

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

CONTROL REPRODUCTIVO DEL MURCIÉLAGO
HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* TRANSMISOR DE LA
RABIA

TESIS

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presentado por
JUAN JOSÉ PÉREZ RIVERO CRUZ Y CELIS

Tutor: J. ÁLVARO AGUILAR SETIÉN

Comité Tutorial:
ALEJANDRO VILLA GODOY
HÉCTOR SERRANO



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.

Agradecimientos

Al **Dr. Álvaro Aguilar Setién**, por haberme tenido la suficiente confianza para llevar a buen termino esta investigación, por brindarme su tiempo, conocimientos, apoyo económico y amistad, mil gracias por todo.

Al **Dr. Héctor Serrano** por haberme guiado y enseñado durante todo el proceso de esta investigación , por su apoyo incondicional , por su confianza en mi, por las horas de asesoría fuera de laboratorio, por su amistad, mil gracias por todo.

Al **Dr. Alejandro Villa Godoy**, por las horas de enseñanza , asesoría y ayuda, por su amistad incondicional y por su confianza en mi, por todo mil gracias.

Al **Dr. Mario Pérez Martínez** por su ayuda incondicional y sus valiosas sugerencias.

A la **Dra. Nuria de Buen** por su ayuda y amistad gracias

Al **MVZ Juan Manuel Gonzáles Rodríguez** por su apoyo incondicional y gran ayuda prestada para la realización de este trabajo. Mil Gracias amigo

A **Dr. Joaquín Arroyo Cabrales** por su amistad y valiosas sugerencias. Gracias

A los **Drs. Germán Colmenares y Arcelia Alvarado**, del INIFAP/CENID/Microbiología en Palo Alto por las facilidades para realizar este trabajo.

A mis maestros de Epidemiología y Medicina Preventiva **Drs. Jorge Cárdenas Lara, Marco Antonio Méndez Ochoa y Marco Antonio Casillas Fabila** por sus enseñanzas y amistad

Al **personal del laboratorio de Inmunovirología del Hospital de Pediatría del CMN siglo XXI** por su cooperación en el desarrollo de este trabajo.

A mi **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por permitirme acceder a este postgrado de excelencia. Mil Gracias

Al **Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por sus consideraciones y cooperación en el procesamiento de las muestras de citología e histología de este trabajo. Gracias

A **CONACyT** por haberme otorgado la beca para poder realizar estudios de postgrado Gracias por su apoyo.

INDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
1.0 Introducción.....	1
1.1 La rabia.	
1.2 El <i>Desmodus rotundus</i> .	
1.2.1 Comportamiento del <i>D.rotundus</i> .	
1.2.2 Reproducción.	
1.2.3 Alimentación.	
1.2.4 Efectos del <i>D.rotundus</i> en la ganadería.	
1.3 Antecedentes de los métodos de control.	
1.3.1 Métodos de control físicos.	
1.3.2 Métodos de control químicos.	
1.4 Epidemiología de la Rabia Paralítica Bovina..	
1.5 El control reproductivo.	
1.6 Los receptores estrogenicos.	
1.7 Hipótesis	
1.8 Objetivos	
2.0 Material y métodos.....	13
2.1 Captura y acondicionamiento de los <i>D rotundus</i>	
2.2 Manejo general	
2.3 Experimento 1.- Detección de la presencia de receptores estrogenicos β en testículo de <i>D. Rotundus</i> .	
2.4 Experimento 2.- Determinación de la acción del coumestrol para producir alteraciones reproductivas en testículos, útero y ovarios de <i>D. Rotundus</i> .	

