



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CAMBIOS EN LA EXPRESION DEL ARNm DE LA GnRH EN EL
AREA PREOPTICA HIPOTALAMICA ANTERIOR, DURANTE EL
CICLO ESTRAL DE LA RATA

T E S I S

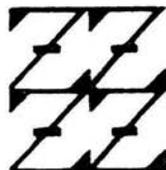
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

DANIEL CRUZ MEDEROS

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO MUNDANO ES JE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. ESTHER CRUZ BELTRAN

MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Cambios en la expresión del ARNm de la GnRH en el área preóptica
hipotalámica anterior, durante el ciclo estral de la rata.**

Tesis presentada por: **Daniel Cruz Mederos**

Directora de tesis: **Dra. María Esther Cruz Beltrán**

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la F.E.S. Zaragoza. UNAM.

A mi hijo: Ángel Daniel, por ser la luz que ilumina mi vida.

A mi esposa: Graciela, por ser auténtica y amorosa con nuestro hijo

A mi mamá: Cipriana Mederos Pérez, por ser la mujer que más admiro y amo en el mundo

A mis hermanos: Marisol y José, por confiar en mí y por todo el apoyo que me brindan

A mis amigos: Por el simple hecho de serlo.

Agradecimientos

A la Dra. Maria Esther Cruz Beltrán, por la confianza que deposito en mí, por el tiempo que empleo en esta tesis y sobre todo por sus enseñanzas.

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá, por ser el creador y uno de los pilares fundamentales de la unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (U.I.B.R.).

A los miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones durante la realización y revisión de este trabajo.

Al laboratorio de Hormona Esteroide del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán” y al Biól. Roberto Chavira por su colaboración en la cuantificación de las hormonas por radioinmunoanálisis.

Al personal del bioterio de la FES Zaragoza por el cuidado y mantenimiento de los animales.

A mis compañeros del laboratorio por los momentos que llegamos a compartir y que nunca se olvidarán.

Los hombres deberían saber que de ningún lado
más que del cerebro provienen las alegrías,
deleites, risas, bromas y pesares,
tristezas, depresiones y lamentaciones.
Y mediante esto, en un modo especial
adquirimos la sabiduría y el conocimiento,
y vemos y oímos y sabemos qué es lo malo
y qué es lo bueno, qué es lo dulce y qué lo desagradable.
Por el mismo órgano nos volvemos locos y
delirantes, y nos asaltan miedos y terrores
algunos por la noche y otros durante el día,
y los sueños y los vagabundeos sin fin,
y las preocupaciones que son nada adecuadas,
y la ignorancia de las circunstancias del momento,
la grosería y la falta de habilidades.
Todas estas cosas le debemos al cerebro
cuando no está sano...o cuando sufre
cualquiera otra aflicción inusual o preternatural.

Hipócrates

Resumen	I
Introducción	1
Marco teórico	
• Ciclo reproductivo	2
• Hipotálamo	6
• Neuronas GnRHérgicas	11
• GnRH	12
1. Estructura	13
2. Síntesis	13
• Receptores a GnRH	15
• Regulación de la secreción a GnRH	16
• Asimetrías hipotalámicas	19
Planteamiento del problema	21
Hipótesis y Objetivo	22
Método	
• Animales	23
• Obtención del tejido nervioso	23
• Obtención del ARNm, RT y PCR	25
• Cuantificación de hormonas y análisis estadístico	27
Resultados	
• Concentraciones hormonales	29
• Expresión del gen de la GnRH	33
Discusión	37
Conclusión	39
Bibliografía	40

Resumen

En la rata, alteraciones en la integridad funcional del lado derecho del hipotálamo anterior inhiben la secreción de gonadotropinas, la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario *in situ*; mientras que la lesión del lado izquierdo no las modifica. Estas diferencias funcionales entre uno y otro lado del hipotálamo parecen estar relacionadas con el hecho de que la concentración de la GnRH en el hipotálamo medio basal del lado derecho es el doble que la del izquierdo. Pero esta asimetría no parece ser constante, sino que podría variar o presentarse en horas específicas del día. Por otra parte, si consideramos que los procesos neuroendocrinos que culminan con la ovulación son diferentes y específicos a lo largo del ciclo estral, es de suponerse que las asimetrías funcionales del hipotálamo varíen también durante el ciclo.

Con la finalidad de conocer si esta asimetría funcional del hipotálamo está relacionada con la cantidad de GnRH en uno y otro lado del hipotálamo, y de si esta varía a lo largo del día y en las diferentes fases del ciclo estral, en este trabajo se cuantificó la expresión del gen para la GnRH en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA durante el ciclo estral de la rata. Para lo cual se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La máxima expresión del gen para la GnRH ocurre en la mañana (09:00 horas) y posterior al medio día del día (13:00 horas) del diestro-2: esta expresión es mayor en el lado derecho de POA-AHA. En los otros días del ciclo estral, la expresión del gen para la GnRH permanece baja y sin diferencias entre los lados.

Estos resultados apoyan las observaciones previas que indican que el hipotálamo funciona en forma asimétrica, como resultado en parte, de diferencias en la expresión del gen que codifica la síntesis de la GnRH entre los lados izquierdo y derecho de POA-AHA. Dicha asimetría varía a lo largo del día y en las diferentes fases del ciclo estral de la rata.

Introducción

El hipotálamo es considerado el centro integrador que modula la secreción de hormonas y la ovulación, por medio de la secreción de la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH; por sus siglas en inglés), misma que es sintetizada en los somas de neuronas GnRHérgicas localizadas en el hipotálamo anterior y medio, y llevada por transporte axónico hacia la eminencia media, donde es liberada hacia los gonadotropos de la hipófisis por medio del sistema porta-hipotalámico-hipofisario. Este evento desencadena una serie de fenómenos o mecanismos neuroendocrinos que involucran a los ovarios y que culminan en la secreción de hormonas esteroides y la ovulación.

Gerendai y col., en 1978, mostraron que en ratas hembras tomadas al azar, la cantidad de GnRH que hay en el lado derecho del Hipotálamo Medio Basal (HMB) es el doble con respecto al lado izquierdo. Estos resultados acerca de la asimetría en la cantidad del péptido ha sido corroborado indirectamente, por medio de diferentes resultados que muestran que la lesión, la deafferentación o la implantación de fármacos en el hipotálamo, provocan efectos asimétricos sobre la secreción de gonadotropinas, la ovulación y el grado de hipertrofia compensadora del ovario (Fukuda y col., 1982; Nance y Moger, 1982; Nance y col., 1983; Cruz y col., 1989 y Moran y col., 1994).

Los resultados experimentales de Gerendai, llevan a pensar que la función asimétrica del hipotálamo no es un fenómeno estático, sino que varía durante el ciclo estral, posiblemente como resultado de la diferente cantidad de neuronas que sintetizan la GnRH, de diferente tipo o cantidad de señales nerviosas entre las neuronas GnRHérgicas de uno y otro lado del hipotálamo, o ambas posibilidades, de disimilitudes en la actividad neural (que se traduce en variaciones en la síntesis de diferentes neuromoduladores), en la cantidad y la sensibilidad de ciertos receptores, en las vías nerviosas procedentes de otras zonas del sistema nervioso central que regulan la actividad de las neuronas hipotalámicas, entre otros.

Para analizar si la diferencia en la cantidad de GnRH entre los lados izquierdo y derecho del hipotálamo medio basal (Gerendai y col. 1978) es un fenómeno resultado de la síntesis de la proteína, y si esta asimetría cambia durante el ciclo estral, en este trabajo se decidió cuantificar la cantidad del RNAm que codifica para la GnRH en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA, durante el ciclo estral de la rata adulta. Estos resultados fueron correlacionados con las variaciones en las concentraciones plasmáticas de estradiol, testosterona, LH y FSH durante el ciclo estral.

Marco Teórico

Ciclo Reproductivo

El ciclo reproductivo, es el resultado de diversos eventos neuroendocrinos que se llevan a cabo en el cerebro, la hipófisis, los ovarios y el útero. La duración del ciclo reproductivo es específico en cada especie; en la rata varía de 4 a 5 días, en la vaca es de 21 días, en la oveja varía de 16 a 17 días, en la cerda es de 21 días y en el primate es de 28 días (Kalra y Kalra, 1983).

La rata (modelo biológico utilizado para el presente estudio) ovula durante todo el año y para su estudio, su ciclo estral se ha dividido en cuatro etapas: diestro 1, diestro 2, proestro y estro. En aquellas ratas que presentan ciclos de cuatro días de duración, la concentración de estradiol en plasma durante el estro es baja (8 ± 2 pg/ml) (Butcher y col., 1974; y Freeman, 1994), empieza a aumentar en la tarde del diestro 2 hasta llegar a su máximo valor (45 ± 2 pg/ml) a las 9:00 a.m. del proestro (Butcher y col., 1974). Durante la tarde del proestro la concentración de estradiol cae rápidamente y alcanza valores basales o bajos en las primeras horas de la mañana del estro.

El aumento máximo en la concentración de estrógenos en plasma desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la GnRH desde el hipotálamo. La GnRH a su vez, estimula la secreción de dos gonadotropinas que son secretadas por la hipófisis anterior y se denominan hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH). La concentración circulante de LH empieza a aumentar alrededor de las 14:00 o 15:00 horas del día del proestro, y alcanza su concentración máxima entre las 13:00 y 17:00 horas de ese día (Butcher y col., 1974; Freeman, 1994). A este momento en el que aumenta al máximo la concentración de gonadotropinas en la sangre se le ha denominado "pico" u oleada preovulatoria. Según la especie, después del "pico" de gonadotropinas (11 horas en el caso de la rata y 36 horas en los primates), la ovulación ocurre en las primeras horas del día del estro. En el día del estro, ocurre un segundo aumento en la concentración plasmática de FSH, el cual marca el inicio del siguiente ciclo (Leo, 1999).

Este rápido incremento de LH en combinación con la FSH induce la ruptura del folículo y la ovulación en las primeras horas del estro. La concentración en plasma de LH empieza a disminuir en la noche del proestro, alcanzando una concentración basal en las primeras horas de la mañana del estro y permanece así durante el diestro 1 y diestro 2. El patrón de secreción de la FSH y prolactina durante el ciclo estral es similar al de la LH, excepto que la concentración de FSH alcanza un segundo "pico" en la mañana del estro cuya función está relacionada con el reclutamiento de folículos (Butcher y col., 1974; Freeman, 1994) (Fig. 1).

Otra hormona que participa en la regulación del ciclo reproductivo es la progesterona secretada principalmente por el cuerpo lúteo del ovario (Greenspan y Forsham, 1988). Durante el ciclo estral de la rata se presentan dos incrementos en la concentración de progesterona en plasma. El primer de ellos se presenta en la tarde del diestro 1 y se prolonga hasta las primeras horas de la mañana del diestro 2, momento en el que alcanza

una concentración basal. El segundo ocurre en la tarde del proestro y desciende a concentraciones basales en el día del estro (Janne, 1981) (Fig. 1)

El efecto de los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas varía durante el ciclo estral (Fig. 1). Durante la mayor parte del ciclo, la concentración plasmática de estradiol es baja regulando de manera inhibitoria la secreción de gonadotropinas. Cuando las concentración plasmática alcanza valores máximos en la mañana del proestro, estimulan la secreción de FSH y LH. El aumento en la concentración plasmática de estrógenos y su brusca disminución a valores mínimos o basales, se conoce como secreción preovulatoria de estrógenos. Esta secreción preovulatoria es esencial para iniciar, mantener e incrementar la respuesta de la hipófisis a la GnRH (Gallo, 1981).

