



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción
Laboratorio de Neuroendocrinología

EFFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES A
ESTRÓGENOS ALFA Y BETA EN EL LADO DERECHO DE
POA-AHA, REALIZADO EN EL DÍA DEL DIESTRO-2 SOBRE
LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA GnRH Y LA
CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL

T E S I S
Que para obtener el título de
B I Ó L O G O

P r e s e n t a n :
JESSICA SOFÍA HERNÁNDEZ SANTIAGO
ALEJANDRO HERRERA ARROYO

Directora de Tesis:
DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

MÉXICO, D.F.

2013





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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **HERRERA ARROYO ALEJANDRO**, con número de cuenta **301071990**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **26** del mes de **noviembre** de 2013 a las **16:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

VOCAL M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

SECRETARIO DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

SUPLENTE M. en IBSh ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

SUPLENTE DRA. JUANA MONROY MORENO

El título de la tesis que presenta es: **Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos alfa y beta en el lado derecho de POA-AHA, realizado el día del Diestro-2 sobre la expresión del ARNm de la GnRH y la concentración de Progesterona y Estradiol.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 29 de octubre de 2013

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **HERNÁNDEZ SANTIAGO JESSICA SOFÍA**, con número de cuenta **303178026**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **26** del mes de **noviembre** de 2013 a las **18:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

VOCAL M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

SECRETARIO DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

SUPLENTE M. en IBSH ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

SUPLENTE DRA. JUANA MONROY MORENO

El título de la tesis que presenta es: **Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos alfa y beta en el lado derecho de POA-AHA, realizado el día del Diestro-2 sobre la expresión del ARNm de la GnRH y la concentración de Progesterona y Estradiol.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F. a 29 de octubre de 2013

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA



“Live your life without regret.
Don't be someone who they forget”
Melanie C

“Intenta no volverte un hombre de éxito,
sino volverte un hombre de valor”
Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMIENTOS:

A la [Universidad Nacional Autónoma de México](#), que desde mi ingreso a la [ENP No. 2](#), hasta la [FES Zaragoza](#), fue un placer y un orgullo formar parte de ella. Goya! Goya!

A los miembros de este jurado por su tiempo, consejos y dedicación, formando parte de este trabajo:

M. en C. Rosalva Rangel Corona
Dra. Patricia Rosas Saucedo
M. en IBSH Angélica Flores Ramírez
Dra. Juana Monroy Moreno

En especial a la [Dra. María Esther Cruz Beltrán](#)

Doc muchas gracias por todo, su gran apoyo, su tiempo, sus conocimientos, su infinita paciencia, su cariño, pero sobre todo por hacerme sentir como en casa en el laboratorio. Nunca olvidare todo lo que hizo por mí y por dejarme formar parte de su equipo de trabajo. Usted es uno de los seres humanos más lindos que he conocido, la quiero y admiro mucho!



DEDICATORIA:

A **Dios**, por la bendición de darme estudios y las fuerzas para terminar este ciclo tan importante.

A mis padres **María de Jesús** y **Alejandro**, por su amor incondicional, su comprensión al aceptarme tal y como soy, su apoyo en la toma de mis decisiones, sus palabras de aliento y el esfuerzo tan grande que han tenido para que pueda llegar a ser alguien. Espero que se sientan orgullosos de mí así como yo lo estoy de ustedes.

A mis hermanos **Iván**, que sirva como ejemplo para que no te des por vencido nunca; **Omarcito**, donde quiera que estés te sientas orgulloso de mí.

A mi familia **Herrera**, mis tías **Anita** y **Paty** por apoyarme y creer siempre en mí, aun cuando había obstáculos muy difíciles jamás me dejaron. Mis Abuelitos **Felisa** y **Agustín**, los quiero y admiro mucho. Todos y cada uno de mis **tías, tíos, primos, primas** y **sobrinos**.

A mi familia **Arroyo**, mis tías **Malena, Lupita** y **Any**. Mis Primas **Yadira, Liliana** y **Karina**, me encanta compartir momentos con ustedes. Mis **tías, tíos, primas** y **primos**. A mis hermosos sobrinitos **Pao, Brendis, Ponchito, Karito, Andy** y **Camilita**, los quiero mucho y espero que esto sea una inspiración para que logren cumplir todos sus sueños.

A **Carlos**, por todo tu apoyo, por estar siempre conmigo, todo tu tiempo dedicado, por hacerme feliz y ser la motivación para poder realizarme profesionalmente y pensar en un futuro.

A **Jessica** y **Sandra Verónica**, por ser mis amigas, compañeras y cómplices en tantas experiencias que hemos pasado a lo largo de esta etapa. Somos compañeros del mismo dolor en esto de la tesis.

A todos los que formaron parte de mi vida universitaria, amigos fue maravilloso conocerlos a todos: **Fer, Verito, Pau, Sandra Leticia, Sofía, Blanch, Yayito, Irán, Eli, Tona, Osvaldo**,

A mis compañeros de laboratorio: **Laura, Kayro, Raúl, Luis, Adriana, Miguel, Esteban, Marian, Aidé**.

A mis amigos de toda la vida: **Nancy, Vanessa, Luis, Sofía, Angie**.

A todas las personas que creyeron en mí y a las que no, también, por motivarme a terminar esta etapa, demostrar de qué estoy hecho y buscar ser lo que siempre he querido, un hombre con valores, exitoso y afortunado.

¡Muchas gracias a todos!

Alejandro Herrera Arroyo



“No temáis a la grandeza; algunos nacen grandes, algunos logran grandeza, a algunos la grandeza les es impuesta y a otros la grandeza les queda grande”

-William Shakespeare

"El guerrero más poderoso es aquel que logra vencerse a sí mismo."

-Netzahualcóyotl

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: por darme la vida haciendo posible lograr mis metas. Porque me iluminas y estas siempre a mi lado para seguir adelante.

A LA UNAM por ser mi segunda casa y de ella haber conocido a grandes seres humanos y día a día enseñarme nuevas experiencias.

A MIS SINODALES: Por su tiempo invertido en esta tesis y sus múltiples consejos que en verdad nos ayudaron mucho, mil gracias.

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Dra. Patricia Rosas Saucedo

M. en IBSH Angélica Flores Ramírez

Dra. Juana Monroy Moreno

Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN: en especial a usted, gracias por su paciencia y por su interés por esta tesis, por haberme hecho sentir parte de la familia del laboratorio 6, por sus múltiples enseñanzas y consejos, por una gran mujer y que nos sirva a todos como un gran ejemplo mil gracias.



Dedicado con mucho amor y cariño para las personas más importantes en mi vida.

A MI MADRE MICAELA , por el gran amor y la devoción que tienes a tus hijos y nietos, por el valor y el coraje que has tenido para levantarte ante cualquier adversidad, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado, por haberme formado como una persona de bien, por ser una gran mujer, agradezco a dios por haber sido la mujer que me dio la vida y me enseña día a día a vivirla... no hay palabras en este mundo para agradecerte que seas la mejor mamá **te quiero mucho**.

A MI PADRE HELADIO: por el tiempo que me dedicaste y en cual me enseñaste muchas cosas, por el ejemplo que me diste, gracias a ti se diferenciar lo bueno de lo malo, por haberme dado la vida y poder disfrutarla al máximo, que dios te bendiga y te proteja en el camino que has elegido **te quiero mucho**.

A MI HERMANA ELDA: por tu apoyo incondicional en las buenas y en las malas, por tu gran coraje para vivir la vida y el ejemplo que me has enseñado de que siempre se puede vencer cualquier obstáculo por muy malo que sea, por tus ganas de salir adelante día a día y ser una buena madre para tu hijo espero y deseo que un día el este orgulloso de tener una gran madre como yo estoy orgullosa de tener una gran hermana deseo que siempre seas feliz **te quiero mucho**.

A MI HERMANO SERGIO: por tu apoyo incondicional en las buenas y en las malas, por tus consejos que siempre me han servido, porque a pesar de todo me demuestras que eres un gran padre y espero que siempre lo más importante sean tus hijos, por tus ganas de salir adelante y seguir luchando, pido a dios que un día puedas alcanzar todos tus sueños y ser feliz **te quiero mucho**.

BETO: gracias por tu apoyo incondicional en las buenas y en las malas, por estar conmigo e impulsarme a seguir adelante, porque eres esa persona especial que me ha enseñado a disfrutar la vida y porque espero que seas con quien la comparta siempre, espero muy pronto compartas conmigo este momento especial en tu etapa profesional háchale muchas ganas recuerda que el que persevera alcanza, gracias por cada momento a tu lado y por los que vienen en un futuro nunca olvides que **te amo mucho**.

A SERGIO, DANI Y YESHUA: por ser la alegría de la casa, porque al hacer feliz a la gente que quiero también me hacen feliz, espero les sirva de ejemplo para que un día ustedes estén en la misma situación y nos den la alegría de verlos convertirse en profesionistas **los quiero mucho** y les deseo todo el éxito a lo largo de sus vidas.

A MIS GRANDES COMPLICES (SANDRA, MIRIAM, ALEJANDRO, BLANCA...): gracias a ustedes y a todas aquellas personas que han compartido experiencias gratas conmigo, por enseñarme el valor de la verdadera amistad y por continuar conmigo hasta el final **los quiero mucho** y les agradezco todo su apoyo y espero me dejen compartir el mismo grato momento.



ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	
Ciclo Estral	3
Hipotálamo	6
GnRH y neuronas GnRHégicas	8
Distribución anatómica de las neuronas GnRHégicas	10
Patrón de secreción	11
Hipófisis	12
LH y FSH	14
Ovario	15
Hormonas Esteroides	17
Esteroidogénesis	18
Teoría de la doble célula- doble hormona	22
Receptores a estrógenos	23
RE y la neurona GnRHégica	24
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	26
HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL, OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS POR MICRO- INYECCIÓN DEL α -RE α	35
RESULTADOS POR MICRO- INYECCIÓN DEL α -Re β	46
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
CONCLUSIONES	58
CARTEL EN FORO DE INVESTIGACIÓN DE BIOLOGÍA	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO	70



RESUMEN

El 17β -estradiol es una hormona secretadas por el ovario, cuyas funciones están relacionadas con la reproducción. El estradiol se une a dos tipos de receptores, el alfa ($RE\alpha$) y el beta ($RE\beta$). Su papel regulador en la reproducción se lleva a cabo al dirigir la actividad de las neuronas que secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). La GnRH estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), las cuales regulan la secreción de hormonas esteroides, el crecimiento folicular y la ovulación. El bloqueo del $RE\alpha$ o $RE\beta$ en el lado derecho y no en el lado izquierdo de POA-AHA, entre las 8:30 y 9:30 horas del día del Diestro-2 provoca que la mayoría de los animales no ovulen en la mañana del Estro esperado. Lo que implica que los dos receptores deben ser activados para que ocurra la secreción de GnRH y la ovulación. Además que en esta fase del ciclo, es el sistema del lado derecho del que depende la ovulación.

Por ello, se estudiaron los efectos del bloqueo de los $RE\alpha$ y $RE\beta$ del lado derecho de POA-AHA sobre la expresión del ARNm de la GnRH en POA-AHA izquierda y derecha, y sobre la concentración sérica de progesterona y estradiol.

Para lo cual se utilizaron ratas hembras adultas micro-inyectadas con el vehículo (Tween 20®), el antagonista al $RE\beta$ (Ciclofenil) o el antagonista al $RE\alpha$ (MPP) a las 9:00 horas del Diestro-2 del ciclo estral. Los animales fueron sacrificadas a las 11:00 y 13:00h del Diestro-2, 11:00 y 17:00h del Proestro y a las 11:00h del Estro, para contar el número de ovocitos liberados por cada ovario, medir el peso de los ovarios y del útero. En otros grupos de ratas sin tratamiento o micro-inyectados, se cuantificó la concentración de estradiol (E_2) y progesterona (P_4) por RIA. En la porción izquierda y derecha de POA AHA se cuantificó la expresión del ARNm de la GnRH. Para evaluar si el bloqueo de los receptores a estrógenos modificó la secreción fásica de GnRH, en otros grupos de ratas tratadas con los fármacos fueron inyectadas con 3.7 μ g/kg peso de LHRH sintética.

Tanto el antagonista del $RE\alpha$ ($\alpha RE\alpha$) como del $RE\beta$ ($\alpha RE\beta$) bloquearon la ovulación en el 88% de los animales tratados, provocaron el aumento del peso de los ovarios. También uno y otro tratamiento resultó en el aumento de la concentración de 17β -estradiol a las dos horas del tratamiento ($\alpha RE\alpha$: 90.6 ± 10.0 , $\alpha RE\beta$: 77.0 ± 12.3 vs. vehículo: 45.3 ± 14.06 , $p<0.05$), sin modificaciones en la concentración sérica de progesterona. La micro-inyección del $\alpha RE\alpha$ en POA-AHA derecha resultó en el aumento de la expresión del ARNm de la GnRH en el lado inyectado ($\alpha RE\alpha$: 1.99 ± 0.21 vs. vehículo: 1.25 ± 0.15), pero sin modificarse en la porción izquierda ($\alpha RE\alpha$: 0.78 ± 0.14 vs. vehículo: 1.24 ± 0.16). En cambio, micro-inyección del $\alpha RE\beta$ en POA-AHA derecha no resultó en modificaciones de la expresión del ARNm de la GnRH.

Con base en los resultados obtenidos proponemos que en la mañana del Diestro-2, el estradiol en POA-AHA derecha al unirse al $RE\alpha$ regula de manera inhibitoria la expresión del ARNm de la GnRH, mientras que al unirse al $RE\beta$ no lo modifica.

En la mañana del Diestro-2, la activación de los dos receptores en POA-AHA derecha regula de manera inhibitoria la secreción de estradiol y no altera la de progesterona.



INTRODUCCIÓN

El hipotálamo y la hipófisis forman una unidad funcional cuya comunicación se establece por hormonas pepticas secretadas por el hipotálamo y que actúan sobre la hipófisis. Esta unidad funcional participa fundamental en la regulación del sistema endocrino. Uno de estos sistemas involucra la regulación de las funciones del ovario (Freeman, 2006).

En el áreas preóptica y el área hipotalámica anterior del hipotálamo (POA-AHA) de los roedores, se localizan las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de las gonadotropinas ó GnRH (siglas de su nombre en inglés: Gonadotropin Releasing Hormone) cuya secreción es modulada por hormonas esteroides, péptidos, opioides, neurotransmisores y aminoácidos (Yao *et.al.*, 1999).

La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son glicoproteínas producidas y liberadas como resultado de la unión de la GnRH a su receptor en la membrana de los gonadotropos. Ambas gonadotropinas son vertidas al torrente sanguíneo a su órgano blanco. Ambas gonadotropinas favorecen la maduración gonadal y la esteroidogénesis, capacitando al individuo para la reproducción. La FSH, estimula la secreción de estrógenos, los que a su vez regulan la secreción de la FSH. La LH produce la ruptura del folículo dando paso a la ovulación. El folículo se transforma en el cuerpo lúteo donde las células de la granulosa y la teca interna se transforman en células luteínicas que secretan progesterona, hormona indispensable en el embarazo (Prieto *et.al.*, 2002).

Recientemente se mostró que el bloqueo del RE α o del RE β en el lado derecho y no en el lado izquierdo de POA-AHA, entre las 8:30 y 9:30 horas del día del Diestro 2 provoca que la mayoría de los animales no ovulen en la mañana del estro esperado (Rodríguez, 2010; Galindo, 2011). Lo que implica que los dos receptores deben ser activados para que ocurra la secreción de GnRH y la ovulación. Además que es el sistema del lado derecho del que depende la ovulación.



MARCO TEÓRICO

Ciclo estral

En la rata, la época reproductiva se caracteriza por cambios periódicos en la secreción de las hormonas secretadas por el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, el resultado final de estos cambios es el crecimiento, la maduración y la liberación de ovocitos fértiles, así como una conducta sexual que asegura la máxima receptividad de la hembra durante la etapa ovulatoria. Esta conducta rítmica que presentan las hembras se le llama ciclo del estro o ciclo estral (Kuiper *et. al.*, 1996).

El término “estro” proviene del griego “*oistros*”, que significa frenesí. Este término se ha utilizado para describir el período de deseo sexual de la hembra y distinguirlo del celo del macho (Hrabovszky *et. al.*, 2000).

La rata es un mamífero policíclico que presenta varios ciclos estrales durante el año, cuya duración promedio es de cuatro a cinco días. El ciclo estral de la rata se divide en cuatro fases: Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro (Hrabovszky *et. al.*, 2000) (Figura 1).

Diestro 1: Esta etapa se presenta después de la ovulación y se le describe como una etapa progestacional, ya que existe un incremento en la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo recién formado. La concentración de LH, FSH y estradiol son bajas (Gráfica 1). Se observan folículos en diferentes etapas de crecimiento. En el frotis vaginal el tipo celular predominante son los leucocitos, aunque también se observan algunas células nucleadas (Hrabovszky *et. al.*, 2000) (figura 1).

Diestro 2: La concentración sérica de progesterona disminuye. Durante la tarde de este día, las concentraciones plasmáticas de FSH y LH se mantienen bajas, el estradiol comienzan a aumentar debido al estímulo de la enzima aromatasa inducido por la FSH en la célula de la granulosa (Gráfica 1). En el ovario se observan folículos pequeños, cuerpos lúteos viejos grandes, producto de ovulaciones anteriores. La citología vaginal muestra leucocitos y aparecen algunas células epiteliales nucleadas (Hrabovszky *et. al.*, 2000) (figura 1).

Proestro: En la mañana de este día se observa un aumento significativo en la concentración de estradiol, estímulo fundamental de la secreción de la GnRH que ocurre entre las 14:00 a 15:00 horas, lo que resulta en el aumento de la liberación de FSH, LH que ocurre en la tarde (17:00 a 19:00 horas) (Gráfica A).



Estas secreciones preovulatorias de las hormonas inducen la ovulación. Por la tarde-noche de esta fase del ciclo, aumenta la concentración de progesterona, lo que favorece la ovulación y facilita el comportamiento sexual, el celo y la copula en la noche de este día. Varios folículos maduran simultáneamente y alcanzan su tamaño máximo en este día del ciclo. En el frotis vaginal se observan predominantemente células epiteliales nucleadas y ocasionalmente escamas, sin la presencia de leucocitos (Hrabovszky *et. al.*, 2000) (Figura 1).

Estro: En las primeras horas del día ocurre la ovulación. La concentración de estradiol y progesterona en sangre se encuentran básicas, mientras que las de FSH muestran un segundo aumento en la mañana de este día, cuyo papel es el de reclutar a los folículos que ovularan en el siguiente ciclo (Gráfica 1). En el ovario se observan folículos de más de 1000 μm que no ovularon y que son atrésicos, así como cuerpos lúteos recién formados. En el frotis vaginal se observan predominantemente células epiteliales cornificadas y el útero incrementa su tamaño (Hrabovszky *et. al.*, 2000).

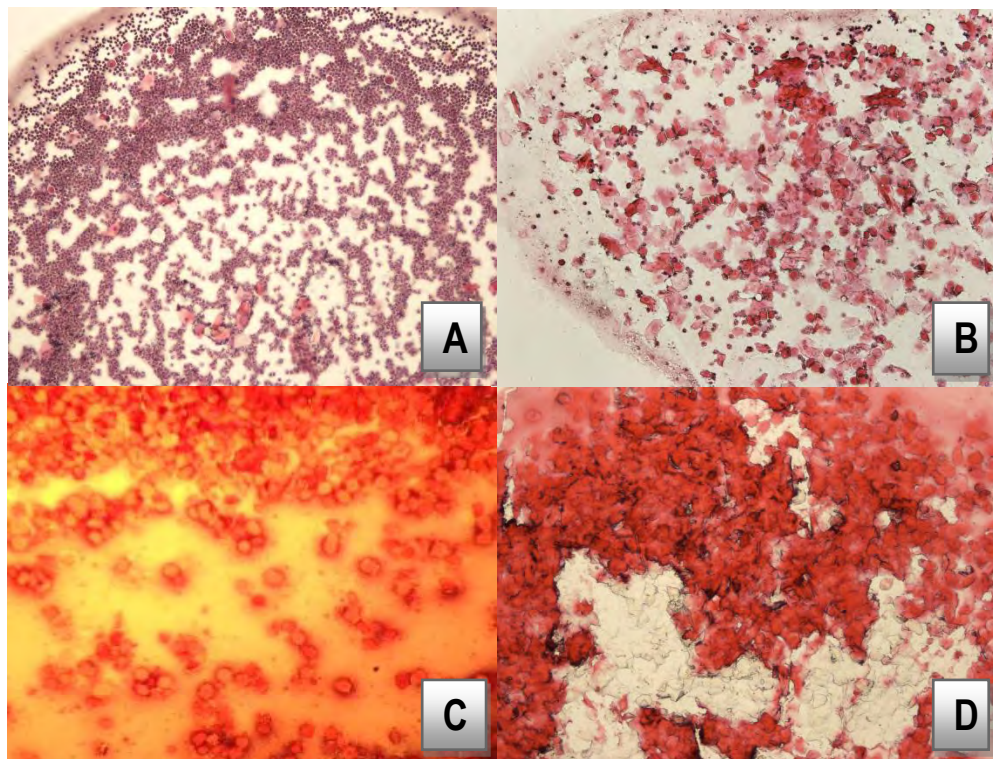
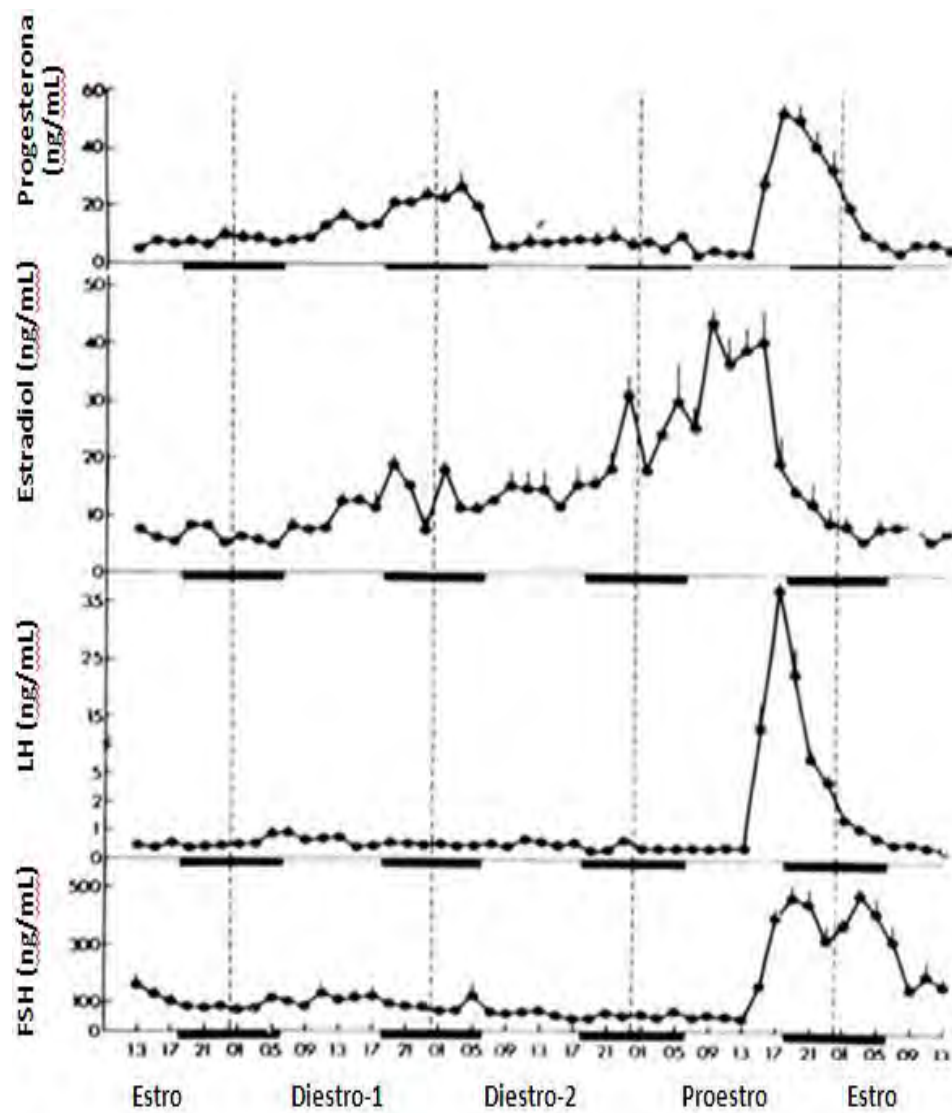


Figura 1. Diferentes tipos de células presentes en frotis vaginal de cada etapa del ciclo estral de la rata hembra. A) diestro 1 con una proporción igual entre leucocitos y células nucleadas 10X B) diestro 2 con predominio de leucocitos 10X C) proestro con predominantes células nucleadas 10X D) estro: contiene células cornificadas 20X



Gráfica A. Concentración de LH, FSH, progesterona, y estradiol obtenido del suero 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 (Tomado y modificado de Freeman 2004).