3.0 Resultados.....	16
3.1 Presencia de receptores estrogenicos β	
3.2 Hembras	
3.3 Machos	
3.4 Análisis estadístico	
4.0 Discusión y conclusiones.....	17
5.0 Figuras.....	19
6.0 Cuadros.....	31
7.0 Referencias.....	35
8.0 Anexos.....	41
8.1 Relación estructura función de receptores para hormonas esteroidales:Receptores a estrógenos.	
8.2 Reproductive control of vampire bat (<i>Desmodus rotundus</i>): An enviromentally friendly alternative.	
8.3 Detección de receptors estrogenicos beta (ER β) en testículo de <i>Desmondus rotundus</i> mediante el uso de coumestrol.	
8.4 La súper familia de los receptores nucleares.	
8.5 Control reproductivo del vampiro. ¿Otra alternativa de control?	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1 Virus de la Rabia.....	19
Figura 1.2.1 Fotografía del murciélago vampiro <i>Desmodus rotundus</i>	20
Figura 1.4.1. Estados y regiones en fase de control de RPB.....	21
Figura 1.4.2. Focos de Rabia Parálitica Bovina (2001-2004).....	22
Figura 1.4.3. Variación del numero de focos de RPB entre 2003 y 2004.....	23
Figura 1.4.4. Número de municipios con antecedentes de RPB en México.....	24
Figura 1.6.1 Receptor estrogenico unido a estradiol.....	25
Figura 3.1.1 Fluorescencia relativa de coumestrol en testículo de <i>Desmodus rotundus</i>	26
Figura 3.1.2 Detección de los receptores estrogenicos β en testículo de <i>D. Rotundus</i>	27
Figura 3.2.3 Comparación del útero de <i>Desmodus rotundus</i>	28
Figura 3.2.4 Comparación Citológica e Histológica en hembras.....	29
Figura 3.3.4 Imagen histológica de testículo en tratamiento y testigo.....	30

LISTA DE CUADROS

Cuadro 3.2.1 Medias de los pesos de ovarios de *D.rotundus* hembras tratados con 200µg de coumestrol por vía oral durante 30 días , testigos y grupos de edad.....31

Cuadro 3.2.2 Interacciones entre los diferentes niveles de tratamiento de las hembras.....32

Cuadro 3.3.1 Medias de los pesos de testículos de *D.rotundus* machos tratados con 200µg de coumestrol por vía oral durante 30 días y testigos y grupos de edad.33

Cuadro 3.3.2 Interacciones entre los diferentes niveles de tratamiento de los machos.....34

RESUMEN

Las estrategias de control del *Desmodus rotundus* y la rabia parálitica bovina (RPB) que transmite no han cambiado desde los años 70. Las técnicas de control empleadas hasta la fecha son en base a sustancias tóxicas, principalmente anticoagulantes.

El incremento de reportes de RPB en el país, genera la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control que incorporen mantenimiento del nicho ecológico ocupado y protección al medio ambiente. Una de estas, es el control reproductivo utilizando coumestrol, un fitoestrogeno, que se une con afinidad similar al estradiol a los receptores estrogénicos beta (ER β) el cual fluoresce cuando es excitado con luz ultra violeta y produce alteraciones reproductivas en diferentes mamíferos.

En un primer estudio se detectó la presencia de ER β , utilizando porciones de 1mm³ de testículos, de dos *D. Rotundus*, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente y sumergidos en varias concentraciones de coumestrol, se incubaron por 30 minutos en cámara húmeda y oscuridad, posteriormente se realizó un squash convencional sin fijador y se observaron al microscopio de fluorescencia detectando la presencia de abundantes ER β en el tejido testicular del *Desmodus rotundus*. Un segundo estudio se efectuó utilizando 4 machos y 6 hembras de *D. rotundus* en grupos experimentales a los cuales se les administró coumestrol 200 μ g/día por vía oral durante 30 días, después de este tiempo los animales fueron sacrificados con anestésicos y punción cardíaca y los órganos reproductivos diseccionados, los cuales fueron comparados en peso y cortados en rebanadas de entre 4 y 5 micras, montados en preparaciones convencionales para histología y teñidos con hematoxilina y eosina, se observaron al microscopio de luz, detectándose que el coumestrol produce alteraciones microscópicas en los machos tratados, como lo es la pérdida de la arquitectura celular de los túbulos seminíferos, comparado con el grupo control el cual estuvo conformado por 5 machos en el cual no se identificaron alteraciones estructurales en los testículos. No se detectaron cambios estadísticamente significativos en el tamaño de los testículos del grupo testigo y experimental ($p < 0.05$)

En los ovarios de las hembras bajo tratamiento se observaron al microscopio quistes foliculares y pérdida de la arquitectura folicular, no así en los ovarios de las hembras control (5 hembras) se observaron cuerpos lúteos. No fueron detectados cambios significativos en el tamaño de los ovarios del grupo testigo y experimental ($p < 0.05$). Se observó edema en los úteros de los animales bajo tratamiento.