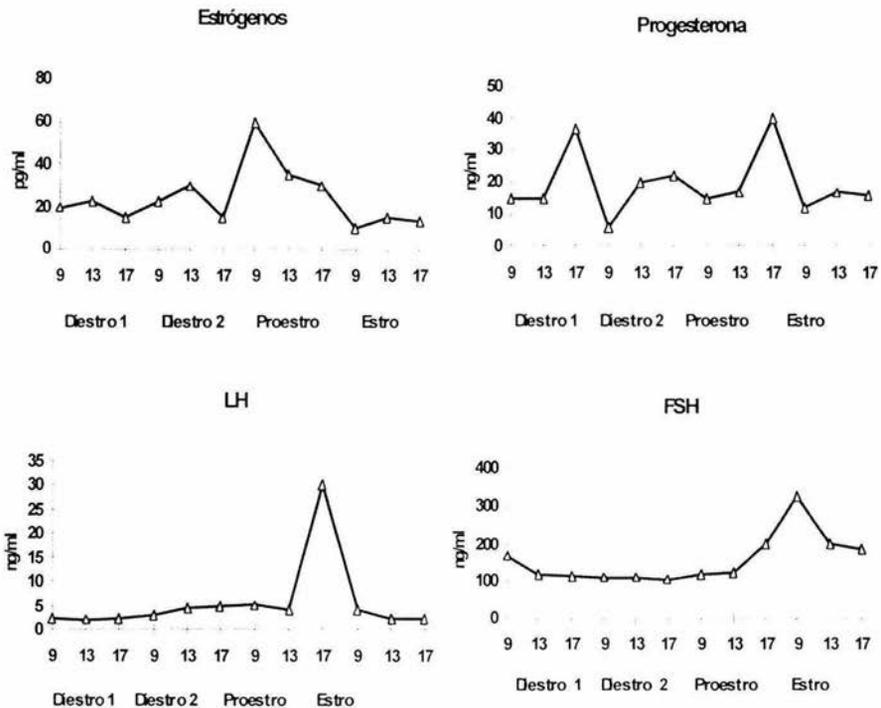


Fig. 1: Variaciones en la concentración plasmática de estradiol, progesterona, FSH y LH durante el ciclo estral de la rata (Freeman, 1994).

Anteriormente se pensaba que los estrógenos regulaban de manera indirecta la síntesis de GnRH, ya que no se había mostrado la existencia de receptores a estrógenos en la neurona que sintetiza el decapeptido, aunque sí se sabía que el ARN mensajero del receptor a estrógenos estaba presente. Actualmente hay evidencias que indican que los esteroides actúan directamente sobre la neurona que sintetiza a la GnRH y que son mediados por receptores nucleares de tipo α y β , los cuales funcionan como factores de transcripción (Kallo y col., 2001).

La secreción de las hormonas esteroides de origen ovárico se lleva a cabo mediante la participación de dos tipos de células del folículo: las tecaes y las de la granulosa.

La esteroidogénesis de folículos antrales está regulado por las gonadotropinas. De acuerdo a la teoría de las dos células, la FSH secretada por la hipófisis actúa en las células de la granulosa del ovario, por medio de su receptor de membrana. La unión de la hormona al receptor activa el sistema adenil-ciclasa (la cual incrementa los niveles de AMPc (Adenosin monofosfato cíclico) a partir del ATP (Adenosin trifosfato)), la que a su vez activa la enzima aromatasa, la cual transforma los andrógenos que provienen de la teca, en estrógenos, principalmente en estradiol. Al mismo tiempo, la FSH induce una mayor producción de sus propios receptores, la síntesis de receptores a LH y estimula la mitosis de células de granulosa. Además, la FSH estimula la producción de inhibina, activina e IGF I. A medida que va aumentando la FSH en la fase folicular del ciclo, se van produciendo cantidades cada vez mayores de estradiol, incrementando sustancialmente su efecto parácrino y endócrino. El objetivo principal de este evento es la dominancia de los folículos que han alcanzado cierto nivel de crecimiento (Gore L y Armstrong T., 1994) (Fig. 2).

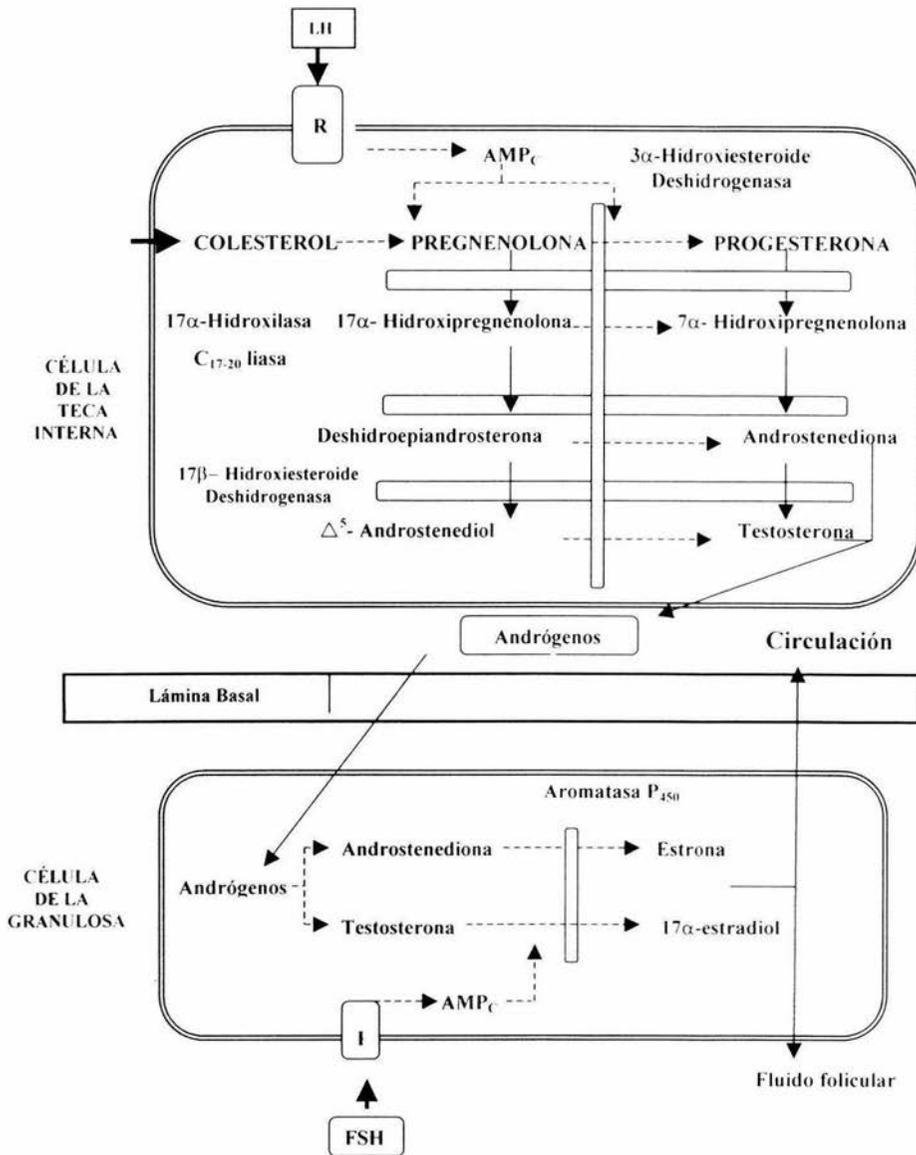


Fig. 2: Rutas biosintéticas de las hormonas esteroides, en la regulación de los efectos de las gonadotropinas en las células del folículo ovárico (Tomado y modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Además de los esteroides, el ovario sintetiza y secreta péptidos como la inhibina, la activina, la follistatina, la relaxina y diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulina I y II (IGF I y II) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), entre otros. Los anteriores factores reguladores del crecimiento folicular, actúan por vía autócrina, parácrina y endócrina. La acción endócrina se ejerce por medio del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. En este sistema el hipotálamo envía la señal GnRHérgica en forma de pulsos, la que es recibida en la hipófisis, produciendo la liberación de LH, la FSH o ambas, las que actúan sobre el ovario (Shupnik, 1996).

HIPOTÁLAMO

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y a ambos lados del tercer ventrículo. Está delimitado en la parte anterior por el quiasma óptico y en la parte posterior por los cuerpo mamilares (McGeer y col., 1987). El hipotálamo se puede subdividir para su estudio, en tres regiones de acuerdo a criterios anatómicos y funcionales.

Al referirse a la topografía del hipotálamo se emplea la denominación de **núcleo** cuando es posible reconocer agrupaciones celulares bien caracterizadas, y se reserva la denominación de **área** para referirse a sectores en los que se reconoce una clara delimitación citoarquitectónica (Fig. 3).

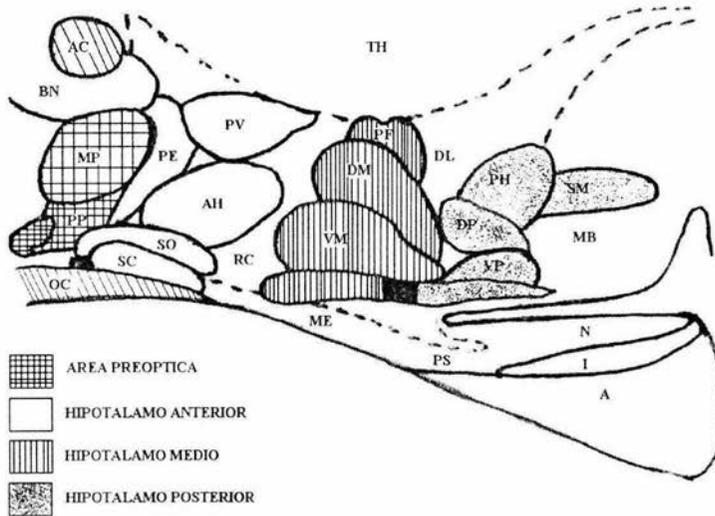


Fig. 3: Corte sagital del cerebro de la rata, que muestra la distribución topográfica de los núcleos y áreas del hipotálamo. **A:** hipófisis anterior, **AC:** comisura anterior, **AH:** núcleo hipotálamico anterior, **AR:** núcleo arcuato, **BN:** base del núcleo de la estria terminalis, **DL:** área hipotálamica dorsolateral, **DM:** núcleo dorsomedial, **DP:** núcleo dorsal premamilar, **I:** lobulillo de la hipófisis intermedia, **LT:** núcleo lateral tuberal, **MB:** cuerpo mamilar, **ME:** eminencia media, **MP:** núcleo preóptico medial, **N:** hipófisis posterior, **O:** organo vasculoso de la lámina terminalis, **OC:** quiasma óptico, **PE:** núcleo hipotálamico periventricular, **PF:** núcleo periformal, **PH:** núcleo hipotálamico posterior, **PP:** núcleo preóptico periventricular (medio), **PS:** hipófisis stalk, **PV:** núcleo paraventricular, **RC:** área retroquiasmática, **SC:** núcleo supraquiasmático, **SM:** núcleo supramamilar, **SO:** núcleo supraóptico, **TH:** talamo. **VM:** núcleo ventromedial, **VP:** núcleo premamilar ventral (Conn. 1999).

En cortes coronales rostro-caudales, los núcleos y áreas hipotalámicas son divididas en hipotálamo anterior, medio y posterior (Fig. 4, 5 y 6)

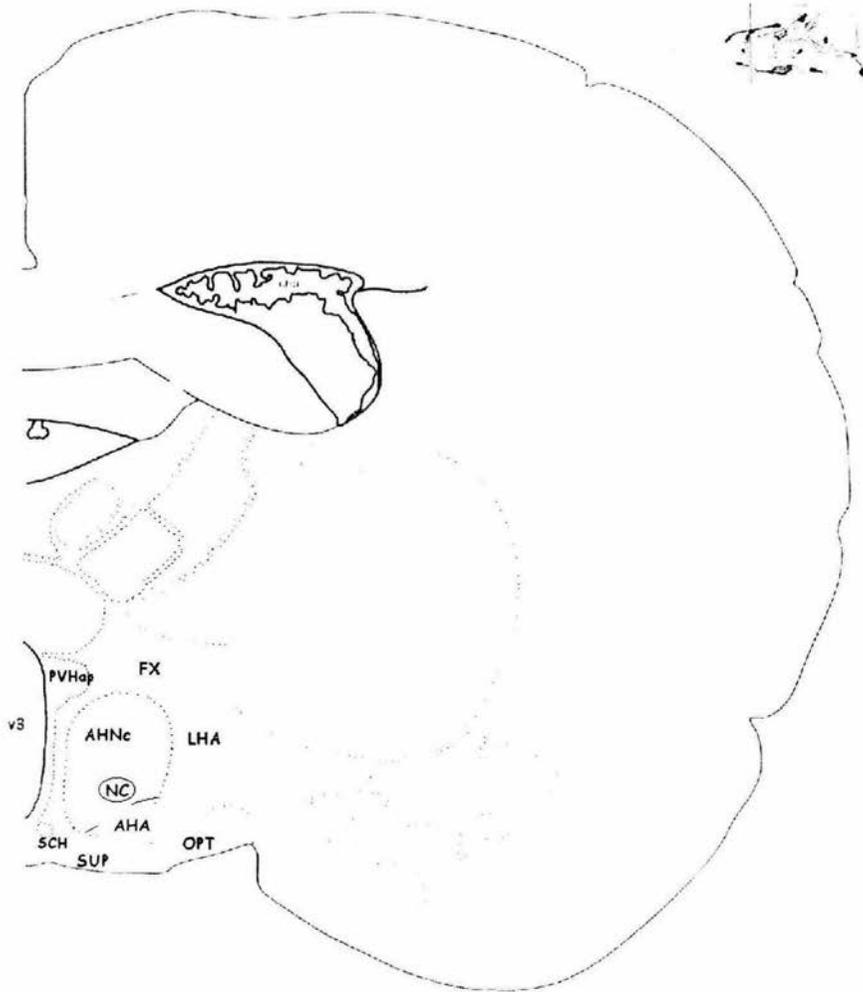


Fig. 4: *Hipotálamo Anterior:* **AHA:** núcleo hipotalámico anterior parte central. **Fx:** columna del fórnix, **LHA:** área hipotalámica lateral, **Nc:** núcleo circularis, **OPT:** tracto óptico, **PVHpv:** núcleo paraventricular hipotalámico parte parvicelular anterior, **RCH:** área retroquiasmática, **SCH:** núcleo supraquiasmático, **SUP:** comisura supraóptica y **V3:** tercerventrículo (Koning y Klieppel, 1963).

