142.3 \pm 6.8	154.7 \pm 8.5
P	127.5 \pm 11.93	147.3 \pm 8.3	127.6 \pm 5.9	125.8 \pm 8.6

EFFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE CICLOFENIL EN EL DÍA DEL ESTRO

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS.

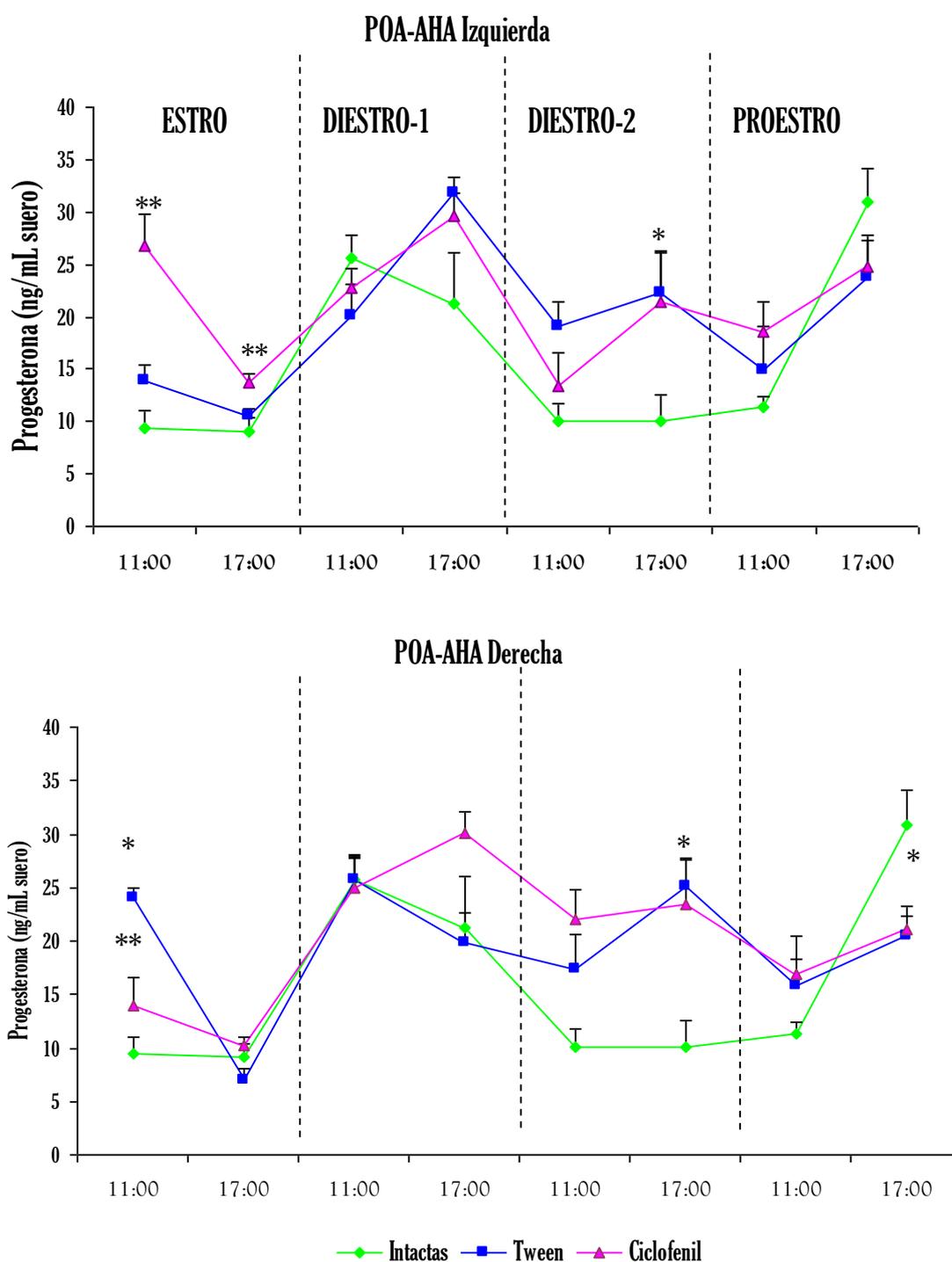
Progesterona (ng/ml suero): La inyección de tween en la porción izquierda de POA-AHA en el día del estro, modificó la concentración de esta hormona durante los días posteriores a la inyección. En cambio, al inyectar el ciclofenil incrementó las concentraciones de progesterona y no se observaron cambios posteriores (Gráfica 12).

En cambio, la inyección de tween en este día del ciclo, del lado derecho de POA-AHA aumentó la concentración de progesterona a las dos horas de inyectarlo (11:00 horas del Estro) y a las 17:00 horas del diestro-2, y la inhibió a las 17:00 horas del proestro. Al igual que en el lado opuesto, la concentración de progesterona se incrementó a las dos horas de inyectar el ciclofenil en el lado derecho de POA-AHA y no se observaron cambios posteriores (Gráfica 12).

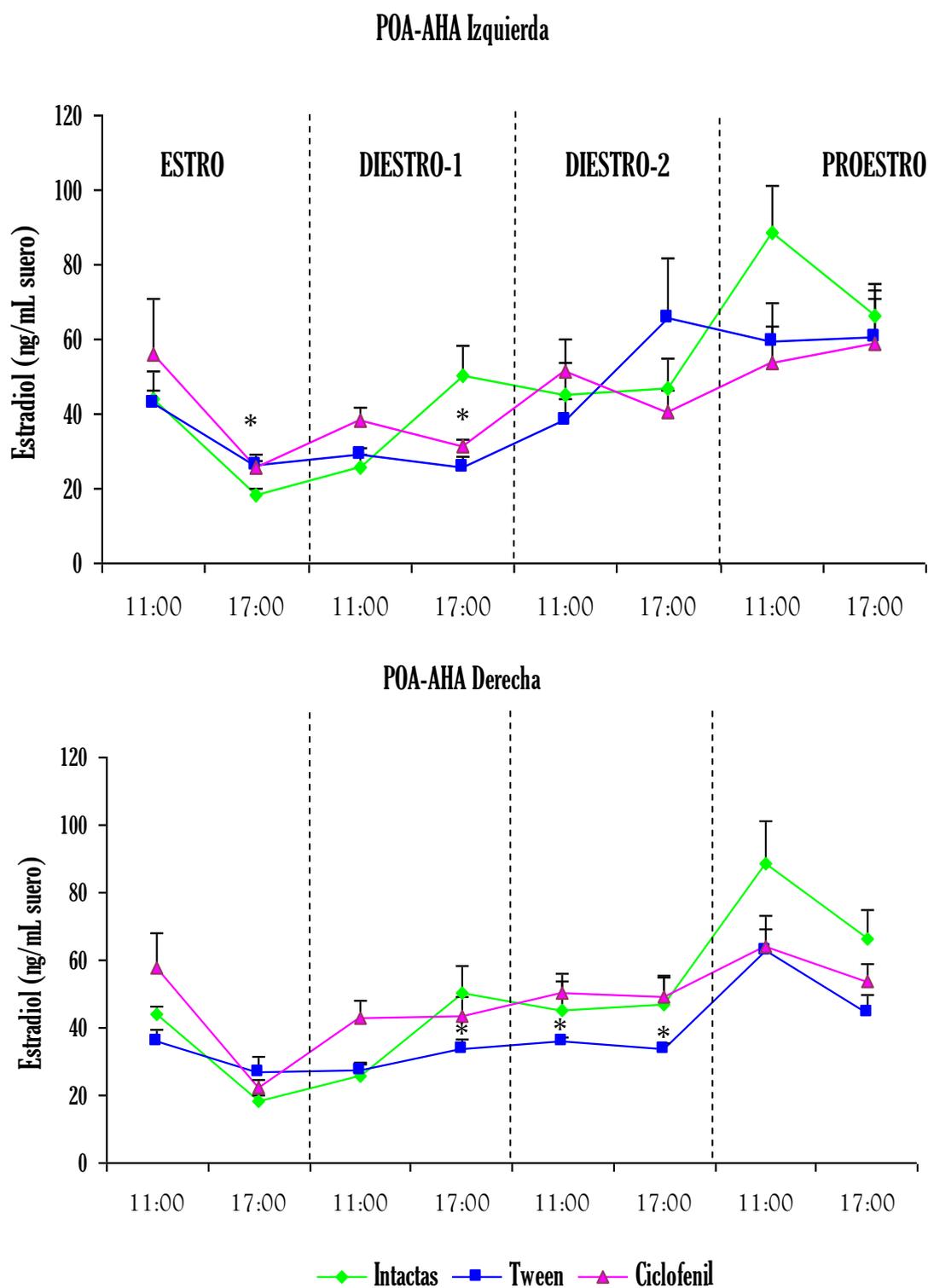
Estradiol (pg/ml de suero): En el día del estro, la inyección de tween en la porción izquierda de POA-AHA provocó disminución en la concentración de estradiol en la tarde del diestro-1 y adelantó el pico de esta hormona, que ocurre a las 11:00 horas del proestro, esto es a las 17:00 horas del diestro-2. El único efecto observado por la inyección de ciclofenil fue el aumento de la concentración de estradiol a las dos horas de haberlo inyectado (Gráfica 13). La inyección de tween en el día del estro pero del lado derecho de POA-AHA provocó disminución de la concentración de estradiol en la tarde del diestro-1 y a las 11:00 horas del proestro. Nuevamente, el único efecto observado por la inyección de ciclofenil fue el aumento de la concentración de estradiol a las dos horas de haberlo inyectado (Gráfica 13).

Hormona Folículo Estimulante (FSH) (ng/ml de suero): En el día del estro, la inyección de tween en la porción izquierda de POA-AHA provocó aumento de la concentración de la FSH a las dos horas de haberlo inyectado, así como disminución del “pico” preovulatorio que ocurre a las 17:00 horas del proestro. La inyección de ciclofenil no modificó los efectos observados por el tween (Gráfica 14). La inyección de tween en el día del estro pero del lado derecho de POA-AHA adelantó el “pico” preovulatorio de esta hormona a las 11:00 horas del diestro-2. Nuevamente, La inyección de ciclofenil no modificó los efectos observados por el tween (Gráfica 14).