La presencia de ER β en el testículo del *D. Rotundus* y la inducción de lesiones en testículo y ovarios y potencialmente inducir alteraciones que se reflejen en la disminución de la fertilidad de los animales tratados abre la posibilidad de utilizar al coumestrol como una alternativa en el control reproductivo de este quiróptero en sitios donde no ha habido reportes de RPB pero presentan problemas por la mordida de este quiróptero.

Palabras clave: Coumestrol, Receptores estrogénicos β , *Desmodus rotundus*

ABSTRACT

Vampire bat control strategies have not changed since 1970 in Mexico. Anti-clotting agents are employed with no satisfactory results and rabies is still maintaining, its impact on economically important species. Bovine Paralytic Rabies is the main vampire bat-bite derived disease. New control techniques are required to complement present procedures and ideally do not have an impact on environment conditions. A major goal is that there have to be no empty ecological niche that can be occupied by another disease-transmitting population. A new control method is being developed taking advantage of the reproductive alterations induced by coumestrol a fluorescent phytoestrogen in mammals. We perform two different experiments.

First experiment: To detect estrogen receptor beta (ER β) in vampire bat testis we cut in 1mm³ two testis and dip in different dilutions of coumestrol, then incubated 30 minutes at 37°C in a damp chamber, once this is done make a conventional squash without fixed and view at the fluorescent microscopy, this show a high level of ER β in vampire bat testis tissue.

In a second experiment vampire bats – 9 males and 11 females- were divided into two groups. Experimental group (4 males and 6 females) was fed with a solution of coumestrol (200 μ g) in 15 ml of bovine defibrinated blood (BDB) for 30 days. The control group (5 males and 5 females) was fed with 15 ml of BDB. After treatment, all animals were sacrificed by anesthesia and heart puncture, reproductive organs were analyzed for gross anatomical and histological alterations. Testis from experimental animals were lost the histological architecture than those of control animals. No weight differences were detected between control and treated testis (p<0.05). Also variations in ovaries such follicular cists and loose of follicular architecture were detected in experimental bats. Control animals show corpus luteum. No weight differences were detected between treated and control ovaries (p<0.05). Coumestrol induces a significant edema in treated uterus when compared to that of the control female. These results strongly suggest that phytoestrogen treatment is a main candidate to replace today's anti-clotting strategy for vampire bat population control in rabies free areas in Mexico and other countries and seems to be more effective, specific and environmentally safe.

Key words: Coumestrol , Estrogen Receptor β , *Desmodus rotundus*

1.0 Introducción

1.1 La rabia

La rabia es una enfermedad zoonótica conocida por el hombre desde la antigüedad. Dependiendo del área y la región geográfica, ha presentado una fisonomía diferente, debido a la naturaleza de su agente etiológico. Esta zoonosis es causada por un virus cuyo material genético es ARN, clasificado taxonómicamente como perteneciente al género *Lyssaviridae*,(1) uno de los cuatro que conforman la familia *Rhabdoviridae* del orden *Mononegavirales*, con distribución mundial, excepto algunas islas como Japón y Gran Bretaña. Esta enfermedad considerada mortal en todos los mamíferos de sangre caliente, se transmite habitualmente por mordida de animales infectados, la saliva sirve al virus como medio de transporte o vehículo para que se introduzca por medio de mordida o lamedura en una lesión reciente de la piel (2,3).

Si bien muchas especies son susceptibles a la rabia, estas pueden dividirse en dos categorías. La primera es la de los reservorios o animales que mantienen el virus y lo diseminan en forma eficaz; estos animales son principalmente predadores del tipo de los perros, zorros, lobos, coyotes, mapaches, mangostas, zorrillos entre otros. Todos estos mamíferos están capacitados para cazar, por lo que tienen en común el hábito de alimentarse de otros animales y no de vegetales., Dentro de este tipo de animales, destaca un quiróptero, mamífero volador que habita en América Latina tropical y subtropical llamado *Desmodus rotundus*, conocido coloquialmente como vampiro o murciélago hematófago. Este quiróptero es el principal transmisor de la rabia al ganado. El desarrollo de la enfermedad y sus signos clínicos han sido caracterizadas como Rabia Paralítica Bovina (RPB). En su transmisión al humano, la rabia debida al *D. rotundus* ocupa el segundo lugar, después que el perro (2,4).