Hipotálamo

El hipotálamo es un componente filogenéticamente antiguo y estable del sistema nervioso central (SNC) y muestra pocos cambios durante la evolución de los mamíferos en su organización general en sus conexiones con otras áreas encefálicas (Palkovits 1979).

Es el encargado de integrar la información nerviosa proveniente del sistema nervioso autónomo, que a su vez envía y recoge información del sistema nervioso periférico que inerva a los diferentes órganos y tejidos. También realiza funciones de integración somato-vegetativa, regula la ingesta de agua, alimento, regula la temperatura corporal entre otras. En conjunto con la hipófisis, establece la homeostasis del organismo, por medio de un sistema de “retroalimentación” estimulante o inhibitorio (Palkovits 1979).

El *hipotálamo* se ubica ventral al tálamo y forma las paredes laterales de la porción ventral del tercer ventrículo. Su límite rostral, la lámina terminal, representa la unión igualmente mal definida entre el diencefalo y el telencefalo. Su límite más claro se ubica caudalmente, en el perímetro caudal del complejo mamilar, a nivel de la unión con el mesencefalo. Lateralmente el hipotálamo está delimitado por los surcos hipotalámicos, el haz medial del cerebro anterior es la vía principal por la cual todos los núcleos hipotalámicos mediales están interconectados con el resto del encéfalo. Las neuronas hipotalámicas se forman a partir de la porción ventral del diencefalo embrionario, predominantemente durante el segundo o tercer mes de la gestación humana y durante la segunda semana de la embriogénesis de los roedores (Palkovits 1979).

Hasta la fecha se considera que el hipotálamo libera alrededor de nueve neuro-hormonas que inhiben o estimulan la secreción de otras hormonas sintetizadas por la hipófisis (McGeer 1987).

Anatómicamente el hipotálamo generalmente es dividido en tres regiones o zonas principales, las zonas medial, lateral y periventricular (la última es inmediatamente medial al epéndimo del tercer ventrículo). La zona lateral puede ser considerada como el relevo donde se establecen conexiones que salen del hipotálamo y son recibidas desde las estructuras encefálicas más rostrales. Las zona medial y periventricular contienen la mayor parte de las estructuras y los sistemas de fibras relacionados con la regulación central del sistema endocrino. Aquí las neuronas muestran los grupos más firmemente apiñados de células nerviosas, denominados núcleos; además, las neuronas menos agrupadas y no tan bien demarcadas dentro del hipotálamo se denominan áreas (Figura 2) (Swanson 1987).

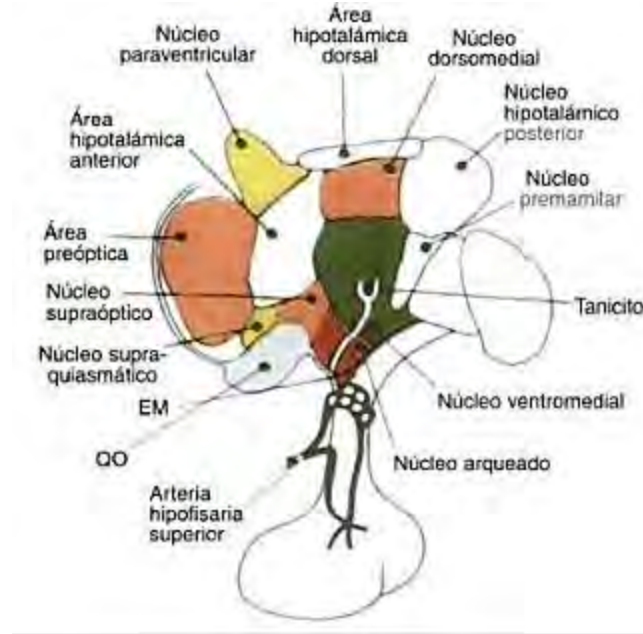


Figura 2. La organización nuclear del hipotálamo de humano se muestra esquemáticamente en el plano sagital tal como aparecería desde el tercer ventrículo. Lo rostr está a la izquierda y lo caudal a la derecha. La hipófisis se muestra ventralmente EM, eminencia media; QO quiasma óptico. (Tomado de Yen, 2011)

Hipotálamo anterior: incluye el *área preóptica* - funcionalmente se le considera parte del hipotálamo pero su origen embriológico es diferente, en la rata esta área ocupa una cuarta parte del total del hipotálamo-, el *área hipotalámica anterior*, el *núcleo supraquiasmático*, el *núcleo supraóptico* y el *núcleo paraventricular* (Swanson 1987).

Hipotálamo medio: incluye tres núcleos: ventromedial, dorsomedial y *arqueado ó arcuato* -localizado inmediatamente por encima de la eminencia media y adyacente al tercer ventrículo-. El área tuberal junto con el núcleo paraventricular contiene la mayor parte de las neuronas que producen las hormonas hipotalámicas que regulan la producción endocrina de la hipófisis anterior y por lo tanto puede ser considerada la zona *hipofisotrófica*. Se ha mostrado que a pesar del aislamiento quirúrgico de esta zona del resto del encéfalo, la mayor parte de los aspectos de la función hipofisaria se mantiene aunque se pierdan las influencias reguladoras impuestas normalmente por otras áreas encefálicas (Swanson, 1987).

Hipotálamo posterior: Caudal al área tuberal el área hipotalámica posterior contiene el complejo mamilar, el núcleo hipotalámico posterior, el núcleo supramamilar y el núcleo tuberomamilar. Con excepción del núcleo tuberomamilar, es poco probable que los otros núcleos de esta región participen de manera significativa en la regulación directa de la función endocrina (Swanson, 1987).



Las neuronas que inervan el hipotálamo están presente en todos los niveles del tronco encefálico, desde el bulbo caudal hasta el mesencéfalo rostral. Es probable que las conexiones eferentes más importantes sean las proyecciones de las neuronas hipotalámicas sobre la neurohipófisis, que incluye la eminencia media, el tallo infundibular y el lóbulo neuro-intermedio de la hipófisis. Este grupo consiste en el sistema neurosecretor magnocelular clásico, que se originan principalmente en las células de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular que producen las hormonas oxitocina y vasopresina. El sistema neurosecretor parvicelular (Swanson 1987; Szentagothai 1967), que surge fundamentalmente del hipotálamo medio basal, incluye dos componentes directamente relacionados con la reproducción: las neuronas que sintetizan la GnRH y las neuronas dopaminérgicas tubero-hipofisarias (Szentagothai, 1967; Swanson, 1987).

GnRH y neuronas GnRHérgicas

La GnRH identificada en los mamíferos es un neuropéptido constituido por diez aminoácidos cuya secuencia es la siguiente (Ulloa-Aguirre; Matsuo *et. al.*1971):



La secuencia del gen de la GnRH fue aislada por primera vez en 1984 a partir de una biblioteca de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico humano (Seeburg-Adelman, 1987).

El análisis de la secuencia de nucleótidos de ARNm revela que el decapeptido GnRH deriva del procesamiento postraduccional de una gran molécula precursora, la preproGnRH (Figura 3). La preproGnRH consiste en 92 aminoácidos con una estructura tripartita; el decapeptido es precedido por un péptido señal de 23 aminoácidos y seguido por una secuencia Gly-Lys-Arg (posiciones 11 a la 13) esencial para el procesamiento proteolítico y la amidación del C terminal de las moléculas de GnRH. El último residuo de 56 aminoácidos se conoce como péptido asociado con la GnRH (GAP), el que puede tener propiedades inhibitoras de la prolactina. La GnRH es codificada a partir de un gen único localizado sobre el brazo corto del cromosoma 8. El gen humano contiene cuatro exones: el exón 2 codifica la proGnRH, el exón 3 y una parte del exón 2 y el exón 4 codifican la proteína GAP y una larga región 3' no traducida también es codificada en el exón 4. El ARNm de la proGnRH placentaria es más largo que el ARNm de la proGnRH hipotalámica debido la codificación de un intrón de 900 pares de bases codificado que puede modificar a los promotores específicos de tejido o ser regulado por ellos (Seeburg-Mason 1987).

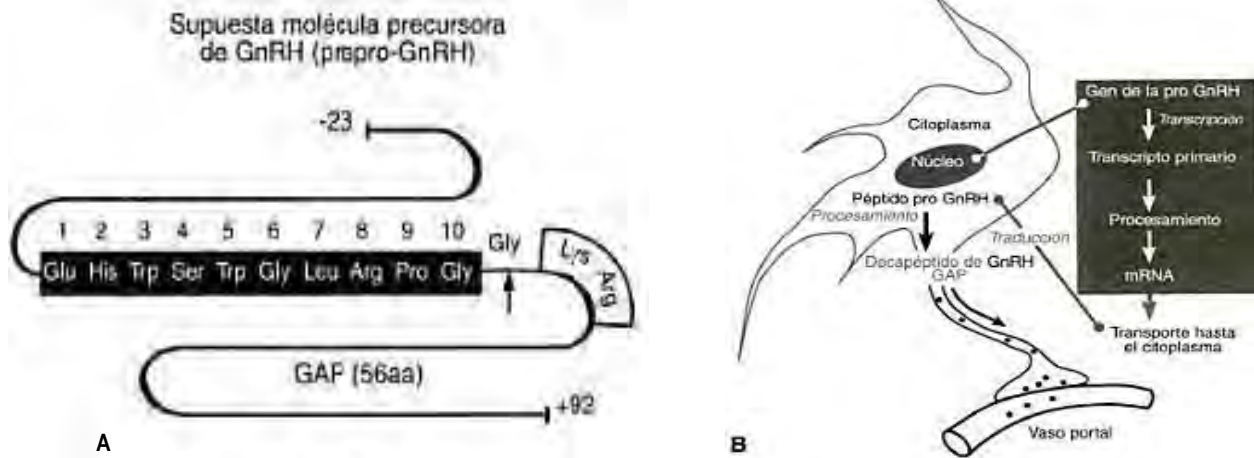


Figura 3. A Gen de la GnRH y procesamiento de pre-pro-GnRH. Representación esquemática de la estructura y secuencia de 92 aminoácidos de pre-pro-GnRH. El decapeptido (aminoácido 1 a 10) ocupa el lugar intermedio entre el péptido señal y la secuencia Gly-Lys-Arg. La flecha indica el sitio de procesamiento proteolítico y la amidación 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 después de la traducción. Un mayor procesamiento conduce a la generación del decapeptido GnRH y del péptido asociado con GnRH (GAP). Luego la GnRH y el GAP son transportados hasta las terminales nerviosas y secretados en tándem en la circulación portáti (Tomado de Yen, 2011).

En los mamíferos se han identificado dos genes que codifican para la síntesis de la GnRH (Sherwood et al., 1993, Urbanski et al., 1999;). El primer gen codifica una proteína precursora de 92 aminoácidos, conocida como GnRH-I; ésta es la que se encuentra en las neuronas hipotalámicas (Urbanski et al., 1999). El segundo gen de la GnRH, codifica para la GnRH-II, este decapeptido difiere del primero en tres aminoácidos (el número 5, 7 y 8): $pGlu^1-His^2-Trp^3-Ser^4-His^5-Gly^6-Trp^7-Tyr^8-Pro^9-Gly-NH_2$ (Pawson et al., 2003). Esta última forma de GnRH se encuentra en el mesencéfalo, y actúa más como neurotransmisor que como factor de liberación hipotalámico

Por medio de estudios filogenéticos se ha mostrado que la GnRH es una molécula muy antigua y que durante la evolución, a partir de un gen ancestral común, se derivaron distintas formas moleculares. Hasta hoy se han descubierto 15 formas moleculares de la GnRH (Montaner et al., 2001).



Tanto la GnRH-I como la GnRH-II se encuentran en especies filogenéticamente diferentes, desde los peces hasta los mamíferos, lo que sugiere que estas formas múltiples de la GnRH se separaron desde las primitivas fases de la evolución de los vertebrados (Fernald y White, 1999).

El gen que codifica la GnRH-I ha sido aislado originalmente en mamíferos. La forma de GnRH-II fue aislada originalmente del cerebro de gallina y junto con la GnRH-I regulan la liberación de las gonadotropinas en las aves. Al parecer, la GnRH-II es la isoforma más antigua identificada hasta hoy y la más común entre los vertebrados (Montaner *et al.*, 2001).

Distribución Anatómica de las Neuronas GnRHérgicas

Las neuronas que producen GnRH, tienen su origen embrionario fuera del sistema nervioso central, y derivan de la placoda olfatoria; dichas neuronas migran hacia el hipotálamo, junto con o como parte del nervio terminal a través de la lámina cribiforme. En humanos, defectos en la migración de estas neuronas resultan en una deficiencia de GnRH asociada con la ausencia del bulbo olfatorio, la principal alteración endocrina es una alteración en la secreción de la LH, lo que resulta una deficiencia del desarrollo de los gonadotropos de la pituitaria e incapacidad para sintetizar LH y FSH. El decapeptido GnRH en la rata adulta, es producido por un número relativamente pequeño de neuronas, las que se encuentran dispersas en el complejo de la banda diagonal-septo medial y el hipotálamo rostral. En el hipotálamo, neuronas parvicelulares neurosecretoras de GnRH se encuentran en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular, el paraventricular y el área preóptica. De estas zonas la GnRH es transportada a la eminencia media y liberada al sistema portal hipotálamo-hipofisiario, preferentemente en el surco infundibular (Jennes *et al.*, 1997).

El sistema neuronal de GnRH ha sido mapeado en detalle mediante el empleo de métodos inmuno-citoquímicos. Las neuronas de GnRH no están agrupadas en núcleos distintos sino que se presentan como redes laxas dispersas a través de varias divisiones anatómicas. La población de neuronas de GnRH es relativamente limitada (se encuentra en el espectro de 1,000 a 3,000). Existen diferencias considerables en la distribución de estas neuronas entre las especies de mamíferos. En los primates, incluidos los seres humanos, las neuronas de GnRH están localizadas principalmente en el núcleo arqueado del hipotálamo basal medial y el área preóptica del hipotálamo anterior (Barry 1975), mientras que en los roedores se han detectado pocas neuronas de GnRH en el núcleo arqueado. La red más sobresaliente en el roedor está compuesta por neuronas que forman un continuo laxo de la vía septo-preóptica-infundibular. Los axones de las neuronas de GnRH se

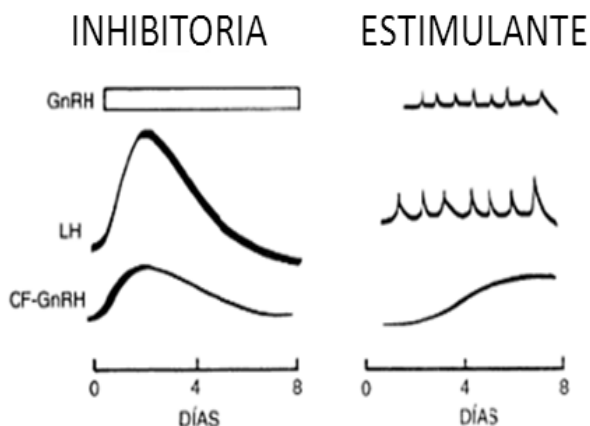


proyectan hacia muchos sitios en el interior del encéfalo. Una de las proyecciones más características va desde el hipotálamo basal medial hasta la eminencia media, que termina en un plexo extenso de botones sobre el vaso portal primario, el cual envía GnRH a su célula blanco, el gonadotropo (Silverman 1987).

Patrón de secreción

Gracias a la medición secuencial frecuente de las hormonas plasmáticas hoy se sabe que la mayor parte de las hormonas son secretadas en forma episódica (ritmo ultradiano), que varias de ellas tienen una ritmicidad circadiana sobresaliente, que algunas están vinculadas con el ciclo sueño-vigilia y que otras están sincronizadas con la ingesta de alimentos y el ciclo oscuridad-luz (Aschoff 1980; Ishyuka *et al.*, 1983).

En la actualidad se sabe que la naturaleza pulsátil de la liberación hipotalámica de GnRH determina la secreción episódica de gonadotropinas hipofisarias. La periodicidad y la amplitud del ritmo pulsátil de secreción de GnRH/ gonadotropinas son fundamentales para regular las actividades gonadales y, por lo tanto, todo el eje reproductivo. Los atributos del efecto de auto-estimulación de la GnRH sobre sus receptores en el gonadotropo solo se expresan en la periodicidad fisiológica (60 a 90 minutos) que estimula la síntesis de los receptores de GnRH; una frecuencia más lenta produce anovulación y amenorrea y una frecuencia más alta o la exposición constante a GnRH induce respuestas refractarias a las gonadotropinas que conducen a un estado de regulación inhibitoria (Gráfica 2).



Gráfica 2.- Representación esquemática de la regulación inhibitoria y de la regulación estimulante de la secreción de LH (hormona luteinizante) con la administración de GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas) de modo continuo y de modo pulsátil, respectivamente. La capacidad fijadora de la GnRH (CF-GnRH) representa la base de la regulación en menos y la regulación en más de la liberación de gonadotropinas.

Hipófisis

La hipófisis se encuentra en la base del cerebro alojada en el esfenoides y cubierta por la duramadre (Fink, 2000). Está unida al hipotálamo por el tallo hipofisario el cual contiene el sistema porta-hipofisario de vasos sanguíneos. Es un órgano complejo dividido en tres partes: lóbulo anterior, 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 (Figura 4) (Arimura, 2000).

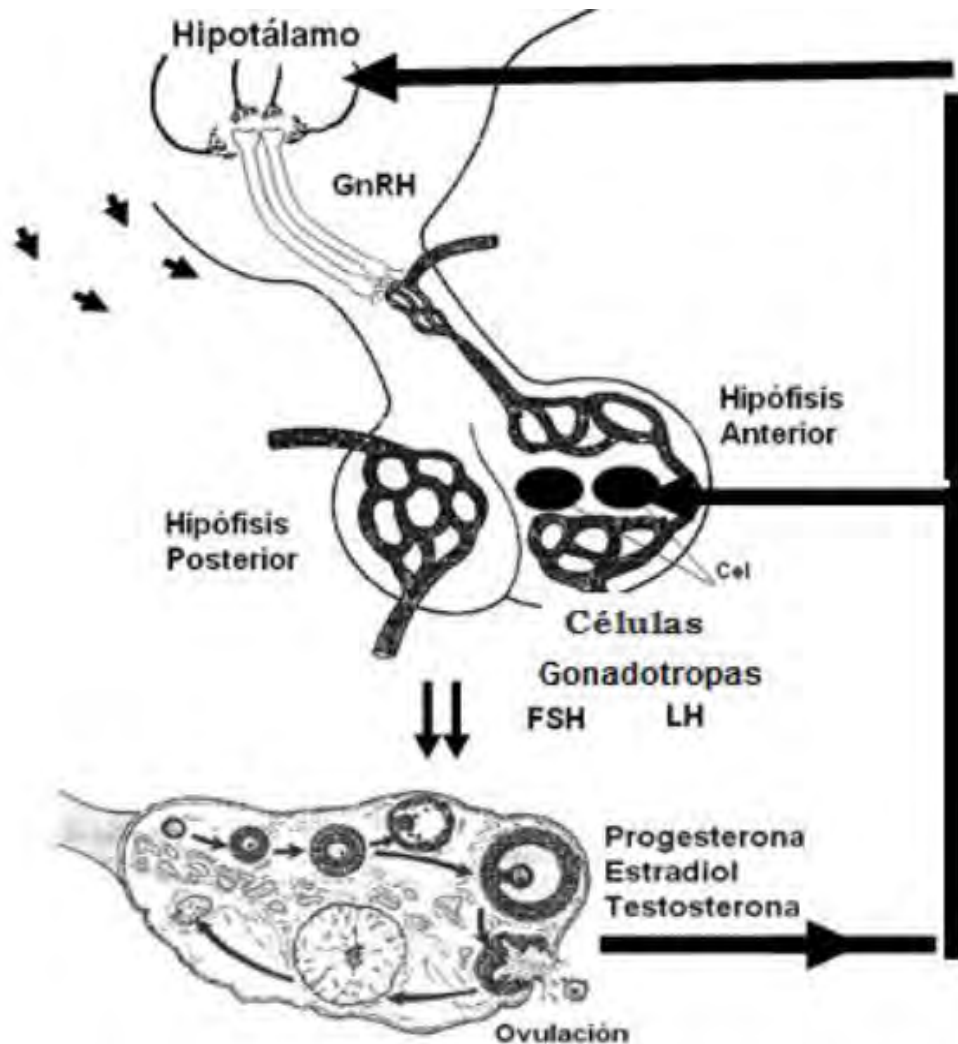


Figura 4. Eje hipotálamo-hipófisis- ovario. En el hipotálamo se secreta la GnRH, la que actúa en la hipófisis estimulando la secreción de las gonadotropinas FSH (hormona folículo estimulante) y la LH (hormona luteinizante), llegando a los ovarios donde se estimula la secreción de progesterona, testosterona y estradiol, así como el crecimiento y la diferenciación de los folículos y la ovulación (Tomada de Berne y Levy, 1992).



La hipófisis secreta diferentes hormonas: la hormona del crecimiento (GH), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormonas Luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), la prolactina (PRL), la tirotropina (TSH), la hormona estimulante de los melanocitos o melanotropina (MSH), oxitocina y vasopresina (Brown, 1994).

Las hormonas hipofisarias se liberan a la circulación y estimulan la secreción hormonal en sus órganos blancos. La FSH y LH estimulan las funciones de los ovarios (liberar ovocitos capaz de ser fecundados y secretar las hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor) y su secreción se ve influenciada por la concentración de hormonas esteroides y el patrón de secreción de la GnRH entre otros (Brown, 1994; Arimura, 2000; Guyton *et al.*, 2001).

