



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE  
MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

“Efectos del bloqueo del RE- $\alpha$  en el lado izquierdo de POA-AHA sobre la ovulación, la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroideas”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA  
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**MARTHA ALICIA VÁZQUEZ MÁFARA**

JUNIO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores**

**“Zaragoza”**

**Unidad de Investigación de la Reproducción**

**Laboratorio de Neuroendocrinología**

**“Efectos del bloqueo del RE- $\alpha$  en el  
lado izquierdo de POA-AHA sobre la  
ovulación, la secreción de  
gonadotropinas y hormonas esteroides”**

**Dr. Rodríguez Medina Marco Antonio  
ASESOR DE TESIS**

**Dra. Cruz Beltrán María Esther  
DIRECTOR DE TESIS**

**Financiamiento: CONACyT (81898) y DGAPA (PAPIIT: IN-214508)**

---

---

México, D.F. a Junio 2011

Agradecimientos:

A dios por darme salud y fortaleza para terminar la carrera.

A mis padres Minerva y Facundo por su confianza, el apoyo y la educación con tanto esfuerzo que me han brindado.

A mis hermanas Norma y Alma.

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

A mi esposo M. en C. Adrián Solís González por su apoyo, comprensión y sus enseñanzas.

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

Dr. Marco Antonio Medina Rodríguez

M. C. Raúl Zavala Chavero

Dra. Teresa Corona Ortega

M. en C. Rosa Elba Galván Duarte

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

	Págs.
RESUMEN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
Hipótalamo.....	2
NeuronaGnRégicas.....	8
Estructura y genética GnRH.....	10
Tipos GnRH.....	12
Funciones GnRH.....	12
Hipófisis.....	13
Receptor GnRH.....	15
El ovario.....	16
La ovulación.....	21
Ciclo estral.....	22
Teoría de la doble célula.....	26
Funciones de los estrógenos sobre el eje H-H-O.....	29
Receptores a estrógenos.....	30
Funciones asimétricas del hipótalamo sobre la secreción de gonadotropinas y funciones del ovario.....	34
Metil-pipiridino-pirazol (MPP).....	36
Tween 20.....	38
Actividad farmacológica.....	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVOS.....	44

# Í N D I C E

---

---

	Págs.
MATERIAL Y MÉTODO.....	45
RESULTADOS.....	49
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	65
COCLUSIONES.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71

---

---

La secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es modulada por diferentes sustancias entre ellas el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), éste es secretado por el ovario y una de sus principales funciones es regular la secreción de la GnRH, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Estas funciones ocurren al unirse a dos tipos de receptores, el alfa ( $RE-\alpha$ ) y el beta ( $RE-\beta$ ). Aunque la mayoría de las neuronas GnRHérgicas poseen el  $RE-\beta$  y no el  $RE-\alpha$  <sup>(72)</sup>. Se desconoce cuál es el papel específico del estradiol al unirse a uno u otro receptor en la regulación de la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación. Por tanto el propósito de este proyecto de investigación fue estudiar el papel del  $RE-\alpha$  del lado izquierdo del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) sobre la ovulación, el peso de los ovarios y del útero, la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides. Para ello se utilizaron ratas hembras, adultas, cíclicas, micro-inyectadas con 25 $\mu$ g de MPP (*metil-piperidino-pirazol*; antagonista de los  $RE-\alpha$ ) disuelto en 1 $\mu$ L de una solución de tween 20 (100  $\mu$ L/10mL  $H_2O$ ) durante un minuto, en el lado izquierdo de POA-AHA. La inyección tanto del fármaco como del vehículo se realizó entre las 8:30 y 9:30 horas de cada fase del ciclo estral de la rata: estro, diestro-1, diestro-2 o proestro. Todos los animales fueron sacrificados por decapitación, a las 10:00 h del estro esperado del ciclo estudiado. A la autopsia se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados. Los ovarios y el útero se pesaron. El cerebro se extrajo para verificar la zona donde se inyectó el fármaco o el vehículo. Otros grupos de animales micro-inyectados con tween 20 o con MPP entre las 8:30 y 9:30 horas del día del estro o del proestro, fueron sacrificados a las 11:00 o 17:00 horas del proestro esperado. Estos animales fueron sacrificados por decapitación, se recogió la sangre del tronco, se obtuvo el suero en el cual se midieron las concentraciones séricas de la LH, FSH,  $E_2$  y Progesterona ( $P_4$ ) por radio-inmunoanálisis (RIA).

El vehículo inhibió la ovulación en el 55% y 16% de los animales tratados en estro y en proestro, respectivamente. Con respecto a los grupos inyectados con vehículo, el bloqueo de los  $RE-\alpha$  alteró el porcentaje de animales que ovularon (%AO) en función del día del ciclo en el cual se bloquearon los receptores. En el día del estro, el MPP indujo la ovulación en el 100% de los animales pero sólo lo hicieron el 14% cuando fueron tratados en proestro. Estos efectos se acompañaron de modificaciones en el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, del peso de los ovarios y del útero.

Con respecto al grupo de animales intactos, el vehículo micro-inyectado en estro provocó disminución de la concentración preovulatoria de  $P_4$ ,  $E_2$  y FSH, sin alterar la de LH. El bloqueo de los  $RE-\alpha$  en la mañana del estro aumentó la concentración de  $P_4$  en la tarde del proestro y de LH, sin modificar las concentraciones de  $E_2$  y FSH comparadas con el grupo de vehículo. En la fase de estro, el vehículo disminuyó la concentración preovulatoria de  $E_2$  y FSH y no modificó la de LH. Cuando se bloquearon los  $RE-\alpha$  aumentó la concentración de  $P_4$ ,  $E_2$  y FSH e inhibió la de LH.

Estos resultados nos llevan a sugerir que el  $E_2$  al unirse a los  $RE-\alpha$  en la mañana del estro regula de manera inhibitoria la ovulación, como resultado del efecto "feedback" inhibitorio sobre la secreción preovulatoria de LH. En cambio en la mañana del proestro, el  $E_2$  por medio del  $RE-\alpha$  inhibe la secreción de FSH, de estradiol pero estimula la secreción preovulatoria de LH y por lo tanto la ovulación.

***EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO.***

**EL HIPOTÁLAMO**

*El Hipotálamo* (del gr. *ὑπό*, "debajo de" y *θάλαμος*, "cámara nupcial, dormitorio") es una glándula endocrina que forma parte del diencéfalo, y se sitúa por debajo del tálamo. Libera al menos nueve hormonas que actúan como inhibidoras o estimulantes de la secreción de hormonas secretadas por la hipófisis. Suele considerarse el centro integrador del sistema nervioso vegetativo o autónomo, que constituye el sistema nervioso periférico. El hipotálamo junto con la hipófisis regula la homeostasis del organismo, por medio de un sistema de retro-control estimulante o inhibitorio que envía instrucciones al resto del cuerpo de dos formas: la primera de ellas, a través del sistema nervioso autónomo y la otra mediante la glándula pituitaria <sup>(1)</sup>.

Las neurohormonas secretadas por el hipotálamo son la hormona antidiurética (ADH) o vasopresina, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH o CRF), la hormona liberadora de somatotropina (STH) o factor liberador de hormona del crecimiento (GRF o GHRH), la somatostatina u hormona inhibidora de la liberación de somatotropina (GIH) y el factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF).

Por medio del sistema nervioso autónomo, el hipotálamo regula la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, la digestión, el sudor, y todas las funciones simpáticas y parasimpáticas del cuerpo.

La zona anterior o rostral del hipotálamo, regula los mecanismos que culminan con la disipación del calor y ciclo del sueño-vigilia; mientras que en el hipotálamo posterior o caudal se llevan a cabo los mecanismos que regulan mantenimiento de la temperatura corporal constante, aumentando o disminuyendo la frecuencia respiratoria y la sudoración (Fig.1).

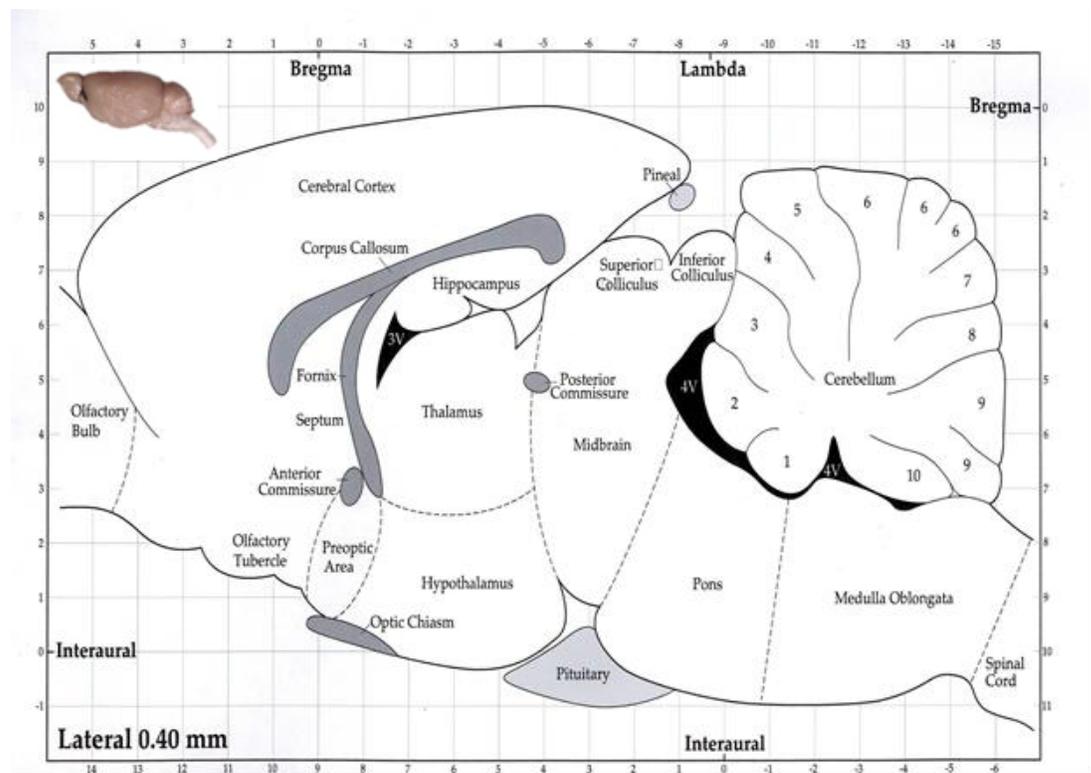


Fig. 1 Corte sagital del cerebro de la ratona donde se muestra la localización rostro-caudal del hipotálamo (Tomado de Paxinos y Watson, 2004) <sup>(2)</sup>.

Para su estudio, el hipotálamo se ha dividido en tres zonas: anterior, medio o túberal y posterior (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferentes funciones del hipotálamo y zonas involucradas en dicha función.

Región	Área	Núcleo	La función
Anterior	Medial	Núcleo medial preóptico	<ul style="list-style-type: none"> <li>● La contracción de la vejiga urinaria</li> <li>● La frecuencia cardíaca disminuida</li> <li>● La presión arterial disminuida</li> </ul>
		Núcleo supraóptico (SO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● La liberación de oxitocina</li> <li>● La liberación de vasopresina</li> </ul>
		Núcleo paraventricular (PV)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● La liberación de oxitocina</li> <li>● La liberación de vasopresina</li> </ul>
		Núcleo anterior del hipotálamo (AH)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Termorregulación</li> <li>● Sudoración</li> <li>● La inhibición de la tirotropina</li> </ul>
		Núcleo supraquiasmático (SC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● La liberación de vasopresina</li> <li>● Los ritmos circadianos</li> </ul>
	Lateral	Núcleo lateral preóptica	
		Núcleo lateral (LT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● La sed y el hambre</li> </ul>
		Parte del núcleo supraóptico (SO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● La liberación de vasopresina</li> </ul>
	Tuberal	Medial	Núcleo dorsomedial del hipotálamo (DM)
Núcleo ventromedial (VM)			<ul style="list-style-type: none"> <li>● Saciedad</li> <li>● Control neuroendocrino</li> </ul>
Núcleo arqueado (AR)			<ul style="list-style-type: none"> <li>● La hormona luteinizante RH liberación</li> <li>● Hormona foliculo estimulante factor de liberación</li> <li>● Alimentación</li> <li>● Dopamina</li> <li>● GHRH</li> </ul>
Lateral		Núcleo lateral (LT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● La sed y el hambre</li> </ul>
		Núcleos lateral tuberal	
Posterior	Medial	Mamílares núcleos (parte de los cuerpos mamílares) (MB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Memoria</li> </ul>
		Núcleo posterior (PN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Aumento de la presión arterial</li> <li>● Dilatación pupilar</li> <li>● Escalofríos</li> </ul>
	Lateral	Núcleo lateral (LT)	

*Hipotálamo Anterior:* Es la zona más rostral del hipotálamo e incluye a los núcleos paraventricular (NPaV), preóptico medial (NPopM), preóptico lateral (NPopL), supraóptico (NSop), supraquiasmático (NSCh) e hipotalámico anterior (NHan). Además de regular los eventos neuroendócrinos de la reproducción, esta zona del hipotálamo regula la temperatura corporal, estimula la sudoración corporal, disminuye la actividad cardíaca y regula la osmolaridad del cuerpo mediante la reabsorción de iones y agua.

*Hipotálamo Medio:* Los núcleos localizados en esta zona del hipotálamo son el dorsomedial (NDM), ventromedial (NVM), arcuato (NAr), túberal, ventral (NPaV). Esta zona regula el apetito o la ingesta de alimento.

*Hipotálamo Posterior:* En esta área del hipotálamo se encuentra el núcleo mamilar medial (NMM), el mamilar lateral (NML), el mamilar intermedio o intercalado (NMI) y el posterior (NP). Aquí se localiza el centro que regula los mecanismos que promueven el aumento de la temperatura corporal o a la hipotermia, como son la vasoconstricción, disminución del sudor y escalofríos<sup>(3, 4)</sup>.

*Área Preóptica:* El área preóptica (POA), constituye la sustancia gris periventricular de la parte más rostral del tercer ventrículo, que se divide en tres núcleos: El núcleo periventricular preóptico que rodea a las paredes del tercer ventrículo en la región del receso preóptico, e l núcleo preóptico interno que está por fuera del núcleo periventricular preóptico y se extiende ventralmente hasta el quiasma óptico. El núcleo preóptico externo, rostral al área hipotalámica externa, se le considera el núcleo intersticial del fascículo prosencefálico medial.

Se reconocen tres regiones hipotalámicas del al área preóptica:

1) Una región supraóptica o anterior, por encima del quiasma óptico y que se continúa al área preóptica. Contiene a los núcleos hipotalámicos paraventricular y el supraóptico. Ambos núcleos envían fibras al lóbulo posterior de la hipófisis. La sustancia gris central menos diferenciada de la región supraóptica constituye un núcleo hipotalámico anterior, que se fusiona imperceptiblemente con el área preóptica.

2) Una región túberal o media. La parte interna forma la sustancia gris central de la pared ventricular, en la cual pueden distinguirse los núcleos ventromedial y dorsomedial.

3) Una región mamilar o posterior, que se continúa caudalmente con la sustancia gris central del acueducto cerebral. Está compuesta por los tubérculos mamilares y las células de ubicación dorsal del núcleo hipotalámico posterior. En el hombre, el tubérculo mamilar está formado casi totalmente por el núcleo mamilar interno. Por fuera se halla el pequeño núcleo mamilar intermedio (Fig.2).

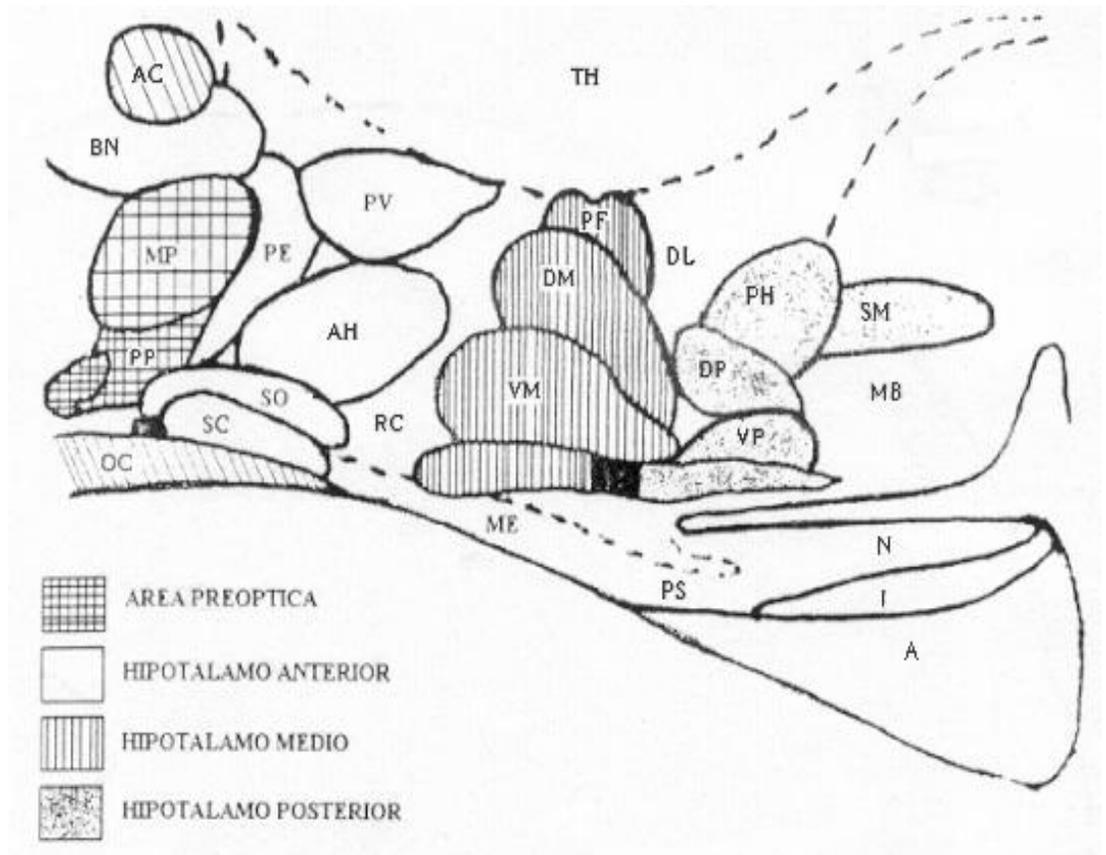


Fig. 2 Corte sagital del cerebro de la rata, que muestra la distribución topográfica de los núcleos y áreas del hipotálamo. A: Hipófisis anterior, AC: comisura anterior, AH: núcleo hipotalámico anterior, BN: base del núcleo de la estría terminal, DL: área hipotalámica dorsolateral DM: núcleo dorsomedial, DP: núcleo dorsal premamilar, I: lóbulo de la hipófisis intermedia, MB: cuerpo mamilar, ME: eminencia media, MP: núcleo preóptico medial, N: hipófisis posterior, OC: quiasma óptico, PE: núcleo hipotalámico periventricular, PF: núcleo perifornical, PH: núcleo hipotalámico posterior, PP: núcleo preóptico periventricular (medio), PS: tallo hipofisario, PV: núcleo paraventricular, RC: área retroquiasmática, SC: núcleo supraquiasmático, SM: núcleo supramamilar, SO: núcleo supraóptico, TH: tálamo, VM: núcleo ventromedial, VP: núcleo premamilar ventral (Tomada de Palkovits 2000) <sup>(4)</sup>.

NEURONAS GnRHérgicas: Las neuronas GnRH secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH (por sus siglas en inglés). Esta hormona también fue conocida como hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH). Tienen su origen embrionario fuera del sistema nervioso central, y derivan de la placa olfatoria durante la gestación temprana; dichas neuronas migran hacia el hipotálamo, junto con o como parte del nervio terminal a través de la lámina cribiforme <sup>(5)</sup>.