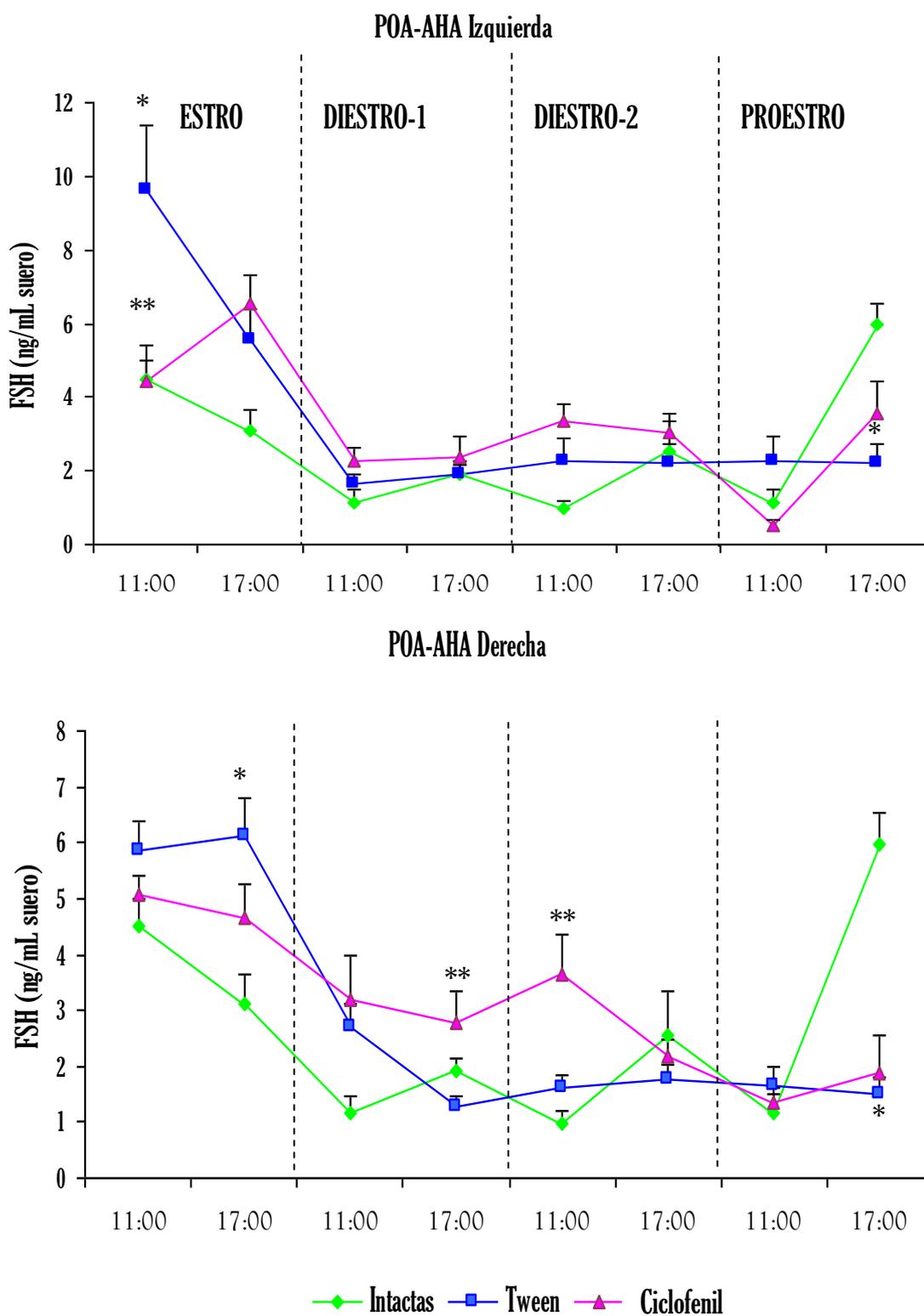
Hormona Luteinizante (LH) (ng/ml de suero): En el día del estro, la inyección de tween en la porción izquierda o derecha de POA-AHA no provocó cambios significativos en la concentración de la LH durante el ciclo. En cambio, la inyección de ciclofenil inhibió el “pico” preovulatorio de la tarde del proestro (Gráfica 15).



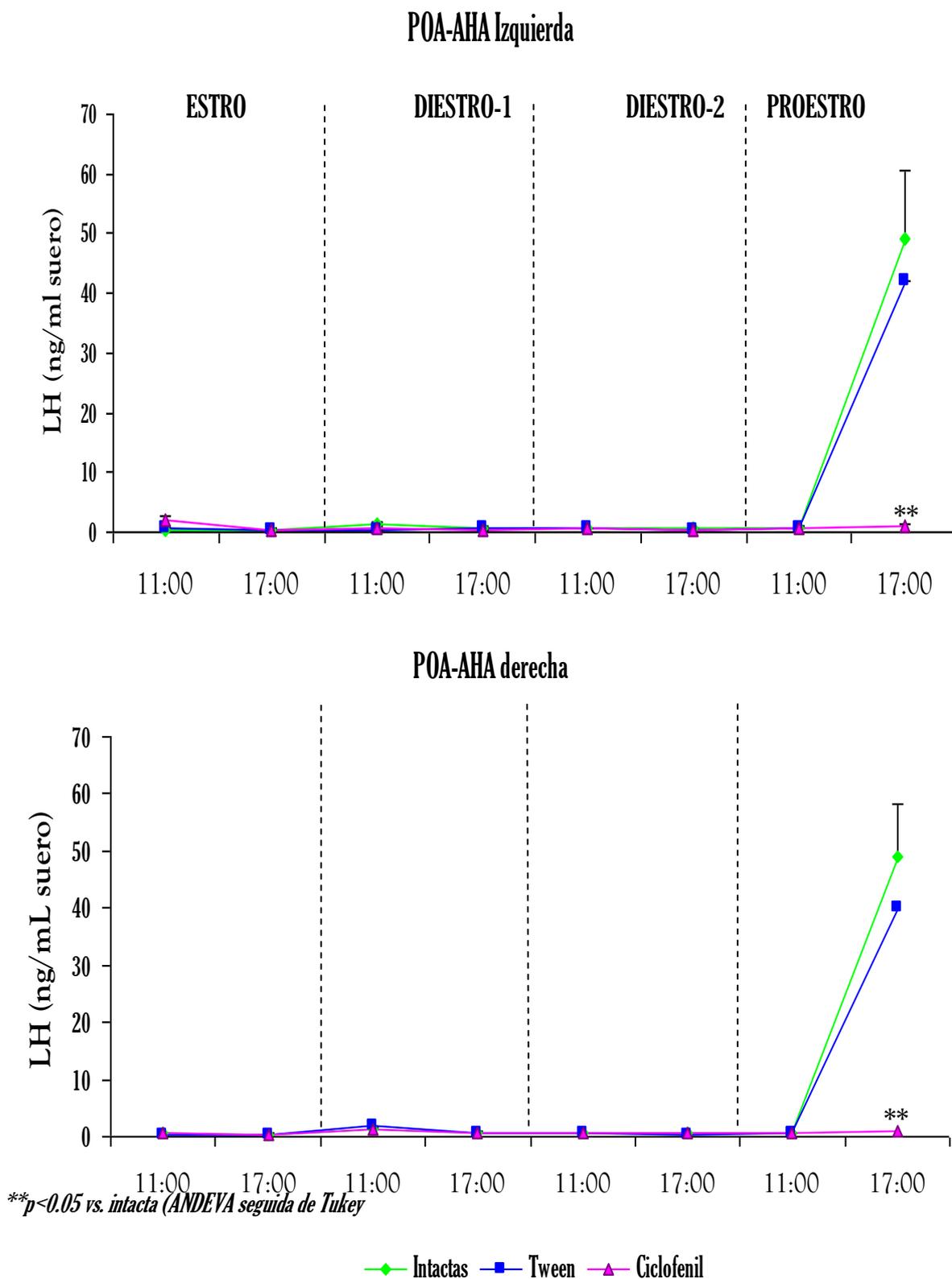
Gráfica 12. Efectos de la inyección en el día del estro, de tween o ciclofenil en POA-AHA izquierda o derecha, sobre la concentración de **Progesterona** (ng/ml suero). * $p < 0.05$ vs. *Intacto* (ANDEVA seguida de Tukey); ** $p < 0.05$ vs. *Tween* (ANDEVA seguida de Tukey).



Gráfica 13. Efectos de la inyección en el día del estro, de tween o ciclofenil en POA-AHA izquierda o derecha, sobre la concentración de **Estradiol** (pg/ml suero). * $p < 0.05$ vs. *Intacto* (ANDEVA seguida de Tukey); ** $p < 0.05$ vs. *Tween* (ANDEVA seguida de Tukey).