Una vez sintetizado la GnRH, es transportada en la vesícula hasta la terminal sináptica que finaliza en la eminencia media, y ahí es liberado en los vasos del sistema porta hipotalámico-hipofisario. La liberación de ésta hormona se realiza por exocitosis en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de los canales de Ca^{+2} dependientes del voltaje (Sitges, 1993). 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 (Figura 5) (Charli *et al.*, 1991).

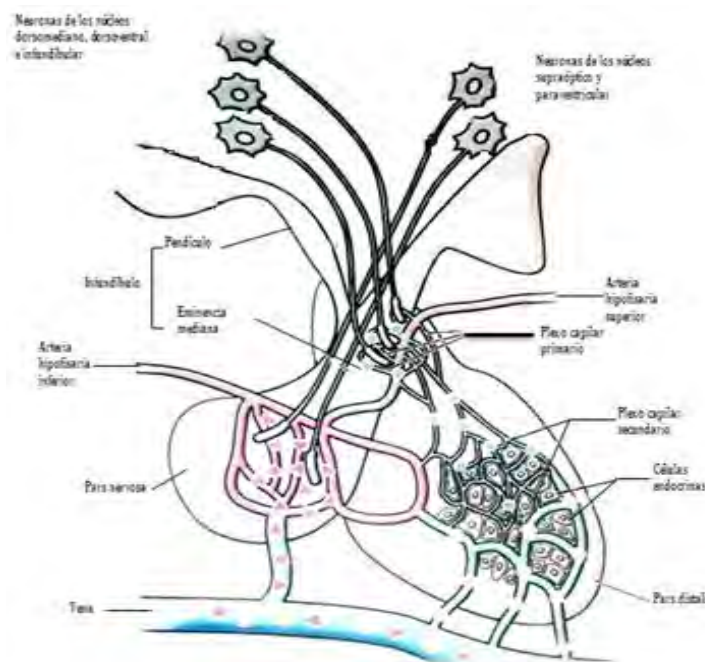


Figura 5. Sistema portal hipotálamo-hipofisario (Tomado de Snell, 1976).



LH Y FSH

La LH y la FSH han sido aisladas de la glándula hipófisis anterior de muchas especies, entre ellas la especie humana, roedores, ganado vacuno, cerdos, caballos, anfibios, peces y varios otros vertebrados. Ambas hormonas han sido purificadas mediante el empleo de ácido etílico y su precipitación con etanol, seguido de intercambios iónicos y la exclusión por cromatografía. La cantidad de LH y FSH es relativamente baja en comparación con la cantidad de hormona del crecimiento; una prueba de ello es que de 1,000 glándulas humanas se aislaron aproximadamente 70 mg de LH, 20 mg de FSH y 5,000 mg de hormona del crecimiento. A un pH bajo las hormonas intactas pueden disociarse y luego las subunidades α y β pueden ser aisladas y purificadas por medio de técnicas de cromatografía. Los tamaños moleculares de la LH y la FSH son de alrededor de 28,000 y 33,000 daltons, respectivamente; el tamaño molecular de la subunidad α común es de aproximadamente 14,000 daltons (Yen *et al.*, 2001).

El análisis de la respuesta de las gonadotropinas hipofisarias a las infusiones de GnRH han aportado información adicional acerca del almacenamiento y la secreción de estas hormonas. Las infusiones constantes de GnRH producen un perfil bifásico de la concentración de LH en plasma, similar a la liberación de otras hormonas almacenadas en gránulos. Estos hallazgos sugirieron la existencia de dos pools de LH en la hipófisis humana. La liberación bifásica de LH, que se observa durante la infusión de GnRH tanto en hombres como en mujeres y en pacientes con hipo-gonadismo, parece ser influida por los esteroides gonadales. La liberación inicial de LH alcanza un “pico” a los 30 minutos y la segunda elevación comienza después de 90 minutos y continúa aumentando durante 4 horas. La magnitud de la segunda respuesta es potenciada por el estradiol, mientras que la progesterona incrementa tanto la respuesta temprana como la tardía después del tratamiento con estrógenos (Yen *et al.*, 2001).

Estas observaciones sugirieron la existencia de un “pool” de LH preformada que es rápidamente liberada por la GnRH y que puede ser el origen de la LH liberada durante el patrón pulsátil de LH que ocurre en los hombres y las mujeres normales, así como en las personas con trastornos del hipotálamo, la hipófisis o las gónadas. Es posible que el “pool temprano” que se observa durante la infusión de GnRH representa el reclutamiento de gránulos en la proximidad de la membrana celular del gonadotropos y que los “picos” episódicos de LH plasmático, representen la misma respuesta a los pulsos endógenos de GnRH procedente del hipotálamo. Estos hallazgos son compatibles con observaciones *in vitro* que indican que la liberación inicial de LH en respuesta a la GnRH no requiere síntesis proteica (Yen *et al.*, 2001).



El segundo “pool” representa la liberación más coordinada de la población de gránulos desde los gonadotropos junto con la estimulación de la síntesis. La magnitud del segundo “pool” (o reserva) se incrementa marcadamente durante la fase folicular, un cambio que puede ser reproducido por el tratamiento con estradiol. Este incremento en la cantidad de LH liberada desde la hipófisis durante la infusión de GnRH, se correlaciona bien con el aumento del contenido hipofisario de LH observado en el momento de la ovulación. A diferencia de la respuesta bifásica la LH plasmática durante la infusión de GnRH, sólo produce un aumento progresivo único de la FSH plasmática. La ausencia de una respuesta temprana de la FSH plasmática podría reflejar la falta de un pool de FSH liberable en forma aguda como una población de gránulos en los gonadotropos o la necesidad de estimulación por parte de un factor liberado de FSH más específico que evoque la liberación de un pool temprano. La segunda posibilidad es favorecida por el desarrollo frecuente de la liberación aguda de FSH en forma de “espigas” sincrónicas con las de la LH y por las elevaciones más marcadas de la FSH plasmática que de la LH que se observan en los pacientes con hipo-gonadismo (Yen *et al.*, 2001).

Un pulso con alta frecuencia de GnRH (intervalos de 30 minutos) estimulan preferencialmente síntesis de la cadena α de las gonadotropinas (GSU α) y la biosíntesis y secreción de la LH, mientras un pulso de baja frecuencia de GnRH (intervalos de 2 horas) estimulan la biosíntesis y secreción de la FSH (Yen *et al.*, 2001).

Ovario

Los ovarios están localizados en la región abdominal, están unidos a la pared posterior del ligamento ancho mediante un pliegue peritoneal llamado mesovario. Los nervios, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos atraviesan el mesovario y penetran en el ovario a través del hilio (Domínguez *et al.*, 1991; Yao y Bahr, 1999). Además de liberar ovocitos capaces de ser fecundados, secretan hormonas proteicas, peptídicas y esteroides (Domínguez *et al.*, 1991).

La superficie del ovario está cubierta por un epitelio simple cúbico o cilíndrico, por debajo del cual se observa una capa de tejido conectivo; fibroso, de poco espesor denominada túnica albugínea. El estroma, ocupa toda la estructura del ovario que rodea a los folículos, el cuerpo lúteo y la glándula intersticial. En la parte central de estroma, se distingue la médula, constituida por tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. La médula se encuentra rodeada por la corteza, que contiene folículos ováricos y cuerpos lúteos (Yao y Bahr, 1999; Colantouni y Santangelo 2005).



Las funciones primordiales del ovario son liberar ovocitos capaz de ser fecundados y secretar las hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor. El folículo ovárico es la unidad anatómico-funcional del ovario, a partir de la cual se originan los tres compartimientos del órgano: el folicular, el luteal y el intersticial (Figura 6) (Yen *et al.*, 2001).

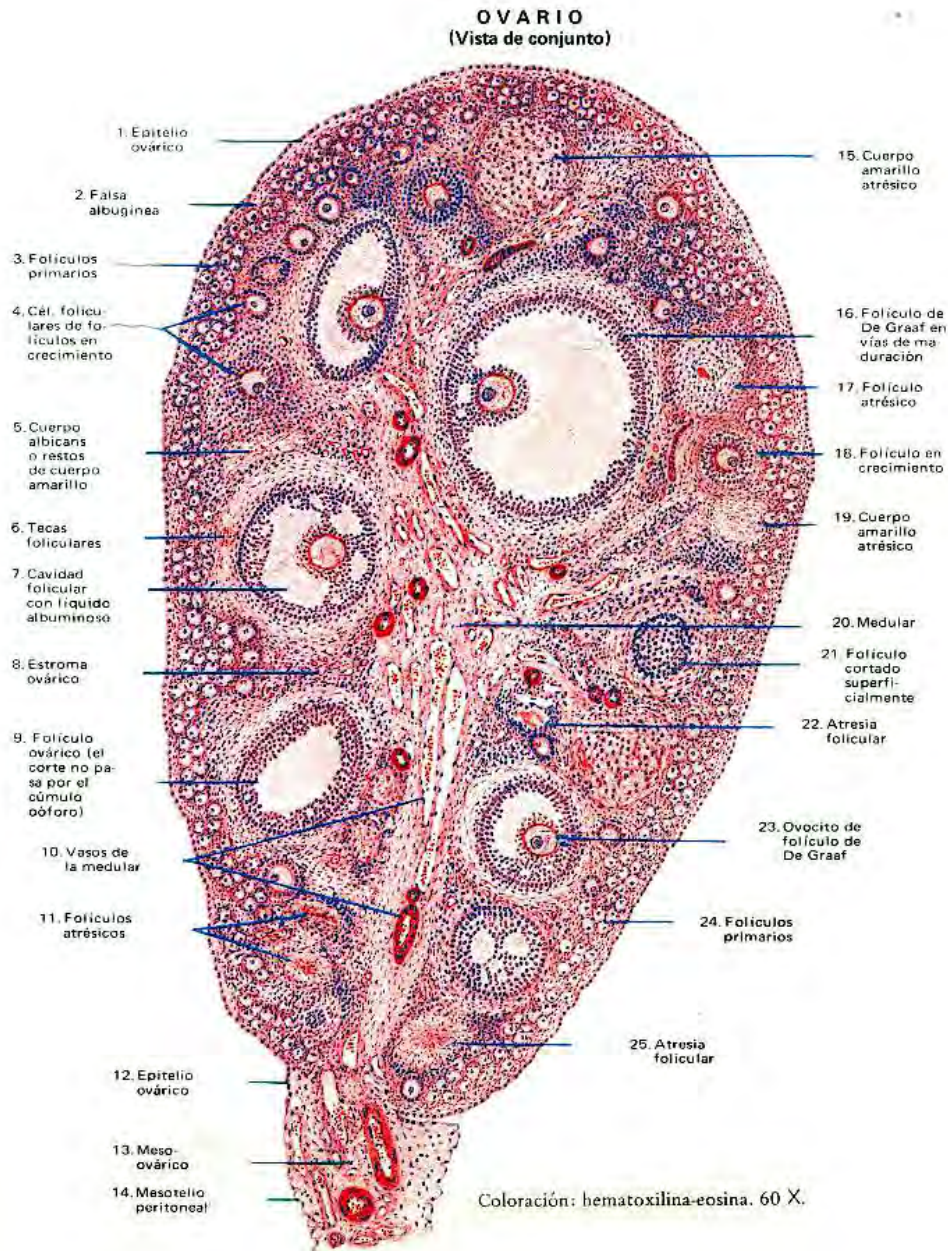


Figura 6. Ovario donde se observa el compartimento folicular, luteal e intersticial (tomado de



Hormonas esteroideas

Los esteroides son moléculas primordiales que han surgido como resultado de la especialización de los órganos blanco y no como el resultado de la evolución de los esteroides. Forman una subclase de lípidos caracterizados por una estructura esquelética básica de cuatro anillos fusionados denominada perhidro-ciclo-pentano-fenantreno (Figura 7) (Van Voorhis, 1999).

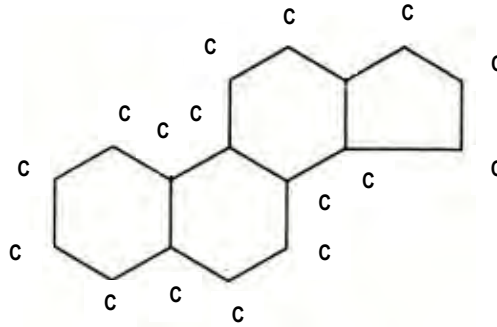


Figura 7. Estructura del anillo perhidro-ciclo-pentano-fenantreno.

Las hormonas esteroideas son sustancias solubles en grasas, que tienen bajo peso molecular y participan en diversas funciones: estimulan el desarrollo folicular, la ovulación, regulan la presión sanguínea, reabsorben sodio, estimulan la supervivencia de las células nerviosas, etc. (Hut *et al.*, 2010). Tienen como órgano blanco el sistema reproductor, el sistema nervioso central, el músculo esquelético y el cardiovascular (Van Voorhis, 1999; Hut *et al.*, 2010).

Hay cinco tipos de hormonas esteroideas: andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides (Van Voorhis, 1999; Yoshinaga, 1999; Hu *et al.*, 2010).

Los compartimientos del ovario sintetizan tres tipos de esteroides: las progestinas que son moléculas formadas por 21 carbonos, como la pregnenolona, 17-hidroxi-progesterona y la progesterona, que en el ovario son secretadas por el cuerpo lúteo y los folículos antrales y preovulatorios. Los andrógenos poseen 19 átomos de carbono y los más importantes son la androstenediona, la testosterona. Los estrógenos que son moléculas de 18 átomos de carbono como la estrona y el 17 β -estradiol (Van Voorhis, 1999; Yoshinaga, 1999; Hu *et al.*, 2010).



Las hormonas tróficas como la LH, FSH o ACTH regulan el proceso de esteroidogénesis mediante la unión a sus receptores localizados en la membrana celular acoplados a proteínas G (Hut *et al.*, 2010).

Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es la capacidad biológica de un órgano para sintetizar hormonas esteroideas, tales como las células de la corteza adrenal, los testículos, los ovarios, el tejido adiposo, la placenta y el cerebro (en el que se conocen como neuroesteroides (Van Voorhis, 1999; Yoshinaga, 1999; Hu *et al.*, 2010).

El colesterol (*chole*, bilis y *stereos*, sólido) es producido por la condensación de dos pirofosfatos de farnesilo (6 unidades isopreno) para formar escualeno, un compuesto con 30 átomos de carbono (Van Voorhis, 1999).

La síntesis del colesterol a partir del escualeno, así como la conversión del colesterol en hormonas esteroideas, implica reacciones de hidroxilación que necesitan la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y oxígeno molecular, reacciones llevadas a cabo por el citocromo P450 monooxigenasas específicas u oxidasas de función mixta (el 50% del oxígeno es reducido a H₂O). La etapa inicial en la biosíntesis de los esteroides es la conversión del colesterol en el compuesto C21 pregnenolona, con pérdida de un fragmento de 6 carbonos. Este paso comprende dos hidroxilaciones antes de la segmentación, está mediado por un único citocromo P450 denominado segmentación de la cadena lateral del colesterol o P450_{scc} y tiene lugar en el interior de las mitocondrias de las células capaces de iniciar la esteroidogénesis (Van Voorhis, 1999).

En la glándula suprarrenal y la gónada el paso regulado en la respuesta esteroidogénica rápida a un inductor, es la traslocación del colesterol desde la membrana mitocondrial externa hasta la membrana interna donde se localiza el sistema enzimático de segmentación de la cadena lateral del colesterol. La transferencia intramitocondrial de colesterol requiere una proteína de recambio rápido, identificada recientemente como una fosfoproteína de 30 kDa designada proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). La síntesis de las hormonas esteroideas comprende hasta cinco hidroxilasas deferentes, dos deshidrogenasas, una reductasa y una aromatasa (Van Voorhis, 1999).

El ovario fetal humano no es inactivo con respecto a la síntesis de estrógenos. Se ha demostrado que el ovario fetal humano no solo puede realizar la segmentación de la cadena lateral de colesterol, sino que también tiene actividad de la 17 α -hidroxilasa y 17,20-desmolasa (Van Voorhis, 1999).



Se ha comparado el contenido de hormonas esteroides entre la vena ovárica eferente y los vasos periféricos, con la finalidad de distinguir entre los esteroides secretados por el ovario y aquéllos producidos por las suprarrenales o por conversión periférica de precursores. Estos estudios han revelado que los ovarios secretan pregnenolona, progesterona, 17α -hidroxi-progesterona, estrona y 17β -estradiol (Van Voorhis, 1999).

La progesterona y la 17α -hidroxi-progesterona han sido encontrados en mayor proporción en el cuerpo lúteo. Mediante precursores esteroides se ha mostrado que la célula de la granulosa aislada es capaz de producir estrógenos y progesterona, además de 17α -hidroxi-progesterona. Por el contrario, la célula de la teca aislada sintetiza progesterona, 17α -hidroxiprogesterona y androstenodiona (Yen *et al.*, 2001).

El citocromo P450_{scc} cataliza tres reacciones diferentes para dicha conversión: la 20α -hidroxilación, la 22 hidroxilación y la escisión del carbono 20 , 22 . Este complejo enzimático está localizado en la membrana interna mitocondrial (Devlin, 1989; Hicks, 2007; Hut *et al.*, 2010; Köhm, 2004; Van Voorhis, 1999).

A partir de la pregnenolona se pueden seguir dos vías enzimáticas diferentes: la ruta Δ^4 y la ruta Δ^5 . La síntesis de progesterona se da por la ruta Δ^4 y es la enzima 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3β -HSD) la encargada de sintetizarla a partir de la pregnenolona. Esta enzima está localizada en el retículo endoplásmico (Figura 8) (Devlin 1989; Hicks, 2007; Hut *et al.*, 2010; Koolman y Röhm, 2004; Van Voorhis, 1999).

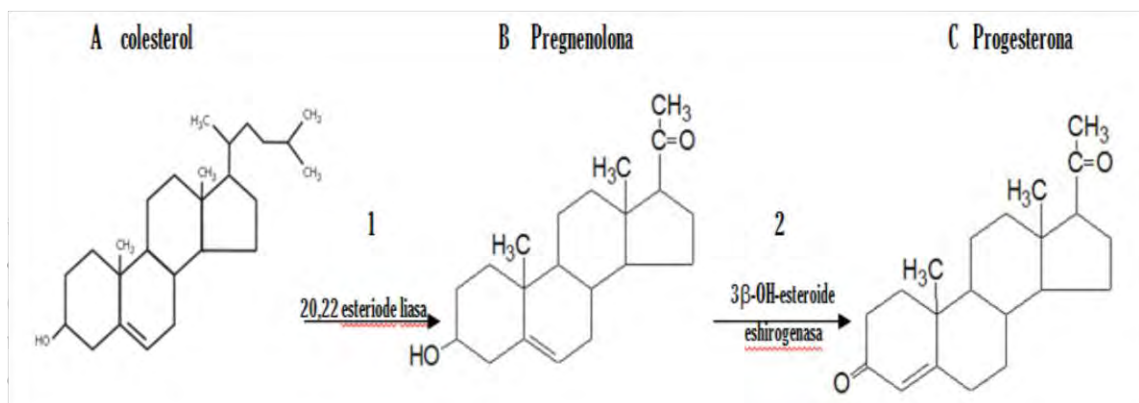


Figura 8. Biosíntesis de la P4. A biotransformación de colesterol a P4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) pérdida de un fragmento de seis átomos de la cadena lateral en el C-17 por medio de la enzima $20, 22$ esteroide liasa (1), b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3 por medio de la enzima 3β -OH-esteroide deshidrogenasa (2) y c) la migración del doble enlace del anillo B al anillo A.1) (Gore-Langton, 1988).



En la ruta Δ^4 la progesterona es hidroxilada en el carbono 17, por acción de la enzima P450c17 convirtiéndola en 17 α -hidroxi-progesterona, que al ser de nuevo hidroxilada formará androstenediona. En la ruta Δ^5 la pregnenolona es hidroxilada por la enzima P450c₁₇ que la transforma a 17 α -hidroxi-pregnenolona y posteriormente dehidro-epiandrosterona (DHEA). La DHEA forma androstenediona cuando actúa en ella la enzima 3 β -HSD. Todas estas enzimas se encuentran localizadas en el retículo endoplásmico (Devlin, 1989; Hicks, 2007; Hut *et al.*, 2010; Koolman y Röhm, 2004; Van Voorhis, 1999).

La fase final en la síntesis de andrógenos es la formación de testosterona que puede tener dos orígenes diferentes. El primero es a partir de la androstenediona formada por ambas rutas enzimáticas y en la cual participa la enzima 3 β -HSD para su formación. El segundo de ellos es a partir de la DHEA formada en la vía Δ^5 y en la cual actúa la enzima 3-cetoesteroide Δ^4 - Δ^5 isomerasa para formar androstenediol que finalmente formará testosterona por acción también de la 3 β -HSD (Devlin, 1989; Hut *et al.*, 2010; Koolman y Röhm, 2004; Van Voorhis, 1999).

En la rata, la androstenediona es el principal andrógeno y es el precursor en la síntesis de estrógenos, además, ejerce una acción trófica sobre el cuerpo lúteo y determina el camino hacia la atresia de los folículos ováricos (Orozco *et al.*, 2010).

La enzima aromatasa P450 forma a la estrona a partir de la androstenediona o bien la convierte de testosterona a estradiol. Esta enzima está localizada en el retículo endoplásmico (Van Voorhis, 1999).

La síntesis de estrógenos en los ovarios es regulada por la acción de las gonadotropinas (Figura 9) (Domínguez, 1991; Yen *et al.*, 2001; Yoshinaga, 1999).

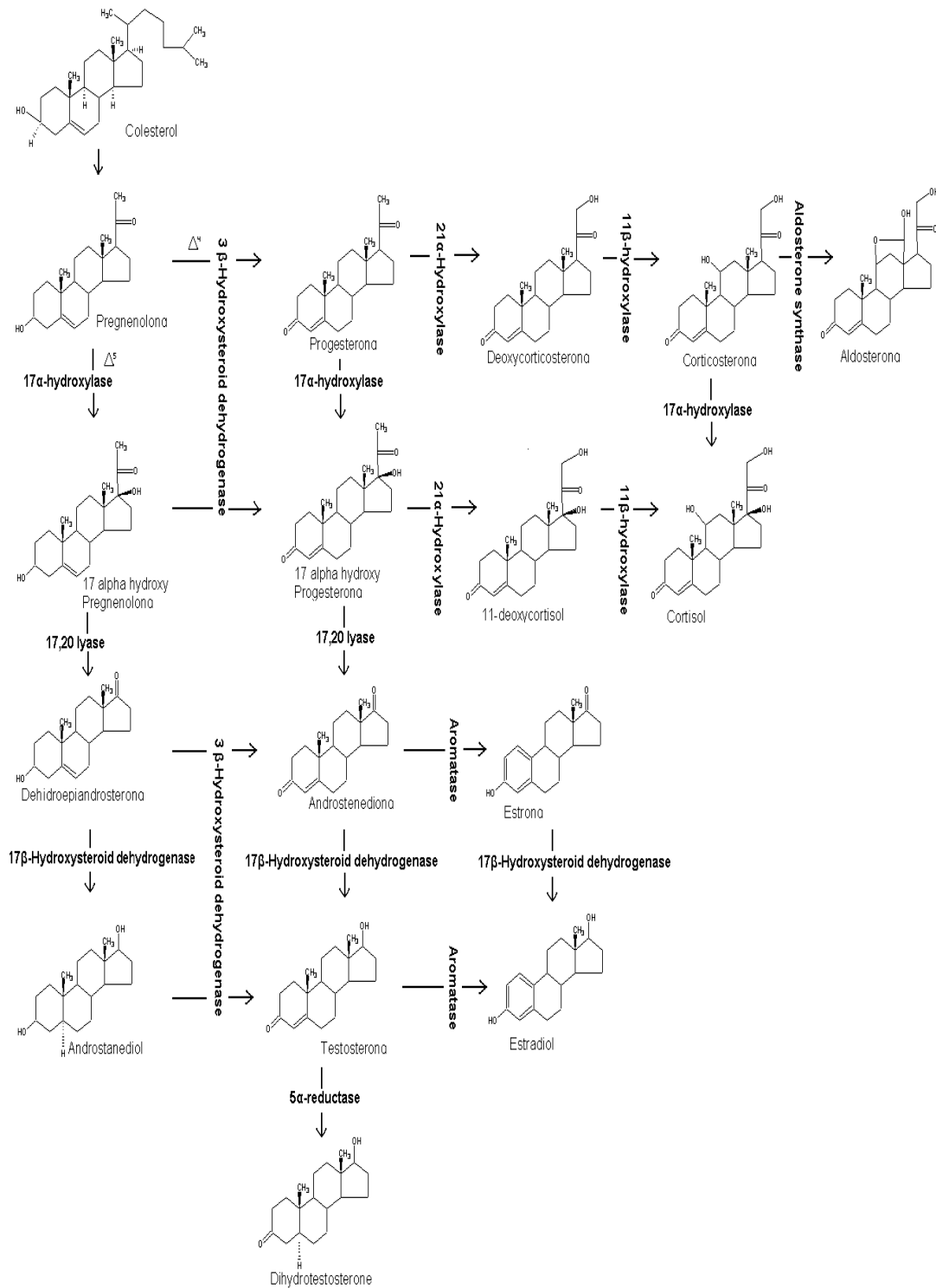


Figura 9. Principal vía biosintética de los esteroides ováricos (modificado de Sánchez, 2003).