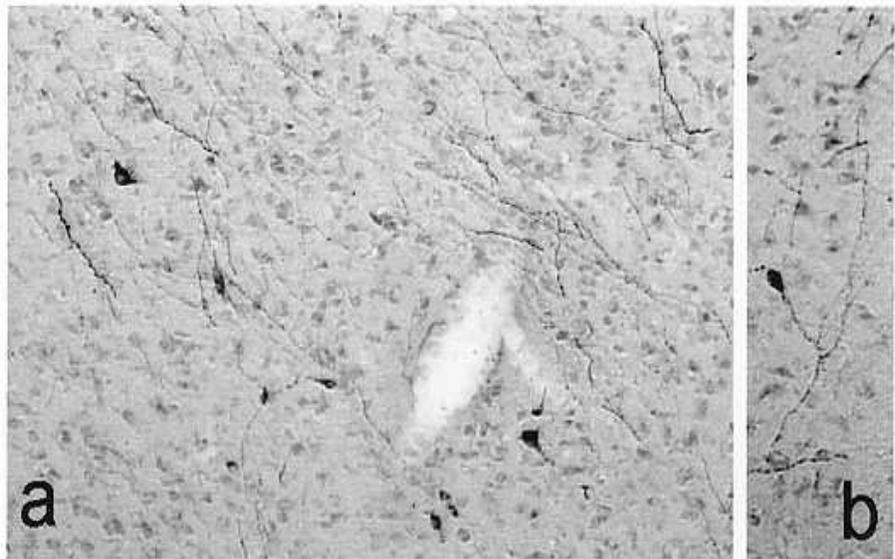
Defectos en la migración de estas neuronas resultan en una deficiencia de GnRH asociada con la ausencia de bulbo olfatorio en humanos (Síndrome de Kallmann: ausencia de interés por el sexo la hormona luteinizante (LH), lo que provoca atrofia de los gonadotropos de la glándula pituitaria e incapacidad para sintetizar LH y la hormona folículo estimulante (FSH) <sup>(6)</sup>.

La GnRH en la rata adulta, es producida por un número relativamente pequeño de neuronas, las que se encuentran dispersas desde el complejo de la banda diagonal de Broca, el septum medial y el hipotálamo rostral. En el hipotálamo, las neuronas secretoras de GnRH se encuentran en el núcleo hipotalámico anterior, el núcleo arcuato, el núcleo periventricular, el paraventricular y el área preóptica. La Fig. 3 muestra la distribución de las neuronas GnRHérgicas en un corte coronal del cerebro de la rata en la zona frontal del diencéfalo.



*Fig. 3 Morfología de la neurona GnRH y su distribución (Tomada de Herbison, 2006) <sup>(7)</sup>.*

La neurona GnRH es una célula bipolar en forma de huso, con un núcleo grande y concéntrico. En la rata, el ratón y el mono el contorno de la neurona puede ser liso o espinoso <sup>(7)</sup>. (Fig. 4).



*Fig. 4 (a) Área preóptica (POA) cerca del fondo del saco varios cuerpos de células de la GnRH  
(b) Neurona bipolar, con prolongaciones (Tomada de Herbison, 2006) <sup>(7)</sup>.*

Estructura y genética de la GnRH: La GnRH se sintetiza como parte de un precursor (pro-GnRH), que consiste de 92 aminoácidos, dividido en tres partes: un péptido de 23 aminoácidos, seguido por una secuencia de Gly-Lys-Arg esencial para el procesamiento proteolítico y por un residuo de 56 aminoácidos conocido como péptido asociado con la GnRH (GAP, por sus siglas en inglés) <sup>(8,9)</sup>.

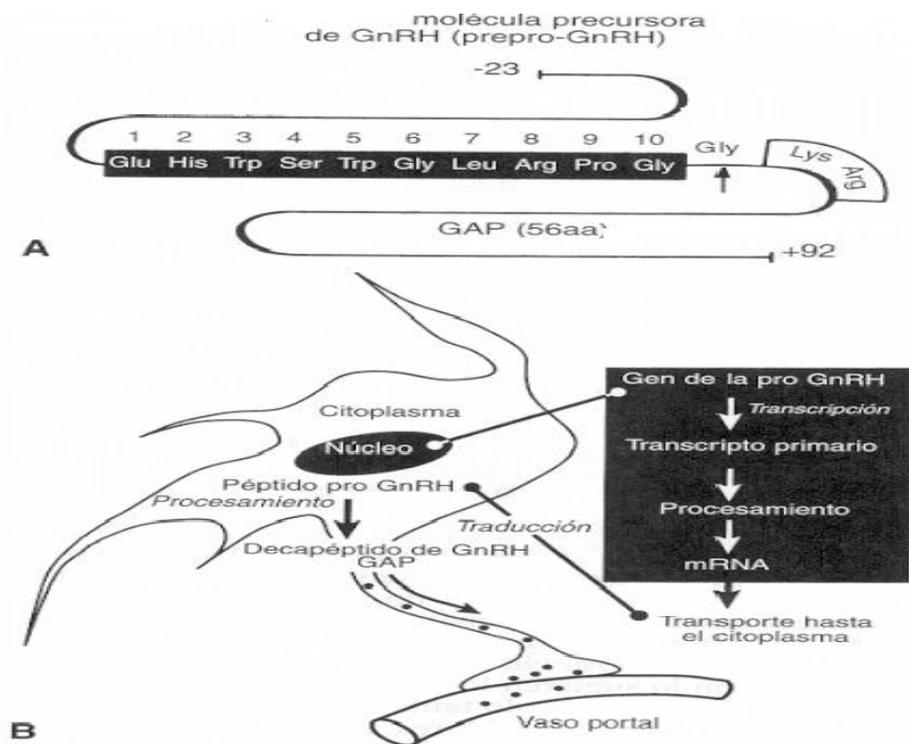
En los mamíferos la GnRH es codificada por el gen GNRH1 que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 8, está integrado por 4 exones: el primero (I) contiene la región 5' no traducida; el exón dos (II) codifica para el péptido señal del decapeptido de la GnRH, para el sitio de amidación y para el sitio del precursor, también codifica para el sitio de amino terminal de once aminoácidos de un segundo péptido asociado de 56 aminoácidos denominado GAP (ácido gama butírico), el cual contiene el segmento prepro-GnRH; el exón tres (III) codifica para los siguientes 32 residuos del GAP; el exón cuatro (IV) codifica para los últimos trece aminoácidos del GAP, para el codón de terminación y para la región 3' no traducida del ARN mensajero <sup>(10,11, 12, 13, 14)</sup>. La estructura del decapeptido GnRH se menciona a continuación <sup>(6)</sup>.



En la rata, las neuronas GnRHérgicas, se originan en la placa olfatoria, migran principalmente al área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) y algunas son encontradas en el hipotálamo medio basal (MBH) <sup>(15)</sup>.

En el adulto, estas neuronas se localizan como redes extensas y difusas distribuidas a lo largo de la ruta septo-preóptica–infundibular <sup>(16)</sup>.

El procesamiento molecular en el interior de las neuronas de GnRH ocurre fundamentalmente en el núcleo. Después de la transcripción y el procesamiento del gen de la Pro-GnRH, el ARNm es transportado hasta el citoplasma, donde tiene lugar la traducción con la generación de GnRH (Fig. 5). Luego los productos, GnRH y GAP son transportados hasta las terminaciones nerviosas y secretados a la circulación <sup>(9)</sup>.



*Fig. 5 A. Representación esquemática de la estructura y la secuencia de 92 aminoácidos de la pre-pro-GnRH. El decapeptido (aminoácidos 1 a 10) ocupa el lugar intermedio entre el péptido señal y la secuencia Gly-Lys-Arg. La flecha indica el sitio de procesamiento proteolítico y la amidación del C-terminal de la molécula de GnRH. B. Procesamiento molecular del decapeptido de GnRH. En el núcleo, el gen de pro-GnRH es procesado a ARNm después de la transcripción; el ARNm es transportado hasta el citoplasma del cuerpo celular (soma), donde se genera el péptido pro-GnRH y del péptido asociado con la GnRH (GAP). Luego la GnRH y el GAP son transportados hasta las terminaciones nerviosas y secretados en la circulación porta (Tomada de Yen, 2001) <sup>(9)</sup>.*

La vida media de la GnRH en el humano se ha calculado de 10 minutos <sup>(17)</sup>.

En la rata macho y hembra la cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es significativamente mayor que en el izquierdo <sup>(18,19)</sup>. Es posible que esta asimetría este definida por el momento y el tipo de participación de los diversos sistemas de neurosecreción que regulan la síntesis y liberación de la GnRH <sup>(18)</sup>.

Tipos de GnRH: 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 solo estimular la liberación de las gonadotropinas <sup>(21)</sup>. En la rata se han detectado dos de ellas, la GnRH-I y GnRH-II <sup>(20)</sup>.

La actividad de las neuronas GnRH es regulada por diferentes neuromoduladores y hormonas como: las endorfinas, el GABA, el glutamato, la dopamina, la noradrenalina y la serotonina, la acetilcolina, el neuropéptido Y, el péptido intestinal vasoactivo, vasopresina, el factor liberador de la corticotropina (CRH), el factor liberador de la tirosina, el estradiol, la progesterona y sus metabolitos.

Funciones de la GnRH: Una vez sintetizado el péptido, es transportado en la vesícula hasta la terminal sináptica, la cual finaliza en la eminencia media, en donde es liberado en los vasos del sistema portal hipotalámico–hipofisario.

La liberación de la GnRH se realiza por exocitosis en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje <sup>(22)</sup>. Como resultado de la entrada de calcio se activan las enzimas proteolíticas que degradan la membrana plasmática, de tal forma que el péptido es liberado <sup>(23)</sup>.

En la hipófisis se localizan las células que expresan el receptor para la GnRH (GNRHR) llamadas gonadotropos, las cuales algunas sintetizan exclusivamente la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y otras secretan ambas.

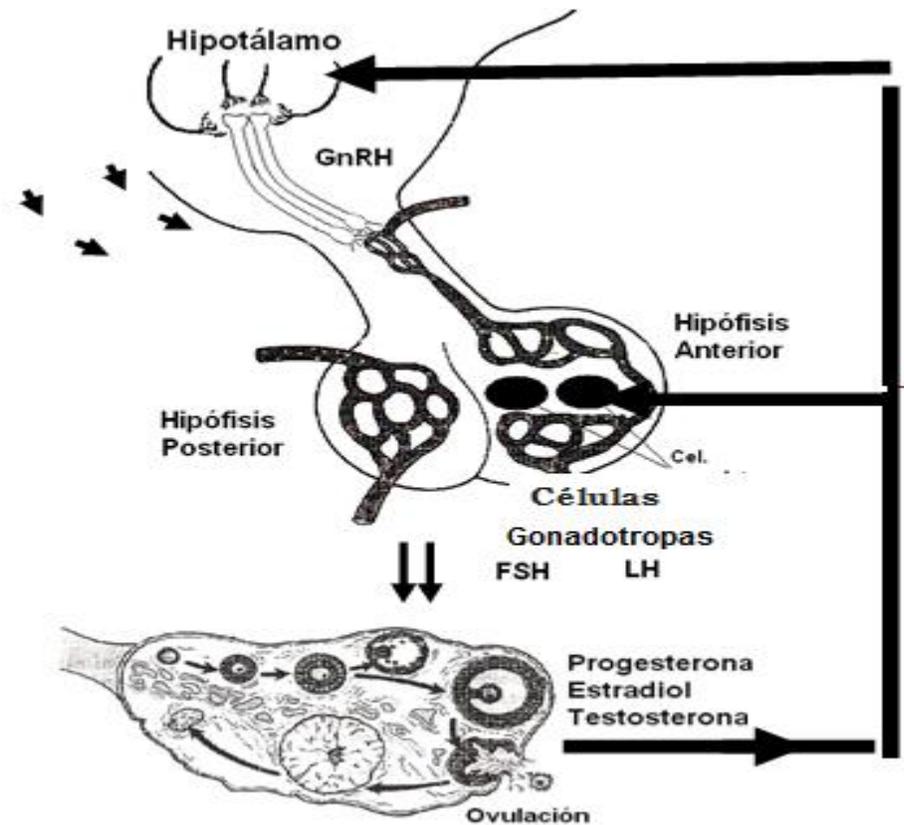
### **LA HIPÓFISIS**

La hipófisis se encuentra en la base del cerebro alojada en el esfenoides y cubierta por la duramadre <sup>(24)</sup>. Está unida al hipotálamo por el tallo hipofisiario el cual contiene el sistema porta hipofisiario de vasos sanguíneos.

La Hipófisis esta dividida en tres partes: el lóbulo anterior, el lóbulo intermedio y el lóbulo posterior. El lóbulo anterior y el intermedio forman una glándula endocrina verdadera llamada adenohipófisis. El lóbulo posterior también llamado neurohipófisis es una extensión del hipotálamo <sup>(25)</sup>.

La adenohipófisis regula las funciones llevadas a cabo por la tiroides, las adrenales, las gónadas, las glándulas mamarias, entre otras. Las funciones de las gónadas son reguladas mediante la producción de la FSH y LH, al actuar directamente sobre los ovarios y los testículos <sup>(25,26)</sup>.

En la hipófisis, la GnRH al unirse a su receptor estimula la secreción de las gonadotropinas, este proceso es controlado por el tamaño y la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH, así como por los efectos estimulante o inhibitorio de los estrógenos. Frecuencias bajas de los pulsos de GnRH conducen a la secreción de la FSH, mientras que las frecuencias altas estimulan la liberación de la LH (Fig.6). <sup>(11)</sup>.



*Fig. 6 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la que al actuar en la hipófisis estimula la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas gonadotropinas llegan a los ovarios, donde estimulan la secreción de progesterona, testosterona y estradiol, así como el crecimiento y diferenciación de los folículos y la ovulación (Tomada de Berne y Levy, 1992) <sup>(27)</sup>.*

Receptor de la GnRH (GnRHR): La GnRHR en mamíferos incluyendo a la rata, su secuencia de aminoácidos es de 327, en los cuales el receptor están presente en ellos, ya que el 85% de los aminoácidos son idénticos <sup>(28)</sup>.

La presencia del GnRHR en el sistema nervioso central sugiere que esta hormona actúa como un transmisor o un neuromodulador que pudiera participar en la regulación de conductas reproductivas y en la promoción de la ovulación <sup>(28)</sup>.

Los GnRHR se encuentran exclusivamente en las membranas citoplasmáticas, el principal sitio blanco de esta hormona es el gonadotropo de la adenohipófisis, los receptores de ésta hormona también se han encontrado en gónadas, en placenta, tejido adrenal, en sistema nervioso central y células cancerígenas <sup>(28)</sup>.

La FSH y la LH están formadas por dos cadenas peptídicas (una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ ) unidas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. La LH y la FSH comparten cadenas  $\alpha$  casi idénticas, mientras que la cadena  $\beta$  proporciona la especificidad biológica en las interacciones con sus receptores. Las subunidades  $\alpha$  de la LH, FSH, TSH (hormona estimulante de la tiroides) y hCG (gonadotropina coriónica humana) son idénticas, y contienen 92 aminoácidos. Las subunidades  $\beta$  varían para cada hormona. La FSH tiene una subunidad  $\beta$  de 118 aminoácidos (FSH- $\beta$ ), que le confiere su acción biológica específica y es responsable de la interacción con el receptor de FSH. La subunidad  $\beta$  de la LH (LH- $\beta$ ) esta constituida por 121 aminoácidos.

### EL OVARIO

El ovario es el órgano reproductor primario. En los vertebrados, este órgano es pareado y se localizan a ambos lados de la cavidad pélvica, están suspendidos en un pliegue peritoneal llamado mesovario. La arteria ovárica (o arteria útero-ovárica) recibe el riego sanguíneo por la aorta abdominal que llega al ovario a lo largo del mesovario, rama que entra a través del hilio, por donde salen las venas <sup>(29,30)</sup>.

En el ovario se distinguen dos zonas: la corteza y la médula. En la corteza se localizan los folículos en diferentes estadios de crecimiento y maduración embebidos en el estroma. La parte más externa de la corteza está tapizada por el epitelio germinal escamoso o cuboidal que se apoya en la túnica albugínea, una capa de tejido conectivo denso, que da al ovario su color. La médula es la capa interna, está formada por estroma, nervios, abundantes vasos sanguíneos arteriales y venosos con poco tejido conectivo y la glándula intersticial. Entre la corteza y la médula no existe línea clara de demarcación.

Hilio es el sitio por donde penetra y sale la arteria y la vena ovárica (o arteria útero-ovárica), la rama de la aorta abdominal que llega al ovario a lo largo del mesovario, los vasos linfáticos, las terminales nerviosas <sup>(9, 31, 32)</sup>.

El ovario está formado por tres compartimientos: el luteal, intersticial y folicular. En este último compartimiento se engloban a los folículos en crecimiento, que son la unidad anátomo-funcional de la gónada y a partir de los cuales se originan los otros dos compartimientos <sup>(31)</sup>.

Compartimento Luteal o cuerpo lúteo: El compartimiento lúteo se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsan al ovocito, por el estímulo de LH. Secreta principalmente progesterona <sup>(32,33)</sup>.

Compartimento Intersticial o glándula intersticial: Incluye tanto a las células teca-intersticiales de los folículos en crecimiento y las células de la teca de los folículos atrésicos, y representa la unidad productora de andrógenos <sup>(30, 34)</sup>.

Compartimento Folicular: Está formado por folículos que se encuentran en la corteza del ovario, en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento, como son los primordiales, primario, secundario, terciario, y preovulatorios <sup>(33, 35)</sup>.

Cada folículo está formado por el ovocito I, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y las células de la teca; estas últimas conforman la denominada teca interna. Además de las células de la granulosa y las tecaes, el folículo está rodeado por un complejo sistema de fibras colágenas, células del tejido conectivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas, todo lo que recibe el nombre de teca externa <sup>(36)</sup>.

De acuerdo a su organización estructural, pueden definirse cinco fases del desarrollo folicular:

- Folículos primordiales: consisten de un ovocito esférico rodeado de una capa de células foliculares planas o cilíndricas bajas y la membrana basal. Algunos de los folículos primordiales se desarrollan y se convierten en folículos primarios <sup>(36,37)</sup>.

- Folículos primarios: el ovocito adquiere un tamaño mayor y aparece rodeado por dos o más capas de células foliculares que ahora reciben el nombre de células de la granulosa. <sup>(29,36)</sup>. El ovocito continua creciendo, queda separado por las células de la granulosa adyacentes, por una estrecha hendidura en la que se proyectan microvellosidades y prolongaciones. En este espacio se acumula una glucoproteína que se condensa gradualmente y forma la zona pelúcida. El estroma circundante forma la teca folicular <sup>(38)</sup>. La proliferación de las células de la granulosa es estimulada por la FSH y los estrógenos, que actúan de manera sinérgica <sup>(39)</sup>. La FSH, a su vez, estimula la síntesis de sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que permite que su número se incremente conforme el folículo madura y también estimula la síntesis de los receptores a LH <sup>(36, 40)</sup>.
- Folículo secundario: continúa la proliferación de células de la granulosa, se forman varias capas circundantes al ovocito. Después, entre las células de la granulosa se forman zonas que contienen líquido, que al aumentar de tamaño y fusionarse forman una cavidad llamada antro folicular, el ovocito adopta una posición excéntrica y lo rodean células de la granulosa formando el *cumulus oophorus*. Se diferencian la teca interna y externa. La teca interna esta muy vascularizada, son células que secretan andrógenos y expresan receptores a LH. Los andrógenos son transportados a las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos por acción del complejo enzimático aromatasa <sup>(30, 39, 41)</sup>. La teca externa compuesta por colágeno, células de tejido conectivo, fibras musculares lisas, vasos sanguíneos y fibras nerviosas <sup>(36)</sup>.

El líquido folicular se encuentran proteínas, polipéptidos, FSH, LH, prolactina, progesterona, andrógenos (DHT, 5 $\alpha$ -androstano-3-17-diona, androsterona y epiandrosterona), estrógenos gonadocrininas y noradrenalina, cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral de la rata <sup>(36)</sup>.