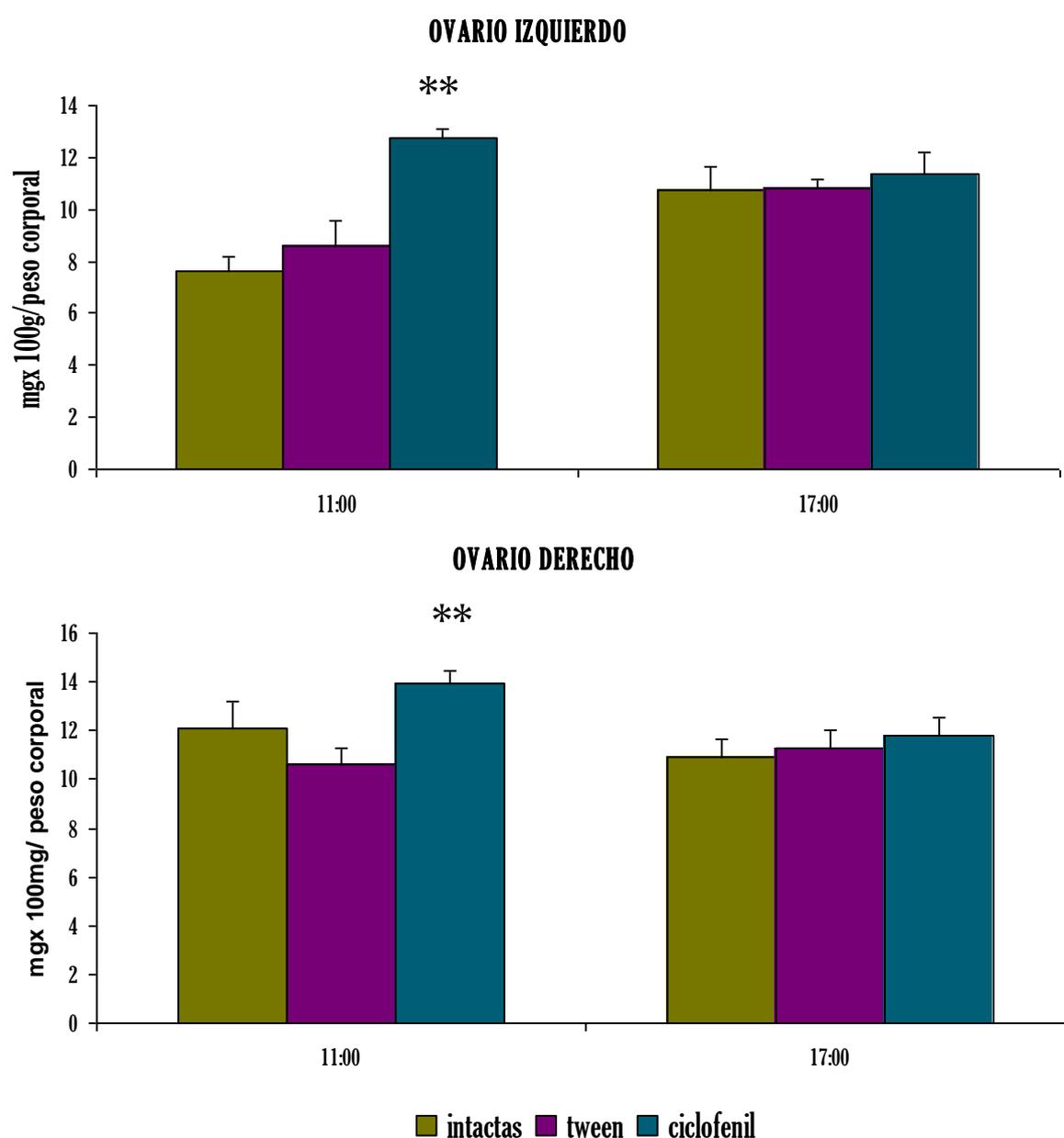
Gráfica 14. Efectos de la inyección en el día del estro, de tween o ciclofenil en POA-AHA izquierda o derecha, sobre la concentración de FSH (ng/ml suero). * $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida de Tukey); ** $p < 0.05$ vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)



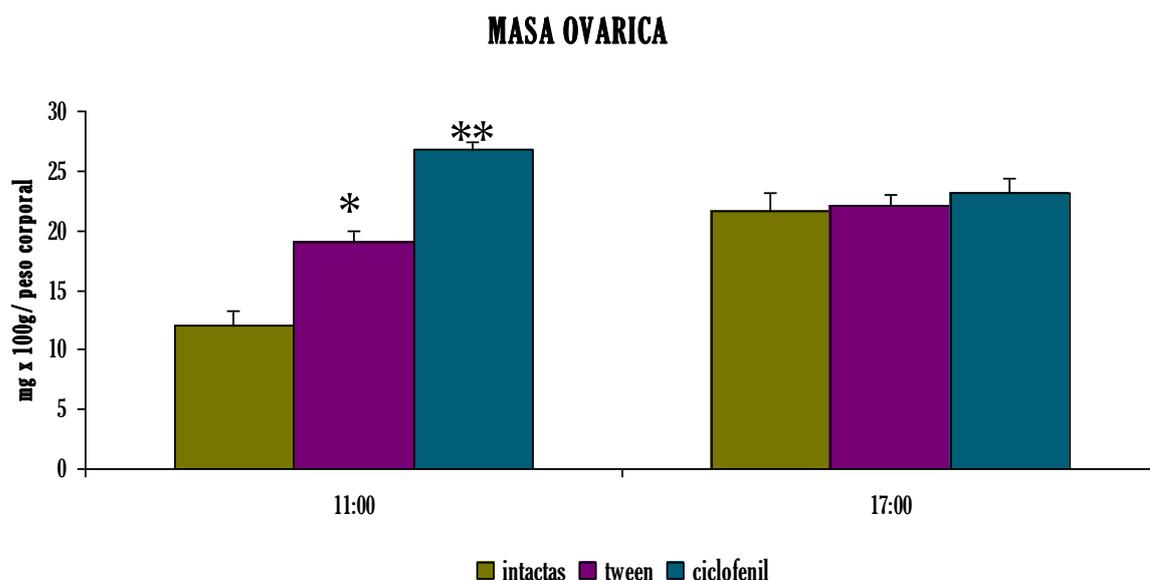
Gráfica 15. Efectos de la inyección en el día del estro, de tween o ciclofenil en POA-AHA izquierda o derecha, sobre la concentración de LH (ng/ml suero).

EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE CICLOFENIL EN EL LADO IZQUIERDO DE POA-AHA EN LA MAÑANA DEL PROESTRO

Peso de los Ovarios: Dos horas después de la inyección de ciclofenil es decir, a las 11:00 horas del mismo día de la inyección, el peso de ambos ovarios aumentó significativamente con respecto a los animales inyectados con tween (Gráfica 18). Este efecto se manifiesta en un aumento en la masa ovárica por la inyección del ciclofenil (Gráfica 19). A las ocho horas de la inyección de ciclofenil es decir, a las 17:00 h del mismo día de de la inyección, el peso de ambos ovarios no se modificó con respecto a los animales inyectados con tween (Gráfica 18). Este mismo resultado se observó en la masa ovárica (Gráfica 19).



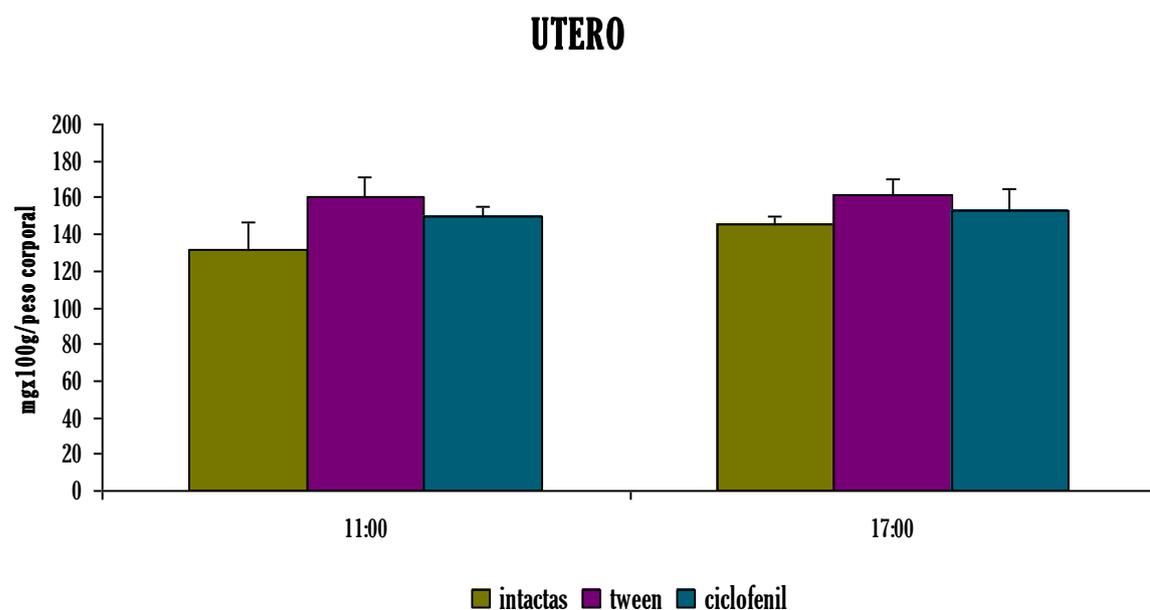
Gráfica 18. Efectos a las dos (11:00) y ocho (17:00) horas después de la inyección de tween o ciclofenil (09:00 horas del proestro), sobre el peso de los ovarios. ** $p < 0.05$ vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)



* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida de Tukey); ** $p < 0.05$ vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)

Gráfica 19. Efectos a las dos (11:00) y ocho (17:00) horas después de la inyección de tween o ciclofenil (09:00 horas del proestro), sobre la masa ovárica.

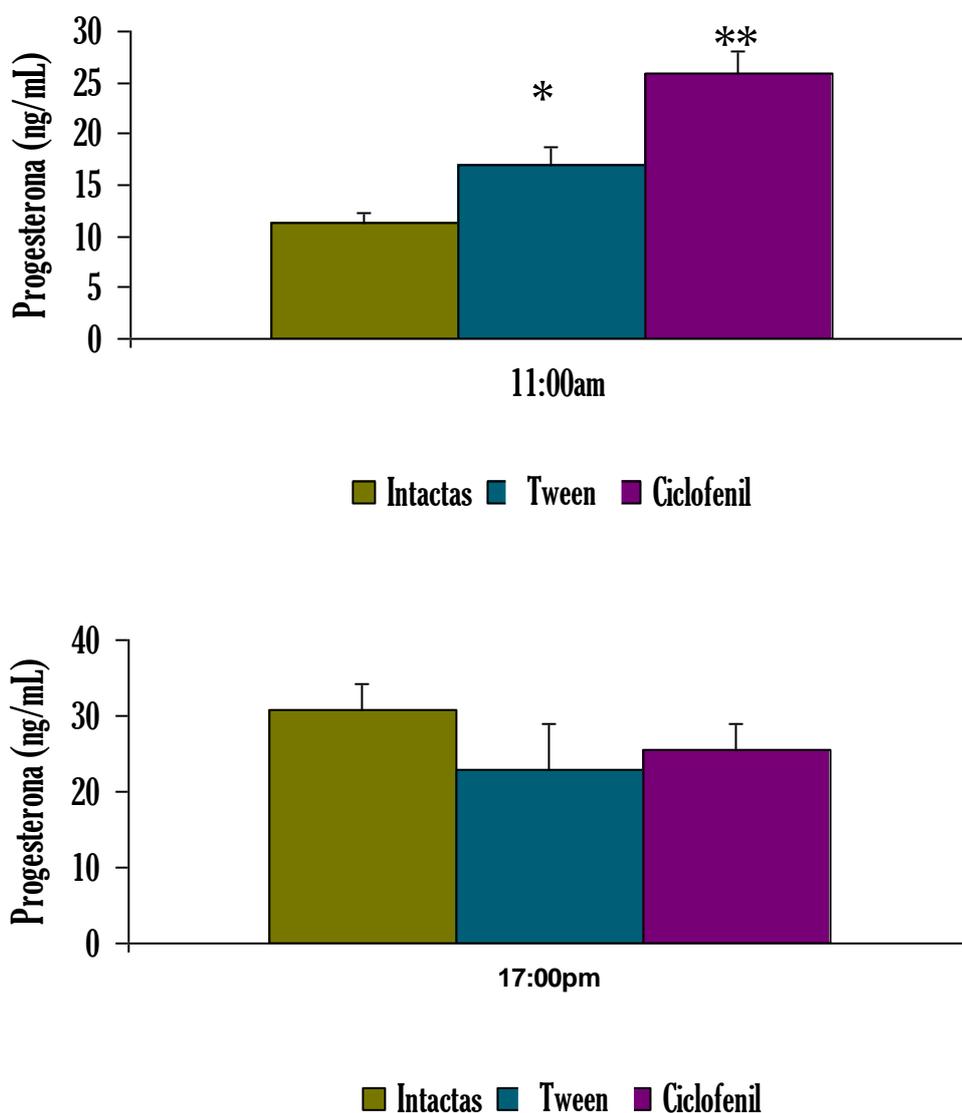
Peso del útero: En ninguna de las horas analizadas se observaron modificaciones en el peso del útero por la inyección de ciclofenil en la mañana del proestro (Gráfica 20).