Teoría de la doble célula-doble hormona

La esteroidogénesis en los folículos ováricos es realizada por las células de la teca interna y las de la granulosa. En las células de la teca, la LH se une a un receptor en la superficie celular, estimula la expresión de las enzimas necesarias para la producción de andrógenos. El colesterol es llevado dentro de la mitocondria por la StAR, donde se convierte en pregnenolona por medio de la (P450_{sc}). La pregnenolona es llevada al retículo endoplásmico liso y convertida en progesterona por la 3 β -HSD y convertida en androstenediona por la 17 α -hidroxilasa. Mientras que en las células de la granulosa, la FSH a través del receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR), estimula la expresión de las enzimas necesarias para la síntesis de estrógenos. La androstenediona producida por las células de la teca entra a las células de la granulosa y es convertida en testosterona por medio de la 17 β -HSD o en estrona por la P450_{arom}. Este proceso fisiológico se conoce como la teoría de la doble célula (Figura 10) (Yao y Bahr 1999).

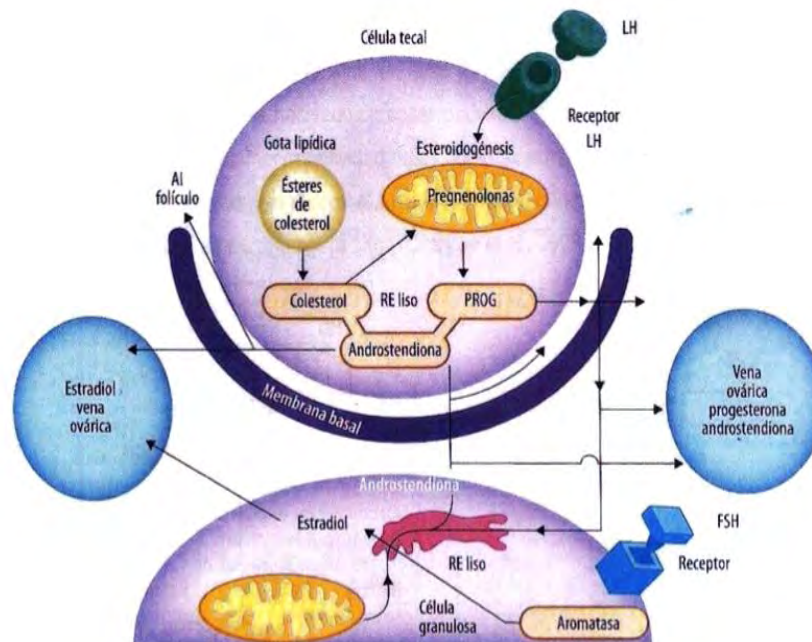


Figura 10.- Teoría de la doble célula-doble hormona. La unión de la LH a su receptor localizado en las células tecales estimula la actividad del AMPc y la actividad enzimática que convierte el colesterol en androstenediona, la cual atraviesa la membrana basal para llegar a las células de la granulosa, en donde la FSH se une a sus receptores, que estimulan la actividad enzimática de la aromatasa, encargada de convertirla androstenediona en estradiol (Tomada de Tresguerres, 2010).

Receptores a estrógenos

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la “súper familia de receptores nucleares”, incluye a otros receptores de hormonas esteroides (Evans 1988).

El RE fue identificado hace aproximadamente 40 años por Jensen y Jacob (1962). Ellos describieron la presencia de sitios de unión a estrógenos en diferentes tejidos de ratas. Cuatro años más tarde, Tofk y Gorski (1966), aislaron por primera vez RE del útero de rata, el cual llamaron receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$). En 1996, Kuiper et al, clonaron un ácido desoxi-ribonucleico complementario (ADNc) del receptor a estrógenos en la próstata de rata, el cual denominaron receptor a estrógenos beta ($RE\beta$).

El $RE\alpha$ está organizado en 6 dominios denominados por letras de la A a la F (Figura 11). En la región A/B localizada en el lado amino terminal de la proteína, es la menos conservada entre los distintos receptores nucleares. Contiene una función de activación de la transcripción genética (Activation Function 1 o AF-1) y varios sitios de fosforilación, los cuales son muy importantes para la activación de la proteína, especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona (Figura 13) (Rollerova, 2000).

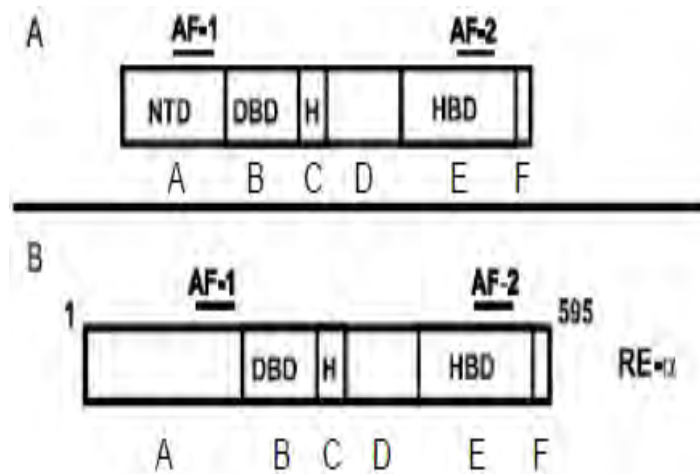


Figura 11. Estructura general de los receptores de hormonas esteroides. A. Esquema de la estructura compartida por los receptores de hormonas esteroides: HBD dominio carboxi-terminal de unión al ligando, DBD dominio de unión al ADN, región bisagra (H) y un dominio aminoterminal NTD, de secuencia muy variable. Presentan además 2 funciones activadoras (AF) AF-1 y AF-2. B Estructura del receptor de estrógenos $RE\alpha$ de 595 aminoácidos (Bottino y Lanari, 2010).



Inmediatamente se encuentra la región de unión al ADN o dominio C, es la zona más conservada entre los diferentes receptores nucleares constituida por 9 residuos de cisteínas que son conservados entre los receptores esteroides, de los cuales, 8 están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar 2 dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de zinc llamada la caja P (P-box) (Freeman, 2006).

La región D o de bisagra no ha sido bien caracterizada, 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. Por último, en el extremo carboxilo terminal se encuentra la región E/F o de unión al ligando (LBD), donde se une la hormona estradiol (E2), es altamente específica para su hormona (AF-2) (Rollerova, 2000).

Existen diversas isoformas del receptor de estrógeno descritas por medio del “splicing” alternativo (ajuste o empalme). Del RE α se conocen 3 formas diferentes y para el RE β 5 formas las cuales pueden transactivar la transcripción solamente cuando se forma un heterodímero con el receptor funcional RE β 1 de 59 kDa. El RE β 3 ha sido detectado en los testículos a elevadas concentraciones. Para las otras dos isoformas del RE α pesan 36 y 46 kDa (Nilsson *et al.*, 2001) (Leung, *et al.* 2006).

Los receptores a estrógeno son proteínas de transcripción de enlace activo que regulan la expresión de los genes blanco; regulan los efectos del 17 β -estradiol en los órganos blanco. Pertenecen a la superfamilia de los receptores de esteroides los cuales juegan un papel importante en diferentes procesos reproductivos (Rollerova, 2000).

RE y la neurona GnRH

Lo estrógenos juegan un papel crítico al establecer la forma de secreción de las neuronas GnRHérgicas durante su diferenciación sexual, esto determina el patrón de secreción de la LH en la etapa adulta (Loza *et al.*, 1995).

Por medio de la detección del ARNm y cuantificación de REs en neuronas GnRHérgica, (por inmunohistoquímica), se mostró que las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE β y no el RE α (Shughrue, *et al.* 1998). No obstante Hrabovszky y sus colaboradores en el 2000, 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), existen neuronas que co-expresan el ARNm para los dos tipos el RE α y para el RE β .

Por medio de técnicas inmuno-histoquímicas se han mostrado que el número de células inmuno-reactivas (ir) para el RE α en POA-AHA es mayor a las 09:00 y 17:00 y menor a las 13:00 horas del día, independientemente de la etapa del ciclo. No obstante, el número de células ir- RE β es mayor a las 13:00 horas del Proestro y del Estro (Mendoza, *et al.* 2008).

Gran parte de las neuronas GnRHérgicas en POA-AHA expresan el RE β y muy pocas el RE α , lo que sugiere que su activación está involucrada en los efectos del “feedback” estimulante e inhibitorio de los estrógenos, por su acción en la neurona GnRHérgica o neuronas que modulan la actividad de ésta. En experimentos con ratones “knockout” en los que el RE α o RE β han sido detectados, se mostró que el RE α es necesario para que se dé el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica, pero no así con el RE β . De igual manera, el uso de un ligando selectivo para el RE α demostró que es necesario y suficiente para estimular la secreción pre-ovulatoria de LH (Rissman, *et al.*, 1997).

El RE β juega un papel primordial en el desarrollo fetal normal y el desarrollo temprano al realizar diversas funciones. Por ejemplo, la adrenal fetal expresa altas concentraciones de RE- β y bajos de RE- α . Se ha visto diferencia de expresión de receptores α y β en varios tejidos (por ejemplo cerebro y cardiovascular), resultando en una respuesta diferente y selectiva de estrógenos específicos (Rollerova, 2000).



JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En la rata, el 17β -estradiol es una de las señales que regulan la función del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Existen dos tipos de receptores a estrógenos: el $RE\alpha$ y el $RE\beta$. En POA-AHA se han identificado ambos RE (Kilen y col., 1998); 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 (Wintermantel *et. al.*, 2006).

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 17β -estradiol, lo que implica el uso de un modelo experimental anti-fisiológico.

Recientemente se mostró que el bloqueo del $RE\alpha$ o del $RE\beta$ en el lado derecho y no en el lado izquierdo de POA-AHA, entre las 8:30 y 9:30 horas del día del Diestro 2 provoca que la mayoría de los animales no ovulen en la mañana del Estro esperado (Rodríguez, 2010; Galindo, 2011). Lo que implica que los dos receptores deben ser activados para que ocurra la secreción de GnRH y la ovulación. Además que es el sistema del lado derecho del que depende la ovulación.

Por lo tanto, en este proyecto se estudiaron los efectos del bloqueo de los $RE\beta$ y del $RE\alpha$ del lado derecho de POA-AHA sobre la expresión del ARNm de la GnRH en POA-AHA, y sobre la concentración sérica de progesterona y estradiol, cuando el procedimiento se realizó a las 9:00 horas del Diestro 2 del ciclo estral.

Con la finalidad de comprobar la falta de GnRH, se planteó reemplazar esta hormona en animales con bloqueo del $RE\alpha$ ó del $RE\beta$.



HIPÓTESIS

Dado que en la mañana del Diestro 2, el bloqueo del RE α ó del RE β del lado derecho de POA-AHA resulta en el bloqueo de la ovulación y que la neurona GnRH expresa el RE β y no el RE α , entonces el bloqueo de uno u otro receptor provocara efectos diferentes en la síntesis del ARNm de la GnRH la progesterona y el estradiol.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del bloqueo del RE α o del RE β en el lado derecho de POA-AHA a las 9:00 h del Diestro-2 sobre la expresión del ARNm de la GnRH en la porción izquierda y derecha de POA-AHA y la concentración sérica de progesterona y estradiol.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar los efectos del bloqueo del RE β ó del RE α del lado derecho de POA AHA en el día del Diestro 2 sobre:

- La ovulación, el peso de los ovarios y el útero.
- La concentración sérica de hormonas esteroides.
- La expresión del ARNm de la GnRH, en ambos lados de POA-AHA.
- Cuantificar la respuesta ovulatoria al reemplazo de la señal hipotalámica de los animales que no ovularon por la micro-inyección del α -RE α o α -RE β en el lado derecho de POA-AHA.



MATERIALES Y MÉTODOS

- Se utilizaron ratas hembras adultas (3-4 meses de edad) de la cepa CIIZ-V, mantenidas en grupos de seis 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 presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días.
- La laminilla con los frotis vaginales fueron teñidos con hematoxilina y eosina, mediante la siguiente metodología: hematoxilina durante ocho minutos, después se colocó en agua de la llave durante 10 minutos e inmediatamente se colocó en eosina por espacio de 5 minutos, finalmente se quitó el exceso de eosina con alcohol al 70%.
- Entre las 8:30 y 9:30 horas del día del Diestro 2, grupos de 9 a 10 animales fueron anestesiados con 25mg/kg peso de pentobarbital sódico por vía intra-peritoneal.
- Se colocaron en un aparato estereotáxico (Figura 12) para ubicar la zona de estudio con base a las coordenadas del Atlas del Cerebro de la Rata de König y Klippel.

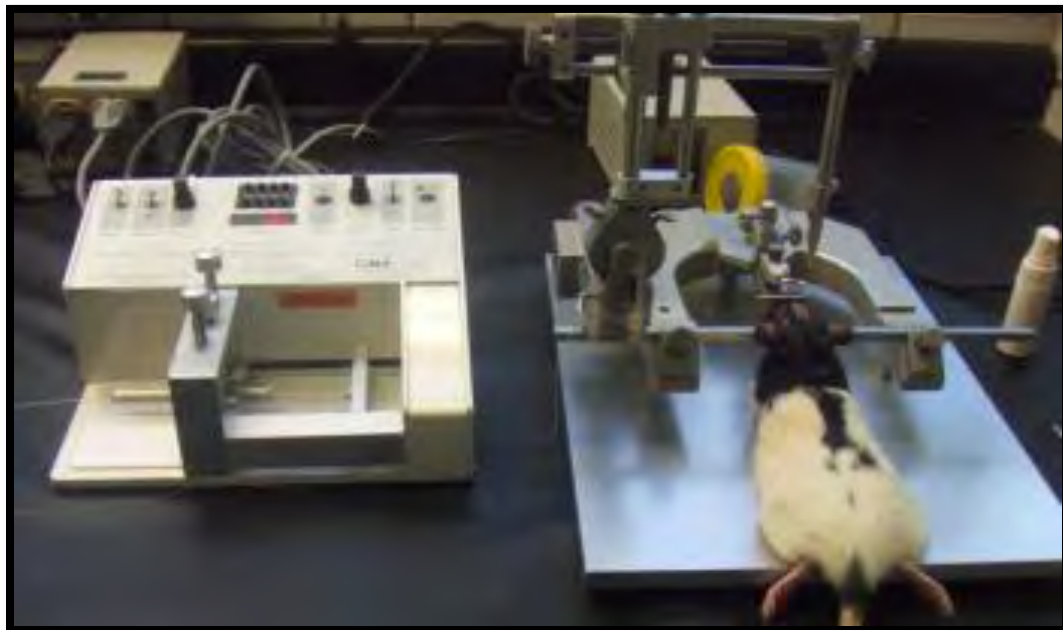


Figura 12. Fotografía que muestra el sistema de micro-inyección utilizado para llegar a POA-AHA y bloquear el RE α y el RE β . Coordenadas utilizadas: AP= 0.04mm; LM= -0.06mm y V= 0.86mm con base al Atlas del Cerebro de la Rata (König y Klippel, 1963).



- Una vez en la zona de estudio (Figura 13), las ratas fueron micro-inyectadas en el lado derecho de POA-AHA con 1 μ L de Ciclofenil (25 μ g/ μ L) (antagonista al RE- β , Sigma-Aldrich, México; Anexo 1). Otro grupo fue micro-inyectado con 1 μ L de MPP (25 μ g/ μ L) (Metil-piperidino-pirazol, antagonista al RE α , Sigma Aldrich, México; Anexo).

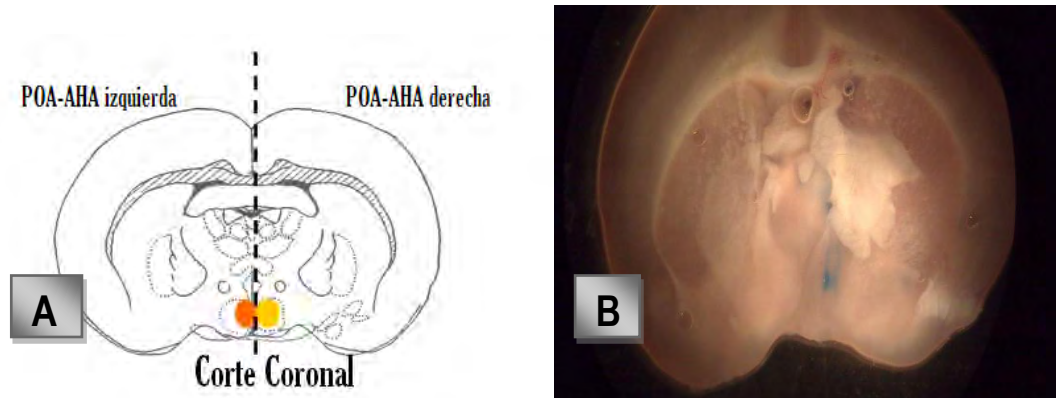


Figura 13. **A.** Zona de estudio en un corte coronal del cerebro de la ratona: Área Preóptica Hipotalámica Anterior (POA-AHA), parte izquierda y derecha. **B.** Corte coronal del cerebro de ratona donde se observa la zona de estudio, señalada por el colorante azul de metileno en el lado derecho de POA-AHA.

- Como grupos control se utilizaron animales inyectados con Tween 20[®] (un 1 μ L) (Anexo 3). Todas las micro-inyecciones se realizaron durante 1 minuto.
- Los animales fueron sacrificados por decapitación de la siguiente manera:

Día de la micro-inyección	Sacrificio
Diestro 2 8:30-9:30 h	Diestro 2 11:00 y 13:00 h
Diestro 2 8:30-9:30 h	Proestro 11:00 y 17:00 h
Diestro 2 8:30-9:30 h	Estro 11:00 h



Sustitución de la señal Hipotalámica

Ratas micro-inyectadas en el día del Diestro 2 con 1μ del α -RE α o de 1μ del α -RE β durante un minuto en el lado derecho de POA-AHA fueron inyectadas a las 14:00 horas del día del Proestro con $3.7 \mu\text{g/Kg}$ de LHRH sintética por vía subcutánea. Estos animales fueron sacrificados en el día del Estro esperado en la misma forma que en los animales con bloqueo de uno u otro receptor.

Autopsia

- Grupo de ratas micro inyectadas con vehículo, α -RE α y α -RE β fueron sacrificadas en la mañana del Estro esperado. Se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados, los ovarios y el útero para pesarlos.
- Se recolecto la sangre del tronco en tubos de ensaye y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos después se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos.
- El suero fue almacenado a -4°C , hasta la cuantificación de progesterona (P_4), estradiol (E_2), por radio-inmuno-análisis (RIA).
- Los grupos de referencia correspondieron a animales sin tratamiento sacrificados en las mismas horas que los grupos experimentales.

Cuantificación de hormonas

- La cuantificación de las concentraciones plasmáticas de progesterona y estradiol se realizó por RIA mediante el uso de estuches comerciales marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA), que contienen tubos de polipropileno impregnado con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (^{125}I -progesterona ó ^{125}I -estradiol) y calibrados para la realización de la curva patrón (P_4 : 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.0, 20.0, y 40.0 ng/mL; E_2 : 0.0, 10.0, 20.0, 50.0, 150.0, 250.0, 500.0 y 900.0 pg/mL). A cada tubo del estuche se le adicionaron 100 μL de muestra de suero más 1000 μL de la hormona marcada (^{125}I - P_4 ó ^{125}I - E_2). Los tubos se agitaron durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas; posteriormente se decantaron y limpiaron, finalmente con la ayuda de un contador de centelleo gamma, se cuantificó se cuantifico la cantidad de hormona de la muestra. Los datos en la concentración de E_2 se expresaron en pg/mL y los de P_4 en ng/mL. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron



de 5.3% y 9.87 para P_4 , 6.9% 10.8% para E_2 . El límite de detección para P_4 fue 0.03091 ng/mL y para E_2 fue de 2.12 pg/mL.

Extracción de POA-AHA

- Para obtener el tejido cerebral se extrajo el cerebro entero y se enjuago con solución salina estéril fría, posteriormente se disecto POA-AHA por la técnica de Palkovits (0), para lo cual se utilizó material de disección limpio y estéril.
- Una vez que se obtuvo POA-AHA se procedió a dividirla en la parte izquierda y derecha y se colocaron en tubos eppendorf estériles, se les agrego 500 μ l de trizol y se homogenizo con un Politrón, modelo PT -MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza).
- Al tejido homogenizado se le agrego 250 μ L de Cloroformo y se agito por 1 minuto, con la finalidad de extraer el ARNm.
- Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 30 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: una fase inferior orgánica de color rosa y una fase superior acuosa incolora. El ARN quedo en esta última fase, mientras que el ADN y las proteínas se mantuvieron en la interfase y en la fase orgánica.
- La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de isopropanol (250 μ L aproximadamente), con la finalidad de precipitar el ARNm. La muestra se conservó a 4°C durante 72 horas.
- Pasadas 72 horas las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm, por 30 minutos, a 4°C. El ARN se precipito formando una pastilla blanca amarillenta.
- Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80 %.
- La pastilla de ARNm se centrifugo nuevamente a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- Después de una segunda separación del sobrenadante, los tubos se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril para que la pastilla se secara a temperatura ambiente para evitar la insolubilidad de la misma. A la pastilla de ARNm se le agregara 30 μ l de H₂O inyectable y se conservó a - 70°C hasta su posterior tratamiento.