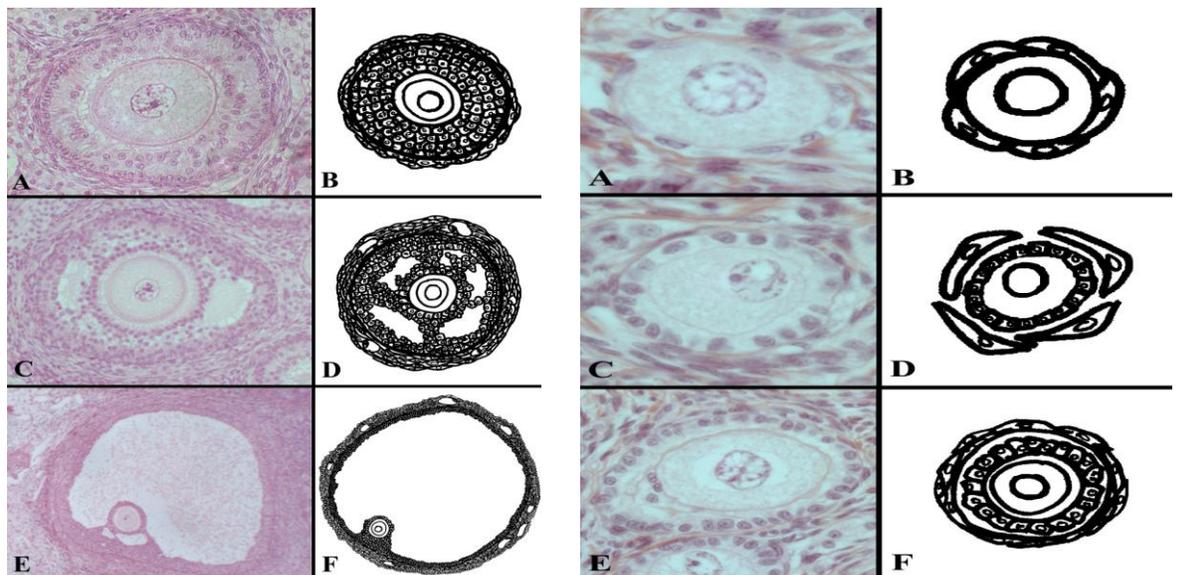
- Folículo preovulatorio: constituido por el ovocito que alcanza su tamaño máximo, un antro desarrollado completamente y lleno de líquido folicular, y varias capas de células de la granulosa denominadas corona radiada <sup>(37)</sup>. Los vasos sanguíneos al igual que los nervios sólo llegan a la teca interna, ya que no penetran a la granulosa. Algunos de las fibras nerviosas terminan en el músculo liso presente en la teca externa y estos nervios regulan la contractibilidad de las mismas lo que influiría en el mecanismo de la ovulación. En el ovario de la rata los folículos llegan a este estadio de desarrollo 17 a 19 días después de haber iniciado el crecimiento <sup>(30,36)</sup>.

El crecimiento y la diferenciación del folículo finalizan con su ruptura y la expulsión del ovocito II (la ovulación) o con la atresia <sup>(42)</sup>. (Fig. 7, 8).

Los ovarios de la rata secretan principalmente 17 $\beta$ -estradiol (estradiol) y pequeñas cantidades de estrona. La mayor proporción de estrona se sintetiza en otros tejidos a partir de los andrógenos androstendiona y testosterona, secretados por las adrenales y las células de la teca del folículo. El estriol es producto del estradiol y la estrona, cuya conversión se realiza en el hígado y la placenta <sup>(9, 43)</sup>.



*Fig. 7 Fotografía de un Corte sagital del ovario de rata muestra dos zonas sin límites precisos: la corteza y la médula ovárica que es más pequeña en comparación con la corteza. La superficie de la corteza ovárica está revestida de un epitelio simple cúbico que se aplana en las mujeres de edad. La corteza está constituida por estroma y parénquima.*



*Fig. 8 Secuencia real y esquemática de la maduración de un folículo ovárico humano (tinción con hematoxilina-eosina). A-B.- Folículo primordial. C-D.- Folículo primario unilaminar. E-F.- Folículo primario en el que empiezan a distinguirse más capas Figura 3. Secuencia real (tinción con hematoxilina-eosina) y esquemática de la maduración de un folículo ovárico humano (II). A-B.- Folículo primario multilaminar. C-D.- Folículo secundario o antral. E-F.- Folículo terciario o de Graff. (Tomada de Carlson, M. B. 2000) <sup>(44)</sup>.*

*LA OVULACIÓN.*- La ovulación es el resultado de un proceso inflamatorio que resulta en la expulsión de un ovocito capaz de ser fecundado. En los folículos preovulatorios, la ovulación ocurre en respuesta al incremento brusco de la concentración de las gonadotropinas en la sangre. La FSH y LH estimulan la secreción de enzimas proteolíticas como el activador del plasminógeno <sup>(40,45, 46)</sup>.

La LH también estimula otras enzimas proteolíticas como plasmina y metalo-proteinasas, las cuales contribuyen a la degradación de la matriz perifolicular y principalmente de las fibras de colágeno que forman la pared folicular.

Estos cambios se acompañan del incremento en el flujo sanguíneo, en la permeabilidad vascular y en el volumen folicular. Los cambios vasculares y de la actividad proteolítica son estimulados, además de la LH, por mediadores locales como son: el factor de crecimiento endotelial vascular, interleucina 1, eicosanoides (prostaglandina y leucotrienos), el factor activador de plaquetas y óxido nítrico <sup>(46,47)</sup>.

Desde el momento del nacimiento, los ovocitos primarios persisten en la etapa de Diploteno hasta el momento de la ovulación, momento en el que prosigue la meiosis y se forma el primer cuerpo polar y se expulsa <sup>(9)</sup>. Cuando se lleva a cabo la ovulación, el ovocito secundario u ovocito II, ya que justo antes de salir culmina la primera división meiótica e inicia la segunda división que se detiene en metafase. La segunda etapa de la meiosis culmina sólo si el ovocito es fecundado <sup>(33,42)</sup>.

Durante la ovulación, el ovocito secundario y las células de la granulosa circundantes son expulsados del folículo e ingresan a la trompa de Falopio <sup>(49)</sup>.

El ovario puede ser considerado como una glándula maestra, cuyas funciones están reguladas por los otros dos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Tanto la ovulación como la secreción de hormonas esteroides se encuentran reguladas por mecanismos neuroendocrinos que cambian durante el ciclo estral<sup>(9,38, 50)</sup>. (Fig. 9).

### **EL CICLO ESTRAL DE LA RATA**

*El término estral se deriva de la palabra en latín “oistros” que significa “frenesí”, se caracteriza por 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<sup>(50)</sup>.*

En nuestro modelo de estudio, la rata de laboratorio, el ciclo estral es de 4 ó 5 días, lo que depende de la cepa que se utilice y del periodo luz oscuridad en que sean mantenidos los animales; para su estudio se le divide en: proestro, estro, diestro-1 y diestro-2<sup>(38,50)</sup>. El perfil de secreción de progesterona ( $P_4$ ), estradiol ( $E_2$ ), prolactina (PRL), FSH y LH durante el ciclo estral se puede observar en la Fig. 10<sup>(51)</sup>. En la etapa de diestro-1 “periodo de recuperación”<sup>(51)</sup>; la citología vaginal se caracteriza por presentar una gran cantidad de leucocitos, El pH vaginal es de 6.1; el cuerpo lúteo producen abundante  $P_4$  por varias horas, lo que provoca que la concentración de esta hormona alcance un “pico” hacia el medio día. En algunas cepas de ratas la secreción de  $P_4$  se prolonga, lo que conducen a ciclos de cinco días.

Las concentraciones de  $E_2$ , LH y FSH son básales durante este día del ciclo<sup>(39,50)</sup>.

En el día siguiente, diestro-2, en el frotis vaginal se observan una menor cantidad de leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas.

La concentración de estradiol empieza a aumentar paulatinamente desde la tarde de este día (Fig. 10) <sup>(38, 53)</sup>.

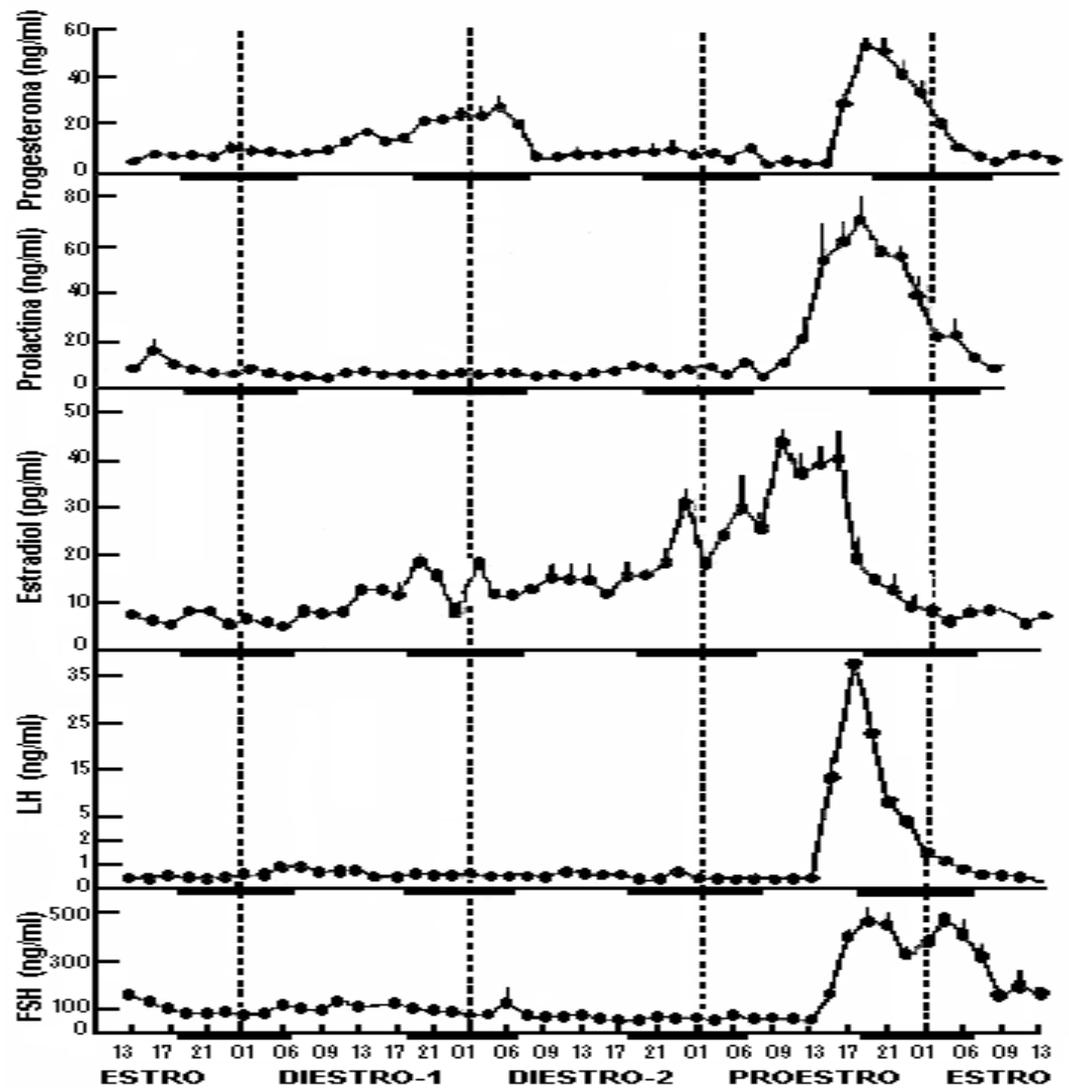


Fig. 10 Concentración de LH, FSH, progesterona, prolactina y estradiol obtenido en plasma cada 2 horas en cada día del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de hormona de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan intervalos de oscuridad en el cuarto del animal (Tomada de Freeman, 1994) <sup>(51)</sup>.

En el día *Proestro* (fase de maduración folicular y preovulatoria). Se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas, dura aproximadamente 12 horas. En esta etapa el pH vaginal es de 5.4, la vagina se torna seca y se comienza a producir la cronificación de las células de las paredes de esta, los ovarios están en plena producción folicular.

Entre las 09:00 y 13:00 horas de este día, la concentración de estradiol en sangre es máxima respecto a los otros días del ciclo, lo que provoca cambios en el útero. Este aumento en la concentración de E<sub>2</sub> alcanza el valor máximo del ciclo, evento llamado “pico” de estrógenos, que estimula la secreción de GnRH (hacia el medio día) y por lo tanto, induce la concentración de FSH y LH, también llamado “pico” preovulatorio, que ocurre en la tarde del proestro (entre las 15:00 y 19:00 horas). La secreción preovulatoria de LH induce la secreción de progesterona que alcanza otro “pico” en la noche de este día y por lo tanto la conducta de apareamiento (Fig. 10).

*Estro:* presenta células epiteliales conificadas y sin núcleo <sup>(50)</sup>. Dura de 9 a 15 horas, la vagina se ve cornificada y seca, el pH vaginal es de 4.2. En este día ocurre la ovulación en la madrugada del estro. En este día las concentraciones de estradiol, progesterona y LH regresan a sus valores basales pero las de FSH aumentan nuevamente a valores ligeramente menores que los de la tarde del proestro (segundo “pico” de FSH), cuya función es reclutar los folículos que entrarán en crecimiento durante los ciclos posteriores a este (Fig. 10).

Esta serie de cambios son regulados por eventos neuroendocrinos que ocurren de forma recíproca y sincrónica entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario, el también llamado eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

### **LOS ESTRÓGENOS**

Los estrógenos son hormonas ampliamente distribuidas en el reino animal, que están presentes en hembras y machos. Estimulan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de sus células blanco <sup>(26, 31, 52)</sup>.

---

---

En la hembra, la principal fuente de estrógenos son los ovarios. Los estrógenos también son sintetizados en órganos como el hígado, la médula ósea, la placenta, los tejidos; adiposo, nervioso, óseo y muscular (34, 53, 54).

Síntesis de estrógenos en el ovario: Los ovarios en la rata secretan principalmente  $17\beta$ -estradiol (estradiol) y pequeñas cantidades de estrona. La mayor proporción de estrona se sintetiza en otros tejidos a partir de los andrógenos, androstendiona y testosterona, secretados por las adrenales y las células de la teca del folículo. El estriol es producto del estradiol y la estrona, cuya conversión se realiza en el hígado y la placenta (9,45, 43).

Estructura química: Los estrógenos pertenecen al grupo de hormonas esteroideas derivadas del colesterol. La estructura química del núcleo básico del colesterol es el ciclopentano-perhidrofenantreno o “núcleo esteroide”, el cual está constituido por 27 átomos de carbono, dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono (ciclobencénicos) denominados A, B, C, y un anillo de cinco átomos (ciclopentano) denominado D, una cadena de seis carbonos en el carbono 17, dos metilos en posición 10 y 13, un doble enlace  $\Delta^5$  y un grupo hidroxilo en el carbono 3 (52). 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 (52, 54). El estradiol conserva el núcleo esteroide de 18 carbonos, por lo que se forma un anillo fenólico A (anillo aromático) con un grupo hidroxilo en la posición carbono 3 y un grupo  $\beta$ -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y la alta afinidad a receptores de estrógenos (34, 55, 56, 57).

Biosíntesis de los estrógenos: La biosíntesis de los estrógenos se realiza a partir de colesterol, que proviene de tres fuentes: 1) del plasma donde el colesterol es transportado unido a lipoproteínas de baja densidad, 2) del sintetizado por la célula a partir de acetato producto del ciclo de Krebs y 3) de ésteres de colesterol acumulados en el citoplasma de esa célula (52).

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<sup>(52, 54)</sup>.

### **TEORÍA DE LA DOBLE CÉLULA**

En las especies animales, el folículo ovárico es el sitio más importante para la síntesis del estradiol. La biosíntesis de estrógenos en ésta glándula es explicada por la teoría de “las dos células” o “doble célula”, en la cuál se plantea la participación combinada de las células de la teca interna y de la granulosa<sup>(34, 43)</sup>.

La unión de la LH a su receptor membranal en las células de la teca interna, activa a la adenilciclase (AC), enzima que estimula la formación del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosín trifosfato (ATP). El AMPc actúa como segundo mensajero, induce la activación del complejo enzimático de la desmolasa del colesterol, localizada en la membrana interna de la mitocondria<sup>(34)</sup>.

La desmolasa es una oxidasa con funciones mixtas, miembro del grupo enzimático citocromo P-450, en el carbono 17 separa la cadena lateral de colesterol de seis carbonos, y en el carbono 20 introduce una función cetona, dando origen a la pregnenolona (constituida de 21 carbonos)<sup>(52)</sup>.

La pregnenolona es el precursor de todas las hormonas esteroides. La transformación de pregnenolona a androstendiona y testosterona en los mamíferos sucede a través de dos vías metabólicas. Estas vías denominadas como “ $\Delta^5$ ” y “ $\Delta^4$ ”, según la localización del punto de insaturación (doble enlace) de los compuestos intermediarios. En la Fig. 11 se muestran las principales moléculas de ambas vías metabólicas<sup>(41, 52)</sup>

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 anillos aromáticos.<sup>(36, 52)</sup>

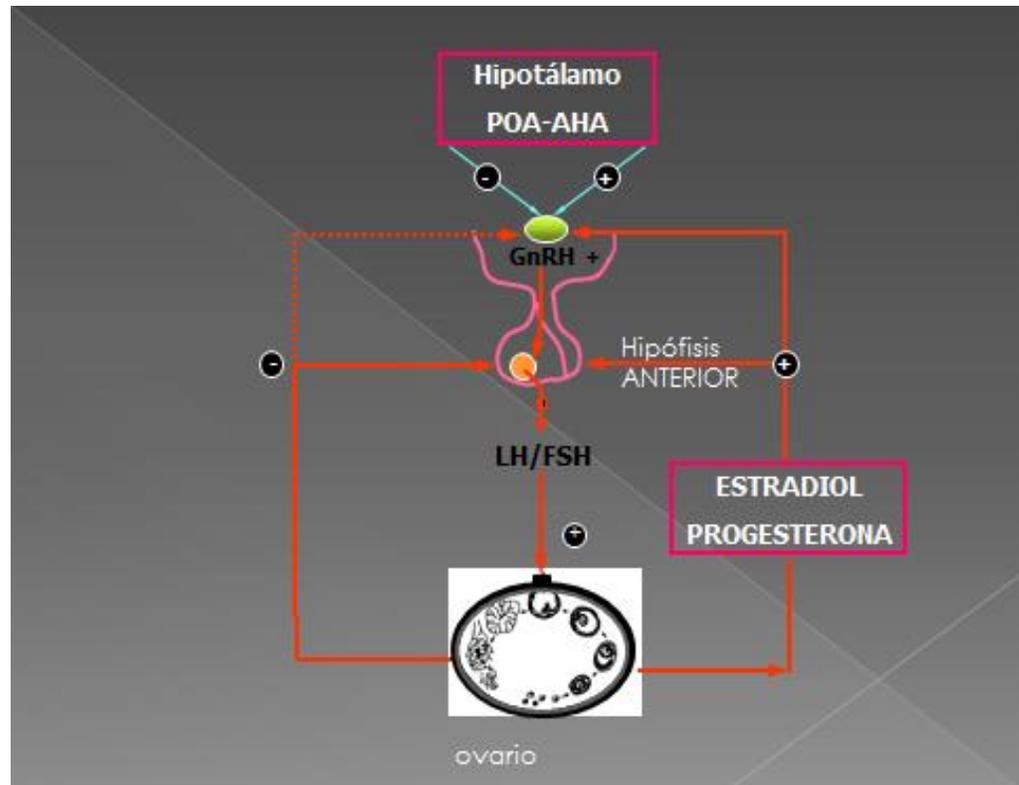
La hormona estimulante del folículo (FSH) estimula la síntesis de la aromatasa. La conversión de los andrógenos en estrógenos requiere que ocurran tres oxidaciones consecutivas. El anillo A es aromatizado con la subsecuente remoción del carbono 18 <sup>(34,52)</sup>.

Los estrógenos atraviesan libremente las membranas celulares por su constitución lipídica, por lo que su secreción se produce por difusión a favor de un gradiente de concentración, establecido por la velocidad de síntesis <sup>(52,54)</sup>.



**FUNCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-  
HIPÓFISIS-OVARIO.**

La función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) es regular los diferentes procesos involucrados con la reproducción (Fig 12).



*Fig. 12 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Estradiol ( $E_2$ ), Progesterona ( $P_4$ ). (Modificado de Ganong 2004)<sup>(32)</sup>.*

En la rata, los estrógenos regulan la secreción de la GnRH<sup>(58)</sup>. Al actuar directamente sobre la neurona GnRHérgica o indirectamente, por medio de neuronas que se vinculan con ella, localizadas principalmente en las áreas preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA). La función estimulante o inhibitoria de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH, cambia durante el ciclo, como resultado de modificaciones en su concentración en la sangre. Lo que determina el patrón de secreción de la GnRH durante la edad adulta<sup>(51, 59,61)</sup>.

En la hipófisis anterior, los estrógenos estimulan la síntesis de GnRHR en los gonadotropos, fenómeno denominado sensibilización o imprimación hipofisaria a la GnRH. Este efecto regula la secreción masiva de las gonadotropinas (FSH y LH) antes de la ovulación, proceso conocido como secreción pre-ovulatoria de LH y FSH <sup>(9, 58)</sup>.