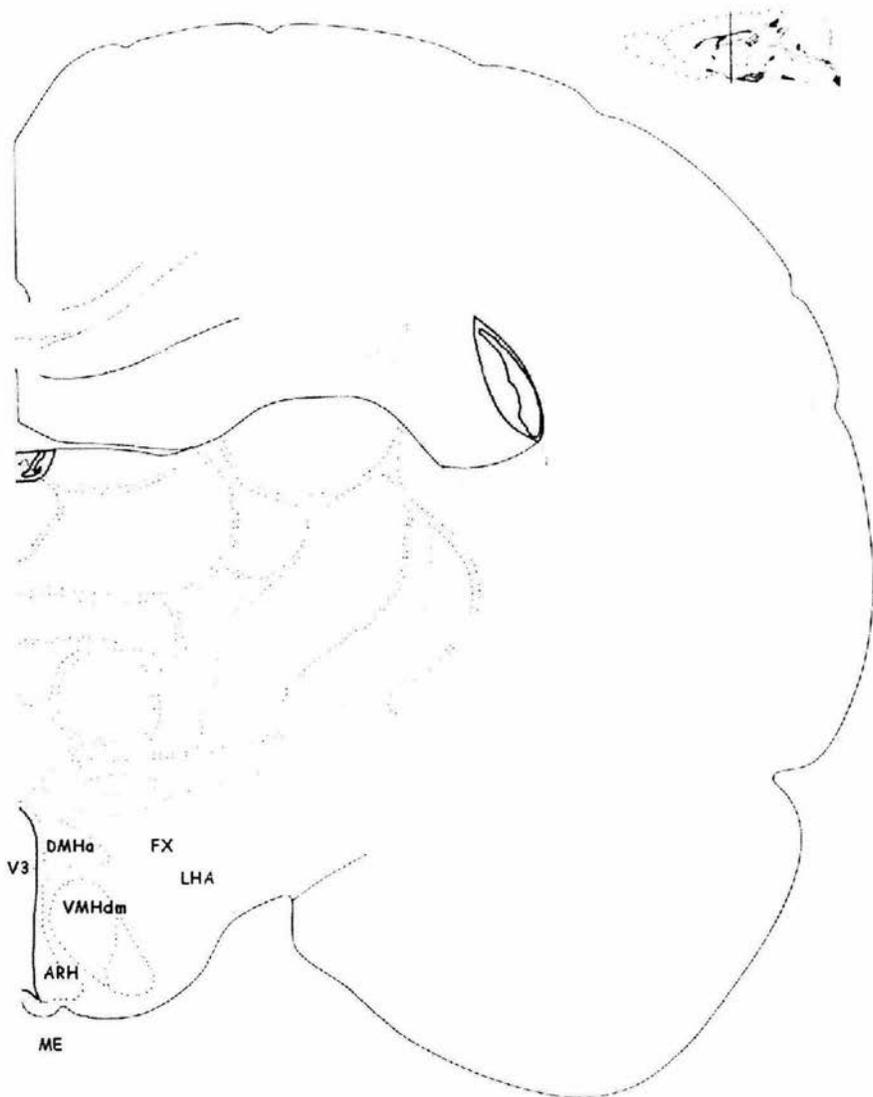


Fig. 5: *Hipotálamo Medio:* **ARH:** núcleo arcuato del hipotálamo, **DMHa:** núcleo dorsomedial hipotalámico parte anterior, **Fx:** columna del fórnix, **LHA:** área hipotalámica lateral, **ME:** eminencia media, **V3:** tercer ventrículo y **VMHdm:** núcleo ventromedial del hipotálamo parte dorsomedial (Koning y Klieppel, 1963).

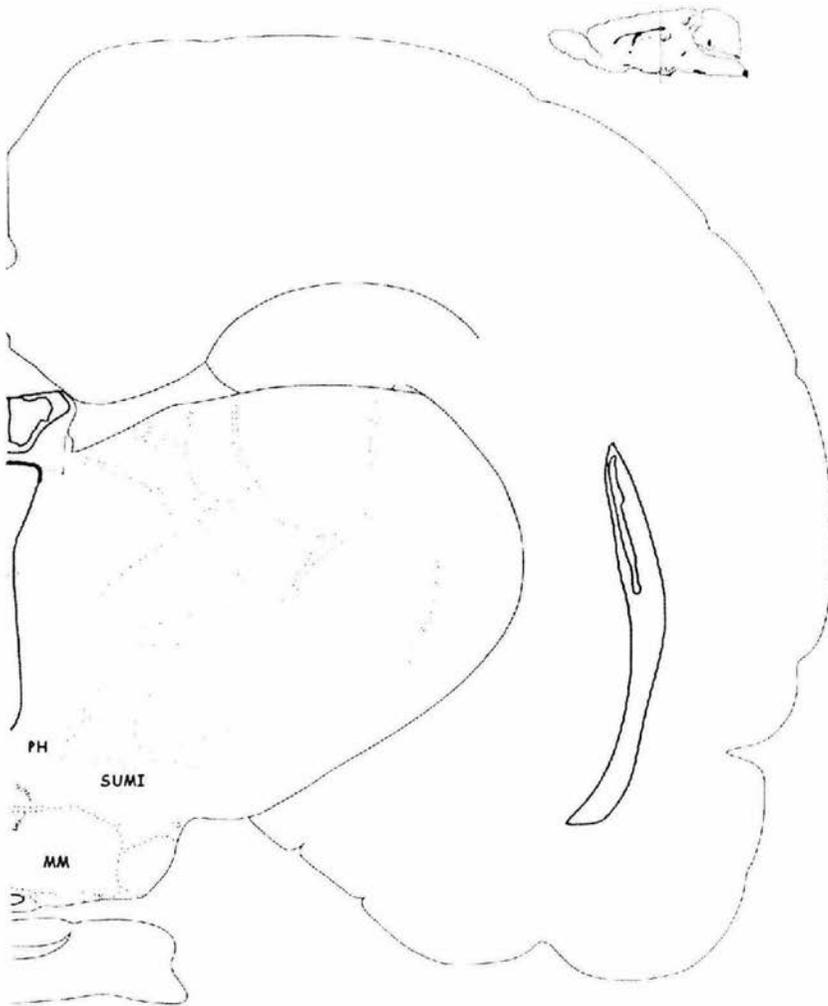


Fig. 6: *Hipotálamo Posterior*: **MM:** núcleo mamilar medial, **PH:** núcleo hipotalámico posterior y **SUMI:** núcleo supramamilar parte lateral (Koning y Klieppel, 1963).

LAS NEURONAS GnRHÉRGICAS

Las neuronas GnRHérgicas tienen su núcleo en el centro del soma y esta rodeado por un borde delgado de citoplasma, que se alarga y extiende dando origen a los conos de las dendritas principales. El núcleo contiene uno o dos nucléolos, el citoplasma tiene varios sacos de retículo endoplásmico rugoso y uno o dos sacos de Golgi y gránulos neurosecretores. En las terminales sinápticas, la GnRH se encuentra contenida en gránulos de 40 a 120 nm de diámetro, unidos a la membrana plasmática (Silverman , 1994) (Fig. 7)



Fig. 7: Fotografía de una neurona GnRHérgica, tomada del área preóptica ventral del mono *rhesus*, con sus dendritas extendidas en cada polo. Esta célula esta próxima a muchas fibras de células GnRHérgicas (Silverman y col. 1994)

Las neuronas que sintetizan GnRH (neuronas GnRHérgicas), se originan de la placoda olfatoria medial durante el desarrollo embrionario (Swanzel-Fukuda y Pfaff, 1989) y migran predominantemente hacia la banda diagonal de Broca (DBB), el órgano vasculoso de la lámina terminalis (OVL) y el área preóptica (POA) (Barry y col. 1985).

Mediante técnicas inmuno-histoquímicas se han identificado las zonas del sistema nervioso central donde se concentran las neuronas GnRHérgicas; estas son: el área preóptica medial, el área anterior del hipotálamo y el núcleo arcuato, así como el septo y la estria terminal.

Este tipo de neuronas no forman agregados, sino redes laxas y difusas. La red más importante por su participación directa en el control de la secreción de las gonadotropinas se extiende desde la banda Diagonal de Broca hasta el área septal, atravesando el núcleo de la estria terminal y las áreas preóptico medial y lateral, hipotalámica anterior, el núcleo periventricular y la zona retroquiásmática del diencefalo. También forman parte de este continuo las neuronas secretoras de GnRH ubicadas en el hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico. Las neuronas GnRHérgicas de esta red principal proyectan sus axones hacia la eminencia media por medio de las vías septo-preóptica infundibular y septo preóptica. Las neuronas ubicadas en el área septo-preóptica proyectan sus axones por medio del fascículo retroflexo hacia las áreas extrahipotalámicas como la amígdala, el complejo mamilar, el área tegmental ventral, el cerebro medio, el rafe y la región periacueductual. Al parecer, en los roedores estas proyecciones participarían en la regulación del comportamiento sexual, ya que la administración de GnRH directamente al área preóptica potencia el reflejo de lordosis (Silverman . 1994).

En los roedores, el número de neuronas GnRHérgicas es variable, yendo desde un promedio de 356 neuronas en el hámster (*Djungarian postpuberal*) hasta 560 o 1300 células en la rata (Yellon y col., 1990).

LA GnRH

Estructura del decapeptido GnRH

Desde el punto de vista filogenético, la molécula de GnRH es muy semejante desde los peces hasta el hombre. Sin embargo, entre los vertebrados existen al menos cinco variantes; la primera de ellas, se aisló y se identificó a partir de 300.000 cerebros de pollo. La existencia de estas variantes, dio la pauta para conocer la relación estructura-función y permitió que hasta la fecha se hayan sintetizado más de 3.500 análogos de GnRH (Russell y White, 1999).

La GnRH es un péptido pequeño constituido por 10 aminoácidos. La secuencia lineal de la GnRH en mamíferos es la siguiente (Susuki y col., 1995) (Fig. 8).

pyroGlu 1-His2- Trp3-Ser4- Tyr5-Gly6-Leu7 -Arg8-PrO9-Gly1 o-NH2

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

Estructura del gene de la GnRH

El gen que codifica la síntesis de la GnRH ha sido aislado de la rata, del ratón y del hombre. La información obtenida de las cadenas complementarias del ácido desoxirribonucleico (cDNAs) clonadas del hipotálamo y de la placenta, indica la presencia de cuatro exones. La secuencia de codificación transcribe una proteína precursora de 92 aminoácidos que origina la GnRH y un péptido de 56 aminoácidos llamado GAP (péptido asociado con la GnRH). El primer exón consiste de una región 5' no transcrita. El segundo exón codifica para el péptido señal, GnRH (10aa) y los primeros 11 residuos de aminoácidos de GAP. El tercer exón codifica para los residuos 12-43 de GAP. El cuarto exón codifica para los 13 residuos terminales de GAP y el restante ARNm no se traduce.