Lectura de la muestra

- Se hicieron alícuotas de 2 μL de la muestra diluida en 98 μL de H_2O inyectable.
- Se leyó la absorbancia de estas muestras en un espectrofotómetro (BOECO Germany Modelo S-30 Spectrophotometer) a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La concentración de ARN se determinó conociendo que una unidad de absorbancia de 260nm equivale a 40mg de ARN mL^{-1} .

$$X = \frac{A (40\text{mg de ARN/mL}) (B)}{1000\text{mL}}$$

C

A= Densidad óptica de la muestra a 260 nanómetros

B= Cantidad de agua en la que se diluyó la muestra (98 μL)

C= Cantidad de la muestra que se diluyó (2 μL)

RT-PCR

- Para obtener el ARN complementario (ARNc) se realizó la retro transcripción del ADN total. Los volúmenes utilizados se muestran en el cuadro 1.

Reactivo	Concentración	Volumen/1 RX
Buffer RT	2 μL	2 μL
DTT	5x	1 μL
dATP	0.2 mM	0.5 μL
dCTP	10 mM	0.5 μL
dGTP	10 mM	0.5 μL
dTTP	10 mM	0.5 μL
RT-M-MLV	100 U	0.5 μL
Oligo dt	0.025 μg	0.5 μL
H_2O		0.5 μL

Cuadro 1. Reactivos utilizados en la técnica de retro transcripción.



- Por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento de la GnRH de 250 pares de bases (pb). Se utilizó GAPDH (por sus siglas en inglés: GlycerAldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase) con 200 pares de bases (pb) como gen control interno. En el cuadro 2 se especifican los reactivos para esta técnica:

Reactivo	Concentración	Volumen/1Rx
Producto de RT		10 µL
Boffer PCR	10x	5 µL
MgCl ₂	2.5	2.5 µL
Taq Polimerasa	0.5 µL	0.5 µL
DNTP's	10 mM	0.5 µL
Oligo 1 y Oligo 2		2 µL
H ₂ O		26 µL

Cuadro 2. Reactivos utilizados en el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

- La reacción en cadena de la Polimerasa se realizó en un Termociclador de gradientes (marca Eppendorf Scientific Inc, Alemania), a las temperaturas y ciclos que se muestran en el siguiente cuadro. Cabe señalar que las temperaturas de alineación, así como el número de ciclos utilizados para los genes en cuestión fueron previamente estandarizados para la optimización del experimento (Cuadro 3) (Arteaga-López; *et. al.*/2005).

GEN	SECUENCIA SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO	TEMPERATURA (°C)	CICLOS
GAPDH	GAT TTG GGC GCC TGG TCA CC	CGC TCC TGG AAG ATG CTG ATG	55.1	32
GnRH	CAA CCC ATA GGA CCA GTG CTG G	CAC TAT GGT CAC CAG CGG GG	53.0	32

Cuadro 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la retrotranscripción, así como las temperaturas y ciclos utilizados para la técnica de RT-PCT.



- En un matraz Erlenmeyer se agregó 1gr de Agarosa y 50mL de una solución Buffer TBE 1x la cual se calentó en el microondas hasta su completa disolución.
- Se agregaron 2.5 μ L de bromuro de etidio y se agito hasta mezclar los componentes en su totalidad evitando formar burbujas.
- El gel se vertió lentamente en una cámara de electroforesis (Horizon 58) por uno de los extremos y con ayuda de una punta de micro-pipeta se eliminaron las burbujas que se pudieron haber formado durante el proceso. Se dejó polimerizar la agarosa.
- Para correr el gel, la cámara de electroforesis se llenó con buffer TBE 1x hasta cubrir totalmente el gel y se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder (Modelo Major Science MINIS-300VP) donde se graduó el voltaje a 100V y se dejaron correr las muestras.

Análisis densitométrico

- Las fotografías de los geles fueron tomadas con una cámara Kodak Gel Logic 112. Los negativos de las fotografías fueron sometidos a un análisis densitométrico para cuantificar las bandas correspondientes a la expresión de ARNm de GAPDH y GnRH mediante el programa Kodak Gel Logic 112 Imaging System.
- La expresión del ARNm para GnRH se determinó mediante la intensidad media de la banda la cual fue medida en pixeles, este valor fue dividido entre el valor de la intensidad media de la banda de la expresión de ARNm de GAPDH con el fin de normalizar los datos.
- El valor obtenido muestra la expresión relativa del ARNm de la GnRH en cada muestra analizada, estos valores fueron considerados como la expresión del ARNm.

Análisis estadístico

- Los resultados del número de animales ovulantes se analizaron por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher, los del número de ovocitos liberados por la prueba de Kruzkall-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los datos de las concentraciones séricas de las hormonas y de la expresión relativa del ARNm para GnRH se analizaron mediante la prueba de análisis de las varianzas (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 o de "U" Mann-Withney (para el caso de resultados no paramétricos). En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad sea ≤ 0.05 .

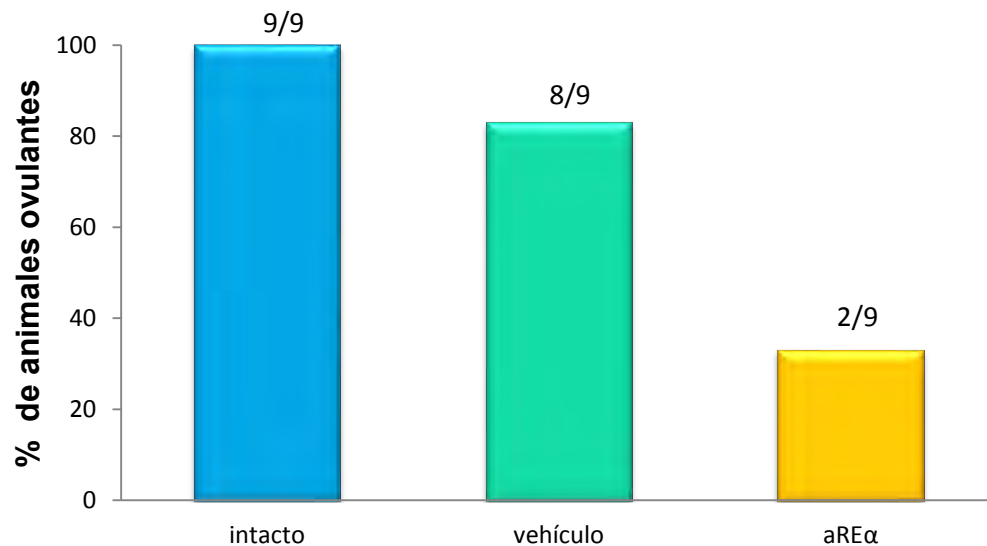


RESULTADOS

EFFECTO DE LA MICRI-INYECCIÓN DEL ANTAGONISTA DEL RE α EN EL LADO DERECHO DE POA-AHA, SOBRE LA OVULACIÓN Y EL PESO DE LOS OVARIOS Y DEL ÚTERO

Porcentaje de animales ovulantes

La micro-inyección de vehículo no modificó el porcentaje de animales ovulantes en relación al grupo intacto, mientras que el bloqueo de los RE α por la micro-inyección del antagonista de RE α provocó que sólo el 22% de los animales ovulara en el día del Estro esperado en relación al grupo con vehículo (Gráfica 3), a pesar de que el 100% de los animales presentaron el frotis vaginal característico de Estro.

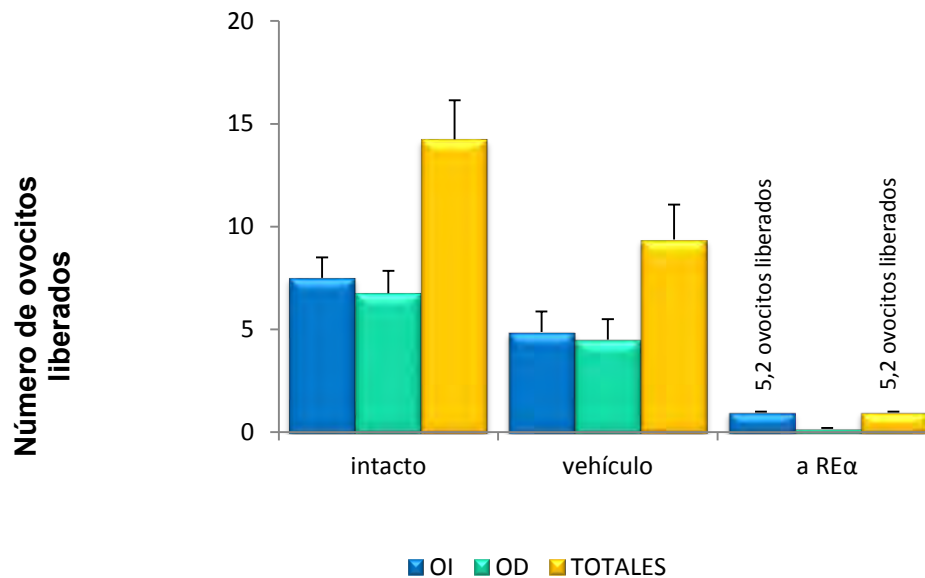


Gráfica 3. Porcentaje de animales que ovularon en el día del Estro esperado, después de la micro-inyección del vehículo y antagonista al RE α en el lado derecho de POA-AHA.



Número de ovocitos liberados

La micro-inyección del vehículo no modificó el número de ovocitos liberados. Con respecto al tratamiento con el antagonista del RE α , los dos animales que ovularon, liberaron 2 y 5 ovocitos cada uno, pero sólo por el ovario izquierdo (Gráfica 4).

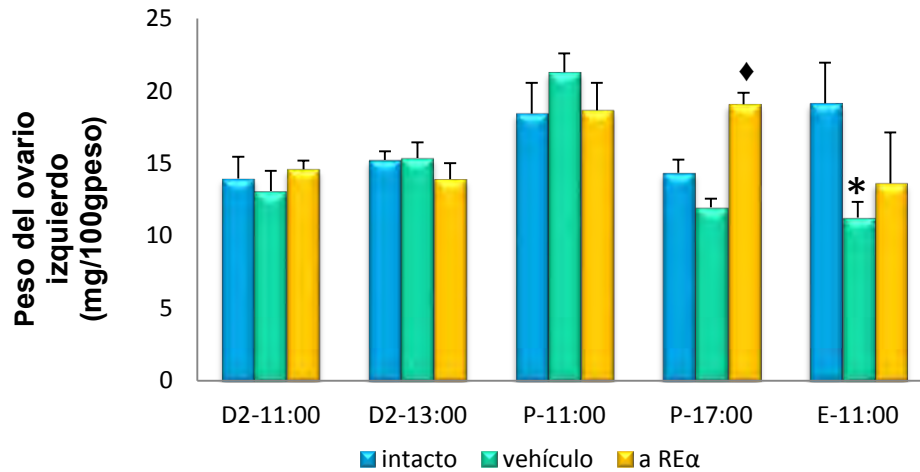


Gráfica 4. Efecto de la micro-inyección de vehículo y antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA sobre el número de ovocitos liberados (media \pm e.e.m.) por el ovario izquierdo (OI), derecho (OD) y ambos (OI+OD) en el día del Estro esperado. Los valores sobre las barras de los grupos micro-inyectados indican el número de ovocitos liberados por los animales que ovularon.

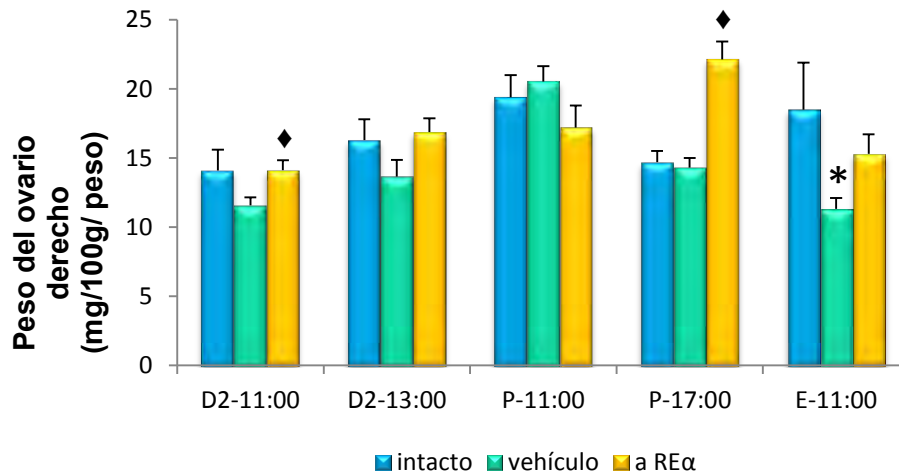
Peso de los ovarios

El peso del ovario izquierdo de los animales micro-inyectados con vehículo disminuyó en la mañana del Estro esperado (11:00 h del Estro). La micro-inyección de antagonista al RE α resultó en el aumento del peso del ovario izquierdo a las 17:00 h del Proestro. (Gráfica 5).

El peso del ovario derecho también disminuyó en la mañana del Estro esperado (11:00 h del Estro) en los animales micro-inyectados con vehículo. La micro-inyección del antagonista del RE α resultó en el aumento del peso de éste ovario a las 2 horas de la micro-inyección y a las 17:00 h del Proestro (Gráfica 6).



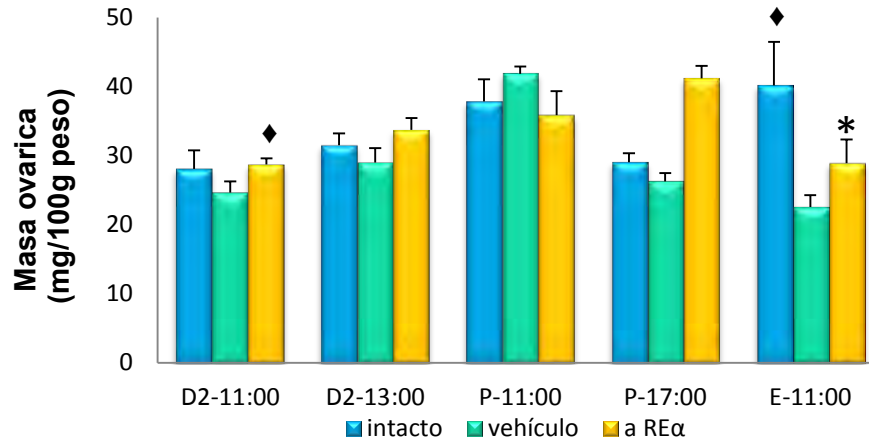
Gráfica 5. Efecto de la micro-inyección del vehículo o del antagonista al RE α en el lado derecho de POA-AHA sobre el peso del ovario izquierdo (media \pm e.e.m.) a las 11:00 y 13:00 horas del Diestro 2, 11:00 y 17:00 horas del Proestro y 11:00 horas del Estro esperado. * $p < 0.05$ vs. intacto; ♦ $p < 0.05$ vs. vehículo (ANOVA seguida de la prueba de Dunn)



Gráfica 6. Efecto de la micro-inyección del vehículo y del antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA sobre el peso del ovario derecho (media \pm e.e.m.) a las 11:00 y 13:00 horas del Diestro 2, 11:00 y 17:00 horas del Proestro y 11:00 horas del Estro esperado. * $p < 0.05$ vs. Intacto; ♦ $p < 0.05$ vs. vehículo (ANOVA seguida de la prueba de Dunn).



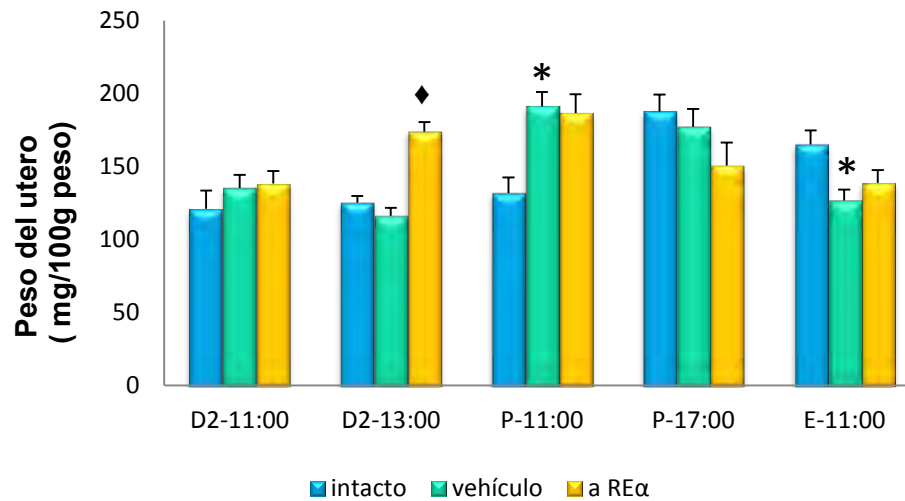
Los efectos observados en el peso de cada ovario por cada tratamiento se reflejó en masa ovárica (peso del ovario izquierdo + peso del ovario derecho) (Gráfica 6).



Gráfica 6.- Efecto de la micro-inyección del Vehículo o el antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA sobre la masa ovárica total (media \pm e.e.m.) a las 11:00 y 13:00 horas del Diestro 2, 11:00 y 17:00 horas del Proestro y 11:00 horas del Estro esperado. * $p < 0.05$ vs Intacto; ♦ $p < 0.05$ vs. vehículo (ANOVA seguida de la prueba de Dunn).

Peso del útero

El peso del útero de los animales micro-inyectados con vehículo aumento a las 26 horas de haberlo inyectado (11:00 h del Proestro) y disminuyó en la mañana del Estro (11:00 h) en comparación con los animales intactos. En los animales micro-inyectados con el antagonista al RE α , el peso del útero aumentó a las 13:00 h del Diestro 2 (Gráfica 7) en comparación con el vehículo.

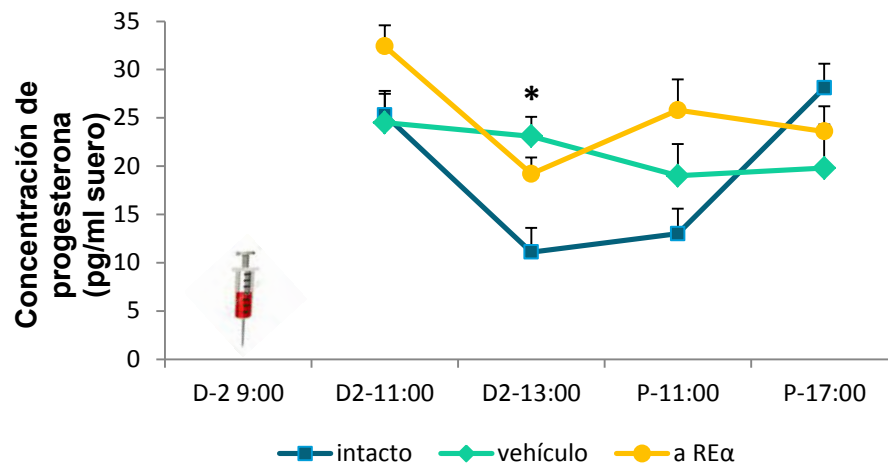


Gráfica 7.- Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA sobre el peso del útero (media \pm e.e.m.) a las 11:00 y 13:00 horas del Diestro 2, 11:00 y 17:00 horas del Proestro y 11:00 horas del Estro esperado * $p < 0.05$ vs Intacto; ♦ $p < 0.05$ vs. vehículo (ANOVA seguida de la prueba de Dunn).

EFFECTOS DEL BLOQUEO DEL RE α DEL LADO DERECHO DE POA-AHA SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICAS DE HORMONAS ESTEROIDES (PROGESTERONA Y ESTRADIOL)

Progesterona (P $_4$)

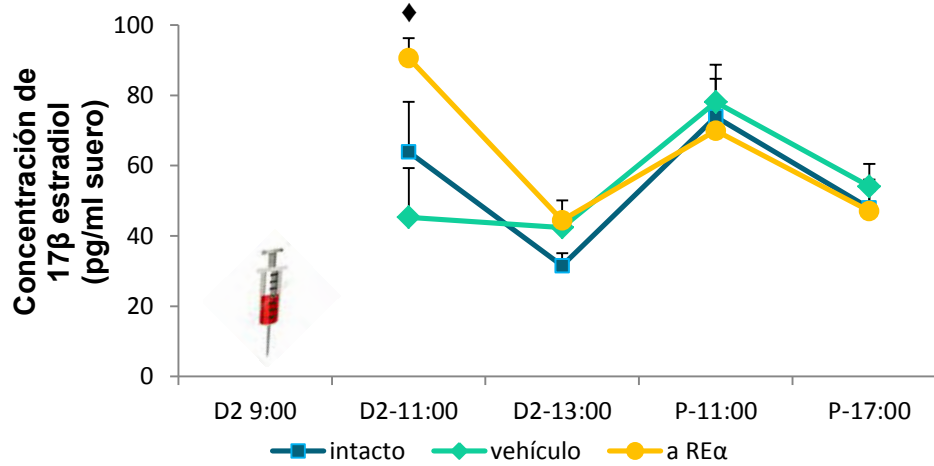
Con respecto al grupo de animales intactos, la micro-inyección del vehículo aumento la concentración de progesterona a las 4 horas del tratamiento (Diestro 2 a las 13:00h). La micro-inyección del antagonista al RE α no modificó la concentración de progesterona con respecto al vehículo (Gráfica 8).



Gráfica 8. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA sobre la concentración de progesterona en suero de ratas (media \pm e.e.m.) en Diestro 2 a las 11:00, Diestro 2 a las 13:00, Proestro a las 11:00, Proestro a las 17:00 y Estro a las 11:00. * $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

Estradiol (E₂)

Con respecto al grupo de animales intactos, la micro-inyección del vehículo en el lado derecho de POA-AHA no modificó la concentración de estradiol en ninguna de las horas estudiadas después del tratamiento. Sin embargo la micro-inyección del antagonista al RE α provocó el aumento en la concentración de estradiol a las 2 horas de haberlo inyectado en comparación con el vehículo (Gráfica 9).



Gráfica 9. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA sobre la concentración de 17 β estradiol en suero de ratas (media \pm e.e.m.) en Diestro 2 a las 11:00, Diestro 2 a las 13:00, Proestro a las 11:00, Proestro a las 17:00 y Estro a las 11:00. \blacklozenge $p < 0.05$ vs. vehículo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

EFFECTOS DEL BLOQUEO DEL RE α DEL LADO DERECHO DE POA-AHA EN EL DÍA DEL DIESTRO 2 SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA GNRH, EN UNO Y OTRO LADO DE POA-AHA

Para poder evaluar si la micro-inyección del antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA en ratas adultas regula la expresión del ARNm para la GnRH, se extrajo el ARN total de POA-AHA y por la Técnica de RT-PCR fue amplificado, como control interno para la técnica se utilizó la amplificación de GAPDH que da un producto de 201 pares de bases (pb), para las muestras se obtuvo un producto de 250 pb que corresponden a GnRH.

Para el análisis de bandas en el gel con el software Kodak Gel Logic II2 Imaging System se midió la banda en pixeles tomando como referencia las bandas de Marcador de Peso Molecular (MPM) para dar una aproximación relativa de la cantidad del producto de la GnRH (expresado en relación con la intensidad media de la banda para GAPDH).



En el grupo de animales intactos, la expresión relativa de ARNm para la GnRH es diferente a las 17:00 h del Proestro entre el lado izquierdo y el lado derecho de POA-AHA.

La micro-inyección del vehículo no modificó la expresión del ARNm de la GnRH en el lado izquierdo, ni el lado derecho de POA-AHA. (Gráficas 10 y 11).

Sin embargo la micro-inyección del antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA incrementó la expresión del ARNm de la GnRH en el mismo lado inyectado (POA-AHA derecha) a las 17:00 h del Proestro (Gráficas 10).