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 <sup>(9, 30, 51, 62)</sup>.

Los receptores a estrógenos: A pesar de su importancia, la función precisa de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica no es del todo clara. Hasta hace quince años, ni aún con la utilización de técnicas inmunohistoquímicas se había podido detectar el receptor a estrógenos (RE) en la neurona GnRHérgica de diferentes especies <sup>(61)</sup>. De igual forma, a partir de estudios *in vivo* existía poca evidencia acerca de la acumulación de estradiol radiactivo en estas células <sup>(64)</sup>.

Los RE son proteínas activadoras ligando-dependientes, que median la actividad de los estrógenos en las células que los poseen o las células blanco <sup>(55,68)</sup>.

---

---

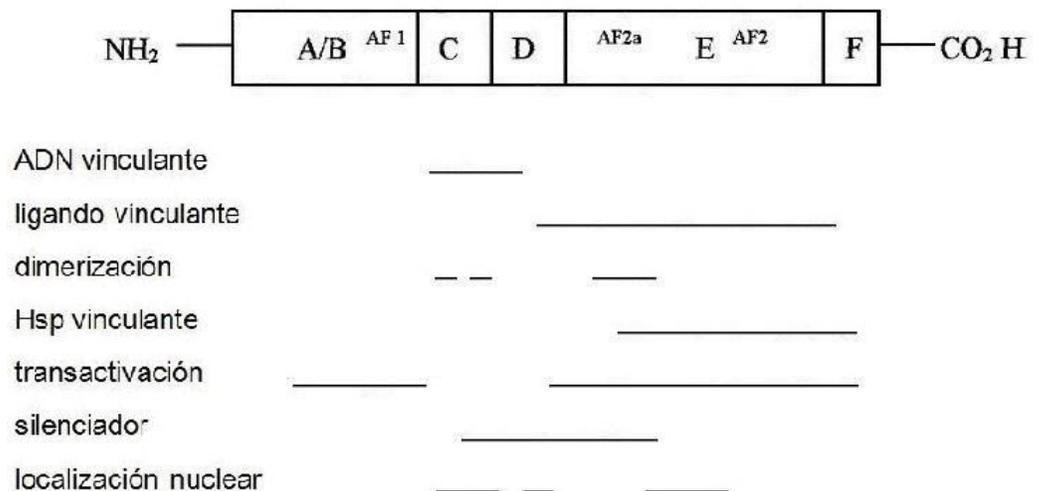
El RE consta de seis dominios funcionales: A/B, C, D, E y F (Fig. 13) <sup>(65)</sup>. El dominio A/B, localizado en el extremo amino terminal (*terminal-N*) contiene una región que regula la actividad transcripcional, conocida como AF-1. El dominio C es el sitio de unión específico al ADN, el cual constituye una sección hidrofílica del receptor y es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares. Esta formado por 66-68 aminoácidos, entre los cuales se encuentran cisteínas capaces de unir zinc, las cuales forman dos proyecciones peptídicas de coordinación tetraédrica con el zinc, denominados dedos de zinc. Contiene dos dedos de zinc que mantienen interacciones específicas con los elementos de respuesta a los estrógenos. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de los aminoácidos Glu, Gly y Ala. El dominio D o región de bisagra (*"finge"*) permite al receptor flexibilidad o alterar su conformación. Mediante la técnica de mapeo proteolítico del RE se ha mostrado que una porción de el dominio D es necesaria para unir un ligando con máxima afinidad. También se ha mostrado que participa en la unión a 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. El dominio E ó sitio de unión del esteroide o ligando, 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. 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 <sup>(66)</sup>.

En el año de 1996, Kuiper y colaboradores clonaron un ácido desoxi-ribonucleico complementario (DNAc) del RE de la próstata de rata, al cual denominaron RE subtipo  $\beta$ , para distinguirlo del que previamente se había clonado del útero de la rata, al cual consecuentemente se denominó RE subtipo  $\alpha$ .

La importancia biológica de los dos subtipos del RE aún no es muy clara. Sin embargo, su existencia explica en parte los diferentes efectos del RE en varios órganos blanco.



*Fig.13 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; Norris y col. 1997; Tsai y O'Malley 1994; Rosen y col. 1995)<sup>(67, 68, 69, 70, 71)</sup>.*

Mediante la detección del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (por hibridización *in situ*) y la cuantificación de los RE (por la técnica de unión con estrógeno tritidado) en neuronas GnRHérgicas (identificadas por inmuno-histoquímica) se mostró <sup>(72)</sup>, que la mayoría de las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE- $\beta$  pero no el ARNm para el RE- $\alpha$ . Otros investigadores <sup>(73)</sup> mostraron que 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 co-expresan el ARNm para ambos tipos de RE, otras expresan sólo el ARNm del RE- $\alpha$  y otras sólo el del RE- $\beta$  <sup>(74)</sup>.

Lagrange y colaboradores (1995) mostraron que los estrógenos tienen un efecto rápido sobre la excitabilidad eléctrica de la neurona GnRHérgica del cuyo. Se ha mostrado que el RE- $\beta$  tiene que ver con los efectos rápidos de los estrógenos sobre la neurona GnRH <sup>(75)</sup>. En el área preóptica (POA), el RE- $\beta$  parece ser exclusivamente nuclear en neuronas que expresan GnRH (5 a 10% de las neuronas) <sup>(76)</sup>.

Aún se desconoce cuál es el papel del RE- $\alpha$  y del RE- $\beta$  sobre la neurona GnRHérgica; diferentes grupos de investigación sugieren que tanto el RE- $\alpha$  como el RE- $\beta$  estarían involucrados en los efectos “feedback” negativos de los estrógenos <sup>(61,75)</sup> ha propuesto diferentes investigadores que los estrógenos están ejerciendo sus efectos sobre la neurona GnRH por medio de mecanismos transinápticos indirectos, dependientes de las células involucradas de los RE- $\alpha$ .

En el POA de ratón hembra adulto, el 45% de las neuronas identificadas como GnRHérgicas expresan el ARNm para el RE- $\alpha$  y el 11% expresa el del RE- $\beta$ ; algunas otras co-expresan el ARNm para ambos receptores.

Esta proporción de neuronas que expresan uno u otro receptor cambia durante el ciclo estral: el RE- $\alpha$  se expresa en el 46% de las neuronas GnRHérgicas en el día del diestro-2, en el proestro son el 18% y el 75% en el estro; para el RE- $\beta$ , los porcentajes respectivos son 6%, 0% y 19% <sup>(77)</sup>. En POA, el 54% de las neuronas de ratones en diestro-2

expresan RE- $\alpha$ , el 22% en proestro y el 25% en estro; para el caso del RE- $\beta$ , los porcentajes respectivos son 12%, 0% y 17%; hay que aclarar que ninguna de estas neuronas de POA medial expresan el ARNm para GnRH<sup>(77)</sup>.

### **EFFECTOS FUNCIONALES ASIMÉTRICOS DEL HIPOTÁLAMO SOBRE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y LAS FUNCIONES DEL OVARIO**

Varios autores han mostrado que la regulación neuroendocrina que ejerce el hipotálamo, sobre la función de los ovarios, es asimétrica<sup>(18, 78, 80, 81,82, 83, 84,85,86,87,88, 89)</sup>.

Además el área POA-AHA responde de manera asimétrica a las hormonas esteroides, ya que el implante de estradiol en el lado derecho del POA o del núcleo ventromedial, de ratas hembras de cinco días provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta (estas hembras prefieren sexualmente a otras hembras). En cambio, cuando el estradiol se implanta en las zonas hipotalámicas del lado izquierdo ocurre defeminización (los animales no tienen ciclos estrales)<sup>(89)</sup>.

Asimismo, el lado derecho del AHA parece jugar un papel preponderante en la regulación del proceso de hipertrofia compensadora del ovario, ya que en la rata con ovariectomía unilateral, la lesión por radio frecuencia del lado derecho de esa área, previene la hipertrofia compensadora del ovario remanente, en tanto que la lesión del lado izquierdo no la modifica<sup>(84)</sup>. La lesión unilateral de esta misma área del hipotálamo con ácido kaínico, bloquea la hipertrofia compensadora sólo si la lesión y la ovariectomía unilateral se hacen del mismo lado<sup>(84)</sup>.

En la rata prepúber, el proceso de hipertrofia compensadora del ovario parece estar controlado por el hipotálamo izquierdo, ya que bloquea la hipertrofia compensadora del ovario, en tanto que la deaferentación del hipotálamo derecho no modifica este proceso<sup>(88)</sup>.

Cada lado de POA-AHA regula la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario ipsilateral, la cual es asimétrica respecto al ovario contralateral; mientras que el hipotálamo medio (que comprende a los núcleos arcuato y ventro-medial) regulan la ovulación de uno u otro ovario de manera estimulante, y de manera asimétrica a la hipertrofia compensadora del ovario<sup>(88)</sup>

Los receptores muscarínicos de POA-AHA regulan en forma asimétrica la secreción de la GnRH y la ovulación, asimetría que cambia durante el ciclo estral<sup>(81)</sup>.

---

---

### **METIL-PIPIRIDINO-PIRAZOL (MPP)**

Los estudios realizados por medio de los moduladores selectivos a los receptores a estrógeno han permitido conocer las funciones de los estrógenos en sus órganos blanco. Estos moduladores tienen actividad agonista o antagonista específica al RE- $\alpha$  o al RE- $\beta$  <sup>(90)</sup>.

El metil-pipiridino-pirazol (MPP) contiene un grupo pirazol, el cual tienen una alta afinidad para los RE, aunque se une con mayor afinidad al RE- $\alpha$  que al RE- $\beta$  (Fig 14) Por ello y a falta de antagonistas selectivos para el RE- $\alpha$ , desarrollaron compuestos que antagonizan con este receptor y no con el RE- $\beta$ , al adicionar una cadena lateral a ligandos pirazólicos [agonistas selectivos para el RE- $\alpha$  (BSC- pirazoles)], que substituye a la típica encontrada en agentes antiestrógenos como el tamoxifen y el raloxifen. Entre estos BSC-pirazoles, el más selectivo para el RE- $\alpha$  es el (MPP).

El MPP incrementa el porcentaje de células del endometrio de la mujer, cuando se compara con los efectos del estradiol. En ratones el MPP aumenta el peso del útero y la proliferación del endometrio <sup>(91)</sup>. La inyección subcutánea de MPP por 6 días consecutivos provoca disminución de la concentración de LH en la hipófisis y en el suero <sup>(92)</sup>. Con base en estos resultados se ha sugerido que en la rata, la acción de los estrógenos sobre la secreción de LH es ejercida por el RE- $\alpha$ . En ratas adultas cíclicas, la inyección subcutánea de MPP en la mañana del diestro-1 provocó aumento del número de ovocitos liberados y disminución del peso de los ovarios, lo que se acompañó de un menor número de folículos, reflejo de la disminución del número de folículos pequeños sanos y aumento de los medianos en los animales sacrificados a las 9:00 y 17:00 horas del proestro <sup>(93)</sup>.

## Estructura (MPP)

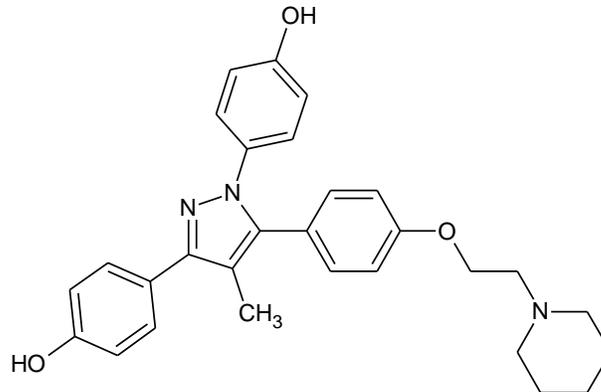


Fig. 14 Metil-piperidino-pirazol (MPP)

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

(Analogos of methyl-piperidinopyrazole (MPP): Antiestrogens with estrogen receptor  $\alpha$  selective activity)

Peso molecular de 469.574 g/mol

Densidad de 1.22 g/mL.

El MPP a dosis de 25 a 150 $\mu$ g aumenta el peso húmedo del útero, pero no de la forma en que lo hace el 17 $\beta$ -estradiol (Mol. Reprod. Dev.), ya que éste provoca efectos pleiotrópicos dentro del útero, estos efectos incluyen un aumento en el peso húmedo del útero y diferenciación en el epitelio luminal y glandular, simulación de transcripción y translación de una variedad de productos genéticos que regulan la progresión del ciclo celular, hiperemia, edema del estroma e inhibición del agua, angiogénesis, incorporación de células inmunes y morfología endometrial <sup>(94)</sup>.

**TWEEN**

Estructura

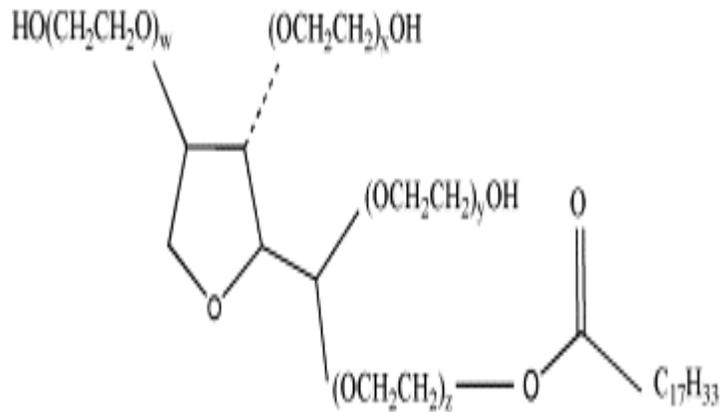


Fig.15 Estructura del tween 20 en donde  $w + x + y + z = 20$ . (Marc D. Wengera, Amy M. Bowmana, Marc V. Thorsteinssona, Kristine K. Littlea, Leslie Wanga, Jinglin Zhongb, Ann L. Lee<sub>c</sub> and Peter DePhillips. Department of Biologics Development and Engineering, Merck Research Laboratories, Merck & Co., Inc., WP42A-20, West Point, PA 19486, USA. bVaccine Biometric Research, Merck & Co., Inc., West Point, PA 19486, USA)<sup>(95)</sup>.

Nombre común: Tween 20

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

Formula condensada: C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>

Masa Molecular: 1227.54 g/mol

Densidad: 1.1 g/mL

Punto de ebullición: &gt;100°C

### **ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA**

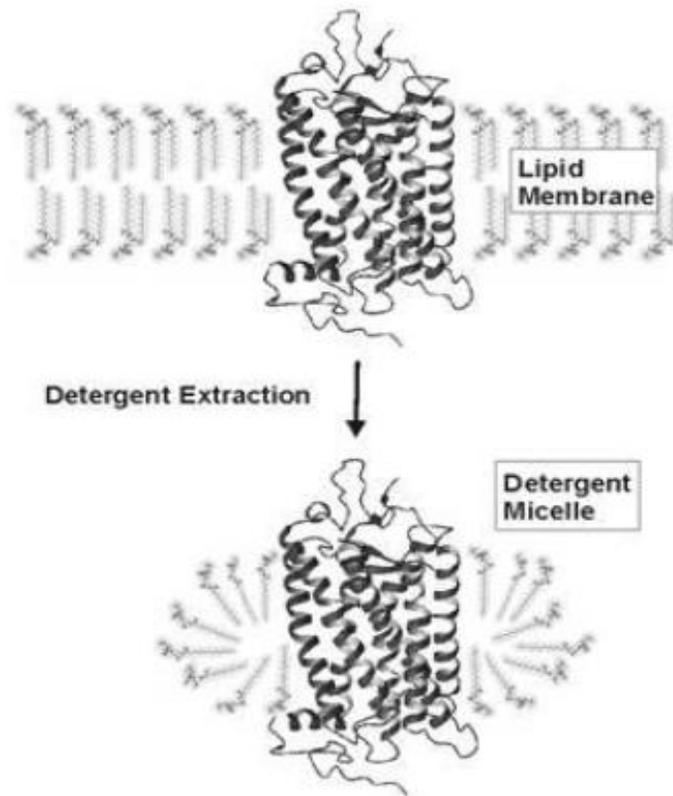
El Tween 20 (comercialmente conocido) es un surfactante no iónico que se utiliza principalmente en la fabricación de cosméticos, productos del cuidado de piel, en alimentos y productos farmacéuticos. El tween se compone de un grupo central sorbitan con cuatro cadenas de óxido de polioxietileno, cuando estas cadenas se esterifican con un ácido oleoso (Fig. 15) y con ácido láurico pueden obtenerse 1500 estructuras. Ya que si las cadenas de polioxietileno son más cortas se forman agregados muy grandes, lo que hace que sea una solución muy viscosa.

En el desarrollo biofarmacéutico, el tween se puede usar durante la purificación y la formulación para disminuir la adsorción de superficies, mantiene la concentración a una distancia definida durante un proceso de purificación, tal como un paso de ultrafiltración o cromatografía.

La dosis oral reportada por diferentes investigadores de tween 20 para ratas adultas es de  $> 30\text{ml/Kg}$  y la intravenosa de  $0.7\text{ml/Kg}$ . Por su baja toxicidad, el tween 20 se ha considerado bastante seguro para la preparación de alimentos y productos farmacéuticos.<sup>(96)</sup> (Fig.15)

Los detergentes no iónicos también se utilizan para la solubilización de membranas y como un medio solvente para proteínas de membrana (Fig. 16). Generalmente el detergente óptimo para ciertas proteínas de membrana se tiene que encontrar empíricamente y puede depender del tipo de experimento que uno quiere hacer. Los detergentes no iónicos no tienen 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 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.



*Fig. 16 Solubilización de proteínas por detergentes no iónicos. (Properties of Detergents 1 by Ari Helenius, Darrell R. Mccaslin, Erik Fries, and Charles Tanford)<sup>(97,98)</sup>.*

El tween 20 por ser un detergente no iónico es usado para estudiar la estructura de las subunidades de proteínas de membrana y las interacciones de proteínas de membrana con estructuras externas, ya que no desnaturalizan a las proteínas y no altera la carga de las proteínas a las que se une (Fig. 17).

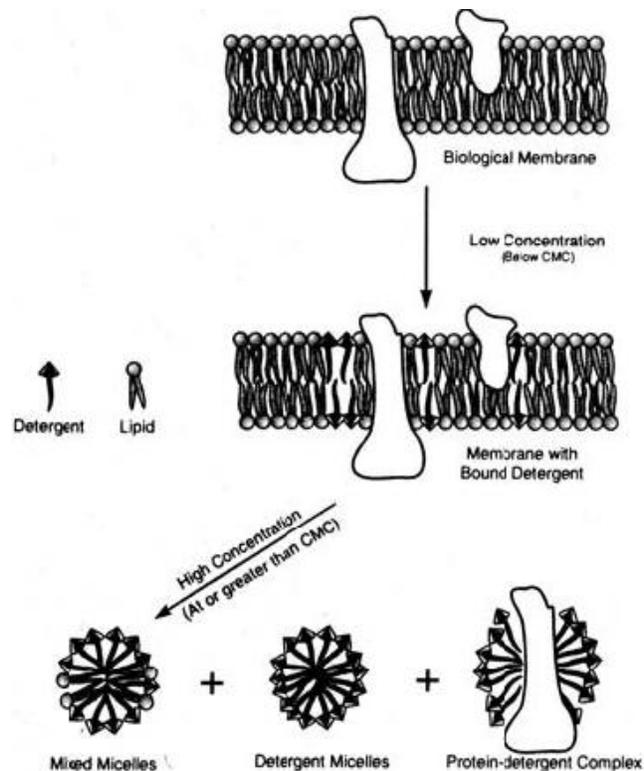


Fig.17 (Properties of Detergents 1 by Ari Helenius, Darrell R. Mccaslin, Erik Fries, and Charles Tanford)<sup>(97, 98).</sup>

Por las propiedades mencionadas el tween 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 pruebas de inmunoensayos como el de Western Blot y ELISA. Se puede disolver en Tris-Buffer Salino o buffer de Fosfato salino en diluciones de 0.05% a 0.5% de v/v<sup>(98).</sup>

En la rata, el  $17\beta$ -estradiol es una de las señales que regulan la función del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Existen dos tipos de receptores a estrógenos: el RE- $\alpha$  y el RE- $\beta$ . En el área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) se han identificado ambos RE <sup>(72)</sup>; sin embargo sólo el RE- $\beta$  ha sido identificado en las neuronas GnRHérgicas y se ha sugerido que tanto el RE- $\alpha$  como el RE- $\beta$  están involucrados en los 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- $\alpha$  o RE- $\beta$  son desactivados, se ha sugerido que el RE- $\alpha$  pero no el RE- $\beta$  es necesario y suficiente para que se manifieste el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH. Y en consecuencia estimular la secreción preovulatoria de LH <sup>(102)</sup>.