La segunda categoría corresponde a los animales susceptibles de desarrollar y que pueden padecer la rabia pero no la diseminan en forma tan eficaz como los primeros debido principalmente a que no son depredadores. Desde el punto de vista epidemiológico este tipo de organismos son considerados “fondos de saco”. Aquí se encuentran los bovinos que

como se mencionó anteriormente, desarrollan la RPB , además de los equinos, los ovinos, los caprinos, los porcinos y el humano.(2).

1.2 El *Desmodus rotundus*

El *Desmodus rotundus* pertenece al orden Chiroptera, familia Phyllostomidae, subfamilia Desmodontinae (5), nombrado comúnmente vampiro o murciélago vampiro (vampire bat). Es moderadamente grande, tienen un peso entre 19 y 43g. La longitud de la cabeza y cuerpo varía entre 70 a 90 mm, las orejas son triangulares, más largas que anchas con hoja nasal reducida que les da la apariencia de cabeza de cerdo, los ojos son relativamente grandes, los incisivos superiores son largos y filosos, mientras los demás dientes son sumamente pequeños; el labio inferior presenta una escotadura en forma de “V”(6), la lengua se dobla hacia abajo y actúa como popote durante la ingestión de sangre (7) (Figura 1.2.1).

El *D.rotundus* no presenta cola, la longitud del pie varía de 13 a 20mm, similar al tamaño de los pulgares los cuales son muy largos con 3 almohadillas bien desarrolladas sobre la parte inferior, con una longitud de 15 a 20mm, el antebrazo mide de 50-63 mm, las membranas de las alas son negras, sin manchas blancas. Presentan hueso calcáneo rudimentario (6). El pelaje es corto, áspero y brillante en la parte dorsal es usualmente de color café grisáceo con tonalidad ligeramente más clara a la parte ventral (6). Se han encontrado *D. rotundus* en vida silvestre de 18 años, lo que indica que son animales longevos. Habitan desde la zona tropical y subtropical de México comprendidas por la zona costera del Pacífico y la del Golfo de México, y algunos estados del centro del país como Hidalgo y Querétaro hasta el norte de Argentina y Trinidad y Tobago, generalmente escogen sus nichos en lugares dispersos, tranquilos, oscuros y difíciles de localizar como lo son las cuevas, pozos, alcantarillas, minas abandonadas y árboles huecos (8).

1.2.1 Comportamiento del *D. rotundus*

Los patrones de asociación del *D.rotundus* dentro de sus guaridas han sido bien estudiados , observándose en la misma guarida varias colonias formadas de entre 20 y 100 vampiros agrupados en estrecho contacto uno con otro y entre las que contenían alrededor de 50 animales se identificaban grupos de 10 a 20 hembras adultas con sus crías y que estas

utilizan múltiples refugios en el área como lo son los árboles huecos. Cada grupo de hembras es acompañado por un macho dominante que es con el que se aparean. Los machos jóvenes se encuentran repartidos en grupos dentro de la guarida como medida de protección contra intrusos (9).

Estos animales dedican mucho tiempo del que se encuentran en su refugio a acicalarse. Los machos se acicalan a si mismos mucho mas tiempo que las hembras y los jóvenes, este comportamiento esta relacionado con la infestación con ectoparásitos, el acicalamiento social depende de la edad y del sexo y es un modo de identificar a los miembros de la colonia (9).

1.2.2 Reproducción

El *D.rotundus* es considerado desde el punto de vista reproductivo como poliéstrico continuos, lo que significa que cada hembra tiene dos crías en un año, teniendo sincronía con los picos de nacimientos, pero no están limitados a estaciones del año en particular y no tienen periodos prolongados de inactividad sexual como otros quirópteros (10).

Tienen un intervalo entre partos de 10 meses ,generalmente tienen una cría por parto, por lo que en optimas condiciones una hembra podrá tener 20 crías durante su vida reproductiva, registrándose el mayor número de crías entre los meses de abril - mayo y octubre - noviembre (11,12).