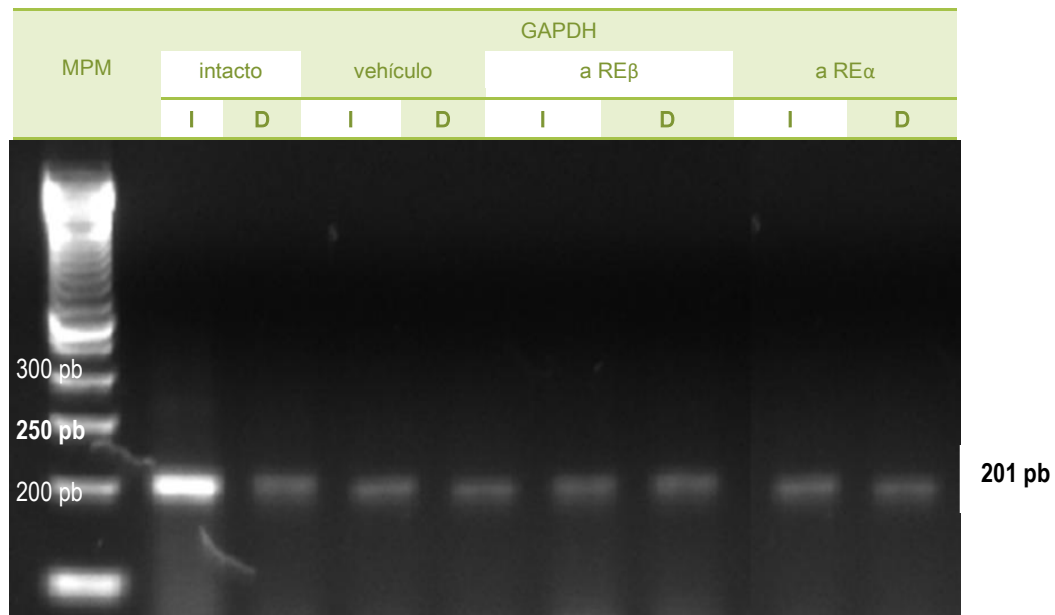


Figura 14 . Producto de amplificación de 201 pb para GAPDH control positivo de la técnica.

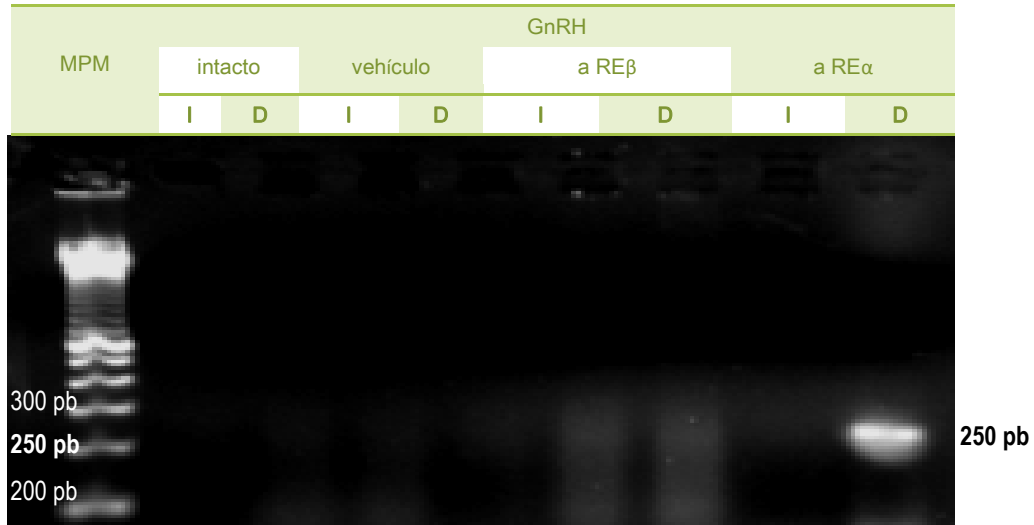
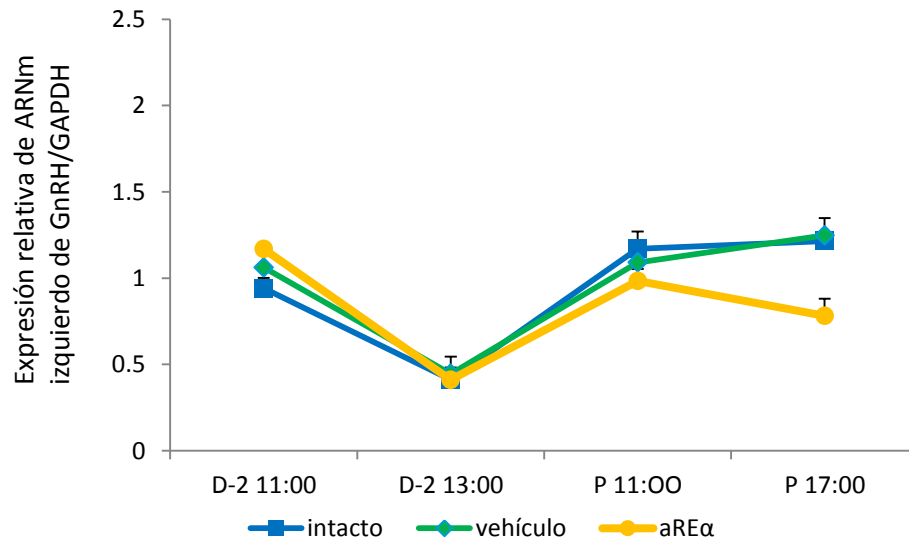
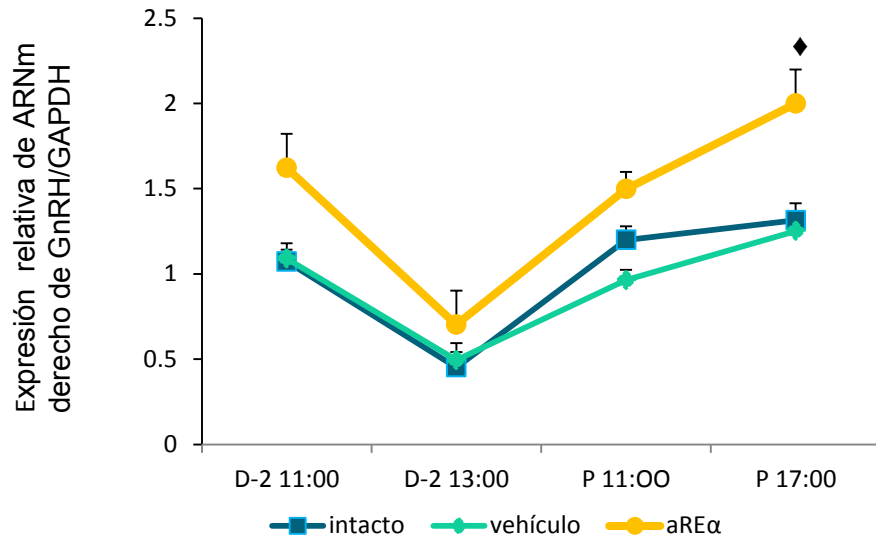


Figura 15 . Expresión del ARNm de la GnRH en el lado derecho de POA-AHA de la rata. Amplificación de GnRH por RT-PCR de 250



Gráfica 10. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA sobre la expresión relativa del ARNm para GnRH del lado izquierdo (media \pm e.e.m.) en Diestro 2 a las 11:00, Diestro 2 a las 13:00, Proestro a las 11:00, Proestro a las 17:00 y Estro a las 11:00.

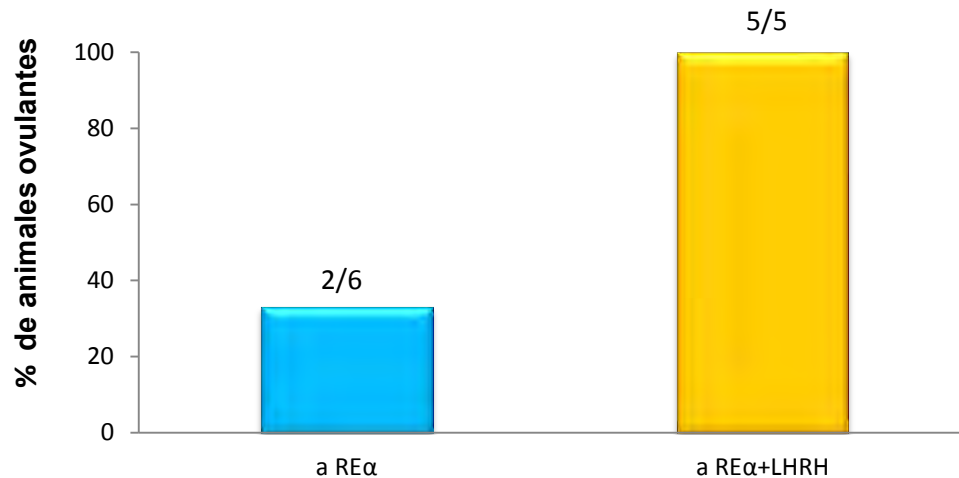


Gráfica 11. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del REA en el lado derecho de POA-AHA sobre la expresión relativa del ARNm para GnRH del lado derecho (media \pm e.e.m.) en Diestro 2 a las 11:00, Diestro 2 a las 13:00, Proestro a las 11:00, Proestro a las 17:00 y Estro a las 11:00. \blacklozenge $p < 0.05$ vs. Vehículo (ANOVA seguida de la prueba de Dunn).



RESPUESTA OVULATORIA AL REMPLAZO DE LA SEÑAL HIPOTALÁMICA DE LOS ANIMALES QUE NO OVULAN POR LA MICRO-INYECCIÓN DE MPP DEL LADO DERECHO DE POA-AHA

El reemplazo de la señal hipotalámica por la inyección de la LHRH-sintética realizada a las 14 horas del Proestro indujo la ovulación en todos los animales micro-inyectados con el α RE α (Gráfica 12).



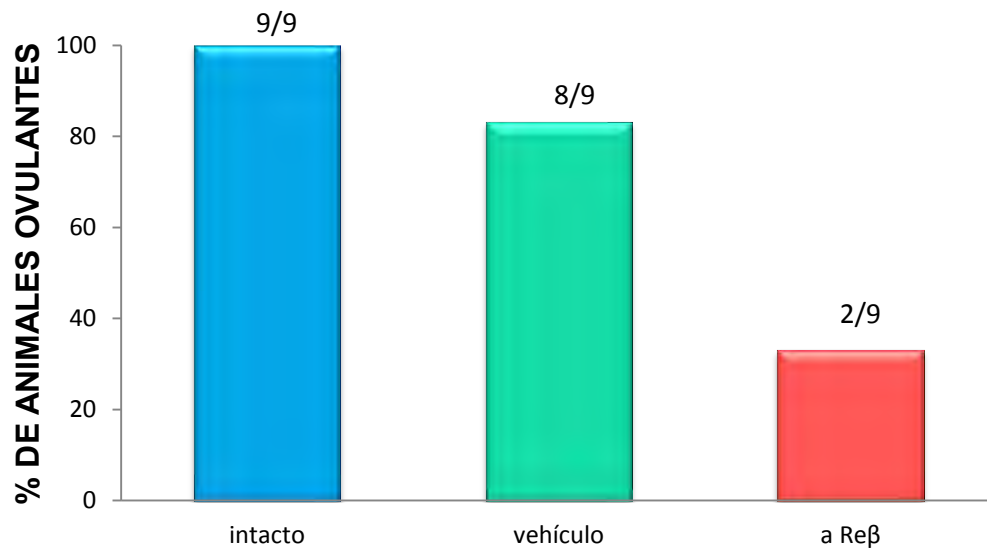
Gráfica 12. Porcentaje de animales que ovularon en el día del Estro esperado, después de la micro-inyección del antagonista del RE α en el lado derecho de POA-AHA e inyectadas con LHRH a las 14:00 horas del Proestro.



EFFECTO DE LA MICRO-INYECCIÓN DEL ANTAGONISTA DEL RE β EN EL LADO DERECHO DE POA-AHA, SOBRE LA OVULACIÓN Y EL PESO DE LOS OVARIOS Y DEL ÚTERO

Porcentaje de animales ovulantes

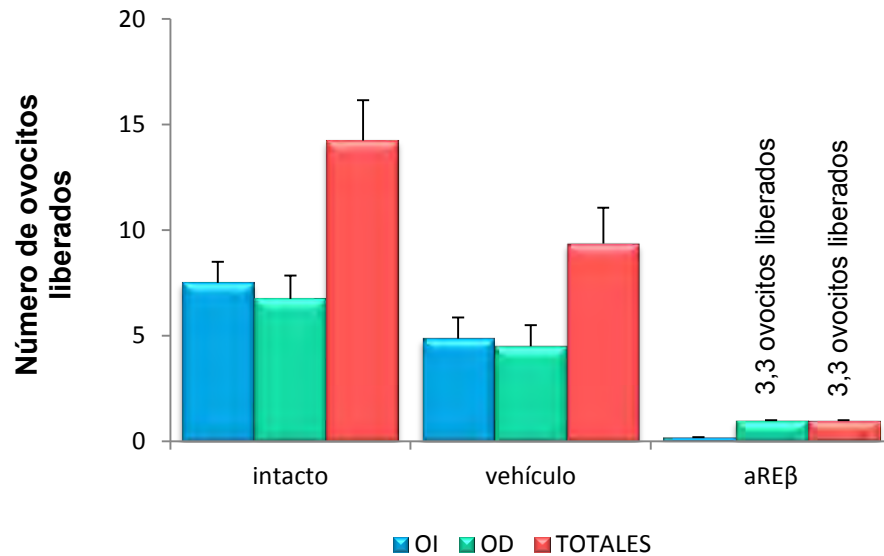
La micro-inyección de vehículo no modificó el porcentaje de animales ovulantes, mientras que el bloqueo de los RE β provocó que sólo el 22% de los animales ovulara en el día del Estro esperado (Gráfica 13), a pesar de que el 100% de los animales presentaron el frotis vaginal característico de Estro.



Gráfica 13. Porcentaje de animales que ovularon en el día del Estro esperado, después de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA.

Número de ovocitos liberado

La micro-inyección del vehículo no modificó el número de ovocitos liberados con respecto al vehículo. Con respecto a la micro-inyección del antagonista del RE β , los dos animales que ovularon, liberaron 3 ovocitos cada uno, pero sólo por el ovario derecho (Gráfica 14).



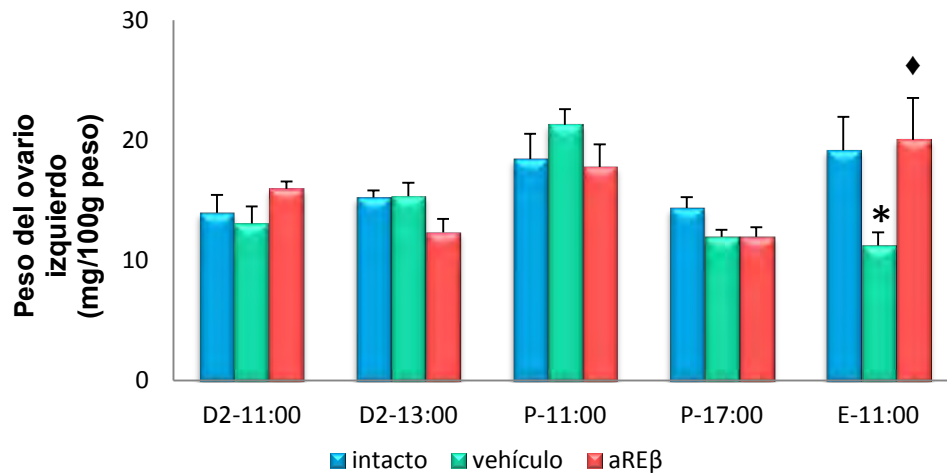
Gráfica 14.- Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA sobre el número de ovocitos liberados (media \pm e.e.m.) por el ovario izquierdo (OI), derecho (OD) y ambos (OI+OD) en el día del Estro esperado. Los valores sobre las barras de los grupos micro-inyectados con el antagonista del RE β indican el número de ovocitos liberados por los animales que ovularon.

Peso de los ovarios

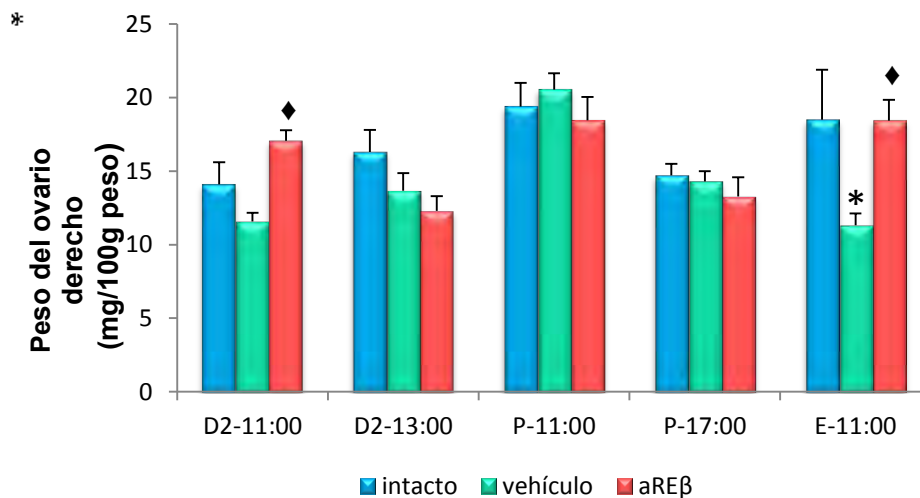
El peso del ovario izquierdo de los animales micro-inyectados con el vehículo disminuyó en la mañana del Estro esperado (11:00 h). La micro-inyección del antagonista del RE β resultó en el aumento del peso del ovario izquierdo cuando se evaluó esta gónada en la mañana del Estro esperado (Gráfica 15).

El peso del ovario derecho también disminuyó en la mañana del Estro esperado (11:00 h) en los animales micro-inyectados con el vehículo con respecto a los animales intactos. La micro-inyección con el antagonista del RE β provocó aumento del peso del ovario derecho a las 2 horas de la micro-inyección y a las 11:00h del Estro esperado. (Gráfica 16).

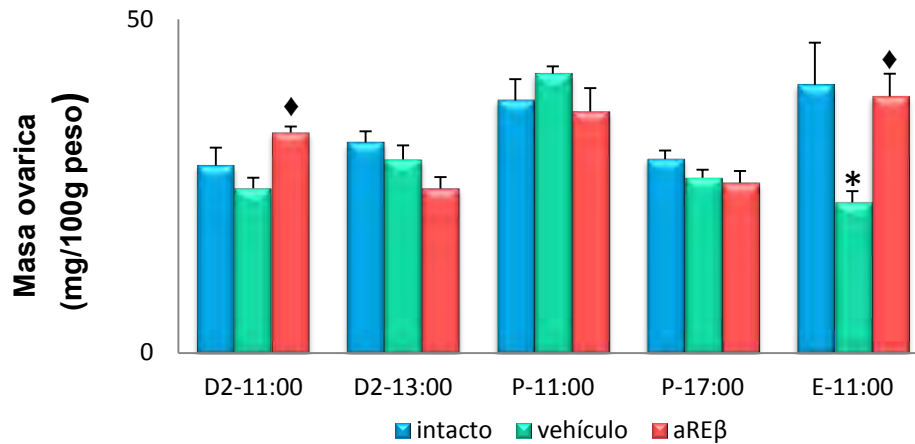
Los efectos observados en el peso de cada ovario por cada tratamiento se reflejó en masa ovárica (peso del ovario izquierdo + peso del ovario derecho) (Gráfica 17).



Gráfica 15. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del REβ en el lado derecho de POA-AHA sobre el peso del ovario izquierdo (media ± e.e.m.) a las 11:00 y 13:00 horas del Diestro 2, 11:00 y 17:00 horas del Proestro y 11:00 horas del Estro esperado. *p<0.05 vs intacto; ♦p<0.05 vs vehículo (ANOVA seguida de la prueba de Dunn)



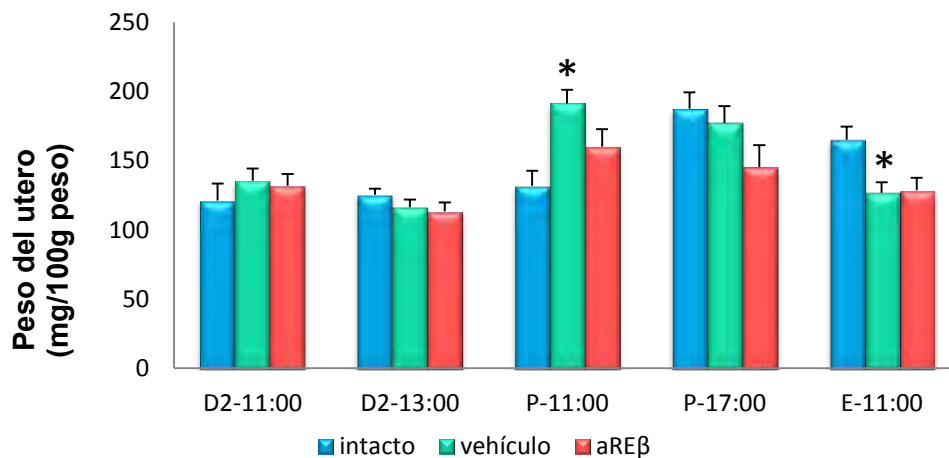
Gráfica 16.- Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del REβ en el lado derecho de POA-AHA sobre el peso del ovario derecho (media ± e.e.m.) a las 11:00 y 13:00 horas del Diestro 2, 11:00 y 17:00 horas del Proestro y 11:00 horas del Estro esperado. * p<0.05 vs. Intacto; ♦ p<0.05 vs vehículo (ANOVA seguida de la prueba de Dunn)



Gráfica 17. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA sobre la masa ovárica total (media \pm e.e.m.) a las 11:00 y 13:00 horas del Diestro 2, 11:00 y 17:00 horas del Proestro y 11:00 horas del Estro esperado. * $p < 0.05$ vs Intacto; ♦ $p < 0.05$ vs. Vehículo (ANOVA seguida de la prueba de Dunn).

Peso del útero

El peso del útero de los animales micro-inyectados con el vehículo aumento en la mañana del Proestro (11:00 h) y disminuyó en la mañana del Estro (11:00 h) en comparación con los animales intactos. (Gráfica 18).