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- $\alpha$  y el RE- $\beta$  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  $17\beta$ -estradiol; así que se trabaja con un animal anti-fisiológico.

Por otra parte, se ha mostrado que el máximo número de células inmunoreactivas al RE- $\alpha$  en POA-AHA se observa a las 9:00 y 17:00 horas de cada día del ciclo estral <sup>(103)</sup>.

Por lo tanto, en este proyecto de tesis se estudiarán los efectos del bloqueo de los RE- $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA sobre la secreción de gonadotropinas, progesterona, estradiol, FSH, LH y la ovulación.

Dado que por medio del uso de ratones “knockout”, en los que el *RE- $\alpha$*  o *RE- $\beta$*  son desactivados, se ha sugerido que el *RE- $\alpha$*  pero no el *RE- $\beta$*  es necesario y suficiente para que se manifieste el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH, y en consecuencia la secreción preovulatoria de LH, entonces el bloqueo de los RE- $\alpha$  de POA-AHA bloqueará la ovulación y la secreción preovulatoria de las gonadotropinas.

**OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los efectos del bloqueo de los RE- $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA sobre la ovulación y la secreción preovulatoria de la FSH, LH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

Durante el ciclo estral, evaluar los efectos del bloqueo de los RE- $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA sobre la ovulación.

En la fase de proestro y estro, evaluar los efectos del bloqueo de los RE- $\alpha$  del lado izquierdo POA-AHA sobre la concentración preovulatoria de LH, FSH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>.

Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes de 3-4 meses de edad de la cepa CIIZ-V, con un peso corporal de entre 195 y 225g, mantenidas en grupos de siete animales por jaula, en períodos controlados de luz-oscuridad (luces encendidas de 5:00-19:00 horas) y con libre acceso al agua y al alimento.

Se les evaluó el ciclo estral por la toma diaria del frotis vaginal y sólo se utilizaron aquellos animales que presenten dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración. La laminilla con los frotis vaginales fueron teñidos con hematoxilina y eosina, mediante la siguiente metodología: hematoxilina durante ocho minutos, después se colocaron en agua de la llave durante 10 minutos e inmediatamente se tiñeron con eosina por espacio de 5 minutos, finalmente se eliminó el exceso de eosina con alcohol al 70%.

Entre las 8:30 y 9:30 horas del día del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro, grupos de 9 a 10 animales fueron anestesiados con 25mg/kg peso de pentobarbital sódico por vía intra-peritoneal. Una vez anestesiados se colocaron en un aparato estereotáxico para ubicar la zona de estudio, con base en las coordenadas del Atlas del Cerebro de la Rata de König y Klippel <sup>(104)</sup>. Una vez en la zona de estudio, las ratas fueron micro-inyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con 25µg de MPP (Metil-piperidino-pirazol, antagonista al RE-α, Sigma-Aldrich, México) disuelto en 1µl de una solución de 100µl de tween 20 en 10 mL de agua destilada y estéril (vehículo), durante un minuto. Como grupos control se utilizarán animales inyectados con vehículo (un µl durante un minuto). Con la finalidad de analizar los efectos del vehículo, se utilizaron ratas cíclicas, sin tratamiento, sacrificadas en el día del estro vaginal (día de la ovulación).

---

---

Todos los animales fueron sacrificados por sobre dosis de éter, entre las 10:00 y 11:00 h del estro esperado, 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 ovularon, como resultado del bloqueo de los RE $\alpha$ , otros grupos de ratas micro-inyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA en la mañana del proestro o estro, fueron sacrificadas a las 11:00 y 17:00 horas del proestro.

Los animales así tratados fueron sacrificados por decapitación; se recogió la sangre del tronco, la que se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero, el cual se almacenó a -4°C hasta la cuantificación de hormonas esteroides y gonadotropinas por radio-inmuno-análisis (RIA).

Cuantificación de hormonas.- La cuantificación de las concentraciones plasmáticas de estradiol (E<sub>2</sub>) y progesterona (P<sub>4</sub>) se realizaron 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 (<sup>125</sup>I-Progesterona ó <sup>125</sup>I-Estradiol) y calibradores para la realización de la curva patrón ( P<sub>4</sub>: 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.0, 20.0 y 40.0 ng/ml; E<sub>2</sub>: 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  $\mu$ l de suero problema más 1000  $\mu$ l de la hormona marcada (<sup>125</sup>I-P ó <sup>125</sup>I-E<sub>2</sub>). 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<sub>2</sub> se expresaron en pg/ml y los de P<sub>4</sub> en ng/ml.

La cuantificación de LH y FSH se realizó por RIA de doble anticuerpo con reactivos de The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) DISTRIBUÍDOS POR EL Dr. A.F. Pavlow.

Para la cuantificación de LH se utilizó un primer anticuerpo del lote NIDDK-anti-rLH-S-11, a una dilución inicial de 1:25200. La hormona marcada con <sup>125</sup>I del lote NIDDK-rLH-1-10. Los resultados se expresaron en términos del estándar de referencia NIDDK-rLH-RP-3. El coeficiente de variación intra-análisis fue de 7.4, e inter-análisis de 12.1, con una sensibilidad de 0.1 ng/ml.

Para la cuantificación de FSH se utilizó un primer anticuerpo del lote NIDDK-anti-rFSH-S-11, a una dilución inicial de 1:62500. La hormona marcada con <sup>125</sup>I del lote NIDDK-rFSH-1-9. Los resultados se expresaron en términos del estándar de referencia NIDDK-rFSH-RP-2. El coeficiente de variación intra-análisis fue de 9.2, e inter-análisis de 14.6, con una sensibilidad de 0.1 ng/ml.

A 100 µL de suero se le adicionaron 100 µl de hormona marcada con <sup>125</sup>I y 100µl 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 °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.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del número de animales que ovularon en el día del estro esperado se analizaron por la prueba de Fisher, los del número de ovocitos liberados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" Mann-Whitney. Los datos de las concentraciones séricas de las hormonas esteroides y proteicas fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de "t" de Student. En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue  $\leq 0.05$ .

**EFFECTOS DEL BLOQUEO DEL RE- $\alpha$  DE LADO IZQUIERDO DURANTE EL CICLO ESTRAL EVALUADOS AL ESTRO ESPERADO**

*Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado*

Con respecto al grupo de ratas intactas, la micro-inyección de tween 20 del lado izquierdo de POA-AHA, en los días del estro o diestro-1 provocó disminución del porcentaje de animales que ovularon espontáneamente en el día del estro esperado. El bloqueo de los RE- $\alpha$  alteró la ovulación de manera diferente durante el ciclo estral: En la fase de estro, el MPP indujo la ovulación en todos los animales inyectados, en los días de diestro no modificó el porcentaje de animales que ovularon, mientras que en proestro lo disminuyó, cuando se comparan estos resultados con los observados en los animales inyectados con tween 20 (Tabla 1).

Tratamiento	Estro	Diestro - 1	Diestro - 2	Proestro
Intactas	100%			
Tween	45%*	16%*	100%	100%
MPP	100%**	0%	77%	14%**

\* $p < 0.05$  vs. intactas; \*\* $p < 0.05$  vs. Tween20 (Prueba de  $\chi^2$ )

*Tabla1. Efectos de la inyección unilateral de Tween 20 o de MPP en POA – AHA durante el ciclo estral, sobre el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado.*

*Número total de ovocitos liberados*

Ni la micro-inyección de tween 20 ni de MPP, durante el ciclo estral; modificó el número total de ovocitos liberados en comparación con el grupo de animales intactos (*Tabla 2*).

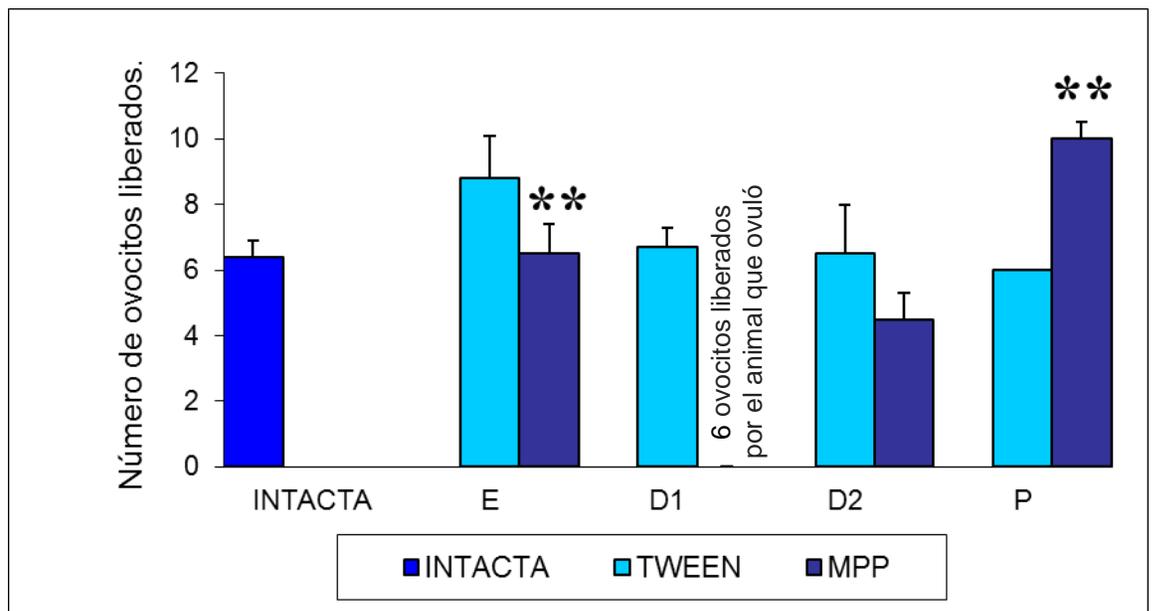
	Intactas	Estro	Diestro - 1	Diestro - 2	Proestro
Intactas	13.4 ± 0.5				
Tween		14.1 ± 0.8	12.7 ± 0.5	13.3 ± 1.3	9.8 ± 1.8
MPP		11.3 ± 1.3	0	14.4 ± 0.8	12 ovocitos liberados por el animal que ovuló

**(no significativa, Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de “U” de Mann-Whitney)**

*Tabla 2. Efectos de la inyección unilateral de Tween 20 o MPP en el lado izquierdo de POA-AHA durante el ciclo estral, sobre el número de ovocitos liberados por animal ovulante.*

*Número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo*

La micro-inyección de tween 20 durante el ciclo estral no modificó el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo. En cambio, cuando se bloquearon los RE- $\alpha$  en el día del estro, el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo disminuyó con respecto al grupo tratado con tween 20. Por el contrario, en la fase de proestro la inyección de MPP incrementó el número de ovocitos liberados por este ovario (Gráfica 1).

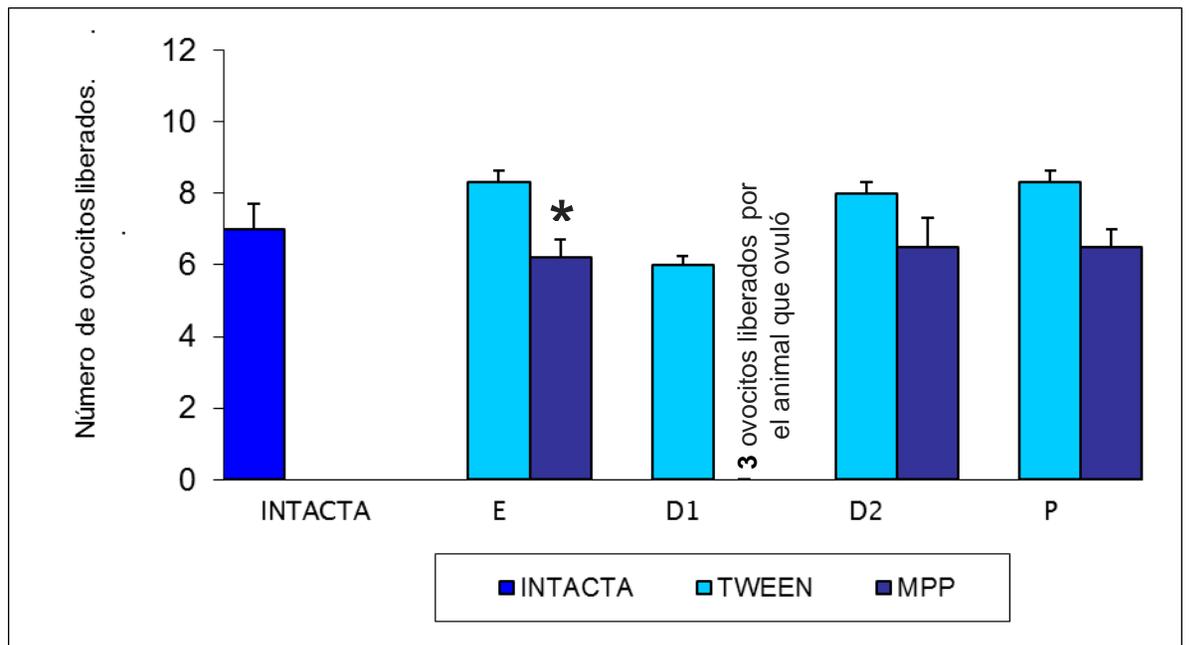


**\*\***  $p < 0.05$  vs. tween (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de "U" de Mann-  
Withney)

*Gráfica 1. Media + e.e.m. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo en animales intactos o inyectados con Tween 20 o con MPP, durante el ciclo estral.*

*Número de ovocitos liberados por el ovario derecho*

El día diestro-1, la inyección de tween 20 disminuyó el número de ovocitos liberados en el ovario derecho en comparación con el grupo de animales intactos. La inyección de MPP no modificó el número ovocitos liberados por el ovario del lado derecho, cuando se inyectó durante el ciclo estral (Gráfica 2).

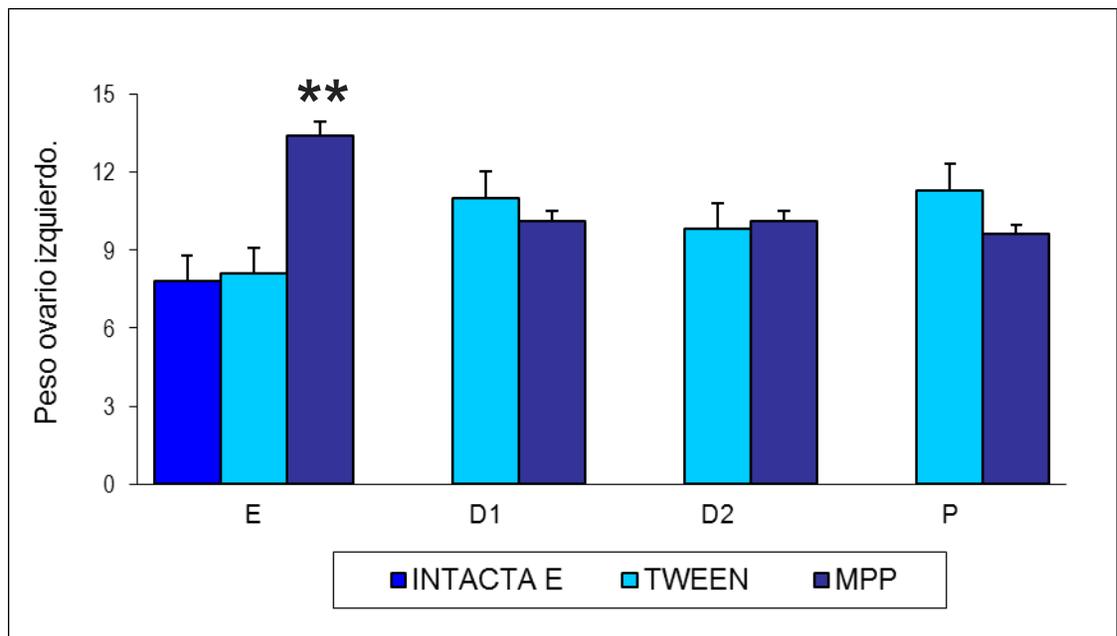


**\*  $p < 0.05$  vs. intactas (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de "U" de Mann-  
Withney)**

*Gráfica 2. Media + e.e.m. del número de ovocitos liberados en el ovario derecho en animales intactos o inyectados con Tween 20 o con MPP en el lado izquierdo de POA-AHA, durante el ciclo estral y sacrificados en el día del estro esperado.*

*Peso ovario izquierdo*

En los animales inyectados con tween 20, el peso de este ovario no se modificó con respecto al grupo de ratas intactas. Sólo en el día del estro, el bloqueo de los RE- $\alpha$  provocó aumento del peso del ovario izquierdo respecto al grupo inyectado con tween 20 (Gráfica 3 y 4).

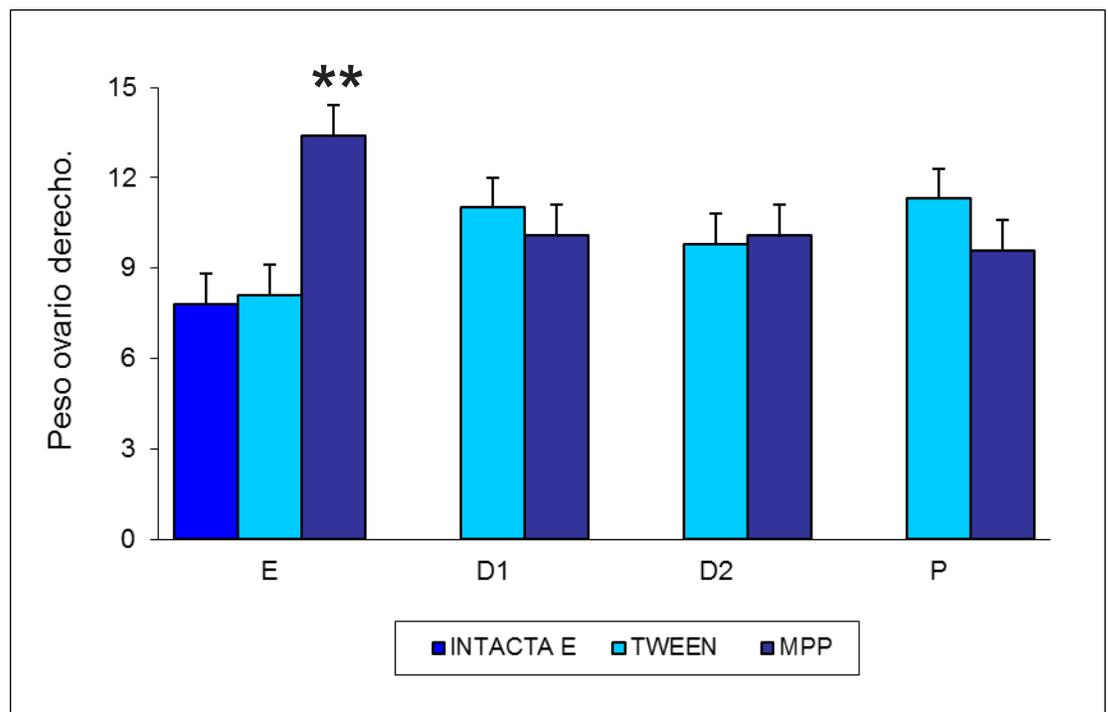


**\*\***  $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA, seguida de la Prueba de Tukey)

*Gráfica 3. Peso del ovario izquierdo (mg/100 g peso) de animales intactos o inyectados con Tween 20 o con MPP en el lado izquierdo de POA-AHA, durante el ciclo estral.*

*Peso del ovario derecho*

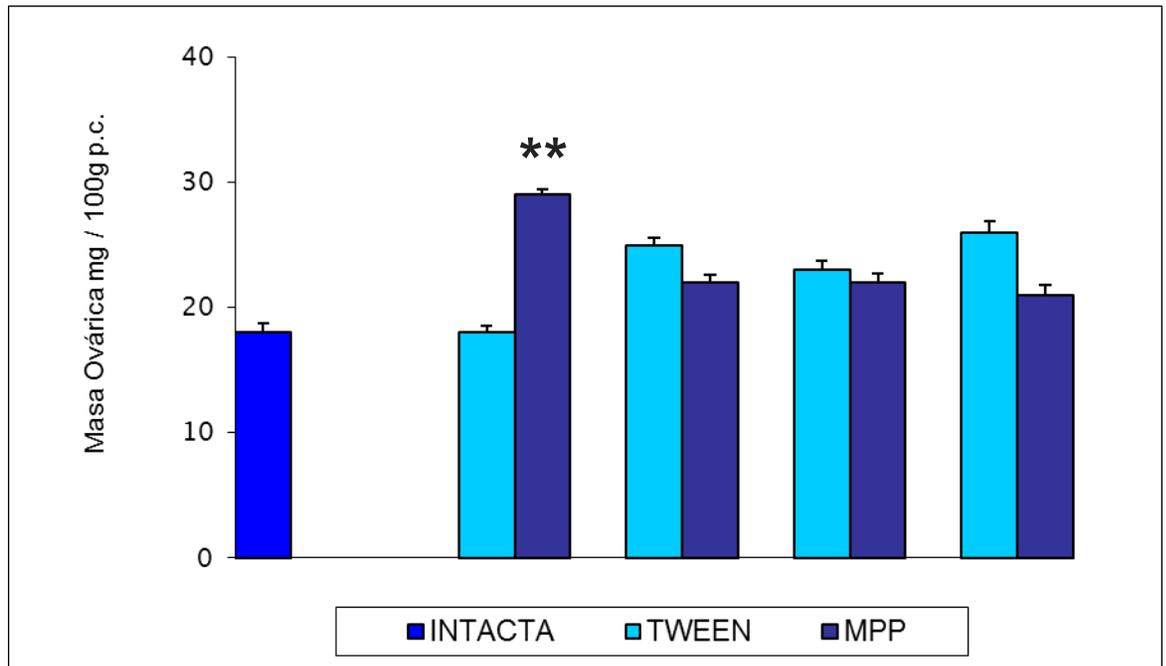
En el día del estro, la micro-inyección de MPP en el lado izquierdo de POA-AHA provocó efectos semejantes sobre el peso del ovario derecho a los que se observaron en el izquierdo, es decir, el MPP aumentó el peso de este ovario (Gráfica 4), lo que se reflejó en el aumento de la masa ovárica (Gráfica 5).