Gráfica 20. Efectos a las dos (11:00) y ocho (17:00) horas después de la inyección de tween o ciclofenil (09:00 horas del proestro), sobre el peso del útero.

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS.

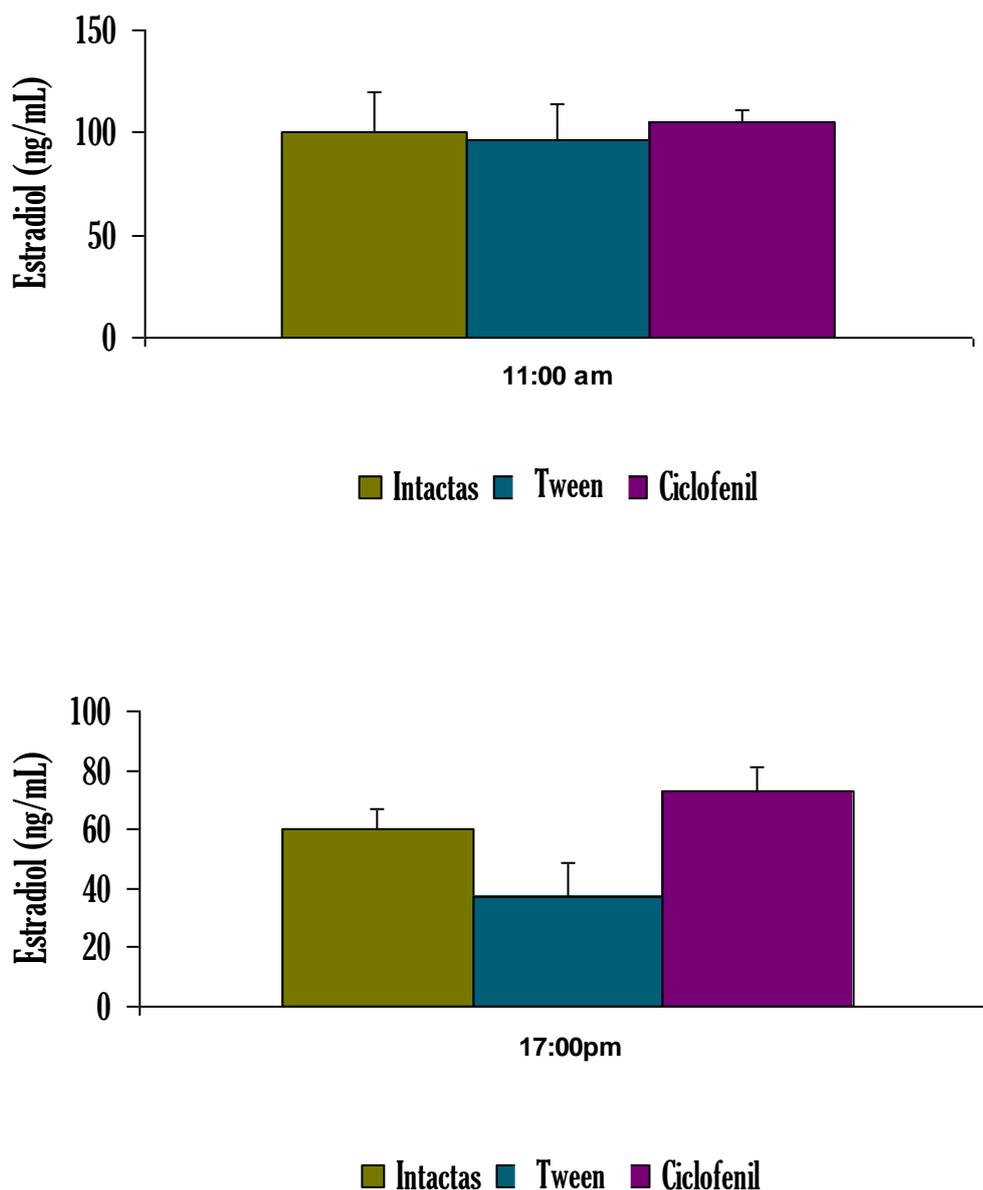
Concentración de progesterona en suero: Dos horas después de la inyección de ciclofenil es decir, a las 11:00 horas del mismo día de la inyección de tween aumentó la concentración de progesterona con respecto al grupo de ratas intactas; efecto que fue incrementado por la inyección de ciclofenil. En cambio, a las 17:00 horas del proestro, es decir 8 horas después de la inyección del fármaco, no se observaron diferencias en la concentración de esta hormona en el suero (Gráfica 21).



* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida de Tukey); ** $p < 0.05$ vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)

Gráfica 21. Efectos de la inyección en el día del proestro, de tween o ciclofenil en el lado izquierdo de POA-AHA, sobre la concentración de progesterona a las 11:00 (panel superior) y 17:00 horas (panel inferior) del mismo día.

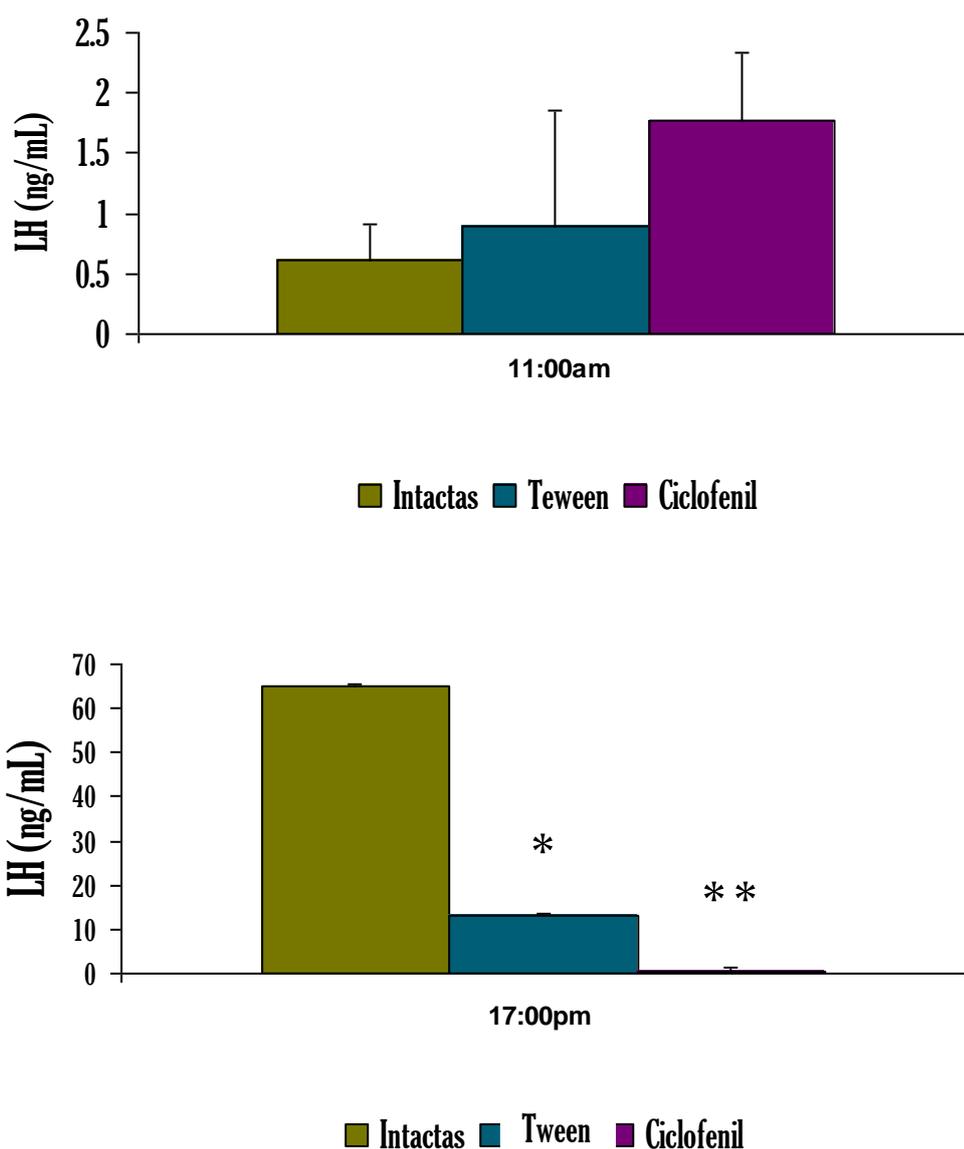
Concentración de estradiol en suero: Dos horas después de la inyección de ciclofenil es decir, a las 11:00 horas del mismo día de de la inyección, la concentración de estradiol no se modificó con respecto a los animales inyectados con tween. En cambio, a las 17:00 horas del Proestro, es decir ocho horas después de la inyección de ciclofenil aumentó la concentración de esta hormona en el suero (Gráfica 22).