Los que alcanzan su madurez sexual entre los 10 y 12 meses. El útero del *D.rotundus* es bicorne siendo el cuerpo mas largo que los cuernos, los ovarios trabajan alternadamente en cada ciclo para producir óvulos, un solo óvulo es liberado para su fecundación. El tipo de implantación de esta especie es intersticial, siendo la placenta de tipo corioalantoidea discoidal, la cual es expulsada en el transcurso del primer día después del parto y no es ingerida por la hembra (10).

1.2.3 Alimentación

Los vampiros son animales de hábitos nocturnos, salen a alimentarse con vuelo raso en las horas de mayor oscuridad, en ausencia de luz lunar, su radio de actividad va de 2 a 20 kilómetros.

Crespo y col. (1971) realizaron observaciones sobre el comportamiento del vampiro al alimentarse en condiciones naturales sobre ganado bovino de diferentes razas y observaron que los vampiros llegan en grupos de 2 a 10 individuos y se han cuantificado más de 50 vampiros por noche, dependiendo del número de estos quirópteros en la zona y la disponibilidad de fuente alimenticia. Con sus filosos incisivos realizan un corte circular prácticamente sin dolor en la piel del mamífero del que se alimentarán. Los anticoagulantes presentes en la saliva evitan que se forme el coágulo y con la lengua toman la sangre de la herida, generalmente ingieren 20 mililitros de sangre, preferentemente de bovino (13).

El tiempo que tardan en alimentarse es variable debido a diferentes factores como lo son el tiempo de oscuridad, reacción del individuo a la mordida, lugar de la mordida y la rapidez con que fluye la sangre (14).

El vampiro tiene un comportamiento altruista, principalmente entre los machos, ya que regurgita sangre a otro individuo de la misma familia que no haya obtenido alimento ese día (15).

A diferencia de otros murciélagos el *D. rotundus* no es capaz de asociar la ingestión de “alimentos” con nuevos sabores, con eventos gastrointestinales adversos para él (16).

1.2.4 Efectos del *D. rotundus* en la ganadería

El número de muertes de ganado se estima anualmente en cien mil cabezas en América Latina y Trinidad y Tobago por la rabia parálitica transmitida por la mordida del vampiro.

El vampiro consume 20 ml de sangre al día y como consecuencia de la acción de los anticoagulantes presentes en su saliva, por mordida, el animal pierde 20 ml de sangre adicionales. Esta pérdida recurrente genera anemia, reduciendo así la ganancia de peso en ganado de carne y descenso de la producción lechera. Las infecciones bacterianas y parasitarias asociadas que se desarrollan sobre la herida agravan el problema, lo que representa cuantiosas pérdidas económicas adicionales (17).

1.3 Antecedentes de los métodos de control

Debido a los hábitos y comportamiento del vampiro, numerosos métodos de control se han desarrollado y empleado a partir de 1936 y hasta la fecha, con resultados y efectos secundarios diversos (18)

1.3.1 Métodos de control físicos

El empleo de fuentes de luz suficientes para iluminar completamente los corrales, ahuyenta a los vampiros, siendo poco efectiva la luz tenue que produzca sitios no iluminados, los cuales son utilizados por los vampiros para morder a sus víctimas. Este método tiene un costo variable dependiendo de la fuente energética que se utiliza y su mantenimiento e impacta directamente en los costos de producción (18).

La colocación de malla de alambre a manera de jaula en los corrales es efectivo y útil para evitar el ataque de los vampiros cuando se cuenta con pocas cabezas de ganado. Esto es impracticable cuando se cuenta con ganado a libre pastoreo o con numerosas cabezas de ganado (18). Estos métodos solo alivian el problema local y favorecen la migración de los *D. rotundus* a otros sitios donde puedan conseguir alimento fácilmente.

La destrucción de las cuevas con explosivos y fuego así como la aplicación de gases tóxicos en su interior son muy discutidos ya que los sitios en los que habita el *D. rotundus* se encuentran en lugares de difícil acceso, siendo muy poco probable que se localicen todos los nichos ocupados, lo que disminuye su efectividad. Además la coexistencia en la misma cueva de otro tipo de murciélagos benéficos y otros animales hace, que este tipo de técnicas no sean ecológicamente aceptables. Villa (1969) encontró que con la aplicación de estas técnicas en Brasil solo el 40% de los murciélagos muertos eran *D. Rotundus* (19).