**\*\***  $p < 0.05$  vs. Tween (ANDEVA, seguida de la Prueba de Tukey)

Gráfica 4. Peso del ovario derecho (mg/100 g peso) de animales intactos o inyectados con Tween 20 o con MPP en el lado izquierdo de POA-AHA, durante el ciclo estral.

*Peso masa ovárica total*

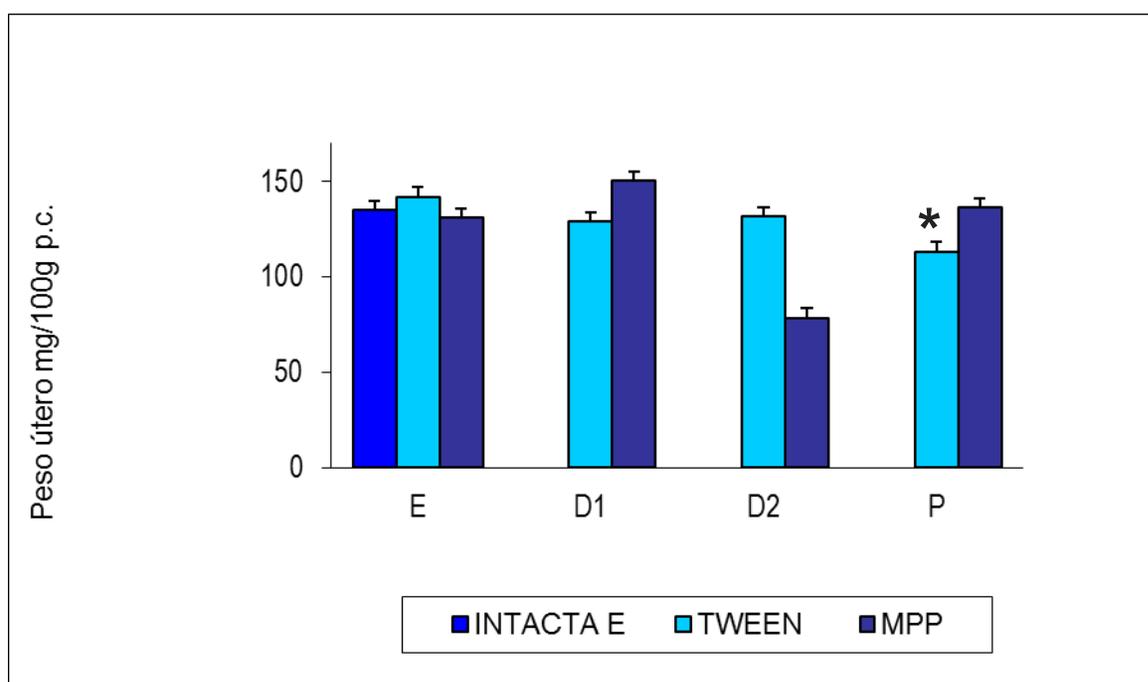


**\*\***  $p < 0.05$  vs. Tween (ANDEVA, seguida de la Prueba de Tukey)

*Gráfica 5. Masa ovárica (mg/100 g peso) de animales intactos o inyectados con Tween 20 o con MPP en el lado izquierdo de POA-AHA, durante el ciclo estral.*

*Peso del útero*

La micro-inyección de tween 20 no modificó el peso del útero. Únicamente en la fase de diestro-2, la inyección de MPP provocó disminución del peso del útero con respecto al grupo de animales tratados con el tween (Gráfica 6).



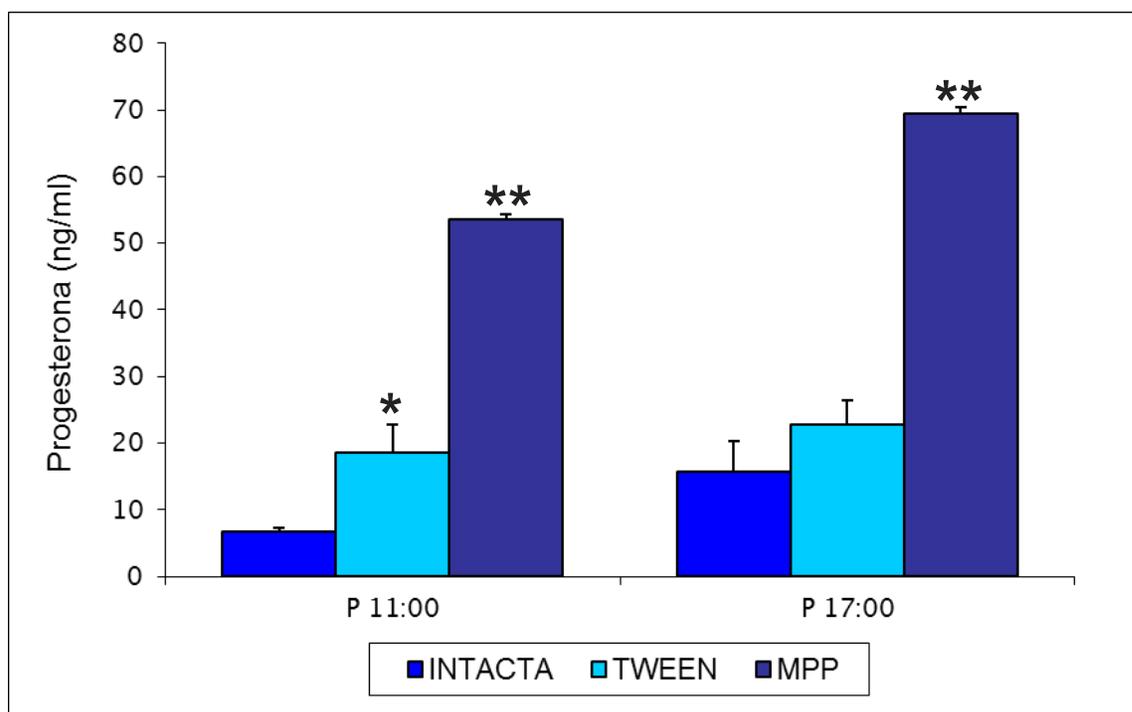
\*  $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA seguida de la Prueba de Tuckey)

Gráfica 6. Peso del útero (mg/100 g peso) de animales intactos o inyectados con Tween 20 o con MPP en el lado izquierdo de POA-AHA, durante el ciclo estral.

CONCENTRACIÓN SÉRICA DE HORMONAS EN EL DÍA DEL PROESTRO  
RATAS MICRO-INYECTADAS EN LA FASE DE PROESTRO

*Progesterona*

Dos horas después de la micro-inyección de tween 20, es decir, a las 11:00 h del proestro, la concentración de progesterona aumentó con respecto a los animales intactos. La inyección del MPP incrementó la concentración de la hormona en el suero con respecto al grupo de animales tratados con tween 20. En la tarde de este día (17:00 h) la concentración de progesterona únicamente aumentó en las ratas con bloqueo de los RE- $\alpha$  (Gráfica 7).

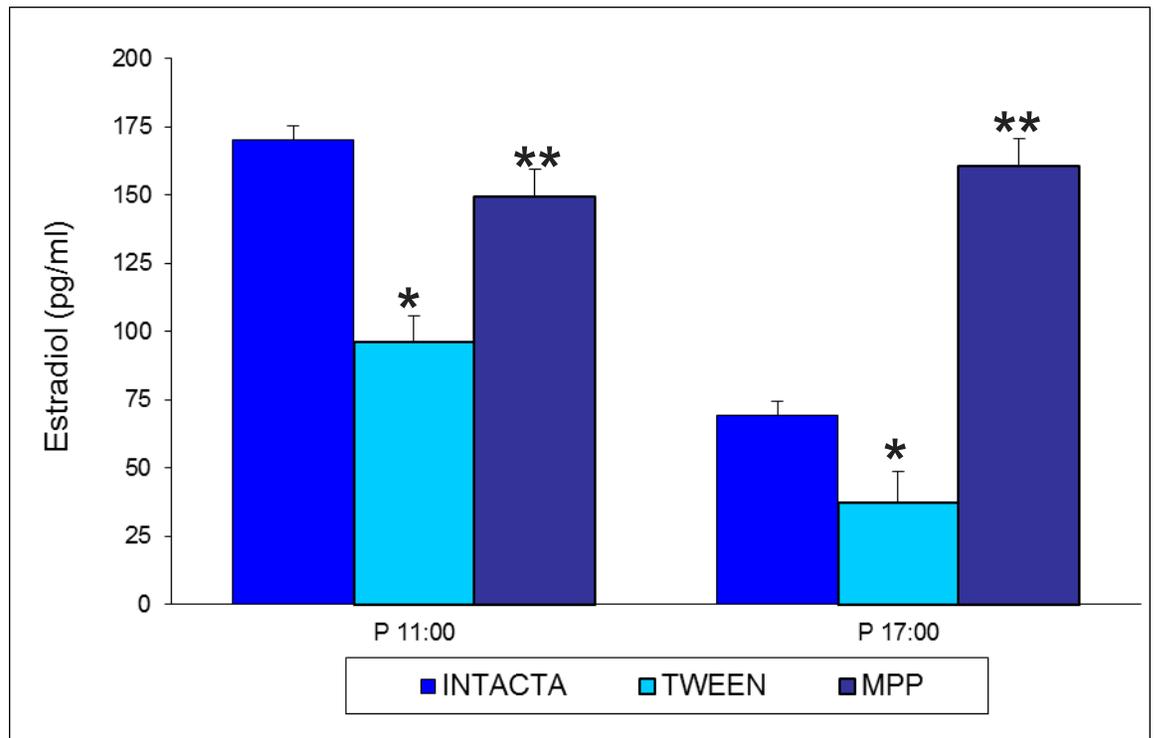


\*  $p < 0.05$  vs. intacta; \*\*  $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA seguida de la Prueba de Tuckey)

Gráfica 7. Concentración de Progesterona (ng/ml de suero) a las 11:00 y 17:00 horas del proestro esperado de ratas intactas o micro-inyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con tween 20 o MPP en la mañana del mismo día del ciclo estral.

*Estradiol*

La micro-inyección de tween 20 en la mañana del proestro, provocó disminución de la concentración de estradiol a las 11:00 y 17:00 horas del mismo día. El bloqueo de los RE- $\alpha$  incrementó la concentración de la hormona a las 11:00 y 17.00, con respecto al grupo tratado con tween 20 (Gráfica 8).

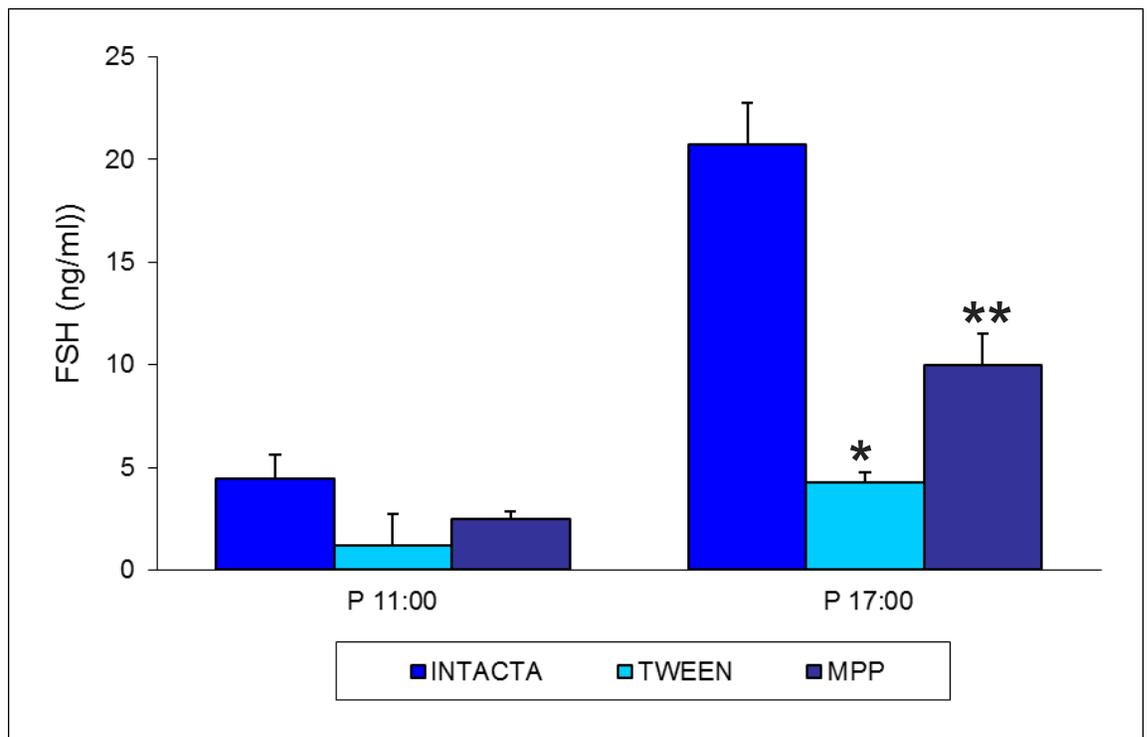


\*  $p < 0.05$  vs. intactas; \*\*  $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA seguida de la Prueba de Tukey).

Gráfica 8. Concentración de estradiol (pg/ml de suero) a las 11:00 y 17:00 horas del proestro esperado de ratas intactas o microinyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con tween o MPP en la mañana del mismo día del ciclo estral.

**FSH**

Ni la micro-inyección del vehículo ni de MPP modificaron la concentración de la FSH sérica, cuando se midió a las 11:00 horas de este mismo día del ciclo. A las 17:00 horas, el tween disminuyó la concentración de la FSH con respecto a los animales intactos, mientras que el bloqueo de los RE- $\alpha$  aumentó la concentración de la hormona con respecto a los animales inyectados con el vehículo (Gráfica 9).



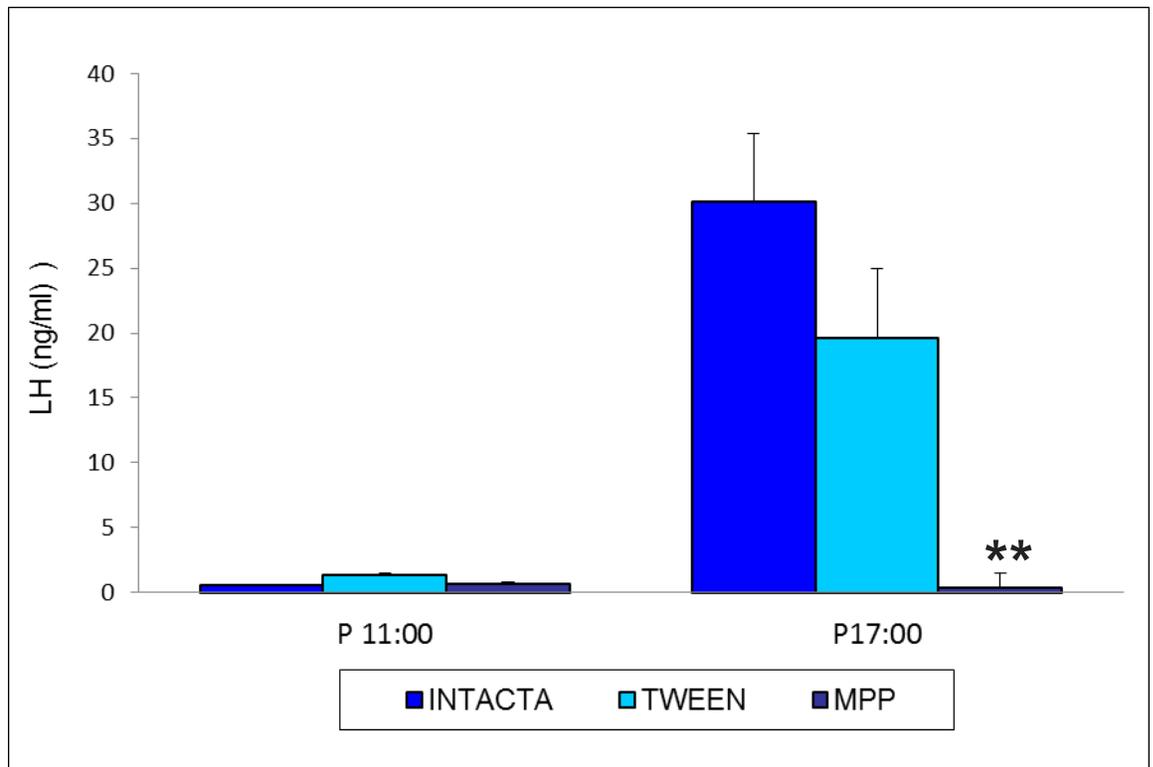
\*  $p < 0.05$  vs. intactas; \*\*  $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA seguida de la Prueba

de Tukey)

Gráfica 9. Concentración de FSH (ng/ml de suero) a las 11:00 y 17:00 horas del proestro esperado de ratas intacta o microinyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con tween 20 o MPP en la mañana del mismo día del ciclo estral.

*LH*

A las 11:00 h del proestro, la concentración de LH no fue modificada en los animales micro-inyectados con tween 20 o con MPP. En la tarde del proestro, los animales inyectados con tween 20 no modificó la concentración de la LH, mientras que el bloqueo de los RE- $\alpha$  la disminuyó (Gráfica 10).