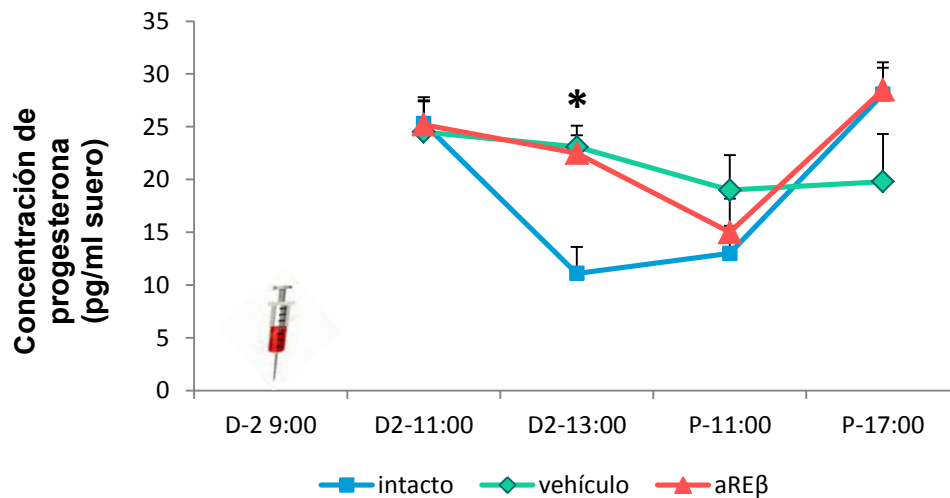
Gráfica 18. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA sobre el peso del útero (media \pm e.e.m.) a las 11:00 y 13:00 horas del Diestro 2, 11:00 y 17:00 horas del Proestro y 11:00 horas del Estro esperado. * $p < 0.05$ vs Intacto; (ANOVA seguida de la prueba de Dunn).



EFFECTOS DEL BLOQUEO DEL RE β DEL LADO DERECHO DE POA AHA SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICAS DE HORMONAS ESTEROIDES (PROGESTERONA Y ESTRADIOL)

Progesterona (P₄)

Con respecto al grupo de animales intactos, la micro-inyección del vehículo aumento la concentración de progesterona a las 4 horas del tratamiento (Diestro 2 a las 13:00h). El bloqueo del Re β no modificó los efectos del vehículo (Gráfica 19).

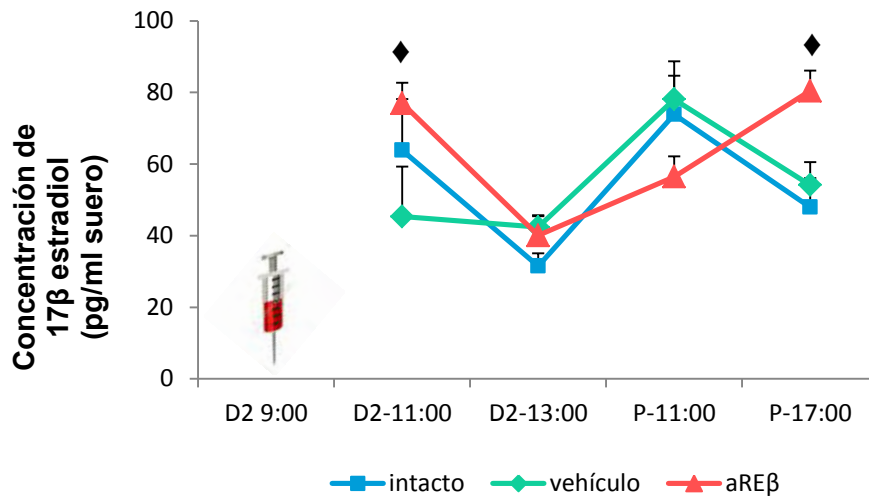


Gráfica 19. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA sobre la concentración de progesterona en suero de ratas (media \pm e.e.m.) en Diestro 2 a las 11:00, Diestro 2 a las 13:00, Proestro a las 11:00, Proestro a las 17:00 y Estro a las 11:00. * $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).



Estradiol (E_2)

Con respecto al grupo de animales intactos, la micro-inyección del vehículo en el lado derecho de POA-AHA no modificó la concentración de estradiol en ninguna de las horas estudiadas después del tratamiento. Sin embargo la micro-inyección del antagonista del $RE\beta$ provocó el aumento en la concentración de estradiol a las 11:00 y 17:00 del Proestro a las 11 horas de Diestro 2 (Gráfica 20).



Gráfica 20. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del $RE\beta$ en el lado derecho de POA-AHA sobre la concentración de 17β estradiol en suero de ratas (media \pm e.e.m.) en Diestro 2 a las 11:00, Diestro 2 a las 13:00, Proestro a las 11:00, Proestro a las 17:00 y Estro a las 11:00 horas. \blacklozenge $p < 0.05$ vs. Vehículo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).



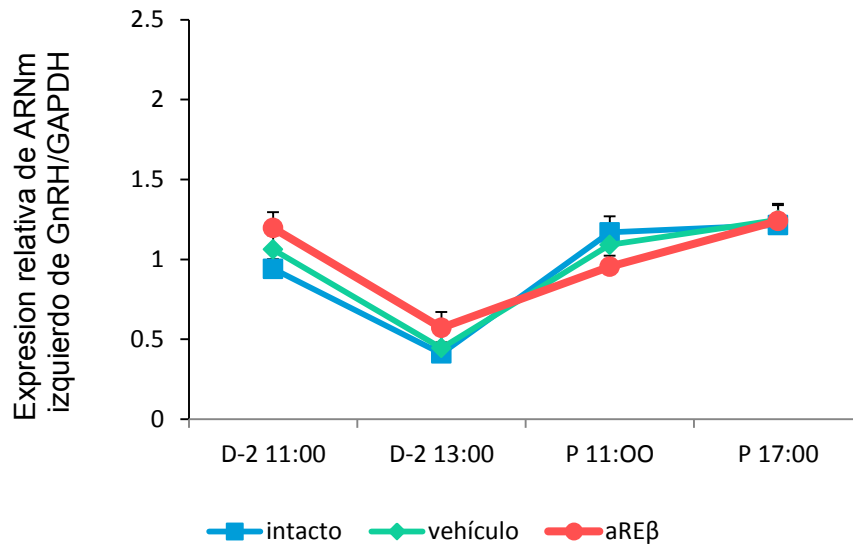
EFFECTOS DEL BLOQUEO DEL RE β DEL LADO DERECHO DE POA-AHA EN EL DÍA DEL DIESTRO 2 SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA GnRH, EN UNO Y OTRO LADO DE POA-AHA.

Para poder evaluar si la micro-inyección del antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA en ratas adultas regula la expresión del ARNm para la GnRH, se extrajo el ARN total de POA-AHA y por la técnica de RT-PCR fue amplificado, como control interno para la técnica se utilizó la amplificación de GAPDH que da un producto de 201 pares de bases (pb), mientras que para la GnRH fue de 250 pb.

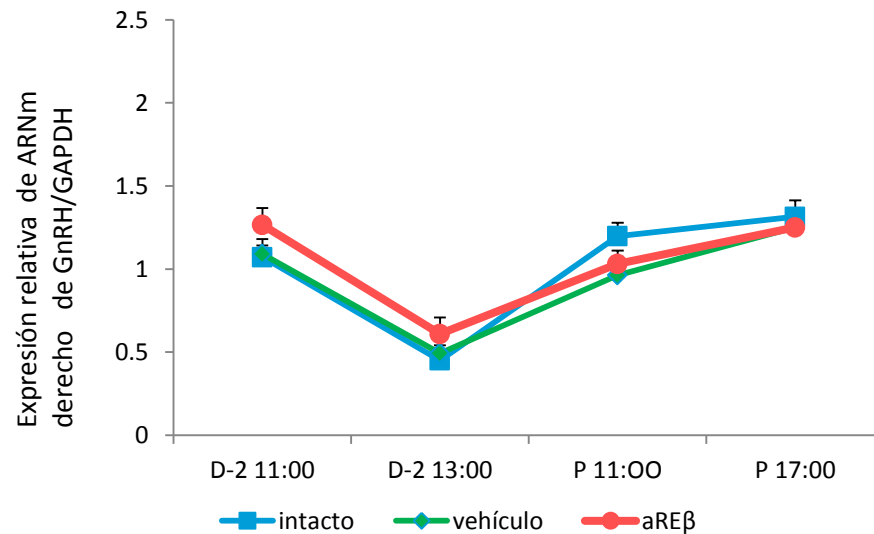
Para el análisis de las bandas en el gel, por medio del software Kodak Gel Logic II2 Imaging System, se midió la banda en pixeles tomando como referencia las bandas del Marcador de Peso Molecular (MPM). Con la finalidad de contar con un valor del producto de la GnRH, este se expresó en relación a la intensidad media de la banda para GAPDH. En la Figura 16 se muestra un gel representativo de los productos del RT-PCR.

En el grupo de animales intactos, la expresión relativa de ARNm para la GnRH es diferente a las 17:00 h del Proestro entre el lado izquierdo y el lado derecho de POA-AHA.

La micro-inyección con el vehículo no modificó la expresión del ARNm de la GnRH en el lado izquierdo, ni el lado derecho de POA-AHA. Un efecto semejante se observó al micro-inyectar el antagonista del RE β (Gráficas 21 y 22).



Gráfica 21. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA sobre la expresión relativa del ARNm para GnRH del lado izquierdo (media \pm e.e.m.) en Diestro 2 a las 11:00, Diestro 2 a las 13:00, Proestro a las 11:00, Proestro a las 17:00 y Estro a las 11:00.

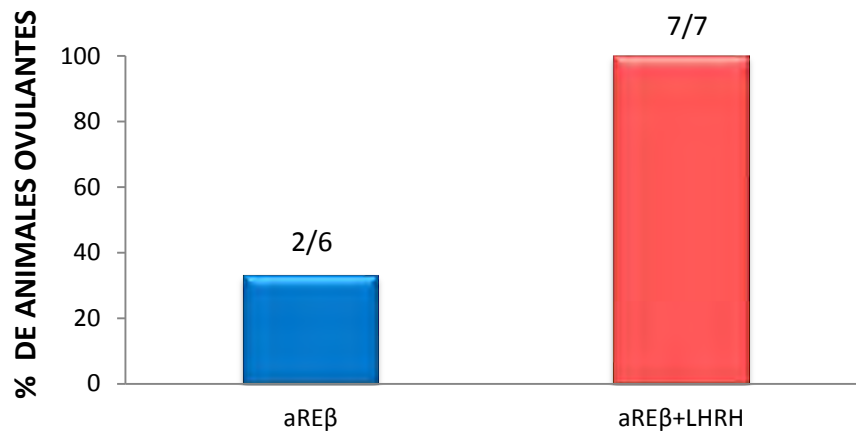


Gráfica 22. Efecto de la micro-inyección del vehículo o el antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA sobre la expresión relativa del ARNm para GnRH del lado derecho (media \pm e.e.m.) en Diestro 2 a las 11:00, Diestro 2 a las 13:00, Proestro a las 11:00, Proestro a las 17:00 y Estro a las 11:00.



RESPUESTA OVULATORIA AL REMPLAZO DE LA SEÑAL HIPOTALÁMICA DE LOS ANIMALES QUE NO OVULAN POR LA MICRO-INYECCIÓN DE CICLOFENIL DEL LADO DERECHO DE POA-AHA.

El reemplazo de la señal hipotalámica por la inyección de la LHRH-sintética realizada a las 14 horas del Proestro indujo la ovulación en todos los animales micro-inyectados con el α RE β (Gráfica 23).



Gráfica 23. Porcentaje de animales que ovularon en el día del Estro esperado, después de la micro-inyección con el antagonista del RE β en el lado derecho de POA-AHA e inyectadas con LHRH a las 14:00 horas del Proestro.



VARIABLE ESTUDIADA	aRE α
% ANIMALES OVULANTES	↓
OVOCITOS LIBERADOS	↓
PESO DE OVARIOS	OI P 17:00 OD D2 11:00 y P 17:00 ↑
PESO DEL ÚTERO	D2 13:00 ↑
PROGESTERONA	=
ESTRADIOL	D2 11:00 ↑
MENSAJERO GNRH	P 17:00 POA-AHA DERECHA ↑
PEEMPLAZO SEÑAL HIPOTALAMICA	OVULAN ↑

VARIABLE ESTUDIADA	aRE β
% ANIMALES OVULANTES	↓
OVOCITOS LIBERADOS	↓
PESO DE OVARIOS	OI E 11:00 OD D2 11:00 y E 11:00 ↑
PESO DEL ÚTERO	=
PROGESTERONA	=
ESTRADIOL	D2 11:00 P 17:00 ↑
MENSAJERO GNRH	=
PEEMPLAZO SEÑAL HIPOTALAMICA	OVULAN ↑

Comparación de los efectos provocados por el bloqueo de los RE α con los RE β del lado derecho de POA-AHA en el día Diestro 2.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con base en los resultados obtenidos deducimos que en el día del Diestro 2, es necesario que tanto el RE α como el RE β de POA-AHA derecha sean activados a la vez por su ligando (17 β -estradiol) para que la ovulación ocurra en el día del Estro esperado. El estradiol a través del RE β no altera la expresión del ARNm de la GnRH, mientras que al unirse al RE α tendría un efecto inhibitorio de la expresión de este mensajero. Con base en los resultados obtenidos sugerimos que la activación del RE α regularía la síntesis de la GnRH, mientras que el RE β regularía la liberación del decapeptido.

La falta de ovulación en la mayoría de los animales con bloqueo de los RE α sería consecuencia de un efecto inhibitorio en la traducción del ARNm de la GnRH a la proteína (Modelo 1), ya que en los animales que fueron micro-inyectados con MPP, la expresión del ARNm de la GnRH aumentó aunque no ovularon. Esta idea es apoyada por el hecho que cuando a estos animales se les administró LHRH sintética, ovularon. Experimentos llevados a cabo con ratones “knockout” para el RE α muestran que estos ratones son incapaces de manifestar la secreción preovulatoria de la GnRH inducida por estradiol (Lubahn *et al.*, 1993; Dupont *et al.*, 2000; Couse *et al.*, 2003), así como la respuesta supresora en la concentración de LH como respuesta a la administración de estradiol (Wersinger *et al.*, 1999; Couse *et al.*, 2003). Con base en esta información se ha sugerido que el RE α está involucrado en el efecto “feedback” negativo del estradiol; sin embargo, nuestros resultados sugieren que en la fase del Diestro 2, los RE α del lado derecho de POA-AHA, participan en el efecto “feedback” positivo de la secreción fásica de la GnRH que ocurre en el Proestro. Hay que considerar que los resultados obtenidos por medio de animales “knockout”, no sólo implica la falta del receptor en el hipotálamo, sino en todos aquellos órganos que expresen el RE α , por lo que la respuesta fisiológica a cualquier manipulación experimental no es del todo verdadera.

Este efecto inhibitorio de la expresión del ARNm para la GnRH del estradiol a través del RE α es asimétrico, ya que el mensajero para esta proteína sólo aumentó en la porción derecha de POA-AHA. Previamente se ha mostrado que la cantidad de ARNm para la GnRH en POA-AHA es mayor en la porción derecha al medio día del Diestro 2 (Arteaga *et al.*, 2003), así como la cantidad de GnRH en la porción derecha del hipotálamo medio basal (Gerendai *et al.*, 1978). Una posibilidad a esta asimetría funcional sería que como en el ratón macho, la cantidad de células GnRHérgicas es mayor en el hemisferio cerebral derecho (Inase y Machida, 1992).



La falta de ovulación en los animales con bloqueo de los RE β resulta del efecto inhibitorio de la liberación de la GnRH (Modelo 2), ya que la expresión del ARNm para la GnRH no fue modificada, pero aun así los animales no ovularon, y sí lo hicieron cuando se les administró LHRH sintética. Con base en estos resultados planteamos que es posible que la falta de activación del RE β modificó la frecuencia, la amplitud o ambos a la vez, de los pulsos de secreción de la GnRH en la tarde del Proestro.

Experimentos llevados a cabo con ratones “knockout” para el RE β muestran que estos ratones tienen concentraciones de LH y de ARNm para la GnRH semejantes a un ratón silvestre son incapaces de manifestar la secreción preovulatoria de la GnRH inducida por estradiol. Se ha mostrado que la infusión de genisteína (agonista selectivo del RE β) en el tercer ventrículo de la oveja ovariectomizada provoca la disminución de los pulsos de la GnRH (Hardy *et al.*, 2002).

En la rata, la mayoría de las neuronas GnRH expresan el RE β , pero no el RE α (Herbison, 2006). Lo que indica que el α -RE β actuó en la neurona GnRHérgica y otras neuronas que expresan este receptor, como la glia, la neurona que sintetiza GABA, glutamato, noradrenalina, etc (Herbison, 2006). En cambio, el α -RE α actuó en todas estas, excepto la GnRHérgica.

Wintermantel *et al.*, (2006) proponen que la secreción fásica de LH ocurre a través del RE α , y que este es el necesario y suficiente para que se lleve a cabo este evento neuroendocrino. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, pero también muestran que el RE β también requiere ser activado en esta fase del ciclo para que se libere la GnRH almacenada en las vesículas.

No solo la secreción fásica de GnRH parece estar modificada, sino que posiblemente también la tónica. Si esto es así, explicaría porque aumenta el peso de los ovarios. McGee *et al.*, (1997) señalan que el crecimiento de los folículos depende de la cantidad de gonadotropinas secretadas, lo que explicaría por qué el bloqueo de los receptores a estrógenos provocó aumento del peso de los ovarios. Conforme al razonamiento anterior se sugiere que en el Diestro 2, la activación de los RE α y β regulan de manera inhibitoria la secreción tónica de FSH.

Junto con el aumento del peso de los ovarios, la concentración de E $_2$ también aumentó por el tratamiento con el α -RE α , a las 32 horas de inyectar el fármaco, lo que apoya la idea del efecto estimulante del α -RE α y del α -RE β en el crecimiento folicular. Es decir, que en condiciones normales, los RE α del lado derecho de POA-AHA, en la mañana del Diestro 2, regulan de manera inhibitoria la secreción de E $_2$.



En el caso del bloqueo del RE α por MPP el aumento en la concentración de E₂ a las 11:00 del Diestro 2 indujo su efecto estimulante sobre el útero, lo que se tradujo en el aumento del peso de este órgano, ya que se ha mostrado que el E₂ tiene un efecto mitogénico, aumenta la síntesis de ADN y la mitosis, forma una red glandular y un sistema elaborado de vasos sanguíneos (angiogénesis) (Hess *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

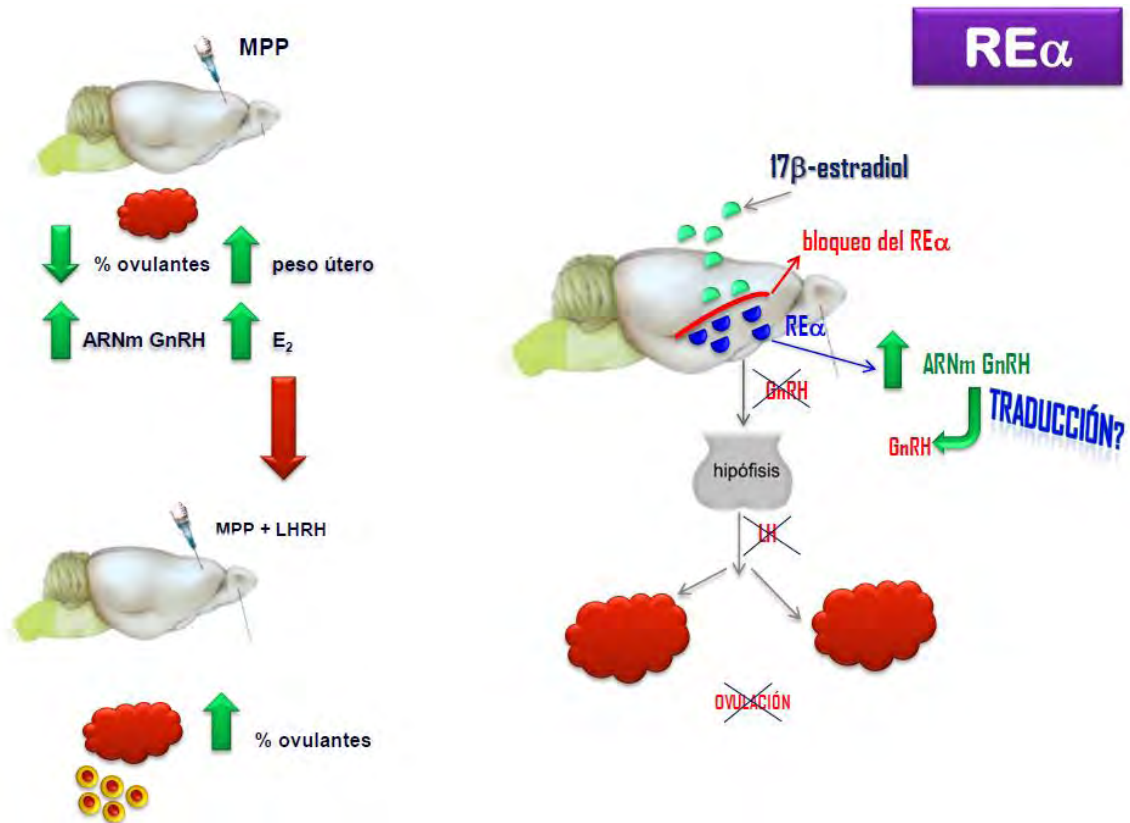
En el día del Diestro 2, es necesario que tanto el RE α como el RE β de POA-AHA derecha sean activados a la vez por su ligando (17 β -estradiol) para que la ovulación ocurra en el día del Estro esperado.

En la mañana del Diestro 2, el estradiol en POA-AHA derecha al unirse al RE α regula de manera inhibitoria la expresión del ARNm de la GnRH, mientras que al unirse al RE β no lo modifica.

En la mañana del Diestro 2, la activación de los dos receptores en POA-AHA derecha regula de manera inhibitoria la secreción de estradiol y no altera la de progesterona.

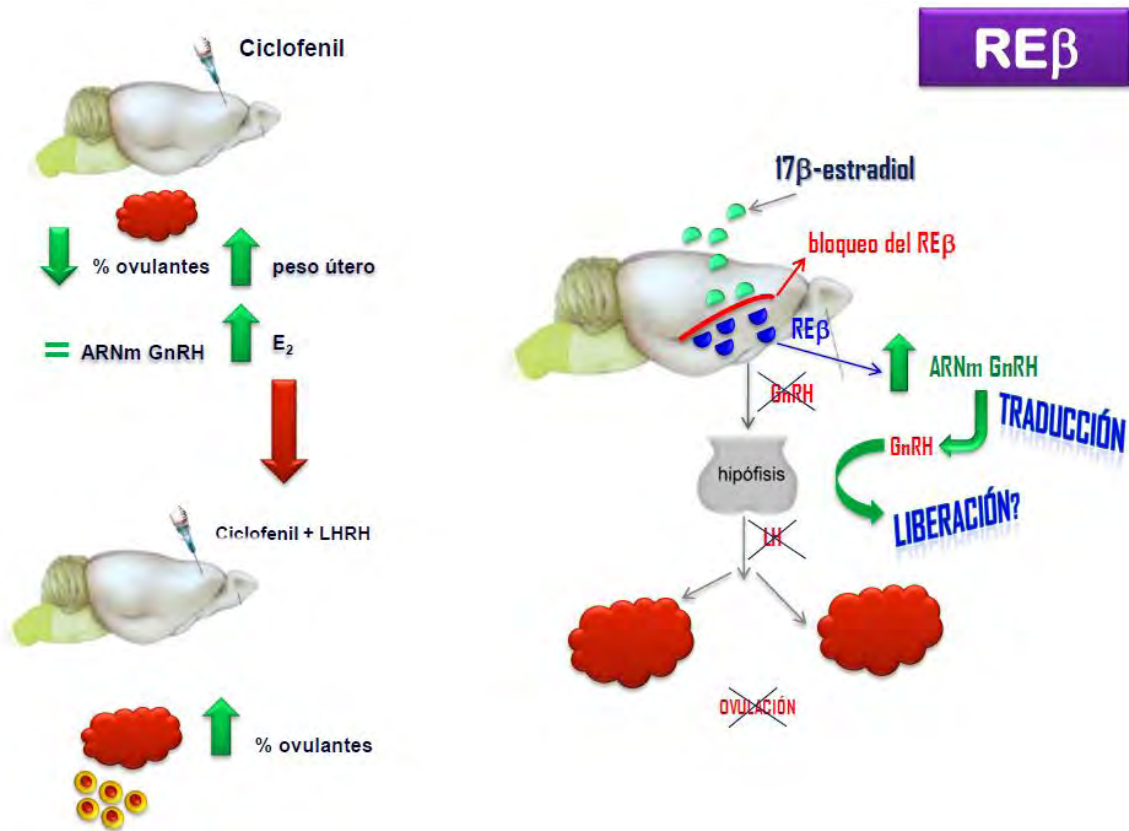


Modelo 1. Esquematización del posible papel del 17 β -estradiol al unirse al RE α en la mañana del diestro-2, en la porción derecha de POA-AHA, en la regulación de la expresión del ARNm de la GnRH, la secreción de estradiol, el peso del útero y la ovulación.