Síntesis de la GnRH

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

La síntesis de la GnRH se inicia con la transcripción del RNAm en los ribosomas adosados al retículo endoplásmico rugoso, dicha transcripción forma un péptido precursor (pre-pro-GnRH) de aproximadamente 10,000 daltones. El precursor de la GnRH se corta por acción enzimática en el retículo endoplásmico y da origen a la pro-GnRH, que se transfiere al aparato de Golgi, donde se produce la ruptura proteolítica de la cadena y la eliminación del par de aminoácidos básicos. En esta estructura se realiza el proceso de activación, que consiste en la ciclización enzimática de la glutamina N-terminal, la ruptura del enlace gly¹¹ - gly¹⁰ y la amidación de la glicina en el carbono terminal (Busby y col., 1987; Charli y col., 1991). Posteriormente, la GnRH y su péptido asociado (GAP) son almacenados en las vesículas de secreción (Fig. 8).

Es prudente señalar que algunos de los péptidos derivados del precursor de la GnRH son biológicamente activos y también estimulan la secreción de gonadotropinas e inhiben la de prolactina, en este caso GAP. (Yen y col, 2001).

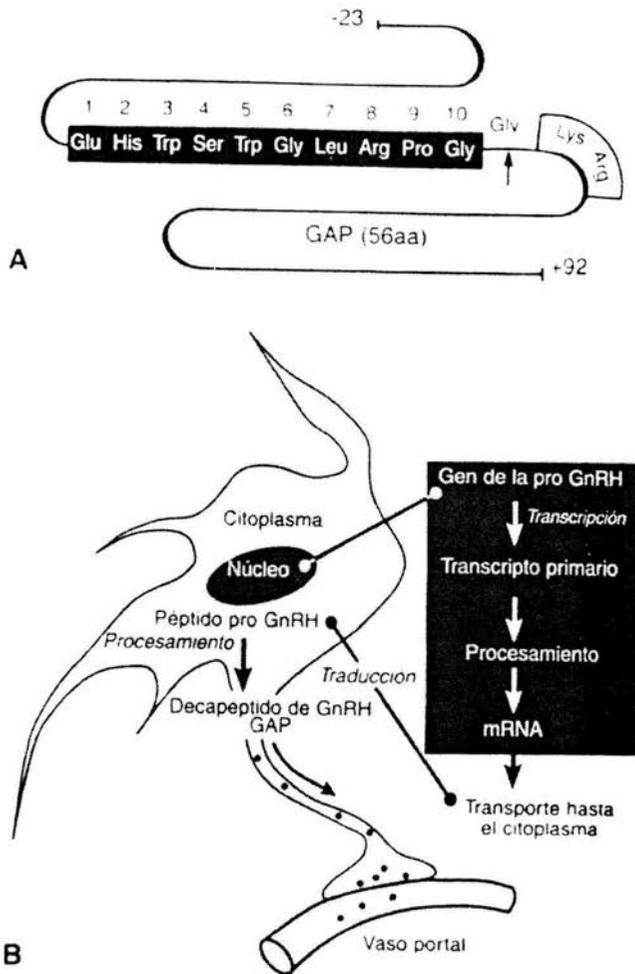


Fig. 8: Gen de la GnRH y procesamiento de pre-pro-GnRH. **A;** Representación esquemática de la estructura y la secuencia de 92 aminoácidos de pre-pro-GnRH. El decapeptido (aminoácidos 1 a 10) ocupa el lugar intermedio entre el péptido señal y la secuencia Gly-Lys-Arg. La flecha indica el sitio de procesamiento proteolítico y la amidación 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 terminaciones nerviosas y secretados en tándem en la circulación portal (Yen y col, 2001)

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

En una serie de experimentos llevados a cabo en el mono rhesus por Knobil en 1980 se estableció firmemente que el sistema neuronal de GnRH del interior del hipotálamo basal medial muestra un comportamiento rítmico con salvas agudas y breves de actividad eléctrica de múltiples unidades. Estas salvas se desarrollan a intervalos de alrededor de una hora y tienen su origen en la proximidad del núcleo arqueado en el interior del hipotálamo medio basal. Este modo de secreción de la GnRH se observa en todas las especies de mamíferos estudiados. Existe una sincronía notable entre los pulsos de GnRH en sangre portal y los pulsos de LH en sangre periférica (Knobil, 1980 y 1989; Minami y col., 1990 y Clarke y Cummins, 1982) por ejemplo; en el día del proestro la concentración de GnRH en el sistema portal aumenta entre las 12:00 y 15:00 horas (según la especie) y hacia las tres de la tarde las concentraciones de GnRH caen dramáticamente, cuando la concentración de LH comienza a aumentar. Levine y Ramírez (1980) observaron que durante el proestro, los pulsos de GnRH ocurren cada 48 minutos en promedio. La secreción de GnRH es modulada por diferentes sustancias que son sintetizadas por neuronas que hacen contacto (mediante conexiones axosomáticas, axodendríticas y axoaxónicas) o no con la neurona GnRHérgica.

En la adenohipofisis, la GnRH se une a sus receptores membranales en los gonadotropos y activa a la adenilato ciclasa y a la fosfolipasa C. Como resultado de la activación de estos sistemas enzimáticos, se forman moléculas que actúan como segundos mensajeros, entre los que se encuentran la adenosina mono-fosfatada cíclica (AMPC), el fosfatidil inositol (IP), el diacil glicerol (DAG), así como la movilización de calcio extra e intracelular. Estos mensajeros activan el sistema de proteínas cinasas C, lo que se traduce como estímulo en la síntesis de la FSH y LH (Conn, 1993; Fink, 1998).

RECEPTORES A GNRH

Los receptores a GnRH son proteínas de membrana con un peso molecular de 136.356 daltones: constan de 7 dominios transmembranales y se caracterizan por movilizar calcio (Fig. 9). El número de receptores a GnRH cambia durante el ciclo estral pero no su afinidad. El número máximo de estos receptores en la hipófisis se da inmediatamente antes del "pico" preovulatorio de gonadotropinas para disminuir posteriormente (Neill, 2002)

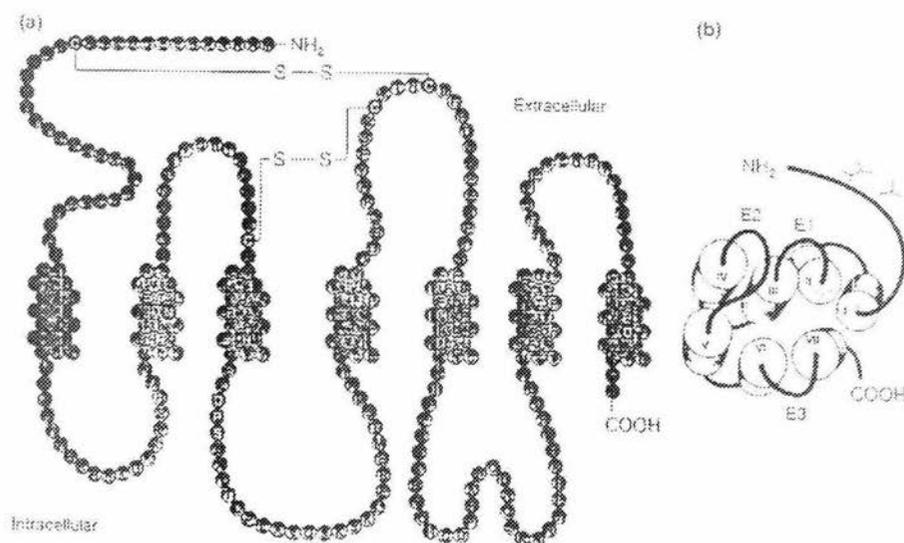


Fig. 9: Secuencia de aminoácidos del receptor a GnRH de rata acoplado a proteínas G. El receptor presenta 7 dominios transmembranales conectados por una serie de vueltas intra y extracelulares, tienen una región amino y carboxilo terminal. Cada dominio transmembranal es representado por un cilindro (Anderson, 1996).

La gonadectomía puede aumentar el número de receptores cuando la conexión hipotálamo-hipófisis se mantienen integras; en ausencia de la señal hipotalámica, el estradiol puede o no puede aumentar el número de receptores (Conn y col., 1999, Shivers y col., 1983).

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH

La síntesis y liberación de la GnRH es modulada por neurotransmisores clásicos (acetilcolina, noradrenalina, adrenalina, serotonina), por péptidos (neuropeptido Y (NPY) sustancia P, colecistoquinina, entre otros), opioides (endorfinas y encefalinas) y aminoácidos (glutamato, ácido γ -amino butírico – GABA-) (Kordon y col., 1994) (Fig 10).

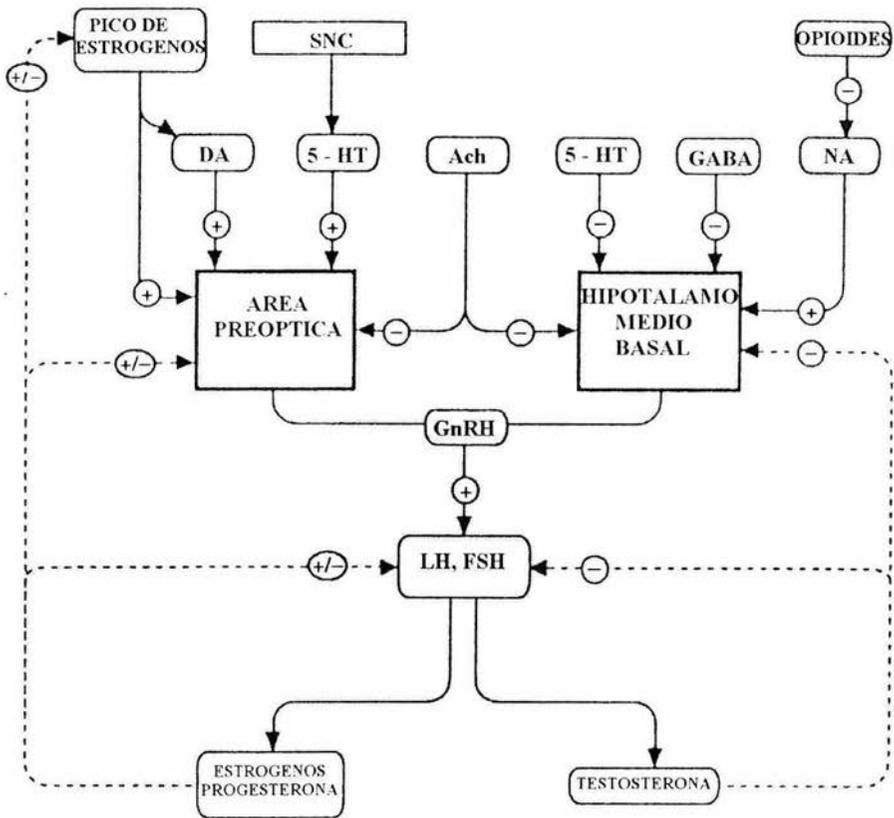


Fig. 10: Resumen de los neurotransmisores que controlan la secreción de GnRH y de gonadotropinas (Brown, 1994).