* $p < 0.05$ vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)

Gráfica 22. Efectos de la inyección en el día del proestro, de tween o ciclofenil en el lado izquierdo de POA-AHA, sobre la concentración de estradiol a las 11:00 (panel superior) y 17:00 horas (panel inferior) del mismo día.

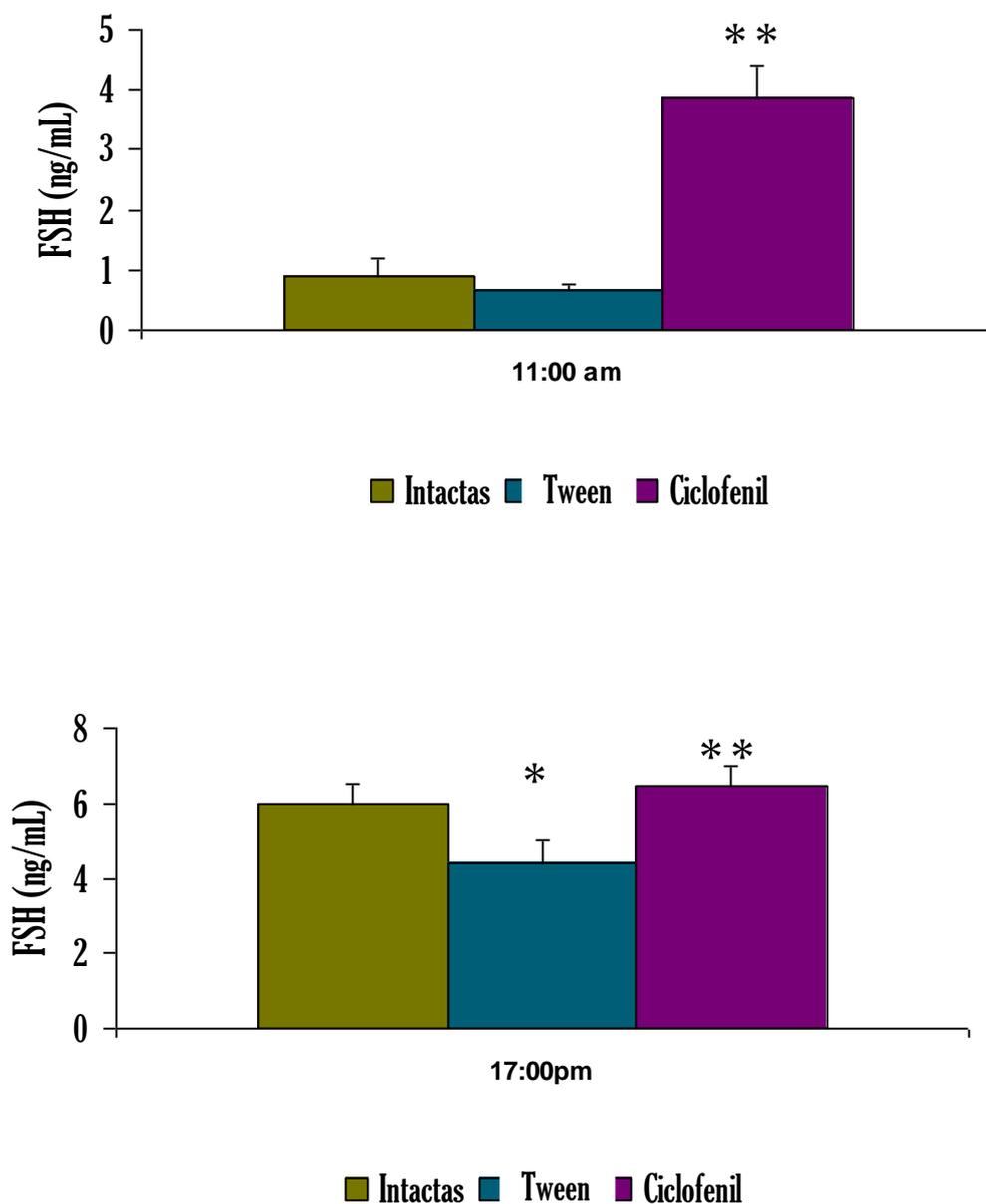
Concentración de LH en suero: A las 11:00 horas del proestro, dos horas después de la inyección del tween o del ciclofenil, la concentración de la LH fue semejante en los tres grupos experimentales. En cambio, en la tarde de este día (17:00 horas) la inyección del tween provocó disminución en la concentración de la LH en el suero con respecto a los animales intactos. El bloqueo de los receptores a estrógenos β , por la inyección del ciclofenil resultó en el bloqueo del “pico” preovulatorio de la LH (Gráfica 23).



* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida de Tukey); ** $p < 0.05$ vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)

Gráfica 23. Efectos de la inyección en el día del proestro, de tween o ciclofenil en el lado izquierdo de POA-AHA, sobre la concentración de LH a las 11:00 (panel superior) y 17:00 horas (panel inferior) del mismo día.

Concentración de FSH en suero: El bloqueo de los receptores a estrógenos β , por la inyección del ciclofenil a las 09:00 horas del proestro, resultó en aumento de la concentración de esta hormonas con respecto a la inyección del tween, cuando se cuantificó a las 11:00 y a las 17:00 horas del proestro (Gráfica 24).



* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida de Tukey); ** $p < 0.05$ vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)

Gráfica 24. Efectos de la inyección en el día del proestro, de tween o ciclofenil en el lado izquierdo de POA-AHA, sobre la concentración de FSH a las 11:00 (panel superior) y 17:00 horas (panel inferior) del mismo día.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El tween es un surfactante (detergente no iónico) que se utiliza para solubilizar las membranas celulares, ya que disuelve los enlaces lipido-lípido y lípido-proteína, este efecto podría modificar la disposición de las proteínas de contacto celular que existen en el área de estudio, esto es en POA-AHA, lo que alteraría las estructuras proteicas de los receptores de neuromoduladores estimulantes o inhibitorios que regulan la actividad de las neuronas. Dado que la inyección del tween en los días del estro y del diestro-1 bloqueó la ovulación espontánea en el día del estro esperado, efecto que no fue observado en el diestro-2 y el proestro, podemos sugerir que estos posibles contactos celulares y receptores que se establecen en estro y diestro-1 determinan que el animal ovule normalmente.

La alteración de estas señales en la mañana del estro, por la inyección de tween, estaría modificando la frecuencia de los pulsos de secreción tónica de la GnRH, lo que en parte, se tradujo en la disminución de la secreción de estradiol en los días del diestro-1 y diestro-2. A su vez, esta disminución de estradiol quizá alteró la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH, lo que se tradujo en el bloqueo de la secreción preovulatoria de ambas gonadotropinas. Se ha mostrado que la administración de inhibidores de estrógenos, de antisuero al estradiol (*Ferin M. et.al. 1969; Niell JD. Et. al. 1971*) o la ovariectomía realizada en el diestro-2, bloquea la secreción preovulatoria de LH en la tarde del proestro. Mientras que la administración de estas sustancias o la ovariectomía realizada en la mañana del proestro no bloquean el “pico” de LH en la tarde del proestro.

El aumento en la concentración de FSH a las dos u ocho horas después de la microinyección del tween en el día del estro, dependiendo del lado de POA-AHA tratado, podría ser el resultado de la disminución de secreción de inhibina, se ha mostrado que existe una correlación inversa entre la concentración de FSH en sangre y la de inhibina en el líquido folicular a lo largo del ciclo estral. Otra explicación al aumento de la concentración de la FSH sería por un efecto estimulante en la secreción de testosterona, se ha señalado a este andrógeno como el estímulo del aumento en la concentración de FSH en el día del estro (*Freeman, 1994*). El aumento de testosterona podría ser consecuencia del estrés causado por la anestesia (*Flores 2008*).

El papel modulador del estradiol al unirse a los RE β localizados en POA-AHA, sobre los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación varían durante el ciclo estral de la rata, como se ha mostrado previamente con otros sistemas de regulación de la ovulación, por ejemplo, el sistema muscarínico *colinérgico* (Cruz *et. al.* 1987, López *et. al.* 1991). En el día del estro, la activación de estos receptores a estrógenos por el 17 β -estradiol tendría un papel estimulante en la ovulación, ya que la inyección del antagonista al RE β la bloqueó en todos los animales tratados, aún cuando los receptores del lado contralateral se mantuvieron “íntegros”, por lo que podemos sugerir que se requiere que los RE β de ambos lados sean activados por el estradiol para que ocurra la ovulación espontánea en el día esperado. Además, en este día del ciclo no ocurre una asimetría funcional del sistema de neuronas que regulan la secreción de la GnRH de POA-AHA.

Dado que la neurona GnRH expresa el RE β pero no el α (Herbison, 2006), sugerimos que el bloqueo de la secreción preovulatoria de FSH y LH en los animales inyectados con el ciclofenil es el resultado de modificaciones en la secreción de GnRH por medio de una acción directa sobre la neurona y no a través de señales nerviosas de interneuronas que podrían regularla, como los opioides, glutamato, GABA, NPY, noradrenalina, acetilcolina, CRH, vasopresina y serotonina (Herbison 2006).

En el diestro-1, el estradiol al unirse a los RE β no participarían en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación, ya que el tratamiento con ciclofenil no modificó los efectos observados por el tween, es decir, el porcentaje de animales que ovularon fue similar al observado en los grupos tratados con el vehículo.

En diestro-2, la ovulación de la rata depende de la activación de los RE β del lado derecho de POA-AHA, ya que la inyección del antagonista disminuyó el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado. En cambio, en proestro, los RE β del lado izquierdo son los que estimulan la ovulación.

El análisis cronológico de los efectos del bloqueo del RE β en la mañana del estro nos permite sugerir que en este día del ciclo, el estradiol al unirse a los RE β regula de manera asimétrica la secreción de progesterona y estimula la secreción preovulatoria de la LH, efectos que finalmente se reflejan en la ovulación.