Modelo 2. Esquematización del posible papel del 17β -estradiol al unirse al RE β en la mañana del diestro-2, en la porción derecha de POA-AHA, en la regulación de la expresión del ARNm de la GnRH, la secreción de estradiol, el peso del útero y la ovulación.





BIBLIOGRAFÍA

- Arimuda A. (2000). Hipotalamic hormones. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, Editores: Conn PO, Freeman ME. Human Press Inc. Cap. 3. 41-58
- Arteaga-Lopez PR. (2005). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*. Pp 21; 251-260.
- Aschoff J. (1980). The circadian system in man. IN Krieger DT, Hughes JC (eds). *Neuroendocrinology*. Sunderland, MA. Sinauer Associates, p 77.
- Barry J, Barette B, (1975). Immunofluorescence study of LRF neurons in primates. *Cell Tissue Res*, pp 163-164.
- Berne Rm, Levy MN. (1992). Revisión de la función reproductora. *Fisiología*. Mosby/Doyma Libros, España Pp. 579-589.
- Bottino, MC, Lanari, C. (2010). Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina*, 70, 173-184.
- Brow RE. (1994). The hypothalamic hormones. En: *Introduction to Neuroendocrinology*. Cambridge University Press, Great Britain. Pp 40-55.
- Cabrera E (2009). Efectos del bloqueo de los receptores α y β sobre la ovulación, crecimiento follicular, el peso del útero y los ovarios, durante el ciclo estral de la rata. En tesis, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Casabiell X. (2006). Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovárico. In: *Endocrinología*. Arce V. M., P, Catalina F. y F. Mallo. (ed.). Universidad de Santiago de Compostela y Universidad de Vigo. Espuma. Pp. 95-101.
- Charli JL, Ponce G y Joseph-Bravo P., (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRGérgicas hipotálamicas. En: *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. México: Edit. R. Domínguez, UNAM-PORRUA. PP 59-85.



- Colantuoni A. y F. Santangelo. (2005) Regulación de las funciones sexuales y reproductivas. PP.: 1378-1384. In: Fiorenzo C. (ed.). Fisiología médica. Milan Italia.
- Couse, J. F., Yates, M. M., Walker, V. R., and Korach, K. S. (2003). Characterization of the hypothalamic-pituitarygonadal (HPG) axis in estrogen receptor null mice reveals hypergonadism and endocrine sex-reversal in females lacking ER α but not ER β . Mol. Endocrinol. Pp. 17, 1039–1053.
- Davis K.M.; Wu J.Y.,(2001). Role producing of glutamatergic and GABAergic systems in alcoholism. J.Biomed. Sci., Koch-Weser, J.;Sellers. Pp119-122.
- Dickson RB, Strancel GM (2000), Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. J. Natl Cancer Monogr, 27, 135-144.
- Domínguez R., R. Chávez, M. E. Cruz. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. PP.: 162-183. In: Tópicos selectos de Biología de la Reproducción. Domínguez R., R. Chávez, M. E. Cruz (ed.). Miguel Ángel Porrúa. México.
- DuPont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., and Mark, M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. Development. Pp. 127, 4277–4291.
- Evans RM, (1988).The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Howard Hughes Medical Institute, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA 92138-9216, pp 885-889.
- Fawcett DW. (1995). Tratado de histología. Duodécima edición. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. Pp. 885-893.
- Fink, G. (2000). Gonadotropin secretion and its control. En Knobil, & Neill. The Physiology of reproduction Pp 1349-1377. Nueva York: Raven Press.
- Freeman EM (2006). “The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the rat”. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E. y Nelly JD editors. Volumen 2, Cap. 46, Raven Press, Nueva York. Pp. 613-615.



- Galindo, JL. (2011). Efectos del bloqueo del RE- α en el lado derecho de POA-AHA sobre la ovulación y la secreción preovulatoria de gonadotropinas y hormonas esteroides. En Tesis. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- 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, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata. Tesis de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U., (1978) unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the medio basal hypothalamus. *Neurosc Lett*; Pp. 9: 333-336.
- Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Scapagnini V. (1979). LH-RH content changes in the medio-basal hypothalamus after unilateral ovariectomy. *Neuroendocrinology: Biological and Clinical Aspects. Proceeding of Sorono Symposia, Vol 19: New York: Academic Press. Pp. 97-102.*
- Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1988) Follicular Steroidogenesis and its control. En: *The physiology of Reproduction*. Editores: Knobil E, Neill JD. Segunda edición. Editorial Raven Press, New York, Vol.2 Cap 12 p.629-724.
- Guyton AC and Hall JE (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. Décima Edición, Mc Graw-Hill-Interamericana. México. Pp. 100-120; 512-538.
- Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tanford C. (1979). Properties of detergents. *Methods Enzymol*, 56: 734-49.
- Herbison AE. (2006). Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, Academic Press, St. Louis, MO, USA. Pp. 1415-1482.
- Hess AP, Nayak NR, Giudice LC (2006). Oviduct and Endometrium: Cyclic Changes in the Primate Oviduct and Endometrium. *Knobil and Neill's Physiology of Rereproduction*, 9 pp 337.
- Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Lipovits Z, Petersen SL. (2000). Detection of receptor- β messenger ribonucleic acid and ^{125}I -estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinal*. Pp. 141 (9): 3506-3509.



- Inase Y, Machida T. (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orquidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Res.* Pp. 580:338-340.
- Ishizukan B, Quigley ME, Yen SSC, (1983). Pituitary hormone release in response to food ingestion: Evidence for neuroendocrine signals from gut to brain. *J Clin Endocrinol Metab*, pp 57:1111.
- Jennes L., Stumpf WE, Sheedy ME.,(1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons. *Journal of Comparative Neurology* pp: 534-547.
- Jensen EV, and Jacobson HI, (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec. Prog. of Hor. Res*, pp 18: 387–414.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1974). Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. WHO Food Additives Series No. 5. World Health Organization.
- Kilen SM, Schwartz NB. (1998). Estrous cycle. En: *Enciclopedia of Reproduction*. Knobil E. y Neill JD editors. Volumen 2, Academic Press, USA, Pp. 127-136.
- König JF y Kilppel RA. *The rat brain a stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of Brain Stem*. New York: Krieger Publishing Co. Inc; 1967.
- Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA, (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. Pp 93: 5925-5930.
- Leung, Y. Mak, P, Hassan, S. Ho, S (2006). Estrogen receptor (ER)- β isoforms: a key to understanding ER- β signaling. *Proc Nac Acad Sci*, 103 (35).
- Loza, AM. Lemus, AE. Pérez GP. (1995) *Metabolismo de hormonas esteroides*. En S. J. Díaz, & H.G.J. *Bioquímica* Pp. 605-660. México: Interamericana McGrawn-Hill.
- Lubahn, D. B., Moyer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. F., Korach, K. S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Pp. 90, 11162–11166.



- Matsuo H, BbaY, Nair RM, Arimura A, Schaky AV, (1971). Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. Pp1334-1339.
- MCGeer PL, Eccles JC, McGeer EG. (1987). *Molecular Neurobiology of the mammalian brain*. Segunda Edición. Nueva York. Pp 150.
- Mendoza L, Arteaga PR, Domínguez R, Cerbon MA, Arrieta I, Flores A, Cruz ME, (2007). Changes in the number of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells on POA-AHA during the estrous cycle of the rat. *AO th Annual Meeting of Society Study of Reproduction, San Antonio Texas*. 21-25 julio, Abst 128, pp 106.
- Montaner AD, Mongiat L, Lux-Lantos VA, Park MK, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lescheid D, Lovejoy D, Libertun C, Sherwood NM, Somoza GM. (2001). Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone isoforms isolated from rat and hamster brains. *Neuroendocrinology*. Pp 74;2-12.
- Nilsson, S. Makela, S. Treuter, E. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol*, 81 (4). 1535-1565.
- Niswender, G.D., Nett, T.M. (1988). The corpus luteum and its control. En: Kobil, E., Neill, J. (eds.). *The Physiology of Reproduction*, Pp. 499-525.
- Palkovits M. (1979). Micro and Macroscopic structure, innervations and vasculature of the hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Conn PM y Freeman ME. Human Press. Pp. 23-31.
- Paniagua G., M. Nistal, M.P. Sesma, M. Alvarez-Uría, R. Anadón, B. Fraile y F. J, Sáez. (2002). Gametogénesis y fecundación In: *Citología e histología vegetal y animal*. McGraw-Hill Interamericana. España Pp. 371-405.
- Pawson AJ, Morgan K, Maudsley SR, (2003). Type II gonadotropin-releasing hormone (GnRH II) in reproductive biology. *Reproduction*. Pp. 126; 271-278.
- Prieto GB, Velázquez PM, (2002). Fisiología de la Reproducción; Hormona Liberadora de las Gonadotropinas. *Rev. Fac. Med UNAM*. Pp 45 (6): 252-257.



- Rainbow TC, Dejruff V, Luine V, McEwn B. (1980). Estradiol-17 β increase the number of muscarinic receptors in hypothalamic nuclei. *Brain Research*; Pp. 198:239-243
Reproduction. Editores: Knobil E, Neill JD. Academic Press, San Diego. 2:
- Rissman, EF. Wersinger, SR. Taylor, JA. Lubahn, D (1997). Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Hom Behav*, 31 (3). 232-43.
- Rodríguez D. (2010). Efectos del bloqueo del RE- β de POA-AHA sobre la ovulación, secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides. En Tesis. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Rollerova E., Urbancikova M., (2000) Intracellular Estrogen Receptors, their characterization and function (Review). *Endocrine Regulations*. Vol. 34, 203-218.
- Romanowicz, K., Misztal, T., and Barcikowski, B. (2004). Genistein, a phytoestrogen, effectively modulates luteinizing hormone and prolactin secretion in ovariectomized ewes during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology*. Pp. 79, 73–81.
- Sanchez Criado JE. Fisiología del ovario. (2003) En: Fisiología humana. 2ª Ed. México: McGraw-Hill Interamerican; Pp. 1036-1048.
- Seeburg PH, Adelman JP, (1984), Characterization of c DNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature*, pp 311-666.
- Seeburg PH, Mason AJ, Stewart TA, (1987).The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog Horm Res*, pp 43-69.
- Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR. (1993). Origin of mammalian gonadotropin-releasing. *Endocrinology Rev*. Pp 14; 241-254.
- Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I. (1998). Evidence for the localization of estrogen receptor- β mRNA and estrogen receptor- α immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinol*. Pp. 139: 5267-5270.
- Silverman AJ., Livine I., Witikin JW., (1994). The gonadotropin- releasing hormone (GnRH), neuronal systems:immunocytochemistry and in situ hybridization. *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill. Vol. 2. Segunda edición, Raven press, New York, EUA, pp.1683-1710.



- Swanson LW, (1987). The hipotalamus. In Bjorklund A, Hokfelt T, Swanson LW, (eds). Handbook of Chemical Neuroanatomy, Amsterdam, Elsevier, pp1-125.
- Szentagothai J, (1967). The parvicellular neurosecretory system. In Bargmann W. Schade JP (eds). Lectures on the Diencephalon. Amsterdam, Elsevier, pp 135-146.
- Tamrazi A. Carlson EK, Daniels JR, Hurth KM y Katzenellenbogen JA, (2002). Estrogen receptor dimerization: Ligand Binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. Molecular endocrinology, pp. 2706-2719.
- Timossi, C. Ulloa, A. (2000). Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reprod Biomed Online*, 1 (2). 48-62.
- Toft D, Gorski J, (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp 18: 387-414
- Tresguerres F. (2010). Fisiología del eje hipotálamo hipófisis ovario In; Fisiología humana Fernández T. J. 4º Edición. Editorial Mc Graw Hill. Madrid España. Pp: 1041-1058.
- Ulloa Aguire A., Rees Midgley, A. Jr, Beitins, I.A, Padmanabhan V. (1995) Follicle- stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev.* Pp. 6, 75-187.
- Urbanski HF. White RB, Fernald RD, (1999). Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the macaque brain. *Endocrinology*. Pp 140:1945-1948.
- Van-Voorhis BJ. (1999). Follicular Development. En: *Encyclopedia of*
- Watts, CK. Sutherland, RL. (1987). Studies on the ligand specificity and potential identity of microsomal antiestrogen-binding sites. *Molecular Pharmacology*. 31 (5) 541-51.
- Wersinger, S. R., Haisenleder, D. J., Lubahn, D. B., and Rissman, E. F. (1999). Steroid feedback on gonadotropin release and pituitary gonadotropin subunit mRNA in mice lacking a functional estrogen receptor alpha. *Endocrine*. Pp. 11, 137-143.



- Wintermantel, T. M., Rebecca E. Campbell, Robert Porteous, Dagmar Bock, Hermann-Josef 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 Hormone Neurons and Fertility. *Neuron*. Pp. 52: 271-280.
- Wise PM, Rance N, Barraclough CA. (1981). Effects of estradiol and progesterone on catecholamine turnover rates in iscret hypothalamic regions in ovariectomized rats. *Endocrinology*; Pp. 108: 2186- 2193.
- Yao H. C. and J. M. Barh. 1999. Ovary, Overview. In: *Physiology of reproduction*. Knobil E., And J.D. Neil. (ed.). 3º Ed Academic Press. Vol 2. United States of America. Pp. 590-596.
- Yen J, Adashi EY. (2001). El ciclo ovárico. En: *Endocrinología de la Reproducción*. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. Editorial Médica Panamericana. Cuarta Edición México. Pp 164- 202.
- Yoshinaga K, Hawkins RA, Strocker JF (1999). Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology* 85; 103-112.
- Zhang X., L. Zhang, S. Huo, J. Wang, and S. Cui. (2010). Neonatal superior ovarian nerve transaction inhibits follicle development by enhancing follicular atresia and suppressing granulose cell proliferation in rats. *Reproduction, fertility and development*. Pp. 22:1148-1158.



ANEXO

MPP

El metil-piperidino-pirazol (MPP) es un antagonista análogo del receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$), tiene una cadena lateral básica (BSC) unida a un ligando selectivo antagonista a $RE\alpha$, metil-pirazol-triol (MPT) a través de un ligando de éter.

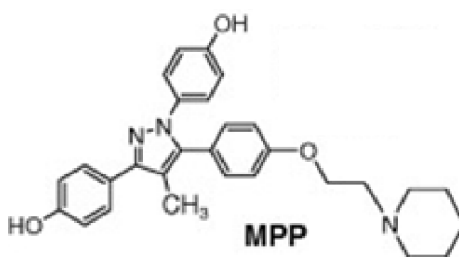


Figura 17. Estructura química del metil-piperidino-pirazol (MPP)

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

Peso molecular: 465.574 g/mol

Densidad: 1.22 g/mL.

El 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 $RE\beta$ (Stauffer *et al.*, 2000). Por la falta de antagonistas selectivos para el $RE\alpha$, se desarrollaron compuestos que antagonizan con este receptor pero no con el $RE\beta$, adicionando 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 apoptosis de células del endometrio humano, cuando se compara con los efectos del estradiol. En ratones, el MPP aumenta el peso del útero y la proliferación del endometrio (Davis *et al.*, 2006). En el caso de ratones ovariectomizados, la administración de este fármaco aumente el



peso del útero y la proliferación del endometrio (Davis *et al.*, 2006). Al inyectar subcutáneamente el MPP durante 6 días consecutivos provoca disminución de la concentración de LH en la hipófisis y en el suero (García, 2007).

Debido a los resultados obtenidos se ha sugerido que en la rata, la acción de los estrógenos sobre la secreción de LH es ejercida por el RE- α . 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 (Cabrera, 2009).

El MPP a dosis de 25 a 150 μ g aumenta el peso húmedo del útero, pero no de la forma en que lo hace el 17β -estradiol, ya que 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 (Dickson, 2000).

CICLOFENIL

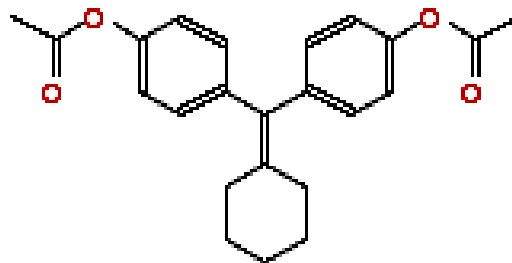


Figura 18. Estructura química del Ciclofenil

Propiedades químicas:

Nombre común: Ciclofenil

UIPAC: [4-[(4-acetoxyphenyl)-cyclohexylidene-methyl]phenyl] acetate

Sinónimos: bis (p-acetoxyphenyl) cyclohexylidenemethane, 4,4'-

Cyclohexylidenemethylenediphenol; 4-(Cyclohexylidenemethylene)-bis-phenol

Nombres comerciales: Ondogyne y Sexovid

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

Masa Molecular: 364.434 g/mol



El Ciclofenil es un estimulante gonadal e inductor de la ovulación. Es utilizado en el tratamiento de la infertilidad y la amenorrea, pero es menos eficaz que el clomífero. Es un modulador selectivo de receptor de estrógeno. El Ciclofenil es el más utilizado en la terapia del cáncer de mama y de infertilidad (*Watts y Sutherland 1987*).

El Ciclofenil también puede actuar como un anti estrógeno, ligándose a los receptores de estrógeno y bloqueándolos. Esto es especialmente útil cuando se suprimen las concentraciones de testosterona naturales.

Hasta el 2003, el Ciclofenil fue catalogado como un antagonista selectivo para el RE β ; tiene una afinidad de unión relativa por este receptor de 150 respecto al estradiol (*Tamrazi et al., 2002*).

TWEEN 20®

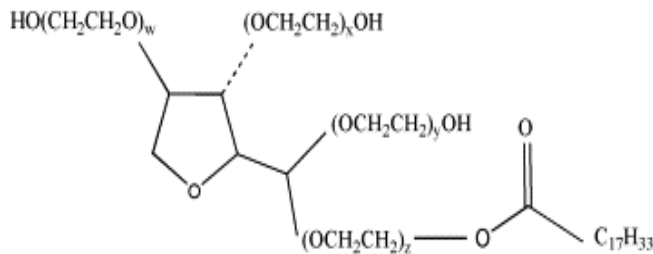


Figura 19. Estructura del Tween 20® (Wenger, *et al.*, 2005)

Propiedades químicas:

Nombre común: Tween 20® 20

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

Formula condensada: C₅₈H₁₁₄O₂₆

Masa Molecular: 1227.54 g/mol

Densidad: 1.1 g/mL

Punto de ebullición: >100°C



Actividad Farmacológica

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

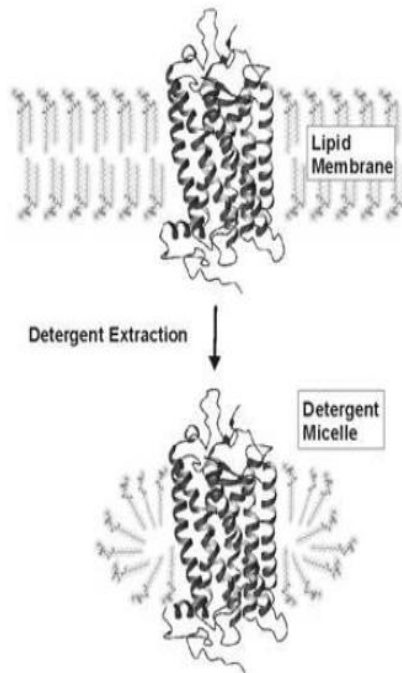
En el desarrollo biofarmacéutico, el Tween 20® se puede usar durante la purificación y la formulación para aminorar adsorción de superficie, como en las formulaciones líquidas el Tween 20® se agrega para aminorar la absorción de la proteína a superficies y mantiene la concentración a una distancia definida durante un proceso de purificación, tal como un paso de ultrafiltración o cromatografía.

Sin embargo los detergentes no iónicos también se utilizan para la solubilización de membranas y como un medio solvente para proteínas de membrana (figura 13), generalmente el detergente óptimo para cierta proteína de membrana o membrana se tiene que encontrar empíricamente y puede depender del tipo del experimento que uno quiere hacer (Helenius, *et al.*, 1979)

Los detergentes no iónicos no poseen ningún grupo cargado. El carácter hidrófilo de estos detergentes se debe al grupo hidroxilo, disuelve los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína, mientras que las interacciones proteína-proteína no resultan afectadas. De este modo se conserva la estructura nativa de las proteínas. Además, el detergente sustituye a los lípidos, que normalmente están unidos (Helenius, *et al.*, 1979)



La parte hidrófoba de las proteínas, con lo que crean un entorno de tipo lípido y pueden estabilizar proteínas solubilizadas.



Estudios han establecido que 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 alteran la carga de las proteínas a las que se unen (figura 14).

Figura 20 Solubilización de proteínas por detergentes no ionicos (Helenius, *et al.*, 1979)

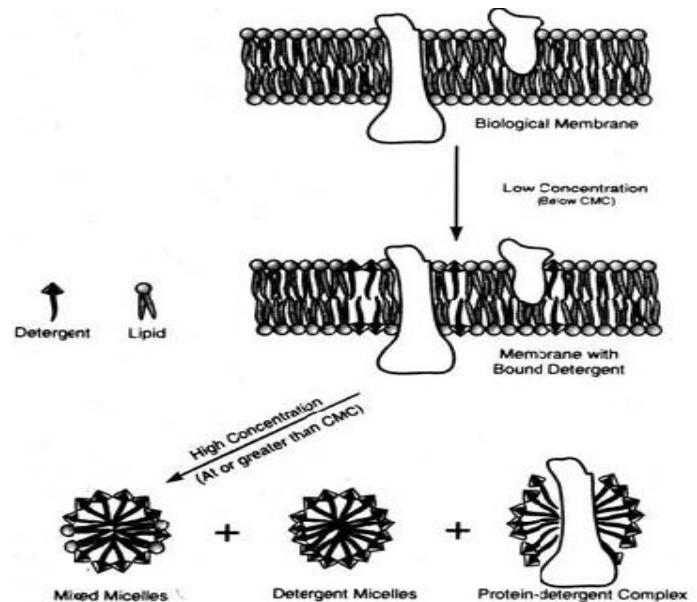


Figura 21. Propiedad de Detergentes (Helenius et al., 1979).

Por las propiedades mencionadas, el polisorbato 20 se emplea para estabilizar la solución de proteínas purificadas usada en prueba de piel para la exposición de tuberculosis, como un agente para lavar las marcas de pruebas de inmunoensayos como el de Western 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. (Joint, 1974).H