Algunas de las neuronas que sintetizan estas sustancias hacen contacto sináptico con la neurona GnRH. En el órgano vascular de la lámina terminal, las terminales GnRHérgicas establecen contactos sinápticos con fibras serotoninérgicas. En el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) existe una comunicación con terminales nerviosas dopaminérgicas, GABAérgicas y noradrenérgicas (Jennes y col., 1983) (Fig. 11)

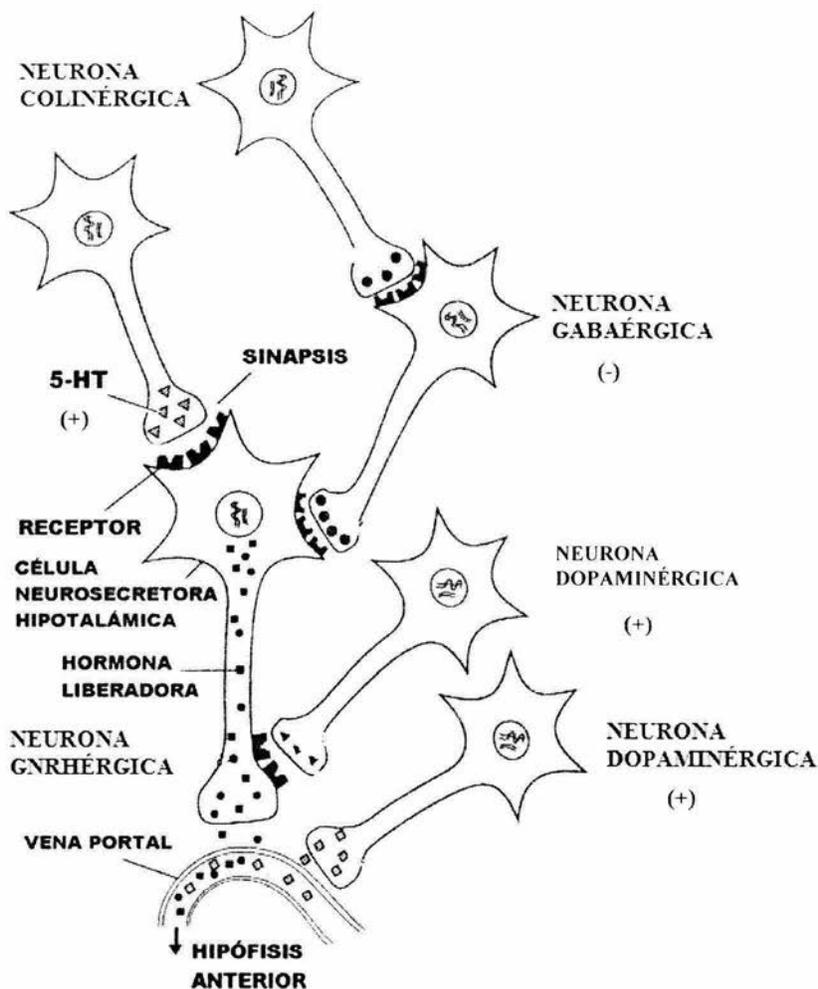


Fig. 11: Posibles interacciones neuronales por medio de los cuales los neurotransmisores podrían regular la secreción de la GnRH (Modificado de Brown, 1994)

ASIMETRÍAS HIPOTALÁMICAS

En el hombre, el hemisferio izquierdo del cerebro se especializa en la organización de la información en forma analítica, como el lenguaje y las habilidades matemáticas, mientras que el hemisferio derecho se especializa en procesar la información en forma holística, como la relacionada con el reconocimiento espacial y las emociones. Esto ha dado lugar a la formación de conceptos tales como el de lateralización cerebral, el cual se ha extendido a otras especies. Por ejemplo, se ha mostrado que en algunas especies de aves la conducta del canto es controlada por el lado izquierdo del cerebro y por el nervio hipogloso del mismo lado y que en la rata, aspectos emocionales y de orientación espaciales son controlados por el hemisferio derecho, semejante a lo que ocurre en los humanos. (Sánchez y Domínguez 1994)

Desde el punto de vista neuroendócrino se ha mostrado que el hipotálamo y los ovarios funcionan de manera asimétrica. Las primeras evidencias al respecto fueron dadas por Gerendai y col. (1978), al indicar que en la rata hembra, la concentración de la GnRH en el hipotálamo medio basal del lado derecho era el doble con respecto al izquierdo. Dicha asimetría es semejante en la rata macho pero ésta sólo se observa en horas específicas del día (Bakalkin y col., 1984).

En el ratón macho, el número de células inmunoreactivas a GnRH es mayor del lado derecho del cerebro que del lado izquierdo. La orquidectomía bilateral o la extirpación del testículo izquierdo disminuye el número de células GnRHérgicas, en tanto que la extirpación de la gónada derecha no cambia este hecho (Inase y Machida, 1992). En la rata macho, la deaferentación del lado derecho del hipotálamo y la extirpación del testículo derecho bloquean el incremento en la concentración plasmática de FSH que normalmente ocurre después de la hemicastración (Nance y col., 1983).

En la rata hembra hemiovariectomizada, la lesión (por radiofrecuencia) del lado derecho del hipotálamo anterior inhibe la hipertrofia compensadora del ovario *in situ*, mientras que la lesión del lado izquierdo no la modifica (Fukuda y col., 1984). La falta de una gónada incrementa el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal del mismo lado que se extirpa la gónada: la hemiovariectomía derecha incrementa el contenido de GnRH del lado derecho del hipotálamo (haciendo más marcada la asimetría), mientras que la extirpación del ovario izquierdo aumenta el contenido del decapeptido en el lado izquierdo (Gerendai y col., 1978). La lesión con ácido kainico, del lado derecho del área retroquiasmática bloquea el desarrollo de la hipertrofia compensadora cuando se extirpa el ovario del mismo lado de la lesión (Nance y col., 1984). La lesión del lado derecho del área preóptica (POA) en el día del estro, disminuye el número de animales ovulantes, mientras que la lesión del lado izquierdo no la afecta (Morán y col., 1994).

Estos resultados muestran, tanto en el macho como en la hembra, que la secreción de gonadotropinas, las funciones de la gónada o ambas dependen del lado derecho del hipotálamo. Esta función asimétrica del hipotálamo parecería depender de asimetrías funcionales de moduladores que regulan la actividad de la neurona GnRHérgica, las que cambian durante el ciclo estral. En el día del estro, el implante de atropina (antagonista colinérgico) del lado derecho de POA-AHA bloquea la ovulación, mientras que el implante del lado izquierdo no la altera. Cuando el implante se realiza en el día del diestro 1, ambos implantes bloquean la ovulación; en el día del diestro 2, sólo los implantes del lado izquierdo la bloquean, y en el día del proestro ninguno de los implantes la modifican (Cruz y col., 1989).

Esta influencia asimétrica del sistema colinérgico sobre la secreción de gonadotropinas y la ovulación parece ser el resultado, en parte, de la cantidad de acetilcolina que se sintetiza en uno y otro lado de POA-AHA, ya que la actividad de la enzima que la sintetiza (colino-acetil-transferasa: CAT) varía durante el ciclo estral en el lado derecho de POA-AHA y permanece constante en el lado izquierdo (Sánchez y col., 1994).

De igual forma, el sistema dopaminérgico parece regular en forma asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación, ya que el implante de haloperidol (antagonista dopaminérgico) en el lado derecho de POA-AHA bloquea la ovulación, sin ser afectada por los implantes del lado izquierdo (Morán y col. 1994)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha señalado, en el hipotálamo se localizan un grupo de neuronas especializadas que secretan GnRH. Diferentes estudios en los que se ha utilizado a la rata como modelo experimental, y en los cuales se han producido lesiones, implantes de hormonas o fármacos y deaferentaciones en uno de los lados del hipotálamo, han mostrado que esta estructura del sistema nervioso central regula en forma asimétrica la secreción de gonadotropinas y las funciones del ovario (Gerendai y col., 1978; Nance y col., 1983; Bakalkin y col., 1984; Hamilton y Vermiere, 1991-4; Aboitz y col., 1992; Inase y Machida, 1992 y Morán y col., 1994)

Una de las posibles explicaciones a esta función asimétrica del hipotálamo parecería estar relacionada, entre otros aspectos, con diferencias en la cantidad de GnRH que se sintetiza entre los lados izquierdo y derecho del hipotálamo. Otras de las explicaciones a esa asimetría serían: diferente cantidad de neuronas GnRH, diferencias en el arreglo, distribución o cantidad de fibras o aún de neuronas que regulan directa o indirectamente la función de la neurona GnRHérgica.

Aún cuando se ha mostrado que la actividad de algunos de los moduladores que regulan función de la neurona GnRHérgica cambia durante el ciclo estral (Brown, 1994) se desconoce si la actividad (expresada en función de la síntesis del péptido) también cambia durante el ciclo, ya que Gerendai y col (1978) midieron la cantidad de GnRH en el hipotálamo medio basal de animales hembras tomadas al azar, sin considerar la hora del día ni la etapa del ciclo estral de la rata. Por lo que, en este trabajo se decidió cuantificar la expresión del gen que codifica el ARNm de la GnRH durante el ciclo estral en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA.

HIPÓTESIS

En la rata, en el POA-AHA se localizan las neuronas que secretan la GnRH; manipulaciones experimentales provocadas en el lado derecho de POA-AHA (mediante técnicas de deaferentación, lesión, bloqueo o estimulación de receptores específicos), modifica la secreción de gonadotropinas y la ovulación, luego entonces, la expresión del gen que codifica para la síntesis de la GnRH en POA-AHA es asimétrica y varía durante el ciclo estral.

OBJETIVOS

- ▶ Estudiar los cambios en la expresión del gen para la GnRH en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA durante el ciclo estral de la rata.
- ▶ Estudiar la relación que existe entre la variación en las concentraciones hormonales de FSH, LH, estradiol y progesterona con la expresión del gen de la GnRH.

MÉTODO

Animales

Se utilizaron ratas hembra adultas (90-120 días) de la cepa CII-ZV, mantenidas en condiciones controladas de luz-oscuridad (luces de 05:00 a 19:00 h) y con libre acceso al agua y al alimento.

El estudio del ciclo estral se llevó a cabo mediante la toma diaria de una muestra del exudado vaginal, entre las 9:00 y las 10:00 horas. Estas muestras o frotis fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio de luz. Sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron 3 ciclos consecutivos de cuatro días de duración.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación en los días del diestro 1, diestro 2, proestro y estro a las 9:00 h, 13:00 h y 17:00 h (seis animales por grupo). Los animales se sacrificaron por decapitación, se colectó la sangre del tronco, se dejó coagular a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para extraer el suero, en el cual se cuantificaron las concentraciones de FSH, LH, estradiol y progesterona.

Obtención del tejido nervioso

Inmediatamente después de la decapitación, se extrajo el cerebro y se disecaron las porciones derecha e izquierda de POA-AHA conforme la técnica propuesta por Palkovitz (1979). Las porciones derechas e izquierdas de tejido nervioso de seis animales (Fig. 12), fueron agrupadas para extraer el ARNm total²⁰⁶.

²⁰⁶ Los resultados obtenidos en las diferentes horas de cada día del ciclo estral corresponden un total de 18 animales estudiados en tres repeticiones.

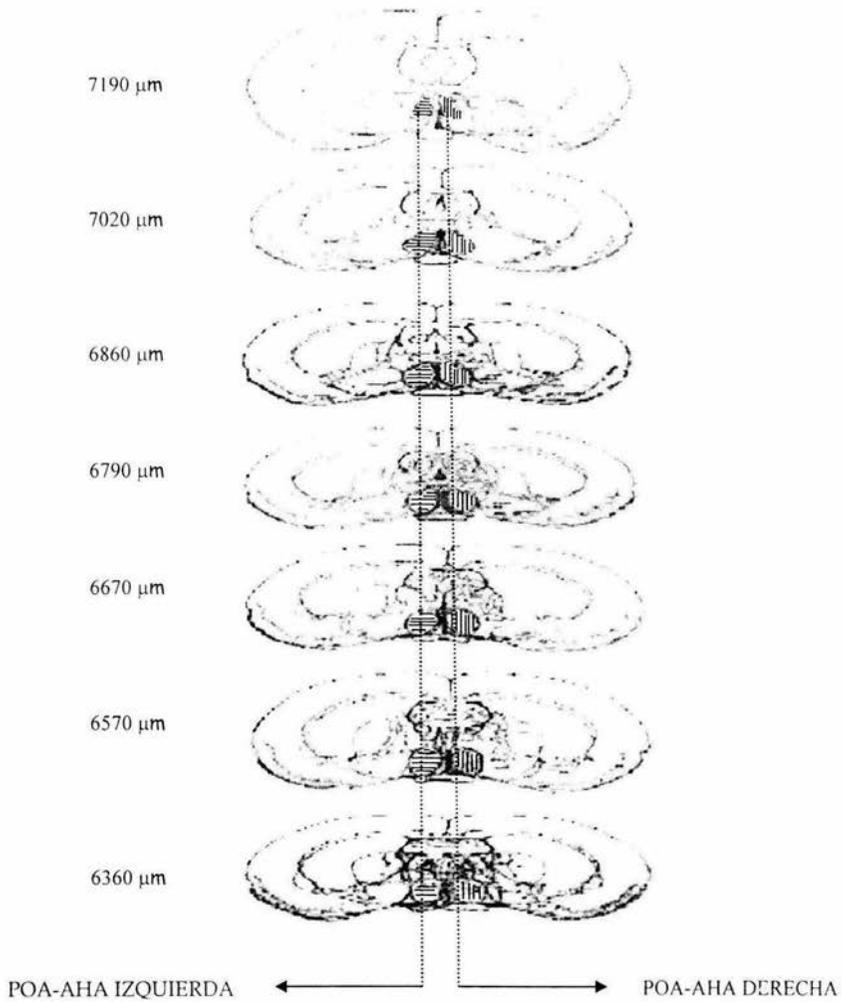


Fig. 12: Esquema que muestra el área izquierda y derecha de POA-AHA en cortes coronales sucesivos desde la coordenada A-7190 – A-6360 en el plano antero-posterior (Koning y Klieppel, 1963).

Obtención de ARN mensajero en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA.