El aumento en la concentración de progesterona dos horas después de la inyección del tween puede ser explicado por el hecho de que éste vehículo haya provocado la activación de las neuronas que secretan el CRF, a su vez, la secreción de ACTH y por lo tanto, la secreción de progesterona por parte de la glándula adrenal o la activación de una vía nerviosa desde esta zona del hipotálamo que regula directamente la secreción de progesterona por el ovario. De ser así este efecto sería asimétrico, ya que sólo cuando el tween fue inyectado en el lado derecho de POA-AHA aumentó la concentración de progesterona. Dado que el bloqueo de los RE β de POA-AHA izquierda aumentó la concentración de progesterona, mientras que el bloqueo de los receptores de la porción derecha la disminuyó, sugerimos que la activación de los RE β de POA-AHA regulan de manera asimétrica la secreción de progesterona en el día del estro. Este aumento en la concentración de progesterona en el día del estro (dos horas después del tratamiento experimental) y en los días de diestro-1 y diestro-2 (aún cuando en ciertos tiempos las concentraciones no sean diferentes estadísticamente con respecto al animal intacto) sería una de las razones por las que los animales no ovularon. Everett (1948) mostró que en ratas con cuatro días de ciclo estral, la inyección de 1mg de progesterona en los días de diestro-1 y diestro-2 retrazaban la ovulación por 24 horas. Otra explicación sería que la progesterona haya sido metabolizada a alopregnenolona por las células de la glía de POA-AHA, metabolito que promueve directamente los canales a cloro asociados al receptor GABA_A en las neuronas GnRH, lo que suprime la secreción de GnRH, la liberación de la LH y la ovulación (*Herbison 2006*).

Con base en los resultados obtenidos en la concentración de estradiol y de FSH en las horas subsecuentes a la inyección del fármaco, sugerimos que la unión del 17 β -estradiol al RE β en POA-AHA no participa en la regulación de la secreción de esta gonadotropina y en consecuencia, la concentración de estradiol fue semejante a la de los animales intactos. Así que podemos inferir que el crecimiento folicular fue normal pero la falta de ovulación fue el resultado del bloqueo de la secreción preovulatoria de la LH. A la fecha, se reconoce que la secreción de una u otra gonadotropina, es decir de FSH o de LH, depende de la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH; pulsos de secreción de GnRH a frecuencias altas (cada 30 minutos) estimula la biosíntesis y secreción de la LH, mientras que pulsos de GnRH a frecuencias bajas (cada 2 horas) induce la secreción de FSH (*Herbison 2006*). Por lo tanto, es posible que el bloqueo del RE β en POA-AHA haya generado que los pulsos de secreción de la GnRH disminuyeran, por lo que el “pico” de LH de la tarde del proestro no ocurrió. Otra explicación es que la falta de disponibilidad de RE β , los cuales son expresados por la neurona GnRH, generó que estas neuronas no respondieran a las señales de “feedback” estimulante de los estrógenos y por tanto no se sintetizó la GnRH.

Si consideramos que la GnRH regula la secreción de ambas gonadotropinas, ¿cómo se explica que se haya secretado en forma normal la FSH y no la LH. Se ha identificado en la parte rostral del diencefalo (el área preóptica y en el órgano vasculoso de la estría terminal) neuronas inmunoreactivas a la isoforma conocida como GnRH de lamprea tipo III (IGnRH-III), la cual regula específicamente la secreción de la FSH (*Hinney 2001*). Por tanto es posible que el RE β no regule la actividad sintética de estas neuronas, lo que explicaría la ausencia de modificaciones en las concentraciones de FSH en las horas posteriores a la inyección intra-hipotalámica del fármaco.

En cambio, el segundo “pico” de FSH que ocurre en la mañana del estro, sí estaría regulado por la unión del estradiol al RE β , ya que en los animales tratados con ciclofenil se observó la inhibición de los efectos estimulantes del tween sobre la secreción de FSH a las dos horas de su inyección intra-hipotalámica, es decir, que las concentraciones de FSH disminuyeron a valores semejantes al grupo de ratas intactas. De tal forma que en la mañana del estro, los RE β regulan de manera estimulante la secreción de FSH que ocurre normalmente en este día del ciclo. Además, este mecanismo neuroendócrino de regulación del segundo “pico” de secreción de la FSH del día del estro parece ser asimétrico, ya que del lado derecho ni la inyección del tween ni la de ciclofenil alteraron la concentración sérica de FSH.

Dado que el bloqueo de los RE β en la mañana del estro disminuyó el peso de los ovarios en el día que los animales debían haber ovulado podría ser explicado por alteraciones en el crecimiento de los folículos (*Rajkovic y col. 2006*).

En el día del proestro, la activación de los RE β del lado izquierdo o del lado derecho de POA-AHA, resultado de la unión del estradiol, regula de manera asimétrica la secreción de progesterona, de LH y la ovulación. Es decir, en este día del ciclo estral, la activación de los receptores del lado izquierdo de POA-AHA inhibe la secreción de progesterona pero induce la secreción preovulatoria de LH, la ovulación y el número de ovocitos liberados tanto por el ovario izquierdo como por el derecho.

Con base en los resultados obtenidos por el bloqueo de los RE β del lado izquierdo de POA-AHA en el estro o en el proestro, podemos señalar que el estradiol regula a la baja la secreción de progesterona; mecanismo que como ya lo señalamos en párrafos anteriores, podría involucrar disminución de la secreción del CRF.

En el proestro, la ovulación espontánea depende de la activación de los RE β del lado izquierdo de POA-AHA, ya que la inyección del antagonista a estos receptores inhibió la secreción preovulatoria de la LH y la ovulación, lo que no sucedió cuando se bloquearon los receptores de la porción derecha. La explicación a esta asimetría implicaría diferencias en la síntesis, afinidad y número de RE β entre el lado izquierdo y derecho de POA-AHA, en los mecanismos de regulación de señalización neural que expresen el receptor o en ambos eventos a la vez. En la rata intacta, se ha mostrado que la cantidad de ARNm para el RE β en el lado izquierdo de POA-AHA se mantiene alta de las 09:00 y a las 13:00 horas del diestro-2, mientras que del lado derecho el máximo de ARNm ocurre solamente a las 09:00 h del mismo día (Arteaga-López 2003). Si consideramos que este mensajero es traducido a la proteína horas después, podríamos pensar que se sintetizan durante más tiempo y en mayor cantidad estos RE β del lado izquierdo que del lado derecho de POA-AHA, lo que se correlaciona con el bloqueo de la ovulación y de la secreción preovulatoria de LH.

En el día del proestro, el papel del estradiol al unirse a los RE β en POA-AHA es ejercer un mecanismo de “feedback” inhibitorio sobre la secreción preovulatoria de la FSH, ya que esta hormona alcanza concentraciones semejantes a las preovulatorias a las dos horas de haber bloqueado los RE β , y no se modifican las detectadas a las 17:00 horas de este día (las preovulatorias); lo que implicaría un papel inhibitorio en la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH, lo que a su vez, se traduciría en menor síntesis del ARNm de la cadena β FSH (Herbison 2006).

El aumento en el peso de los ovarios de los animales inyectados con ciclofenil en la mañana del proestro puede ser el resultado del aumento en el número de folículos preovulatorios (Rajkovic y col. 2006), que no llegaron a ovular por el bloqueo de la secreción preovulatoria de la LH.

CONCLUSIONES

- ✚ La activación de los RE β de POA-AHA regula de manera diferente la ovulación espontánea de la rata adulta durante el ciclo estral.
- ✚ Al inicio del ciclo estral, en la fase de estro, la ovulación depende de la unión del estradiol a los RE β de ambos lados de POA-AHA; mientras que en la etapa de diestro-1 no participan en los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación. En cambio, en los días del diestro-2 y del proestro los RE β regulan de forma asimétrica la ovulación.
- ✚ La alteración de la estructura de las membranas de las neuronas de POA-AHA en las dos primeras fases del ciclo estral (estro y diestro-1) modifican los mecanismos neuroendócrinos que ocurren en POA-AHA y en consecuencia bloquean la ovulación.
- ✚ En el día del estro, el estradiol unido a los RE β regula de manera asimétrica la secreción de progesterona. En el lado izquierdo el estradiol acoplado al RE β inhibe la secreción de progesterona, mientras que en el lado derecho la estimula. Este efecto regulador es observado a las dos horas de la desactivación de estos receptores.
- ✚ El estradiol adherido a los RE β de POA-AHA no altera ni su secreción basal ni la preovulatoria.
- ✚ En el día del estro, el estradiol unido a los RE β regula de manera asimétrica el segundo “pico” de secreción de FSH, es decir el del día del estro. En el lado izquierdo el estradiol acoplado al RE β estimula la secreción de esta glucoproteína, mientras que en el lado derecho la inhibe.
- ✚ En el día del proestro, el papel asimétrico del estradiol acoplado a los RE β sobre la ovulación de la rata adulta es el resultado de la estimulación temprana de la secreción de progesterona y de la FSH, así como del bloqueo de la secreción preovulatoria de la LH.

REFERENCIAS

- ✚ Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. The estradiol pharmacophore. Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*, 1996; 62: 268-303.
- ✚ Arimura A. Hypotalamic hormones.: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Editores: Conn PM, Freeman ME. Humana Press inc. Totowa, New Jersey, USA; 2000.
- ✚ Arteaga López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Menoza- Rodríguez CA, Cruz ME. Differential mRNA expresión of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic region during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*. 2003, 21: 251-260
- ✚ Baenziger JU, Green E. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem. Biophys. Acta*. 1988; 947: 287-306.
- ✚ Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem*. 2001; 276: 36764-36769.
- ✚ Bakker J, Baum MJ. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Front Neuroendocrinol*. 2000; 21: 220-262.
- ✚ Barraclough C. A. Neural control of the synthesis and release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Ciba Symposium*. 1992; 68:233-251.
- ✚ Bartsch, W. Sponer, G., Dietman, K. and Fuchs G. *Arzneim-Forsch*. 1976; 26:1581-1583.
- ✚ Baur-Danoín AC, Weiss P, Jameson JL. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 1995; 136:1014-1019
- ✚ Benoit J. L'inversion sexuelle de la poule déterminée par l'ablation de l'ovaire gauche. *Arch. Zool. Exp. Gen*. 1932; 73:1-112.
- ✚ Bowman SP, Leake A y ID Morris. 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*. 1982; 65:355-366.
- ✚ Brown RE. The hypothalamic hormones. En: *Introduction to Neuroendocrinology*. Cambridge University Press, Great Britain; 1994 p. 40-55.
- ✚ Brown TR. Steroid hormones, Overview. En: *encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neil D (eds). Academic Press. U.S.A. 4. 1999. p. 634-644.
- ✚ Burris TP. Progestins. En: *Encyclopaedia of reproduction*. Knobil E y Neil D (eds) Academic Press. U.S.A. 1999; 4, 23-40.
- ✚ Busby WH, Quackenbush GE, Humm J, Youngblood WW, Kizer JS. An enzyme(s) that converts glutamyl peptides pyroglutamylpeptides. *J. Biol. Chem*. 1987; 262: 8532-8536.
- ✚ Butler JA, Sjöberg M y CW Coen. 1999. Evidence for estrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons. *Journal of Neuroendocrinology*. 11: 331-335.