Se han empleado armas de fuego para el control de este quiróptero siendo poco práctico y peligroso debido a que se tienen que encontrar los refugios, entrar a ellos y dispararles.

La captura con redes de nylon colocadas alrededor de los corrales y en las entradas de las cuevas es una buena alternativa para el control de estos animales, tiene como factores limitantes las horas hombre empleadas en su colocación y el manejo de los vampiros. En un estudio realizado por Aguilar-Setién y col. en 1996 en el que realizaron 6 sesiones de captura con una red de 12 metros de longitud y 2.5 metros de altura en el noreste de México; se informó que de 255 animales capturados, 221 eran *D. rotundus* y 34 (13.3%) pertenecían a otras especies de murciélagos, por lo que se debe tener personal entrenado en la identificación correcta de estos vampiros para no dañar al ecosistema con tratamientos erróneos a especies no blanco (20).

Estas redes están fabricadas con malla de nylon teniendo varios cordones de refuerzo extendidos longitudinalmente. Las redes deben de ser colocadas al ras del suelo y alcanzar una altura de aproximadamente dos metros. Las redes son sostenidas en tubos de 2.5 metros de largo, los cordones longitudinales deben quedar tensos y las mallas deben quedar poco tensas, para que cuando los vampiros choquen con ellas queden atrapados fácilmente. Se deben desenredar con cautela los vampiros atrapados en las redes para evitar que estas últimas se rompan. Estas finas redes requieren cuidados continuos ya que atrapan basuras y se enredan fácilmente (21).

1.3.2 Métodos de control químicos

Se han desarrollado básicamente tres métodos de control empleando sustancias químicas y todos ellos están basados en el comportamiento del vampiro.

La aplicación de pomadas de estricnina sobre las heridas que los vampiros producen al ganado cuando se alimentan de el, se desarrollo en Trinidad en 1936, siendo un producto sumamente toxico para el vampiro, el ganado y los operadores. Posteriormente en México se sustituyó la estricnina por difenadiona una sustancia anticoagulante que ofrece menos toxicidad para el ganado y el operador. Esta técnica está basada en que el vampiro regresa normalmente el día siguiente a alimentarse del mismo animal o de otro que ya haya sido mordido con anterioridad, se impregna de la pomada medicada y regresa a su cueva. Se estima que un vampiro impregnado con la pomada medicada es capaz de impregnar por lo menos 20 vampiros mas, por el contacto íntimo entre ellos y el acicalamiento que practican produciéndoles la muerte en una semana como promedio (18,22).

Actualmente se ha incorporado también la warfarina como principio activo a estas pomadas (22).

La aplicación de este tipo de pomadas sobre los nichos ha dado buenos resultados cuando los refugios son accesibles, teniendo el inconveniente de la difícil localización de los refugios (23).

El capturar a los vampiros con las redes de nylon por las noches cuando salen a alimentarse, untarles en el cuerpo la pomada medicada y liberarlos para que regresen a sus nichos ha sido un método eficaz para su control, ya que al igual que el método de

tratamiento de las heridas, cada quiróptero tratado contamina a por lo menos una veintena de sus compañeros de nicho causándoles la muerte (21).

La susceptibilidad del *D.rotundus* a los anticoagulantes y la resistencia del ganado a las dosis tóxicas para estos vampiros hicieron posible el desarrollo de otra técnica de control por medio de la aplicación intrarruminal o intramuscular de difenadiona, esta se absorbe y se fija a las proteínas plasmáticas del ganado, cuando el vampiro se alimenta de la sangre de su víctima es el anticoagulante que no es hidrolizado por los jugos gástricos es suficiente como para matar al vampiro en unos días, este método es muy específico y no requiere de la identificación del vampiro; presenta el inconveniente de que la acción del producto en el ganado solo dura tres días, por lo que es necesario repetir las dosis con frecuencia, además de ser impracticable en explotaciones de subsistencia por el periodo de cuarentena en el consumo por el humano de los productos provenientes del animal tratado (18,24).