El ARN total de las áreas izquierdas y derechas de POA-AHA se extrajo de la siguiente manera:

1. Al tejido preóptico-hipotalámico de los lados izquierdo como derecho, contenidos en tubos eppendorf estériles se le agregaron 300 μ l de trizol y se homogenizaron con un Politron (marca: PT 3100 by kinematica).
2. Al tejido homogenizado se le agregaron 100 μ l de cloroformo y fue agitado durante 30 segundos en un vortex, con la finalidad de extraer el ARNm.
3. Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm a 4° C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: una fase inferior orgánica de color rojo (orgánica) y la fase superior acuosa incolora. El ARN quedó en esta última fase, mientras que el ADN y las proteínas se mantienen en la interfase y en la fase orgánica.
4. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de isopropanol, con la finalidad de precipitar el ARN. La muestra se mantuvo a 4° C durante toda la noche.
5. Se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12.000 rpm a 4° C. El ARN se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta.
6. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80 %. Se centrifugo a 7500 rpm durante 8 minutos a 4° C.
7. Después de una segunda separación del sobrenadante, los tubos se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril y se secó la pastilla en un horno con vacío a temperatura ambiente, sin que se secará por completo la pastilla para evitar la insolubilidad de la misma.
8. Se disolvió la pastilla de ARN en 50 μ l de H₂O dietil pirocarbonada. Se hicieron diluciones 2:750 y 3:750. Se leyó la absorbancia de estas muestras a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

La concentración de ARN se determinó conociendo que: una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 mg de ARN ml⁻¹. La pureza del ARN se determinó por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm (260/280 nm).

9. Se realizó la electroforesis del ARN en un gel de agarosa al 1% (ver cuadro 1).

La agarosa se disolvió en el agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonada). Posteriormente se agregaron el formaldehído y el MOPS (3-(N-morfolino) paopanesulfórico), se mezcló la solución y se vertió en el molde de la cámara de electroforésis.

10. Para el corrimiento electroforético se prepararon los reactivos del cuadro 2.
11. El ARN se mezcló con formamida, formaldehído y MOPS y se calentó a 75 °C por 5 minutos, se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos. Se le agregó el amortiguador Loading y el Bromuro de Etidio.
12. Se cargaron las muestras en gel y se corrieron a 90 volts por 120 minutos. Se observaron las muestras en un transiluminador de luz ultravioleta.
13. Se realizó la retrotranscripción del ARN total para obtener el ADN complementario (ADNc). El control negativo consistió de una muestra de agua en sustitución del ARN. Los volúmenes utilizados en la técnica se especifican en el cuadro 3.
14. Por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de los genes de la GnRH. Se utilizó GAPDH como gen control interno. En el cuadro 4 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la técnica.
15. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en un termociclador eppendorf de gradientes, modelo Mastercycle gradient, a las temperaturas y ciclos que se muestran en el cuadro 5.

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.

16. Una vez obtenidos los productos de PCR, se corrieron en gel de agarosa al 2%, preparado con TBE al 1% y teñido con BrET. Se utilizaron cámaras de electroforesis horizontales modelo Horizon 216.
17. Se tomaron fotografías del gel con una cámara Kodak EDAS 216.
18. Los negativos de las fotografías de los geles se cuantificaron por densitometría por medio del programa Scion Image de Inc..

Cuantificación Hormonal

Las concentraciones séricas de LH y FSH se cuantificaron por radio-inmuno-análisis, con la técnica de doble anticuerpo. Los reactivos y protocolos usados fueron proporcionados por el National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD). Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 5.1% y 6.5% para LH y 4% y 7.9% para FSH, respectivamente. Los resultados se expresaron como ng/ml de los estándares internacionales de referencia NIH LH-RP3 y FSH-RP2.

Las concentraciones séricas de progesterona y 17 β -estradiol fueron cuantificados por RIA, utilizando estuches comerciales suministrados por Diagnostic Products (Los Angeles, CA). Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 2.0% y 5.4 % para progesterona y 6.1% y 7.4% para 17 β -estradiol, respectivamente.

Análisis Estadístico:

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguida de la prueba de Tukey. Para el caso de la comparación de los resultados de dos grupos experimentales se utilizó la prueba de "t" de Student. Aquellas diferencias en las que la probabilidad fue ≤ 0.05 % fueron aceptadas como estadísticamente significativas.

Cuadro I. Reactivos utilizados en la preparación del gel de agarosa, para el corrimiento del ARN obtenido de POA-AHA.

Reactivo	Concentración	[] para 120 ml de gel
Agarosa	1 %	1.2 g
Formaldehído 37 %	6 %	19 ml
MOPS 12X	0.1 M	10 ml
Agua estéril/DEPC	-----	91 ml

Cuadro 2. Reactivos utilizados en el corrimiento electroforético de las muestras de ARN obtenidas de los lados derecho e izquierdo de POA-AHA.

Reactivo	Concentración
ARN	3 µg
Formamida	50 %
Formaldehído	6.5 %
MOPS	0.1 M
Amortiguador Loading para ARN	0.1 M
Bromuro de Etidio	2.5 µg

Cuadro 3. Reactivos utilizados en el desarrollo en la técnica de retrotranscripción

Reactivo	Volumen
ARN total	2 µg
Buffer RT 1x	50 mM Tris-HCl (pH 8.3) 75 mM KCl 3mM MgCl ₂
Tris-HCl (pH= 8.3)	50 mM
DTT	10 mM
DNTP's	0.5 mM c/u
RT M-MLV	400 unidades
Oligo dt	0.05 µg
H2O	c.b.p. 10 µl

Cuadro 4. Reactivos utilizados en el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

Reactivo	Volumen
Producto de RT	10 µl
Buffer PCR	
Mg ²⁺	15 mM
Taq polimerasa	1000 unidades
DNTP's	1 mM c/u
Oligo sense y antisense	0.05 µg c/u
H2O	c.b.p. 50 µl

Cuadro 5. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la retrotranscripción, así como las temperaturas y ciclos utilizados para la técnica de PCR

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Tm	ciclos
GnRH	caa ccc ata gga cca gtg ctg g	cac tat ggt cac cag cgg gg	55.8 ° C	32
GAPDH			61.4 ° C	32

RESULTADOS

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LH, FSH, 17β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA DURANTE EL CICLO ESTRAL

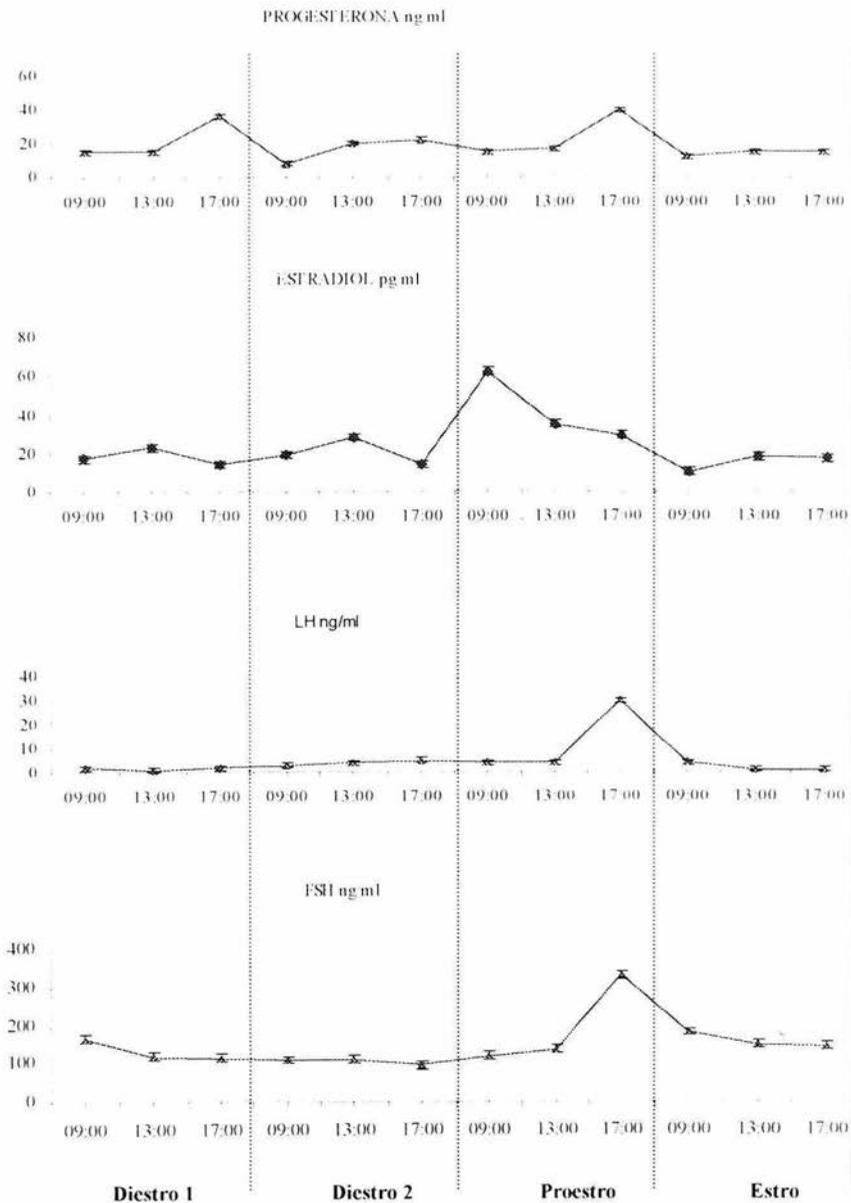
Las variaciones en las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, 17β -estradiol y progesterona a diferentes horas del día y en las diferentes fases del ciclo estral son presentadas en la Gráfica 1. Como puede observarse, el patrón en las concentraciones de estas hormonas es semejante a las observadas en otras cepas de rata y el mostrado con anterioridad para esta cepa (Villegas, 1998):

Progesterona : La concentración de progesterona en sangre tiene dos máximos durante el ciclo estral. El primero se observa en la tarde del diestro 1 (D1) y el segundo a la misma hora pero del proestro (P). Durante el resto del ciclo estral las concentraciones de progesterona no varían significativamente.

17β -Estradiol : La concentración de este esteroide en sangre comienza a aumentar en la tarde del día del diestro-2 (D2), con un máximo que se presenta en la mañana del proestro (P), el cual cae paulatinamente a valores basales en la tarde de este mismo día; concentraciones que se mantienen durante el resto del ciclo.

LH : Al igual que para la FSH, la concentración de LH alcanza un máximo en la tarde del P (17:00 horas); en los otros días del ciclo permanece baja.

FSH : La concentración de esta glucoproteína alcanza su máximo en la tarde del P (17:00 horas) y durante el resto del ciclo permanece en valores basales (Gráfica 1).



Gráfica 1: Media \pm e.e.m. de las concentraciones plasmáticas de la progesterona, estradiol, LH y FSH durante el ciclo estral de la rata.