- ✚ Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA y OK Park-Sarge. Estrogen Receptor- β mRNA Expression in Rat Ovary: Down-Regulation by Gonadotropins. *Molecular Endocrinology*; 1991. p. 11:172-182.
- ✚ Carrillo VM, Martínez SR, Ayala ME, Monroy JM, Matsumara PD, Cruz ME, y RC Domínguez. Efecto de la administración de Tamoxifen (TX) en el diestro-1 (D1), sobre la concentración de gonadotropinas en la rata adulta; 2005; 47 Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. C-107.
- ✚ Carten ME y JD Miller. (1990). Uterine function: Molecular and cellular aspects. Plenum: New York;1990. p. 605.
- ✚ Carson-Jurica MA, Schrader WT y O'Malley B. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrine Reviews*; 1990;11:201-222.
- ✚ Celotti F, Avogadri N, Melcangi RC, Milani S y P Negri-Cesi. 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*; 1984; 107(3):340-5.
- ✚ Charles N. Rudick, Robert B. Gibbs, and Catherine S. Woolley A Role for the Basal Forebrain Cholinergic System in Estrogen-Induced Disinhibition of Hippocampal Pyramidal Cells; 1984.
- ✚ Charli JL, Ponce G y Joseph- Bravo P. Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRHérgicas hipotálamicas. En: Tópicos selectos de biología de la reproducción. México:Edit. R. Domínguez, UNAM-PORRUA; 1991.p. 59-85.
- ✚ Chen Z, Zheng H, Dong KW. Identification of negative and positive estrogen response elements in human GnRH upstream promoter in the placental JEG-3 cells. *Mol Cell Endocrinol*; 2001;184: 125-134.
- ✚ Ching M. Correlative surges of LHRH, LH and FSH in pituitary stalk plasma and systemic plasma of rat during proestrus. Effect of anaesthetics. *Neuroendocrinology*; 182; 34: 279–285.
- ✚ Conn PM. The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormona action in the pituitary. *The Physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1993;Capitulo 32 : 1349-1377.
- ✚ Conn PM. *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. New Jersey:Edit. Human Press; 1999. p. 24-25.
- ✚ Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of Endocrinology*; 1989; 24:739-742.
- ✚ Domingez R, Chavéz R, Cruz ME. La regulación del crecimiento y del desarrollo del foliculo ovárico. En: Tópicos selectos en Biología de la reproducción. México: Editor: Domínguez R. Ed. UNAM- Porrúa; 1991; Capitulo 7: 161-192.
- ✚ Drouva SV, Laplante E, Gautron J-P, Kordon C. Effects of 17 β -estradiol on LH-RH release from rat mediobasal hypothalamic slices. *Neuroendocrinology*; 1984; 38:152–157.
- ✚ Egozi Y, Kloog Y, Sokolovsky M. Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrous cycle. *Brain Research*; 1986; 383:310-313.
- ✚ Enmark E. y J-A Gustafsson. Orphan nuclear receptors, the first eight years. *Molecular Endocrinology*; 1995;10: 1293-1307.
- ✚ Enmark E. y JA Gustafsson. Oestrogen receptors - an overview. *Journal Internal Medicine*, 1999, 246:133-138.

- ✚ Evans NP, Dahl GE, Glover BH, Karsch FJ. Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the pre-ovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology* 1994; 134:1806–1811.
- ✚ Evrett JW. Pituitary and hypothalamus: Perspectives and overview. En: the physiology of reproduction. Knobil E y Neill JD eds. 2° e. New York: Raven Press; 1994.p. 1509-1526.
- ✚ Everett JW. Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*;1998; 43:389-405.
- ✚ Ferin M. Ovarian Cycle, mammals. En : Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill D (eds.).USA:Academic Press; 1999. p. 547-553.
- ✚ Fink G. The endocrine control of ovulation. *Sci Prog Oxf*; 1986;70, 403-423.
- ✚ Fink G. Gonadotrophin secretion and its control. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill JD e. New York: Raven Press; 1988.p. 1349-1377.
- ✚ Fink G. Gonadotrophin secretion and its control, en: the physiology of reproduction. Edt.E. Knobil y J. D. Neill. New York, USA; 1998. p. 1349-1378.
- ✚ Fink G. (2000) .Neuroendocrine regulation of pituitary function. En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Totowa N.J.:Humana Press inc; 2000. p. 107-133.
- ✚ Flanagan CA, Millar RP, Illing N. Advances in understanding gonadotrophin releasing hormone receptor structure and ligand interactions. *Rev of reproduction*;1997; 2: 113-120
- ✚ Freeman ME. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. En: *The Physiology of Reproduction*. New York: Eds. Knobil E y Neill JD. Raven Press; 1994; 2: 613-658.
- ✚ Funabahi T, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K, y F Kimura. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. *Progress Brain Research*; 2002;141:165-73.
- ✚ Gallo RV. 1981 Pulsatile LH release during periods of low-level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biology of Reproduction*; 24:771-779.
- ✚ Garrido Gracia JC, Gordon A, Bellido C, Aguilar R, Barranco I, Millan Y, de las Mulas JM, y JE Sánchez-Criado. 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*; 2001;193, 107-119.
- ✚ Genazzani AR, Petraglia F, Mercuri N, Brilli G, Genazzani AD, Bergamaschi M, DeRamundo BM, Volpe A. Effect of steroid hormones and antihormones on hypothalamic beta-endorphin concentrations in intact and castrated female rats. *Journal of endocrinological investigation*, 1990; 13(2):91-6.
- ✚ Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Scapagnini V. (1979). LH-RH content changes in the medio-basal hypothalamus after unilateral ovariectomy. *Neuroendocrinology: Biological and Clinical Aspects. Proceeding of Sorono Symposia, Vol 19*: New York: Academic Press; 1979. p. 97-102.

- ✚ Gore-Lantog RE y Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction*. 2° ed. New York: Raven Press; 1994; Vol I .p. 571-627.
- ✚ Gore-Langton RE. Cyclosporine differentially affects estrogen and progesterin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*; 1988; 57: 187-198.
- ✚ Gore-Langton RE y Armstrong DT . Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill JD eds. New York: Raven Press; 1994.p. 571-627.
- ✚ Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, y TE Spencer. Developmental Biology of Uterine Glands. *Biology of reproduction*; 2001; 65:1311–1323.
- ✚ Greenwald GS y SK Roy. (1994). Follicular development and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994; 1:629-724.
- ✚ Guyton AC, Hall JE (2001) Tratado de Fisiología Médica. Décima edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 2001. p. 100-110.
- ✚ Haisenleder DJ, Ortolano GA, Landefeld TD, Zmeili SM, Marshall JC. (1994). Prolactin messenger ribonucleic acid concentrations in 4-day cycling rats at the time of the prolactin surge. *Endocrinology*; 124: 223-2028
- ✚ Halász B. The Hypothalamus as an endocrine organ. En: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Totowa New Jersey USA: Humana Press; 2000; 1: 3-21.
- ✚ Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, Kosemund D, Müller G, Hillisch A, Walker A, Kraetzschmar, y KH Fritzemeier. Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 2004; 93: 5129-5134.
- ✚ Herbison AE. Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology Review*; 1998; 19: 302-330.
- ✚ Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Momoeda M, Tsutsumi O, Taketani Y, y M Muramatsu. Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. *Journal of Molecular Endocrinology*; 1999; 22: 37-44.
- ✚ Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z y Petersen SL. 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*; 2000; 141:3506-3509.
- ✚ Hsueh A.J, Adashi E.Y, Jones PB y Welsh TH. Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cell. *Endocr*. 1984; Rev 5: 76-127.
- ✚ Hutchinson JS, Nelson PB, Zeleznik AJ. (1986). Effects of different gonadotropin pulse frequencies on corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology*. 1986; 119: 1964-1971.
- ✚ Ing NH. (1999). Steroid hormone receptors Overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. EUA: Academic Press;1999. p. 654-661.

- ✚ Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME. Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons. *Journal of Comparative Neurology*; 1985; 232:534-547.
- ✚ Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *WHO Food Additives Series No. 5*. World Health Organization. 1974.
- ✚ Jones RE, Desan PH, López KH, Austin HB. Asymmetry in diencephalic monoamine metabolism is related to the side of ovulation in a reptile. *Brain Research*; 1990; 506:187-191
- ✚ Karla SP, Horvath T, Naftolin F, Xu B, Pu S, Kalra PS. The interactive language of the hypothalamus for the gonadotropin releasing hormone (GnRH) system. *J Neuroendocrinol*. 1983;9:569 –576
- ✚ Katt JA, Duncan JA, Herbon L, Barkan A, Marshall JC. The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin –releasing hormone receptor. *Endocrinology*. 1985; 116: 2113-2115.
- ✚ Koike S, Sakai M y M Muramatsu. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Research*. 1987;15(6):2499-513.
- ✚ Köning JFR, Klippel RA. The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system. Baltimore U.S.A: Williams and Wilkins Co.1963.
- ✚ Köning JFR, Klippel RA. The rat brain a stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of Brain Stem. New York: Robert E. Krieger Publishing. 1967.
- ✚ Knobil E. Neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res*. 1980;36:53
- ✚ Krajewski SJ, Abel TW, Voytko ML, Rance NE. Ovarian steroids differentially modulate the gene expression of gonadotropin-releasing hormone neuronal subtypes in the ovariectomized cynomolgus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 655-662
- ✚ Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JÅ. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1996;93: 5925-5930
- ✚ Legan SJ, Coon GA, Karsch FJ. Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 1975; 96: 50–56.
- ✚ Levine JE, Ramirez VD. In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology*. 1980;107(6), 1782-1790.
- ✚ Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Conaghan LA, Legan SJ, Meredith JM, Strobl FJ, Urban JH, Vogelsong KM, Wolfe AM. Neuroendocrine regulation of luteinizing hormone pulse generator in the rat. *Recent Prog Horm Res* ; 1991;47: 97–153.
- ✚ Levine J.E Pulsatility in neuroendocrine systems. Academic Press U.S.A.1994.
- ✚ López E, Cruz ME, Domínguez R. Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpin in the preoptic- anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the rat. *Archives of Medical Research*;1997; 28 (3): 343-348.