Un procedimiento similar es la aplicación por vía intramuscular de warfarina, la cual supera a la anterior en que no se requieren conocimientos anatómicos específicos para su aplicación, no tiene periodo de cuarentena para consumir la leche del ganado, se puede aplicar a partir de los 3 meses de edad y la duración del efecto es de cinco días (25).

1.4 Epidemiología de la Rabia Paralítica Bovina en México

La campaña contra la RPB en México tiene por objetivo prevenir y controlar esta enfermedad en el territorio nacional. Ésta se encuentra en fase de control en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas. Según la Secretaría de Agricultura Ganadería Recursos Naturales Pesca y Alimentación (SAGARPA) el número total de bovinos en el año 1999, fue de 30,177,135 cabezas, de estos 19,889,477 se encuentran en estos estados bajo control. El resto de los estados se consideran en fase libre natural. (Figura 1.4.1)

El boletín de vigilancia epidemiológica de rabia en las Américas, informa que en México en el año 2001 se presentaron 148 focos de RPB (26), en 2002 se presentaron 323 focos según el cuestionario FAO/OIE/OMS – 2002 (27), El Sistema Nacional de Sanidad,

Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) reportó al 3 de noviembre de 2003, 179 focos de RPB, de los cuales los estados de Hidalgo (36 focos), San Luis Potosí (57 focos), Tabasco (15 focos) y Veracruz (23 focos) contribuyeron con el 73% de los casos (28). Sin embargo se informó para finales de este mismo año 272 focos de RPB por la Organización Internacional de Salud Animal (OIE) y 16 focos en quirópteros, siendo vacunados en México 8,365,829 bovinos contra la RPB (29)

Proyecciones efectuadas para el 2004, indican que al primero de abril hubieron 43 casos, siendo los estados de Puebla (12 focos), Hidalgo (11 focos) y Chiapas (9 focos) en donde se presentó el 74% de los casos (30). Un mes después se presentan 70 focos de RPB, en donde el 77% de estos se presentaron en los estados de Campeche (10 focos), Chiapas (12 focos), Hidalgo (11 focos), Puebla (12 focos) y Tabasco (9 focos) (31). La incidencia para el 1° de junio se incrementa, presentando 124 focos, donde San Luis Potosí aporta el 37% de los casos con 46 focos, aportando el 48% de los reportes los estados de Campeche (11 focos), Chiapas (14 focos), Hidalgo (11 focos), Puebla (15 focos) y Tabasco (9 focos) (32). El número de focos de RPB en el país se incrementa a 140 según se informó el día 5 de julio, contribuyendo los estados de Campeche (14 focos), Chiapas (15 focos), Hidalgo (11 focos), Puebla (18 focos), Tabasco (17 focos) con el 53% de los reportes (33) como se observa en la Figura 1.4.2.

Se han acumulado 188 focos de RPB para la semana epidemiológica 36 (5 al 11 de septiembre de 2004) (34).

Para la semana epidemiológica 33 (15 al 21 de agosto 2003) la dirección general de epidemiología, dependiente de la Secretaría de Salud reporta un caso de rabia en humano en donde es atribuido el contagio a quiróptero u otro animal para la misma semana de 2004 no se han presentado casos de rabia en humanos (35).

La revisión de los informes anteriores de casos de RPB de 2003 y 2004, muestra que lejos de haberse establecido un control de este padecimiento, la tendencia es que en 2004, se superará el número de casos registrados hasta noviembre de 2003; particularmente en algunas entidades como Campeche en donde se presentaron 11 casos acumulados para noviembre de 2003 y el informe del 5 de julio de 2004 reporta 14 casos. En el mismo periodo Chiapas se presentaron 8 y 15 brotes respectivamente, en Nayarit 1 y 4, en San Luis

Potosí 57 y 47 y en Tabasco 15 y 17 casos (Figura 1.4.3), existiendo todavía estados como Querétaro y Guanajuato en donde existen poblaciones importantes de *D. rotundus* aparentemente libres del virus de la rabia en donde no se han reportado brotes de RPB.