El gen de la GAPDH fue utilizado como control interno. Este gen fue utilizado para comparar la secuencia del gen del gen de la GnRH para evitar que se estuviera analizando un gen diferente por contaminación (Fig. 13)

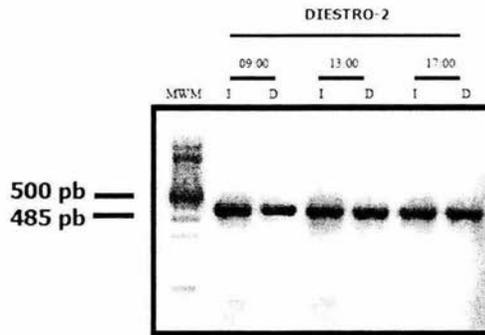
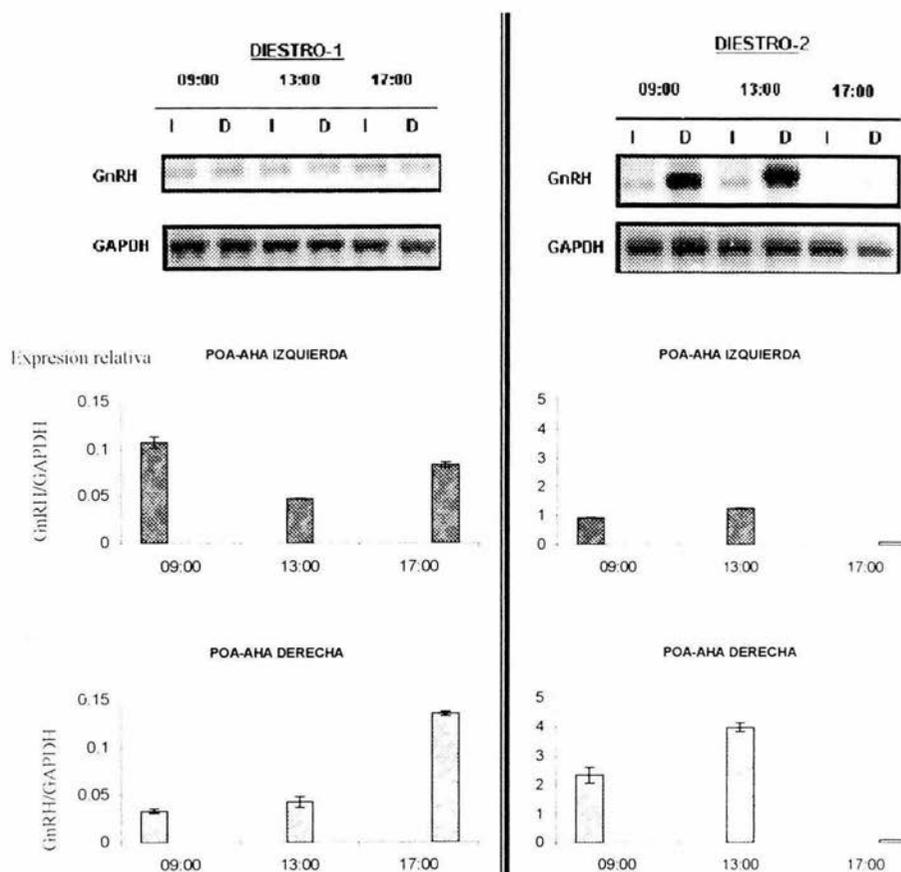


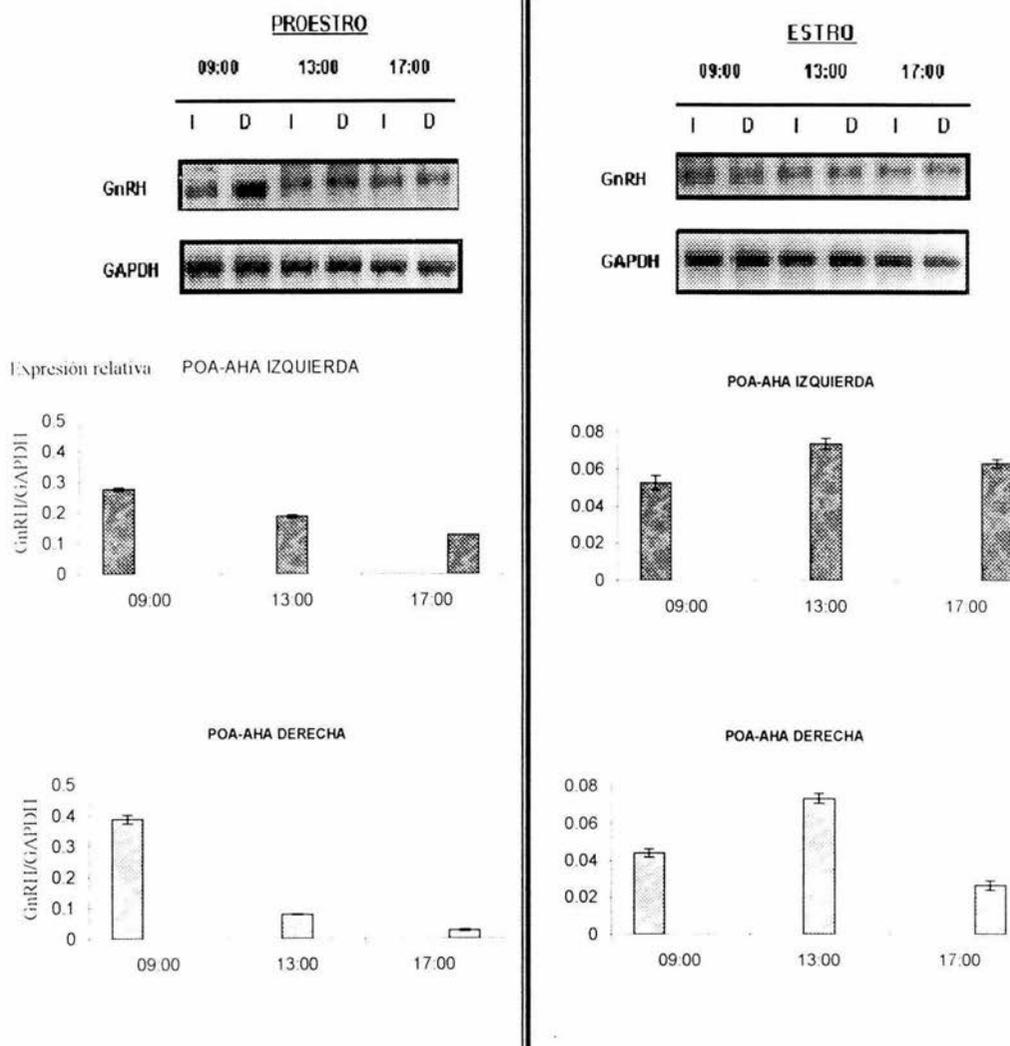
Fig. 13: Las bandas más oscuras son la expresión del gen de la GAPDH cuyas bandas muestran una longitud de 485 pb

EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA GnRH.

Las bandas correspondientes al ARNm de la GnRH, fueron detectadas por amplificación de genes. En todas las amplificaciones realizadas, se detectaron bandas de 370 a 375 pb correspondientes al tamaño de los fragmentos de GnRH y de GAPDH (Gráficas 2 y 3).

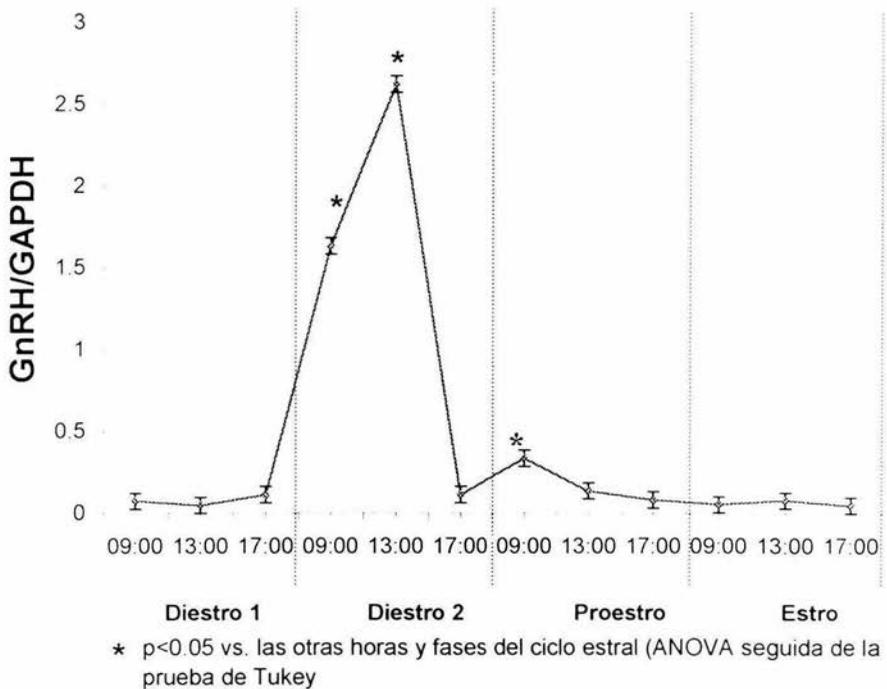


Gráficas 2: Expresión relativa del ARNm para la GnRH y GAPDH, en los lados izquierdo (I) y derecho (D) de POA-AHA de ratas hembras adultas sacrificadas a las 09:00, 13:00 y 17:00 horas del día del diestro-1 o diestro-2.



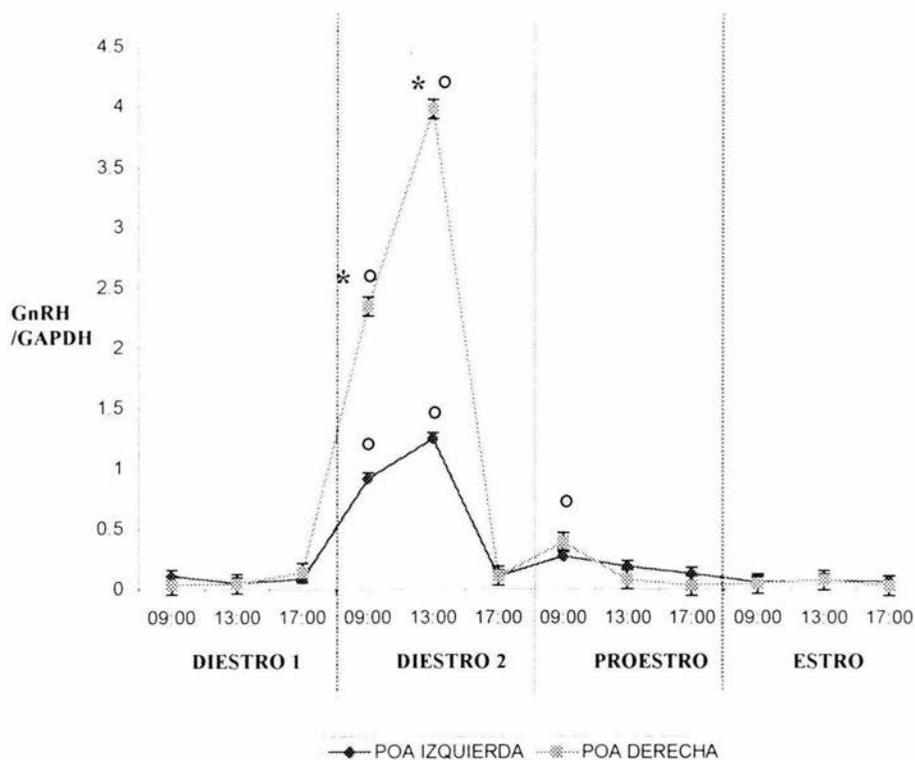
Gráfica 3: Expresión relativa del ARNm para la GnRH y GAPDH, en los lados izquierdo (I) y derecho (D) de POA-AHA de ratas hembras adultas sacrificadas a las 09:00, 13:00 y 17:00 horas del día del Proestro o Estro.

La máxima expresión relativa del ARNm para la GnRH se cuantificó a las 13:00 horas del D2, aunque ya desde las 09:00 horas de este día el valor es significativamente diferente respecto a las demás horas y días del ciclo estral (Gráfica 4).



Gráfica 4: Expresión relativa del ARNm de la GnRH (media \pm e.e.m.) total (ambos lados) de POA-AHA a las 09:00, 13:00 y 17:00 horas de los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta.

Cuando consideramos el lado de POA-AHA, observamos que el lado derecho mostró mayor cantidad relativa de ARNm para la GnRH que el lado izquierdo (Gráfica 5). Como puede observarse, la cantidad relativa del ARNm para la GnRH varía durante el día del D2 del ciclo estral. En el día de máxima expresión (diestro 2), ésta es significativamente mayor en el lado derecho de POA-AHA.



* $p < 0.05$. vs. lado izquierdo de POA-AHA a la misma hora (ANOVA, seguida de la prueba de Tukey).

° $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos del mismo lado (t-Student)

Gráfica 5: Expresión relativa del ARNm de la GnRH (media \pm e.e.m.) en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA a las 09:00, 13:00 y 17:00 horas de los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la máxima expresión del gen para la GnRH ocurre de las 9:00 a 13:00 horas del diestro-2; expresión que es mayor en el lado derecho de POA-AHA.

Estos resultados concuerdan con los observados por Gerendai y col (1978, 1997), quienes mostraron que la cantidad de GnRH (como péptido) es mayor en el lado derecho del hipotálamo medio basal. Cabe señalar que estos autores no consideraron el día del ciclo estral ni la hora del día en la cuantificaron la proteína.

Por otra parte, Gore y col (1995 y 1997), por medio de la técnica de protección de la RNAasa y sin considerar la porción izquierda y derecha de POA-AHA, describen en el día del diestro-2, dos concentraciones máximas e iguales en la cantidad de ARNm para GnRH, uno a las 11:00 y otro a las 18:00 h, y en el día del proestro observa otro semejante a las 11:00 h. Sin embargo, ella señala que los máximos observados en diestro-2 son regulados en forma diferente al valor máximo observado en proestro, ya que cuando cuantifica el primer transcrito de GnRH, éste es constante y bajo en diestro-2 y sólo se observa el valor máximo a las 11:00 h del día del proestro. Estos resultados no pueden ser comparados del todo con los de esta tesis, ya que nosotros cuantificamos a las 13:00 h una concentración mayor a la observada a las 09:00 y 17:00 h, que ella no detecto quizá por no cuantificar a esta hora ni el ARNm, ni el primer transcrito de GnRH.