- ✚ Levine JE. The hypothalamus as a major integrating center. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. New Jersey, USA: Humana Press Inc; 2000; capítulo 5:75-93.
- ✚ Leipheimer RE, Bona-Gallo A, Gallo RV. The influence of progesterone and estradiol on the acute changes in the pulsatile luteinizing hormone release induced by ovariectomy in diestrus 1 in the rat. *Endocrinology*; 1984; 114:1605-1612.
- ✚ López FJ, Merchenthaler IJ, Moretto M, Negro-Vilar A. Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell Mol Neurobiol*; 1998; 18:125–146.
- ✚ Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Shultz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Manuel M, Chambon P y Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. 1995; *Cell* 83: 835–839.
- ✚ Martínez Reyes S. 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. 2005.
- ✚ MacGREGOR JI y VC Jordan. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological reviews*; 1998;50(2):151-96.
- ✚ 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.
- ✚ McGeer, P.L., Eccles, J.C. y McGeer, E.G. (1987). *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. 2ª edición. Nueva York; 1987.p. 150.
- ✚ Mclean MP, Khan I, Puryear TK y G Gibori. Estradio-Induced Synthesis and Translation of Specific Proteins in the Corpus Luteum. En: *Growth Factors and the Ovary*. New York: Hirshfield AN. Plenum; 1989. p. 363-368.
- ✚ Norris OD. An Overview of Chemical Regulation En: *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press. 1996; 1-22;146-150.
- ✚ Norris JD, Fan D, Kerner SA. Identification of a third autonomous activation domain within human estrogen receptor: *Mol. Endocrinol*. 1997; 11, 747-754.
- ✚ O' MALLEY BW, Strott AC. (2001). *Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción*. Endocrinología de la Reproducción. 4ta edición. México: Médica Panamericana; 2001.p. 119-143.
- ✚ Palkovits M. Micro- and Macroscopic structure, innervation, and vasculature of hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. 2000.
- ✚ Papka RE, Storey-Workley M, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Collins JJ, Usip S, Saunders PT, y M Shupnik. Estrogen receptor- α and - β immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord. 2001; *Cell Tissue Res* 304:193–214.
- ✚ Parthair IS. Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes. En: *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors*. 2002; 141:3-17.
- ✚ Paxinos G, Kus L, Ashwell KW, Watson C. *Chemoarchitectonic Atlas of The Rat Forebrain*. Academic Press. USA; 1999.p. 248.
- ✚ Pedernera E. Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: *Comunicación Neuroendócrina Bases Celulares y Moleculares*. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, 1993.p. 33-46.

- ✚ Pérez EP. 1995. Infertilidad, Esterilidad y Endocrinología de la Reproducción, un toque integral. México: Ciencia y Cultura Latinoamericana; 1995.p. 287-325.
- ✚ Pelletier G, Labrie C y Labrie F. Localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology*. 2000;165: 359-370.
- ✚ Perce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and fuction. *Ann Rev Biochem*. 1981;50:465-495.
- ✚ Rao BR. 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*. 1998; 65:3-41.
- ✚ Rainbow TC, Dejroff V, Luine V, McEwn B. Estradiol-17 β increase the number of muscarinic receptors in hypothalamic nuclei. *Brain Research*;1980;198:239-243
- ✚ Rollerova E y Urbancikova. Intracellular Estrogen Receptor, their characterization and function (Review). *Endocrine Regulations*. 2000; 34: 203-218.
- ✚ Ross MH, Kaye GI y Pawlina W. Histología texto y alas color con bilogía celular y molecular, 4° ed, Argentina: Médica Panamericana; 2005.p. 380-384, 644-655.
- ✚ Sanchez Criado JE. Fisiología del ovario. En: Fisiología humana. 2ª Ed. México: McGraw-Hill Interamerican; 2003.p. 1036-1048.
- ✚ Sar M y W Frank. Diferencial Expresión of Estrogen Receptor- β and Estrogen Receptor- α in the Rat Ovary. *Endocrinology*; 1999;140: 963-971.
- ✚ Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T y Y Ohta. Apoptotic cell death Turing the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *Anatomical Record*. 1997;248: 76-83.
- ✚ Shivers BD, Haran RE, Morell JI y Pfaff DW. Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 1983; 304: 345-347
- ✚ Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ y Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor- α (ER α) and β (ER β) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids*. 1998;63: 498-504.
- ✚ Shughrue PJ, Scrimo PJ y Merchenthaler I. Evidence for the colocalization of estrogen receptor- β mRNA and estrogen receptor- α immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology*;1998;139: 5267- 5270.
- ✚ Sitges, M. Comunicación entre las células nerviosas. Sinapsis. Comunicación neuroendócrina. Bases moleculares. Sociedad mexicana de ciencias fisiológicas. CONACYT y SE; 1993. p. 292.
- ✚ Siverman AJ, Levine I, Within JW. (1998). The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hibridization. En: The Physiology of Reproduction. Nueva Yorks: Raven Press; 1998, Volumen 1, Cap. 28. p. 1683-1709.
- ✚ Sokolovsky M, Egozi Y, Avisar S. Molecular reguation of receptors: interaction of bet-estriol and progesterona with the muscarinic system. *Proceedings of the Nacional Academy of Science of USA*; 1981;78 (9): 5554-5548.
- ✚ Smith. Estrogens, Overview. En: encyclopedia of reproduction. U.S.A: Academic Press; 1999; 2: 119-126.
- ✚ Stevens A y Steven LJ. Texto y Atlas de Histología. España: Mosby/Doyma Libros; 1995; 250-254

- ✚ Stojilkovic SS, Reinhart J y Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocrine Rev*; 1994; 15, 62-499.
- ✚ Suter KJ, Song WJ, Sampson TL, Wuarin J-P, Saunders JT, Dudek FE, Moenter SM. Genetic targeting of green fluorescent protein to gonadotropin-releasing hormone neurons: Characterization of whole-cell electrophysiological properties and morphology. *Endocrinology*; 2000; 141: 412–419.
- ✚ Taleisnik S. Receptores celulares y la transducción de señales. Argentina: Edit. Brujas; 2006.p.272.
- ✚ Tamrazi A, Carlson EK, Daniels JR, Hurth KM, y JA Katzenellenbogen. Estrogen Receptor Dimerization: Ligand Binding Regulates Dimer Affinity and Dimer Dissociation Rate. *Molecular Endocrinology*; 2002; 16: 2706–2719.
- ✚ Terasawa E. Control of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generation in nonhuman primates. *Cell Mol Neurobiol*; 1995; 15: 141-164.
- ✚ Tatcher R.W. Walker R.A. Giudice S. Human cerebral hemispheres develop at different rates and ages. *Science* 1987; 236:1110-1113.
- ✚ Ulloa Aguirre A., Rees Midgley, A. Jr, Beitins, IA, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr. 1995; Rev. 6, 75-187.*
- ✚ Ulloa Aguirre A, Timossi C. Biochemical And Functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive BioMedicine online*; 2000; 1: 48-62.
- ✚ Ukena K, Kohchi C y Tsutsui K. Expression and activity of β hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in the rat purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology*; 1999; 140: 805-813.
- ✚ Wang H, Eriksson H, y L Sahlin. Estrogen Receptors α and β in the Female Reproductive Tract of the Rat During the Estrous Cycle. *Biology of Reproduction*; 2000; 63: 1331–1340
- ✚ Watson CS, Pappas TC y B Gametchu. The Other Estrogen Receptor in the Plasma Membrane: Implications for the Actions of Environmental Estrogens. *Environ Health Perspect.* 1995; 103(7): 41-50.
- ✚ Watts CK y RL Sutherland. Studies on the ligand specificity and potential identity of microsomal antiestrogen-binding sites. *Molecular Pharmacology*; 1987; 31(5):541-51.
- ✚ Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochemical Journal*; 1996; 319(3):657-67.
- ✚ Wintermantel TM, Campbell RP, Bock D, Gröne HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schütz, y AE Herbison. Definition of Estrogen Receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone. *Neuron*; 2006; 52(19): 271-280.
- ✚ Wise PM, Rance N, Barraclough CA. Effects of estradiol and progesterone on catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic regions in ovariectomized rats. *Endocrinology*; 1981; 108: 2186- 2193.
- ✚ Xu M, Yamamoto T, Kato T. In vivo striatal dopamine release by M1 muscarinic receptors in induced activation of protein kinase C. *Journal of Neurochemistry*; 1990; 54:1917-1919.
- ✚ Yao HH, Bahr JM (1999). Ovary, overview. *Encyclopedia of reproduction. U.S.A: Academic Press*; 1999; 3: 590-595.

- ✚ Yeh J y Adashi EY. El ciclo ovárico. En: *Endocrinología de la Reproducción*. 4ª. Edición. México: Panamericana; 2001.p. 164-202.
- ✚ Yellon SM, Lehman MN, Newman SW. The gonatrophin-releasing hormone neuronal system of the male Djungarian hamster; distribution from the olfactory tubercle to the medial basal hypothalamus. *Neuroendocr*; 1990; 51: 219-225.
- ✚ Yong EL, Glasier A, Hillier H, Ledger W, Caird L, Beattie G, Sweeting V, Thong J y DT Baird. Effect of cyclofenil on hormonal dynamics, follicular development and cervical mucus in normal and oligomenorrhoeic women. *Human Reproduction*, 1992; 7(1):39-43.
- ✚ Zmeili SM, Papavasiliou SS, Thorner MO, Evans WS, Marshall JC, Landefeld TD. Alpha an luteinizing hormone β subunit messenger ribonucleic acid concentrations during the rat estrous cycle. *Enocrinology*; 1986; 119: 1867-1869.
- ✚ Zwain IH y Yen SS. Neurosteroidogenesis in astrocytes oligodendrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*; 1999; 140: 834-852.