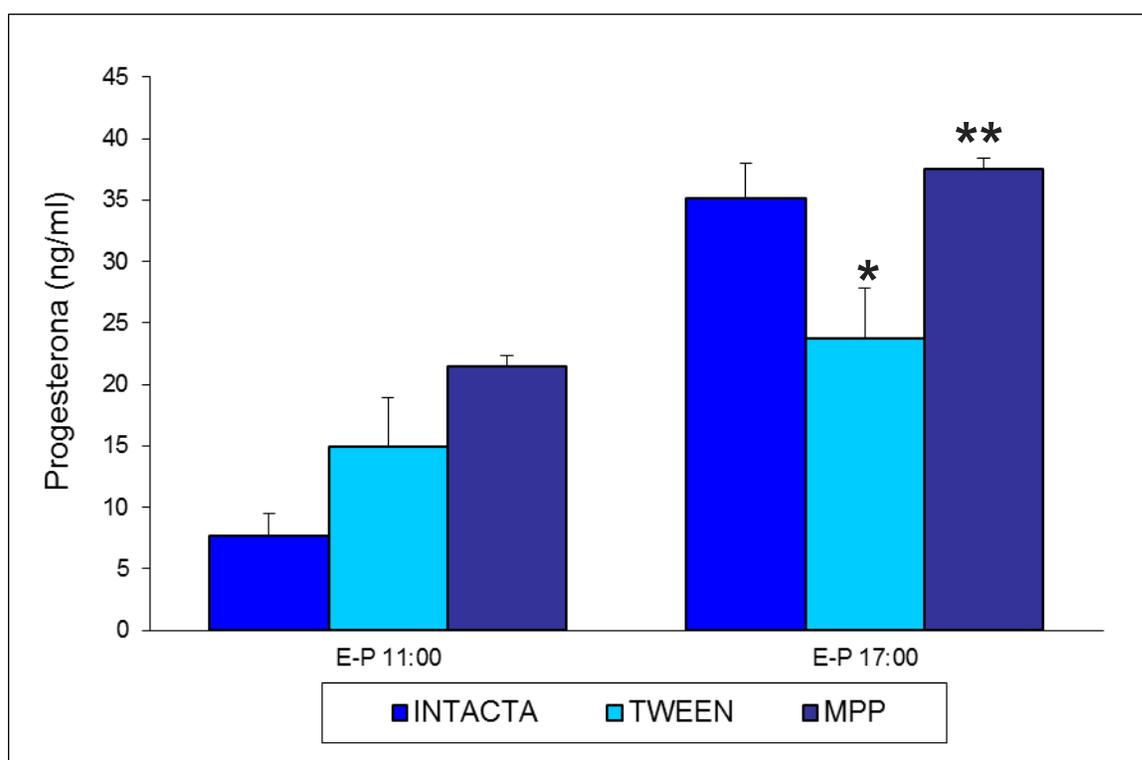
**\*\***  $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA seguida de la Prueba de Tukey)

Gráfica 10. Concentración de LH (ng/ml de suero) a las 11:00 y 17:00 horas del proestro esperado de ratas intactas o microinyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con tween o MPP en la mañana del mismo día del ciclo estral.

RATAS MICRO-INYECTADAS EN LA FASE DE ESTRO

**Progesterona**

La micro-inyección de tween 20 o de MPP en el día del estro, no modificó la concentración de progesterona a las 11:00 h del proestro esperado, con respecto a los animales intactos. Cuando se midió la concentración de progesterona a las 17:00 horas del proestro, la inyección de tween 20 disminuyó la concentración de la hormona, mientras que el MPP la aumentó (Gráfica 11).

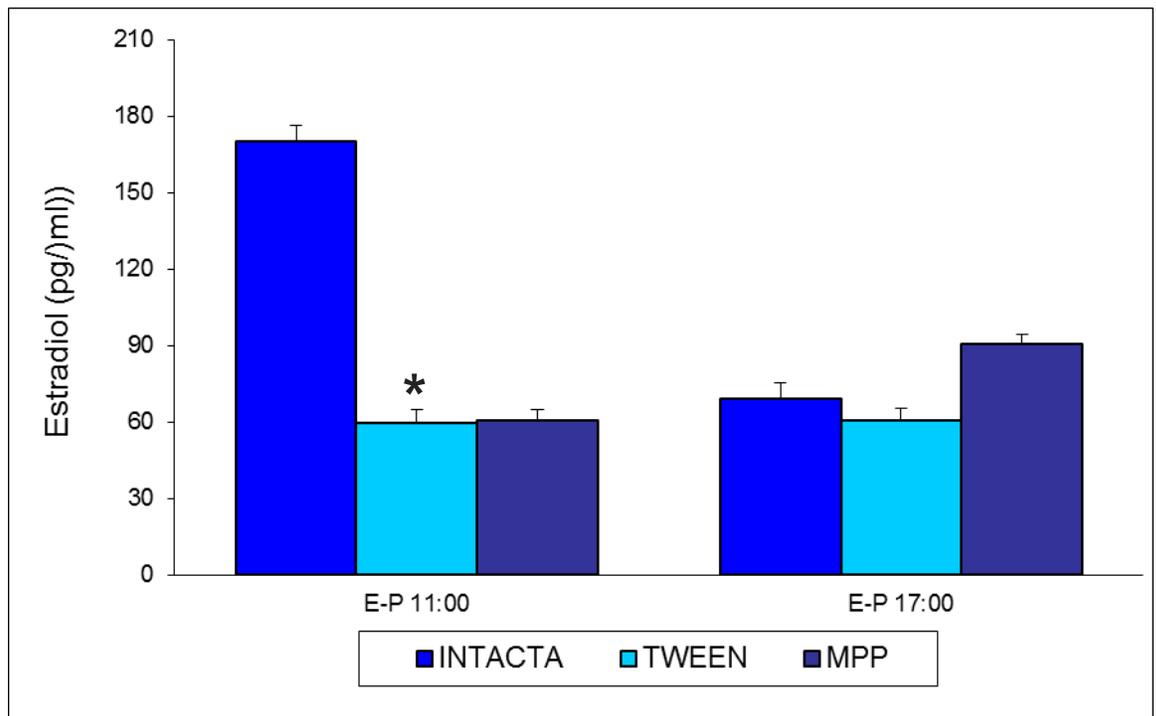


**\*  $p < 0.05$  vs. intactas; \*\*  $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA seguida de la Prueba de Tukey)**

Gráfica 11. Concentración de progesterona (ng/ml de suero) a las 11:00 y 17:00 horas del proestro esperado de ratas intactas o micro-inyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con tween 20 o MPP en la mañana del estro.

*Estradiol*

En comparación con el grupo de ratas intactas, la micro- inyección de tween 20 disminuyó la concentración de estradiol a las 11:00 h del proestro esperado, mientras que el bloqueo de los RE- $\alpha$  no modificó los efectos del tween 20. Cuando se evaluaron los efectos de la micro-inyección en la tarde del proestro, se observó que ni la inyección del tween 20, ni la de MPP modificaron la concentración de la hormona con respecto al grupo de animales intactos (Gráfica 12).

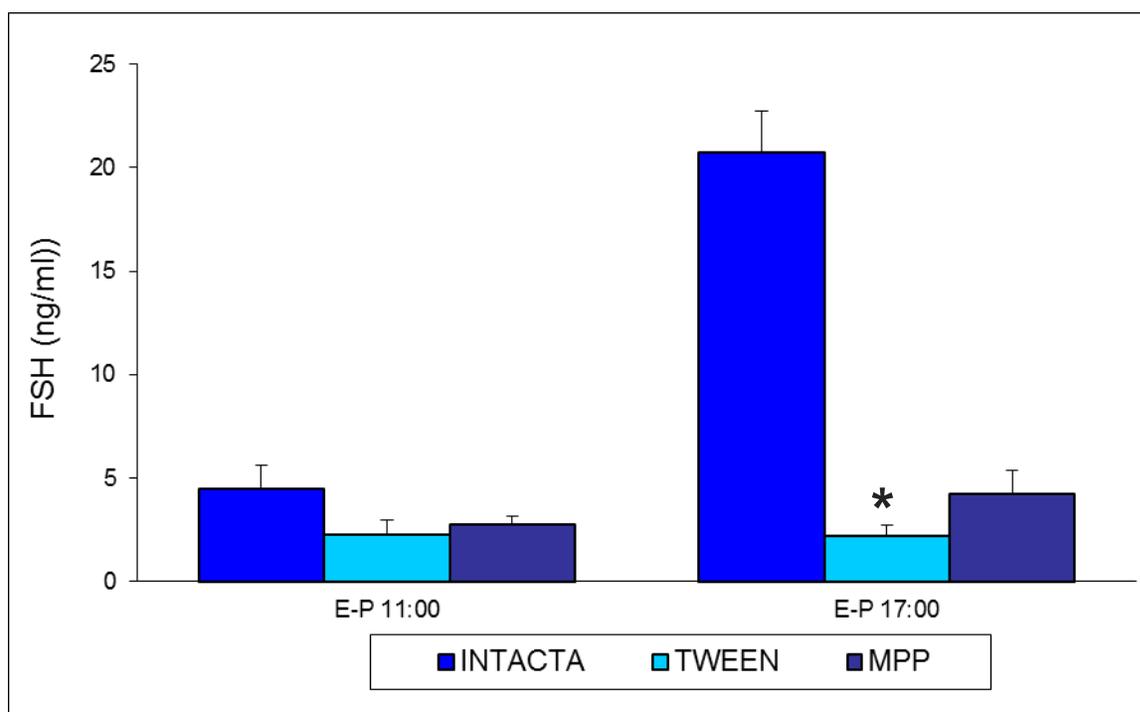


\*  $p < 0.05$  vs. intacta (ANDEVA seguida de la Prueba de Tukey)

Gráfica 12. Concentración de estradiol (pg/ml de suero) a las 11:00 y 17:00 horas del proestro esperado de ratas intactas o microinyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con tween 20 o MPP en la mañana del estro.

*FSH*

La micro-inyección del tween 20 o del MPP en la mañana del estro no provocó cambios en la concentración de FSH a las 11:00 h del día del proestro esperado. Sin embargo, en la tarde de este día, el tween 20 disminuyó la concentración de esta hormona con respecto a las ratas intactas, efecto que no fue modificado por la inyección del MPP (Gráfica 13).

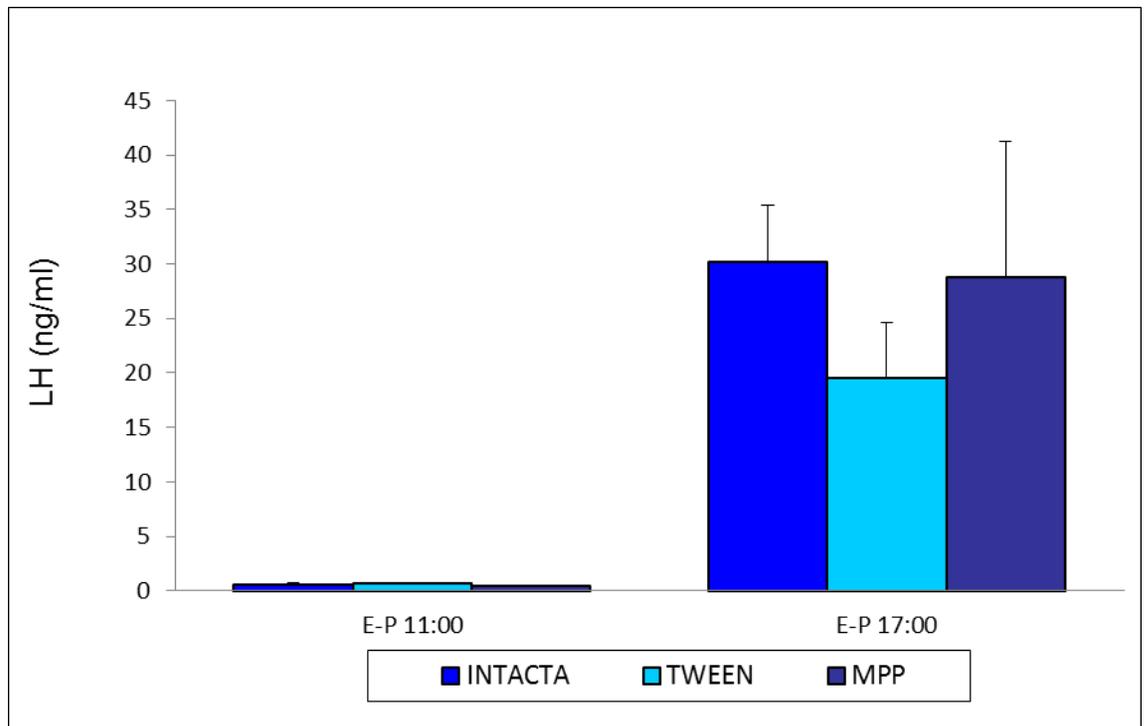


\* $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA seguida de la Prueba de Tuckey)

Gráfica 13. Concentración de FSH (ng/ml de suero) a las 11:00 y 17:00 horas del proestro esperado de ratas intactas o micro-inyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con tween 20 o MPP en la mañana del estro.

*LH*

La micro-inyección de tween 20 o de MPP en la mañana del estro no provocó cambios en la concentración de la LH, cuando se midió a las 11:00 o a las 17:00 horas del proestro esperado (Gráfica 14).



**\*\***  $p < 0.05$  vs. tween (ANDEVA seguida de la Prueba de Tukey)

Gráfica 14. Concentración de LH (ng/ml de suero) a las 11:00 y 17:00 horas del proestro esperado de ratas intactas o micro-inyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con tween 20 o MPP en la mañana del estro.

En la rata, la activación de los RE- $\alpha$  por la unión del E<sub>2</sub> en el lado izquierdo del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA), regula de manera diferente la ovulación durante el ciclo estral: en el día del estro los RE- $\alpha$  inhiben la ovulación, en los días de diestro no la alteran, mientras que en proestro la inducen.

Dado que la inyección de tween 20, el solvente del fármaco, en los días del estro y del diestro-1, bloqueó la ovulación, sugerimos que este efecto es el resultado de la alteración de la secreción de la GnRH. El tween 20 es un surfactante (detergente no iónico) que se utiliza para solubilizar las membranas celulares, al disolver los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína; este efecto podría modificar la disposición de las proteínas de contacto celular que existen en, lo que alteraría las estructuras proteicas de los receptores de neuromoduladores estimulantes o inhibitorios que regulan la actividad de las neuronas, las sinapsis entre las neuronas GnRH, la glía y otras neuronas. Dado que la inyección del tween 20 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 membranales que se establecen en estro y diestro-1 determinan que el animal ovule normalmente, al encenderse la cascada de eventos que culminan con esta función.

La alteración de estas señales neuroendocrinas en la mañana del estro, por la inyección de tween 20, estaría modificando la frecuencia de los pulsos de secreción tónica de la GnRH, lo que en parte, se tradujo en la disminución de la secreción preovulatoria de estradiol en la mañana del proestro, como consecuencia de modificaciones en el crecimiento de los folículos. Se ha mostrado que la secreción de estradiol se correlaciona con la concentración de FSH<sup>(101)</sup>.

A su vez, esta disminución de la concentración de estradiol en los animales inyectados con el tween 20 en la mañana del estro, 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, ya que en las ratas tratadas en estro con el vehículo disminuyó la concentración de FSH y LH en la tarde del proestro. Se ha mostrado que la administración de inhibidores de estrógenos <sup>(105)</sup>, de antisuero al estradiol o la ovariectomía <sup>(106)</sup>, 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.

Otra explicación sería que el aumento en la concentración sanguínea de progesterona (aunque no estadísticamente significativa) en la mañana del proestro, haya sido metabolizada a alopregnenolona por las células de la glía del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA), metabolito que promueve directamente la apertura de los canales a cloro asociados al receptor GABA<sub>A</sub> en las neuronas GnRH, lo que suprimiría la secreción de GnRH, la liberación de la LH y la ovulación <sup>(60)</sup>. Altas concentraciones de progesterona inhiben la transcripción génica de FSH $\beta$  en células de la hipófisis en ovinos. La progesterona actúa de manera selectiva al estimular la expresión del ARNm de la FSH $\beta$ .

El incremento en el número de animales que ovularon después de ser inyectados en el día del estro con el MPP, nos lleva a plantear que en este día del ciclo, el estradiol por medio de los RE $\alpha$  regula de manera inhibitoria la secreción preovulatoria de la LH, pero no interfiere con la de FSH, ya que en los animales inyectados con MPP la concentración de LH en la tarde del proestro fue semejante a la de los animales intactos,

mientras que la de FSH fue significativamente menor a la de los animales inyectados con tween 20 y a los intactos. Es posible que la secreción preovulatoria de FSH ocurriera en otro momento, el cual podría ser entre las 11:30 y 16:30 horas ó después de las 17:00 horas del día del proestro. Dado que en la mañana de este día del ciclo la concentración de E<sub>2</sub> disminuyó en los animales inyectados con MPP, explicaría la falta de la secreción preovulatoria de LH en el tiempo esperado.

Así mismo, la disminución en la concentración de E<sub>2</sub> en la mañana del proestro podría ser explicada por alteraciones en la respuesta de los folículos a ambas gonadotropinas, especialmente a la FSH o al tipo de FSH secretada<sup>(6)</sup>. han mostrado que el tiempo de vida media y la actividad biológica de la molécula de FSH depende de la cantidad de ácido siálico en la glucoproteína: las moléculas de FSH con mayor número de carbohidratos tienen mayor tiempo de vida media pero menor actividad biológica, mientras que las moléculas con menor concentración de azúcares tienen menor tiempo de vida media pero mayor actividad biológica<sup>(5)</sup>.

Otro resultado que apoyaría esta hipótesis es que en los animales micro-inyectados en estro haya disminuido el número de ovocitos liberados y haya aumentado el peso de los ovarios en las ratas tratadas con el antagonista al RE- $\alpha$  sugieren que el número final de folículos que ovularán depende de la FSH así como de la concentración intracelular del GDF9 (de sus siglas en inglés: growth differentiation factor 9) y de BMP15 (de sus siglas en inglés: bone morphogenetic protein 15).

En el día del proestro el tween 20 altera los mecanismos neuroendocrinos involucrados en la ovulación al modificar la secreción de FSH y LH, por lo que en la mañana del proestro, el “pico” preovulatorio de

$E_2$  disminuyó. Estos resultados nos permiten sugerir que la síntesis de hormonas esteroideas resultó de alteraciones en el crecimiento de los folículos del ovario. Por el contrario, el bloqueo de los RE- $\alpha$  estimula la síntesis de  $E_2$  desde la mañana y hasta la tarde del proestro. El aumento constante de  $E_2$  sería el responsable del bloqueo de la secreción preovulatoria de LH y por lo tanto de la ovulación.

Cuando se comparan las concentraciones séricas de FSH de los animales con bloqueo del RE- $\alpha$  con los de tween 20, se observa que esta hormona aumentó en sangre durante el “pico” del proestro, sin embargo, no alcanza los valores de un animal intacto. Un efecto opuesto se observa al analizar las concentraciones de LH, ya que el MPP provocó inhibición de la secreción preovulatoria de esta hormona. Estos resultados implican que la secreción de FSH y LH estaría regulada de manera diferente al unirse el  $E_2$  a sus RE- $\alpha$ . Resultados semejantes se han observado al bloquear los receptores colinérgicos por vía subcutánea, mediante la inyección de atropina

El bloqueo del receptor nicotínico colinérgico por la alfa bungatoxina afecta el tercer ventrículo de ratas ovariectomizadas decrementando la frecuencia en las secreciones de LH y esto no afecta en amplitud de la secreción de nadir o secreción de LH<sup>(107)</sup>.

En concreto la ovariectomización de animales y la administración de etanol por vía gástrica mediante una cánula en dosis que produzcan intoxicación media inhiben pulsaciones relacionadas por LH pero no en la FSH<sup>(108)</sup>.

La disminución del peso del útero observada en los animales inyectados con MPP en diestro-2 implican alteración en la función esteroideogénica del ovario, ya que el útero es un órgano blanco tanto de

progesterona como de estradiol, los que ejercen efectos tróficos sobre el tejido de éste órgano <sup>(109)</sup>. Además este hecho confirma la idea de que los efectos producidos por cualquier manipulación experimental dependen del día del ciclo estral en que se lleven a cabo.

Cuando se comparan los efectos provocados por el bloqueo de los RE- $\alpha$  con los del RE- $\beta$  del lado izquierdo de POA-AHA (Apéndice 1) podemos observar que el estradiol al unirse a cada receptor desencadena mecanismos de regulación neuroendocrinas opuestas que resultan en alteraciones de la ovulación diferentes en la fase de estro o del proestro.

En estro el bloqueo del RE- $\alpha$  aumenta la tasa de animales ovulantes (Tabla 1 del Apéndice 1) como respuesta al aumento mantenido desde la mañana hasta la tarde del proestro en la concentración de LH (Tabla 2, Apéndice 1); aún cuando la concentración de estradiol se mantuvo constante y no se haya observado secreción preovulatoria de este esteroide, secreción que pudo ocurrir entre las 12:00 y 16:00 h en las cuales no se tomaron muestras de sangre. El bloqueo del RE- $\alpha$  no altera la secreción de FSH en el día del proestro pero adelanta la de progesterona (Tabla 2, Apéndice 1). Estos resultados nos llevan a sugerir que en el estro, el estradiol al unirse a los RE- $\alpha$  juega un papel inhibitorio de los mecanismos de secreción de LH y la ovulación, sin regular los relacionados con la secreción de la FSH. En cambio el estradiol unido a los RE $\beta$  estimulan la secreción de LH y por lo tanto la ovulación <sup>(110)</sup>.