La marcada asimetría en la expresión del gen de la GnRH entre los lados izquierdo y derecho de POA-AHA, durante el diestro-2, podría estar relacionada con el número de neuronas GnRH; en el ratón, hay más neuronas inmunoreactivas a GnRH en el lado derecho del hipotálamo que del lado izquierdo (Inase y Machida, 1992; Bakalkin y col., 1984).

El fenómeno asimétrico observado durante la mañana del diestro-2 desapareció hacia la tarde del mismo día, resultado que concuerda con las observaciones hechas por Bakalkin y col (1984), quienes mostraron en la rata macho que la asimetría observada durante la mañana en la cantidad de GnRH, desaparece en la noche, lo cual pone de manifiesto un comportamiento asimétrico circádico, y que en la hembra sería además variable durante el ciclo estral.

En función de la expresión del gen para la GnRH y de la cantidad de la proteína, uno puede considerar que del lado derecho del hipotálamo dependen las funciones reproductivas en las que interviene el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Se ha mostrado que alteraciones funcionales del lado derecho de POA-AHA o del hipotálamo, como lesiones, deaferentaciones, bloqueos o estimulaciones de sistemas de neurotransmisión alteran la secreción de gonadotropinas, la ovulación, la esteroidogénesis de la gónada o incluso el grado de hipertrofia compensadora ovárica del animal hemiovariectomizado (Nance y col., 1983 y Inase y Machida, 1992).

Se ha mostrado que la cantidad de GnRH en la sangre del sistema porta-hipofisario aumenta a medio día del proestro (Gerendai y col., 1978), hecho que es precedido por la secreción preovulatoria de estradiol y precedido por el de las gonadotropinas. En esta tesis, se observó que el ARNm de la GnRH aumenta en la mañana del diestro-2. Si consideramos que la síntesis de una proteína lleva en promedio entre 8 y 24 horas, estos resultados concuerdan con lo observado en la literatura y las concentraciones plasmáticas de FSH, LH, estradiol y progesterona cuantificados en nuestros animales experimentales.

El presente trabajo confirma la existencia de asimetría en la actividad de las neuronas GnRHérgicas, sin embargo quedan por resolverse una gran cantidad de incógnitas como: ¿la neurona GnRHérgica por si misma funciona asimétricamente o es regulada de esta forma por neuronas de actividad asimétrica?, como sería el caso de la acetilcolina. Sin embargo, estos hallazgos junto con los observados por otros autores (Cruz y col, 1989 y Sánchez y col., 1994) permiten ir armando el rompecabezas que llevará a entender cómo son los mecanismos neuroendocrinos de la función asimétrica del hipotálamo. No obstante no permite responder cuál es el significado de estas asimetrías.

CONCLUSIONES

En nuestra cepa de ratas y bajo las condiciones experimentales utilizadas:

- ▶ La expresión del gen para la GnRH es máxima a las 13:00 horas del diestro-2 del ciclo estral
- ▶ En el día del diestro-2, la expresión del gen para la GnRH es asimétrica, esto es, mayor en el lado derecho de POA-AHA que en el izquierdo.
- ▶ La expresión del gen de la GnRH parece ocurrir aproximadamente 28 horas antes de la liberación del péptido

Bibliografía

- Aboitz F, Scheibel AB, Fisher RS y Zaidel E.** (1992). Individual differences in brain asymmetries and fiber composition in the human corpus callosum. *Brain Res.* 598 (1,2): 154-61.
- Anderson, L.** (1996). Intracellular mechanics triggering gonadotrophin secretion. *Reviews of Reproductions* 1: 193-202
- Bakalkin G, Tsibezob VV, Sjutkin EA, Veselova JP, Novikov ID y Krivaskeev OG.** (1984). Lateralization of LH-RH in rat hypothalamus. *Brain Research* 296: 361-364.
- Barry J, Hoffman GE y Wrays S.** (1985). LHRH-containing system. In: Bjorklund AS, Hokeleff T (eds) *Handbook of chemical Neuroanatomy*. Elsevier. Amsterdam. vol 4:225
- Brown, R.E.** (1994). An introduction to neuroendocrinology. Ed. Cambridge university press. Pág. 56-87
- Bubsy WH, Quackenbush GE, Humm J, Youngblood WW, Kizer JS.** (1987). An enzyme(s) that converts glutaminil peptides pyroglutamylpeptides. *J. Biol. Chem.*, 262: 8532-8536.
- Butcher RL, Collins WE y Fugo NW.** (1974). Plasma concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and 17 β -estradiol throughout the 4-day cycle of the rat. *Endocrinology*: 94(6): 1704-1708.
- Charli JL, Ponce G y Joseph-Bravo P.** (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRHérgicas hipotálamicas. En: *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. Edit. R. Domínguez, UNAM-PORRUA. México, 59-85.
- Clarke IJ and Cummins JT** (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111:1737.
- Conn PM.** (1993). The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary. *The Physiology of reproduction*. Capitulo 32. Ed. E. Knobil y J. Neil. et. al. Raven Press. Ltd. nueva York, 1349-1377
- Conn PM.** (1999). *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Edit. Human Press. Totowa, New Jersey. pp 24-25
- Conn PM, Jennes L y Janovick JA.** (1999). Gonadotropin-Releasing hormona. *Enciclopedia de reproducción*. Edit Knobil y J. Neil. Academia Press. New York, USA. 464-477.

- Cruz, ME, Jaramillo LP y Domínguez R.** (1989). Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Brain Research Bull.* 24:739-742
- Cruz ME, Arteaga PR, Huerta-Delgadillo M, Sánchez MA y Domínguez R.** (1997). Differences in acetylcholine, binding and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Med. Sci. Res.*, 25:823-825.
- Fink G.** (1998). Gonadotrophin secretion and its control. en: *the physiology of reproduction*. Edit. E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA. 1349-1378.
- Flanagan CA, Millar RP, Illing N.** (1997). Advances in understanding gonadotrophin releasing hormone receptor structure and ligand interactions. *Rev of Reproduction*; 2: 113-120.
- Freeman FE.** (1994). The neuroendocrine control of the rat cycle estrous. En: *The physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill. 2da edition. cap. 46. Raven Press. Nueva York. pp. 613-658.
- Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y.** (1982). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neurosci Lett*; 51: 265-370.
- Fukuda, M., Yamanouchi, K., Nakano Y., Furuya H. y Arai Y.** (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neuroscience letters*. 51: 365-370
- Gallo, RV.** (1981). Pulsatile LH release during periods of low level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biol Reprod.* 1981 May;24(4):771-7.
- Gerendai I, Halász B.** (1997). Neuroendocrine Asymmetry. *Frontiers in neuroendocrine* 18: 354-381.
- Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U** (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neurosci Lett*; 9: 333-336.
- Gore AC.** (1995). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. *J. Neurosci* 14: 5548-5558.
- Gore AC, Yeo TT, Ho A. y Roberts JL.** (1997). Post-transcriptional regulation of the gonadotropin-releasing hormone gene in GT1-7 cells. *J. Neuroendocrinol.* 9(4): 271.277.

- Gore-Langton R.E., Armstrong D.T.** (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. (Edits) E. Knobil y J. d. Neill. Raven Press. New York, USA, 571-611
- Greenspan F y Forsham P.** (1988). *Endocrinología básica y clínica*. Edit. El manual moderno. S.A de C.V. pp 32-41.
- Hamilton CR y Vertiere BA.** (1991-4). Complementary hemispheric specialization in monkeys. *Science*: 242
- Inase Y, Machida T.** (1992). Differential effects of right-sides and left-sides orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Research*: 580: 338-340.
- Janne O.** (1981). Progesterone action in mamalian uterus. *Acta Obstet. Gynecol. Scan. Suppl.* 101:11-16.
- Jennes D, Stumpf WE, Tappaz ML.** (1983). Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic system with the GnRH-system in the septo-hypothalamic area. *Brain Res.*, 50: 91-99.
- Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kalló, Goubillon y Coen** (2001). Oestrogen receptor b-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurons: regulation by oestrogen. *Journal of Neuroendocrinology*. 13: 741-748.
- Kalra, SP. y Kalra PS.** (1983). Neural regulation of luteinizing hormone secretion in rat. *Endocrinol Rev* 4:311-351
- Knobil E.** (1980). Neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 36:53.
- Knobil E.** (1989). The electrophysiology of the GnRH pulse generator. *J Steroid Biochem* 33:669.
- Koning FR. y Klieppel RA.** (1963). *The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem.* The williams and Wilkins company. Baltimore Pág.: 21,24 y 34
- Kordon C., Drouva SV, Martínez G. y Weiner RY.** (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactine. *The physiology of reproduction*. Capitulo 27. Raven Press
- Leo R.** (1999). Follicle-stimulating hormone. *Enciclopedia of reproduction*. E. Knobil. Editores: JD. Neill 2:418:422. Academic Press.
- Levine JE y Ramírez VD.** (1980). In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannula from mediobasal hipothalami of ovariectomized, steroidprimed rats. *Endocrinology*. 107(6): 1782-1790.

- McGeer, P.L., Eccles, J.C. y McGeer, E.G.** (1987). Molecular neurobiology of the mammalian brain. segunda edición. Nueva York. pp 150.
- Minami S, Frautschy SA, Plotsky PM.** (1990). Facilitatory role of neuropeptide on the onset of puberty: Effect of immunoneutralization of neuropeptide Y on the release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 52:112.
- Morán JL, Cruz ME y Domínguez R.** (1994). Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic and anterior hypothalamic area performed on each day of the estrous cycle of adult rats. *Brain Res Bull* 33: 663-668.
- Nance DM y Moger WH.** (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks increase in serum FSH following hemicastration. *Brain. Res. Bull.* 8:299-302.
- Nance DM, Bhargava M y Myatt GA.** (1983). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemicastration. *Brain Res Bull* 10: 353-355.
- Nance DM, Bhargava M, Myatt GA.** (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Res Bull* 13: 651-655.
- Neill, JD.**(2002). GnRH and GnRH receptors genes in the human genome. *Endocrinology* 143:737-43.
- Palkovits M.** (1979). Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain res.* 59:449-450.
- Russell, D. y White RB.** (1999). Gonadotropin-Releasing Hormone Genes: Phylogeny, Structure, and functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20: 224-240
- Sanchez MA y Domínguez R.** (1994). Asimetrías en los sistemas nervioso, inmune y endócrino. *Arc Ins Nac Neurol Neuroscir (MEX)* 9:66-72. (Abstract).
- Sánchez MA, García JC, Cruz ME, Tapia R. y Domínguez R.** (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Neuroreport* 5: 433-434
- Shivers BD, Harlan RE, Morell JI y Pfaff DW.** (1983). Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304: 345-347.
- Shupnik MA.** (1996). Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol. Reprod.* 54(2):279-286.

Silverman, A. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores. E. Knobil y JD. Nelly, Segunda edición, vol. 1, Capítulo 29. , et. al., Raven Press, Ltd. Nueva York, pp 1638-1709.

Sitges, M. (1993). Comunicación entre las células nerviosas. Sinapsis. Comunicación neuroendócrina. Bases celulares moleculares. Sociedad mexicana de ciencias fisiológicas. CONACyT y SEP. pp. 292

Susuki M, Nishihara M, Takahashi M. (1995). Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrous cycle. *Endocrine journal*; 42(6): 789-796.

Swanzel-Fukuda M y Pfaff DW. (1989). Origen de los neurones liberadoras de la hormona luteinizante. *Nature* 338:161

Villegas MG. (1998). Efectos de la administración de sulfato de atropina en el día del diestro 1. sobre las concentraciones de monoaminas en POA-AHA y de gonadotropinas y de hormonas ováricas en sangre. Tesis para obtener el grado de biólogo. Facultad de estudios Superiores Zaragoza.

Yellon SM, Lehman MN, Newman SW. (1990). The gonadotrophin-releasing hormone neuronal system of the male Djungarian hamster: distribution from the olfactory tubercle to the medial basal hypothalamus. *Neuroendocr*: 51: 219-225.

Yen SC, Jaffe RB y Barbieri RL. (1999). Endocrinología de la reproducción. 4ª edición. Editorial Medica Panamericana. México. DF. pp 31 - 85