Por el contrario, en proestro, el estradiol por medio de los RE- $\alpha$  estaría regulando de manera opuesta la secreción de las gonadotropinas (Tabla 3, Apéndice 1), es decir, sería inhibitoria para la FSH y estimulante para la LH. En cambio, la unión del estradiol al RE- $\beta$  regularía sólo la liberación preovulatoria de la LH y por lo tanto, la ovulación <sup>(110)</sup>.

- El  $E_2$  al unirse a los RE- $\alpha$  en la mañana del estro regula de manera inhibitoria la ovulación, lo que resultaría de un efecto “feedback” inhibitorio sobre la secreción preovulatoria de LH.
- En cambio en la mañana del proestro, el  $E_2$  por medio del RE- $\alpha$  inhibe la secreción de FSH,  $E_2$  pero estimula la secreción preovulatoria de LH y por lo tanto la ovulación.

1. **Prieto-Gómez, B.**, Velázquez-Paniagua, M. (2002). "Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas", en la Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM, pg.45.
2. **Paxinos G**, Kus L, Ashwell KW, Watson C. (2004). Chemoarchitectonic Atlas of The Rat Forebrain. Academic Press. USA; p. 248.
3. **Palkovits, M.** Arimura A., Browns, M., Shally, A., & Saavedra, J.M. (1994). Luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) content of the hypothalamus nuclei in rat. *Endocrinology* 95, 554.
4. **Palkovits M.** (2000). "Micro and Macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*". Con PM y Freeman ME. Human Press. 23-31.
5. **Ulloa-Aguirre A**, Timossi C. (2000). Biochemical And functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive Bio Medicine Online*. 1: 48-62.
6. **Jennes L.** (1989). Prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone-containing systems in rat brain. *Brain Research*; Vol.1 y 3 pg. 482:97-108, 64, 140-5 México.
7. **Herbison A.E.** (2006). Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 3th edition. Editor-in- Chief Jimmy D. Neill, Ph.D. Academic Press is an imprint of Elsevier: 1415-1482.
8. **Adelman JP**, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg PH. (1986). "Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 179-183.
9. **Yen SSC**, Jaffe RB y Barbieri RI. (2001). *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico*", Editorial Medica Panamericana. Argentina. 31-85,195,196, 119-14.
10. **Fan NC**, Peng C, Krisinger J, Leung PC. (1995). "The Human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiples promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signa signals". *Mol Cell Endocrinol* 107:R1-R8.

- 
- 
11. **Herbison AE**, Pape J-R, Simonian SX, Skynner MJ, Sim JA. (2001). Molecular and cellular properties of GnRH neurons revealed through transgenics in the mouse. *Mol Cell Endocrinol*. 185(1-2):185-94.
  12. **Jennes L**. (1989). Prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone-containing systems in rat brain. *Brain Research*; 482(1):97-108.
  13. **Kakar SS**. (1997). "Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene". *Eur J Endocrinol* 137:183-192.
  14. **Suzuki M**, Nishihara M, Takahashi M. (1995). "Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrous cycle". *Endocrine Journal*; 42(6): 789-796.
  15. **Funabashi T**, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K Kimura F. (2002). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. En: *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors*. Parhar I. 141: 165-173.
  16. **Silverman AJ**. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill D. Raven Press. 1: 1638-1709.
  17. **Jennes L**. (2000). Prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone-containing systems in rat brain. *Brain Research*; 485(1):95-100.
  18. **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. Proceedings of Sorono Symposia, Vol 19*, editors A. Polleri y R. MacLeod. New York. Academic Press. 97-102.
  19. **Bakalkin GY**, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID, Krivosheev OG. (1984). Lateralization of LHRH in rat hypothalamus. *Brain Res*; 296: 361-364.
  20. **Parhar IS**. (2002). "Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes. *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors*". Parhar I. 141: 3-17.
  21. **Chen A**, Yahalom D, Ben-Aroya N, Kaganovsky E, Okon E, Koch Y. (1998). "A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents". *FEBS. Letters* 453 199-203.

- 
- 
22. **Sitges M.** (1993). Comunicación entre las células nerviosas. Sinapsis. Comunicación neuroendocrina. Bases celulares moleculares. Sociedad mexicana de ciencias fisiológicas CONACyT y SEP. p.22.
  23. **Charli JL**, Ponce G, Joseph-Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRHérgicas hipotálamicas. Tópicos selectos de biología de la reproducción. Edit. R Domínguez, UNAM-PORRUA. México. 59-85.
  24. **Fink G.** (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary Function. Neuroendocrinology in physiology and medicine. Humana Press. Inc. Totowa, N.Y. pp 107-133.
  25. **Arimura A.** (2000). "Hypothalamic hormones. En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine", Editores: Conn PM, Freeman ME. Humana Press Inc., Totowa, N.J., capítulo 3: 41-58.
  26. **Guyton AC**, Hall JE. (2001). "Tratado de Fisiología Médica". Décima edición, McGraw- Hill Interamericana. México. 100 -110.
  27. **Berne RM**, Levy MN. (1992). Revisión de la función reproductora. Fisiología. Mosby/Doyma Libros, España, 579-589.
  28. **Sealfon SC**, Weinstein H. Millar RP. ;(1997) "Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotrophin- releasing hormone receptor". 18:180-205.
  29. **Fawcett DW.** (1995). Tratado de Histología. Duodécima Edición. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp: 885-893.
  30. **Yao HH**, Bahr JM. (1998). Ovary, Overview. En: Encyclopedia of reproduction. Vol. 3. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 590-595.
  31. **Ganong WF.**(2004). Fisiología médica. El Manual Moderno: México. Págs. 472-483.
  32. **Espey LL.** (1999). Ovulation. En: Encyclopedia of reproduction. Vol 3. Eds. Knobil E, Neill JD. Academic Press: EUA. 3:605-615.
  33. **Ross MH**, Lynn JR, Kaye GI. (1997). Histología texto y atlas color. 3° ed, Médica Panamericana, México, 674-690.
  34. **Sánchez-Criado JE.** (2003). Fisiología del ovario. En: Fisiología humana. Ed. Tres guerres J.A. 2ª Ed. McGraw-Hill Interamericana: México.1036-1048.

- 
- 
35. **Domínguez R.** (1997). Endocrinología de las gónadas. En: Curso internacional Precongreso. Actualización en Fisiología. Ed. SMCF y PUIS-UNAM, México. 271-279.
36. **Domínguez R,** Chávez R, Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción. Editor: Domínguez R. Ed. UNAM-Porrúa, México, capítulo 7: 161-192.
37. **Hirshfield AN.** (1997). Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. Environmental and molecular mutagenesis. 29: 10-15
38. **Schwartz NB.** (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Eds PM Conn, Freeman M. Raven Press: EUA. 135-145.
39. **Van BJ.** (1999). Follicular development. En: Encyclopedia of reproduction. Vol. 2, Eds. Knobil E, Neill J. Academia Press: EUA. 376 -388.
40. **Ulloa-Aguirre A.** (1991). Aspectos Bioquímicos-Funcionales de la Hormona Estimulante del Folículo .En Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Domínguez R. Edit. Porrúa. México.
41. **Gore-Langton RE,** Armstrong DT. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. The Physiology of reproduction. Knobil E y Neill D. Raven Press. New York. USA. 571,611,627.
42. **Espey LL,** Lipner H (1994). Ovulation. En: The Physiology of Reproduction.Vol.1 Eds. Knobil E, Neill JD. Raven Press: New York. 725-780.
43. **Brown TR.** (1999). Steroid Hormones, Overview. En: Encyclopedia of Reproduction.Vol.4 Eds. Knobil E, Neill JD. Academic Press: EUA. 634-644.
44. **Carlson, M. B.** (2000). "Embriología Humana y Biología del Desarrollo". Ed Harcourt 558-650.
45. **Hirshfield AN,** Midgley AR. (1978). Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biology of Reproduction. 19: 597-605.
46. **Tsafiriri A,** Reich R.(1999). Molecular aspects of mammalian ovulation. Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes. 107(1): 1-11.

- 
- 
47. **Tsafiriri A.** (1995). Ovulation as a tissue remodeling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 377:121-40.
  48. **Tsafiriri A,** Reich R.(1999). Molecular aspects of mammalian ovulation. *Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes*. 107(1): 1-11.
  49. **Drucker C.**(2005). Fisiología médica. Manual Moderno: México. Págs. 595-599.
  50. **Kilen SD,** Schwartz B. (1998). Estrous cycle. *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 2: 127-136.
  51. **Freeman ME.** (1994). The Neuroendocrine control of the ovarian cycle of rat. *The Physiology of Reproduction, Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. Vol 1: 613-654.
  52. **O'Malley BW,** Strott AC. (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. *Endocrinología de la Reproducción*. 4ª. Edición. Eds. Yen S, Jaffe R y R. Barbieri. Editorial Médica Panamericana: México. Págs. 119-143.
  53. **Carson-Jurica MA,** Schrader WT, O'Malley BW. (1990). Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrine Reviews*. 11:201-222.
  54. **Hinshelwood MM.** (1999). Steroidogenesis, Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill J. Academic Press: EUA. 4:644-653.
  55. **Jordan VC,** Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman ME. (1985). Structure-activity relationships of estrogens. *Environmental Health Perspect*. 61:97-110.
  56. **Duax WL,** Griffin JF, Weeks CM, Wawrzak Z. (1988). The mechanism or action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *Journal of Steroid Biochemistry*. 31(4B): 481-492.
  57. **Smith CL.** (1999). Estrogen Overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill J. Academic Press. EUA. 2:119-126.
  58. **Silverman AJ,** Levine I, Within JW. (1998). The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. Y Nelly JD editores. Vol. 1, Cap. 28, Raven Press, Nueva York, pp 1683-1709.

- 
- 
59. **Funabashi T**, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K Kimuraf. (2002). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. En: *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors*. Parhar I. 141: 165-173.
60. **Herbison AE**, Pape J-R, Simonian SX, Skynner MJ, Sim JA. (2001). Molecular and cellular properties of GnRH neurons revealed through transgenics in the mouse. *Mol Cell Endocrinol*. 185(1-2):185-94.
61. **Herbison AE**. (1998). Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19: 302-330
62. **Greenwald GS**, Roy SK. (1994). Follicular development and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E, JD Neill. Raven Press: New York. 1:629-724.
63. **McLean MP**, Khan I, Puryear TK, Gibori G.(1989). Estradio-Induced Synthesis and Translation of Specific Proteins in the Corpus Luteum. En: *Growth Factors and the Ovary*. Ed. Hirshfield AN. Plenum: New York. 363-368.
64. **Kuiper GGJM**, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JÅ. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930.
65. **Mangelsdorf DJ**, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 15;83 (6) :835-839.
66. **Rollerova E**, Urvancikova M. (2000). Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (review). *Endocrine regulation*. 34 203-218.
67. **Grandien K**, Berkenstam A, Gustafsson JA. (1997). The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29(12):1343-69.
68. **MacGregor JI**, Jordan VC. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological reviews*. 50(2):151-96.
69. **Norris JD**, Fan D, Kerner SA. (1997). Identification of a third autonomous activation domain within human estrogen receptor. *Mol. Endocrinol*. 11 747-754.
70. **Tsai MJ**, O'Malley BW. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem*. 63 451-486.

- 
- 
71. **Rosen J**, Day A, Jones TJ. (1995). Intracellular receptor and signal transducers and activators of transcription superfamilies: Novel for small-molecule drugs discovery. *J. Med. Chem.* 38 4855- 4874. Abraham IM, Han SK, Todman MG.
72. **Hrabovsky E**, Shughrue PJ, Merchenthalr I, HajszánT, Carpenter CD, Liposits Z y Petersen SL. (2000) Detection of estrogen receptor- $\beta$  messenger ribonucleic acid and Estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology.* 141:3506-3509.
73. **Butler JA**, Sjoberg M, Coen CW. (1999). Evidence for estrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *Journal of Neuroendocrinoly.* 11: 331-335.
74. **Shughrue PJ**, Lane MV, Scrimo PJ y Merchenthaler I. (1998). Comparative distribution of estrogen receptor-  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA in the rat pituitary, gonad and reproductive tract. *Steroids.* 63:498-504.
75. **Abraham IM**, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE. (2003). Estrogen receptor  $\beta$  mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J, Neurosc* 23: 5771-5777
76. **Kalló I**, Butler JA, Barkovics-Kalló M, Goubillon ML, Coen CW. (2001). Oestrogen Receptor  $\beta$ -immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *Neuroendocrinology* 13: 741-748.
77. **Skynner MJ**, Sim JA, Herbison AE. (1999). Detection of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinol* 140: 5195-5201.
78. **Advis JP**, Ahmed CE, Ojeda SR. (1989). Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. *Brain Res. Bull.* 22: 605-610.
79. **Korach KS**, Herbison AE. (2003). Estrogen receptor  $\beta$  mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J, Neurosc* 23: 5771-5777.
80. **Cook B.** (1987). Endocrine asymmetry (Comentary). *J. Endocrinol.* 113: 331-332.

- 
- 
81. **Cruz ME**, Jaramillo LP, Domínguez R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J. Endocrinol* ; 123: 437-439.
82. **Cruz ME**, Moran JL, Jaramillo LP, Domínguez R. (1990). Differential effects of a unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rat. *J. Endocrinol.* 124: 37-41.
83. **Cruz ME**, Moran JL, Jaramillo LP, Domínguez R. (1990<sup>a</sup>). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Res Bull.* 24: 739-742.
84. **Fukuda M**, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy. *Neurosci Lett*; 51:367-370.
85. **Gerendai I**, Drago F, Continella G, Scapagnini V. (1984). Effects of mastectomy and vagotomy on grooming behavior of the rat: Possible involvement of prolactin. *Physiol Behav.* 33: 1-4.
86. **Mizunuma H**, Depalatis LR, McCann SM. (1983). Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: Evidence for direct neural connection between testis and CNS. *Neuroendocrinology.* 37: 291-296.
87. **Nance DM**, Morger WH. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemi-castration. *Brain Res. Bull.* 8: 299-302.
88. **Nance DM**, Bhargava M, Myatt GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Res. Bull.* 13: 651-655.
89. **Nordeen EJ**, Yahr P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science.* 218: 391-393.
90. **Duax WL**, Griffin JF, Weeks CM, Wawrzak Z. (1988). The mechanism or action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *Journal of Steroid Biochemistry.* 31(4B): 481-492.
91. **Davis AM**, Ellersieck MR, Grimm KM, Rosenfeld CS. (2006). The Effects of the Selective Estrogen Receptor Modulators, Methyl-Piperidino-Pyrazole (MPP), and Ramoxifene in Normal and Cancerous Endometrial

---

---

Cell Lines and the Murine Uterus. *Molecular Reproduction and Development* .73:1034-1044.

92. **García JE.** (2007). Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos de las porciones izquierda o derecha de POA-AHA, realizado en el día del diestro-2, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata. Tesis de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
93. **Cabrera E.** (2009). Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos alfa y beta sobre la ovulación, crecimiento folicular, el peso del útero y los ovarios, durante el ciclo estral de la rata. En tesis, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
94. **Dickson, R.B.** and Stancel, G.M. (2000). Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J. Natl Cancer Monogr*, 27, 135-1044.
95. **Marc D.** Wengera, Amy M. Bowmana, Marc V. Thorsteinssona, Kristine K. Littlea, Leslie Wang, Jinglin Zhongb, Ann L. Leec 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.
96. **Bartsch, W.** Sponer, G., Dietman, K. and Fuchs G. *Arzneim-Forsch.* (1976); 26:1581-1583.
97. **Ari Helenius**, Darrell R. Mccsclin, Erik Fries, and Charles Tanford (1979).
98. **Charles N.** Rudi, Robert B. Gibbs, and Caterine S. (1984). Woolley A. Role For the Bassal Forebrian Cholinergi Sistem in estrogen-induced this inhibition of hippocampal piramydal cell.
99. **Joint FAO/WHO** (1974). Expert Committee on Food Additives. Toxicologica evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *WHO Food Additives Series No. 5.* World Health Organization.
100. Krivoned, J. and Buresova, O, (1972). Cortical acetylcholinesterase and handedness in rat. *Experientia*, 28,291. quitar
101. **Ferin M.** (1998). Ovarian Cycle, mammals. *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 3: 547-553.
102. **Witermantel**, Tim M. Rebecca E. Campbell, Robert Porteous, Dagmar Bock, Hermann-Jesef Gröne, Martin G. Todman, Cristian A. Pérez and Allan E. Herbison. (2006). Definition of Estrogen receptor Pathway Critical for Estrogen

---

---

Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Neurons and Fertility. *Neuron* 52: 271-280.

103. **Mendoza –Garcés L.P.R.**, Arteaga-López, R.Domínguez M. A. Cerbón,I.Arrieta-Cruz A. Flores, M. E. Cruz (2007). Changes in number of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in POA-AHA during the estrous cycle of the rat 40 th annual meeting of Society study of reproduction, San Antonio Texas. 21-25 July, Abstr 128,pp. 106.

104. **Köning JFR**, Klippler R.A. The rat brain a stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower parts of brain stem. New York:Robert E. Krieger Publishing. 1969.

105. **Palafox, T.** (2007). Un estudio de las interacciones funcionales de las adrenales y la secreción de estrógenos por parte de los ovarios. En tesis para obtener el título de Biólogo, México, D.F. FES Zaragoza, 58.

106.**Chavéz R**, Cruz ME, Domínguez R, (1987).Differences in the ovulation rate of the right or left unilaterally ovariectomized rat: Effect of ipsi-and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinol* 113:397-407.

107. **Kalash, J.**, Romita, V. and Billiar, R. B. (1989). Third ventricular injection of alpha-bungarotoxin decreases pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 49, 462-470.

108. **Dees WL**, Rettori V, Kozlowski GP, and McCann SM (1985). Ethanol and the pulsatile release of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin in ovariectomized rats. *Alcohol* 2, 641-6.

109. **Gray CA**, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW y TE Spencer.(2001). Developmental Biology of Uterine Glands.*Biology of reproduction*. 65:1311-1323.

110. **Rodríguez D.** (2010). Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos alfa y beta sobre la ovulación, durante el ciclo estral de la rata. En tesis, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

<i>VARIABLE ESTUDIADA</i>	<i>DÍA DEL CICLO</i>	<i>RE <math>\alpha</math></i>	<i>RE <math>\beta</math></i>
TASA DE ANIMALES OVULANTES	ESTRO	↑	↓
	D1	=	=
	D2	=	=
	PROESTRO	↓	↓
OVOCITOS LIBERADOS	ESTRO	↓ Ovario izquierdo	=
	PROESTRO	↑ Ovario izquierdo	↓ Ovario izquierdo ↓ Ovario derecho
PESO OVARIOS	ESTRO	↑ Ovario izquierdo ↑ Ovario derecho	↓ Ovario derecho
MASA OVARICA	ESTRO	↑	↓
PESO ÚTERO	D2	↓	=

TABLA 1.

Comparación de los efectos provocados por el bloqueo de los RE- $\alpha$  con los RE- $\beta$  del lado izquierdo de POA-AHA.

INYECCIÓN EN PROESTRO Y CUANTIFICACIÓN EN PROESTRO		<i>RE</i> $\alpha$	<i>RE</i> $\beta$
P <sub>4</sub>	11:00 h	↑	=
	17:00 h	↑	=
E <sub>2</sub>	11:00 h	↓	=
	17:00 h	=	=
FSH	11:00 h	=	=
	17:00 h	↑	=
LH	11:00 h	=	=
	17:00 h	↓	↓

TABLA 2.

Comparación de los efectos provocados de los RE- $\alpha$  con los RE- $\beta$  del lado izquierdo de POA-AHA al inyectar y cuantificar hormonas en el ciclo estral Proestro.

INYECCIÓN EN ESTRO Y CUANTIFICACIÓN EN PROESTRO		<i>RE α</i>	<i>RE β</i>
P <sub>4</sub>	11:00	=	↑
	17:00	↑	=
E <sub>2</sub>	11:00	↓	=
	17:00	↓	=
FSH	11:00	=	↑
	17:00	=	↑
LH	11:00	↑	=
	17:00	=	↓

TABLA 3.

Comparación de los efectos provocados de los RE-α con los RE-β del lado izquierdo de POA-AHA al inyectar en el ciclo estral estro y cuantificar hormonas Proestro.