En lo que respecta al número de municipios los cuales han tenido casos de RPB alguna vez, éstos se han incrementado en 6 años (1998-2003) en 67%. (Figura 1.4.4). Quizás el número de focos de RPB vaya en ligero descenso a nivel global, en comparación con otros años en los estados bajo control de la campaña contra RPB, con algunas excepciones ya mencionadas; pero lamentablemente los focos que se presentan en la actualidad se detectan en municipios en los que no se había tenido reportes de RPB, lo que contribuye al avance geográfico de esta enfermedad.

Es posible que haya una subnotificación de magnitud desconocida debido a la dificultad de realizar el diagnóstico oportuno por la orografía accidentada del país, por la poca infraestructura en algunas regiones y por el desconocimiento del padecimiento, por lo que en este documento solo se revisaron los datos obtenidos de fuentes confiables.

Todo lo anterior hace evidente que los métodos utilizados actualmente en zonas donde no se había presentado RPB, sin embargo existe el problema de la mordida del vampiro no sean del todo efectivos en esta situación en particular, ya que es factible que con las técnicas en donde se utilizan tóxicos se favorezca la migración de vampiros en condiciones sanitarias dudosas, para ocupar un nicho el cual fue desocupado de vampiros a causa de los tratamientos con los agentes ya mencionados. El resultado es un mayor espacio, mas alimento y generalmente el sitio vuelve a poblarse en un corto tiempo, en algunos casos con mayor cantidad de individuos que los que existían antes del tratamiento(36,37,38).

1.5 El control reproductivo

En la década de los años 60 la investigación en el manejo de fauna silvestre dañina se encaminó en diseñar la mejor forma de eliminarlos, aceptando las consecuencias que esto generara, principalmente la eliminación de especies no blanco, esta conducta fue modificada en la década de los años 80 cuando se inicio la regulación de los plaguicidas. Se empezó a tomar en cuenta los entornos ecológicos y la calidad del medio ambiente. En la década de los 90 y primeros años del nuevo milenio, se planteó la necesidad de nuevas estrategias de control no letal de la fauna silvestre nociva (39).

La investigación en métodos no letales para el control de fauna silvestre dañina se está enfocando hacia el control de su fertilidad. Esto produce una reducción paulatina del número de animales y el impacto nocivo que generan.(40)

Las líneas de investigación en contracepción animal son diversas. El anticonceptivo ideal para quirópteros será aquel que sea efectivo, económico, de fácil administración y específico. Miller y Fagerstone mencionan la posibilidad de utilizar fitoestrogenos para inducir infertilidad en animales silvestres (40).

Los fitoestrógenos son compuestos naturales derivados de las plantas, los cuales son reconocidos por los receptores estrogénicos (ER) de los tejidos animales; por lo que mimetizan y en algunos casos suplen a los estrógenos endógenos (41). Los fitoestrógenos se dividen en tres grandes categorías: las isoflavonas, los coumestanos y los lignanos. Una sola planta es capaz producir diferentes tipos de fitoestrogenos, por ejemplo los frijoles de soya son ricos en isoflavonas, aunque las plantas de soya en crecimiento tienen cantidades importantes de coumestrol (41). Diversos estudios con el fitoestrogeno coumestrol (3,9-dihidroxy-6h-benzofuro[3,2-c][1]benzo-pyran-6-one), reportan la inducción de patologías del tracto reproductivo en el ratón, como lo son: cronificación vaginal persistente, folículos hemorrágicos en los ovarios, apertura vaginal prematura en neonatos y reducción de la tasa de ovulación cuando se administra oralmente en dosis de 50 y 100µg (41).

Se ha comparado el efecto de diferentes fitoestrogenos en el útero, a diferentes dosis, en ratas neonatas en desarrollo, encontrando que la respuesta inicial del día 1 al 5 de administración fue hipertrofia uterina, sin embargo a mayor dosis / tiempo 100µg el coumestrol produce bloqueo de los ER con la consecuente disminución del tamaño uterino (41).

Cuando se estudió la unión de fitoestrogenos y micoestrogenos (42) en los ER del útero de la rata se encontró que el coumestrol es uno de los más activos, teniendo tanta afinidad como los estrógenos endógenos. Miksicek (1993) quien observó su gran especificidad y afinidad a los ER, usando cultivos celulares detectándolo por el aumento en la fluorescencia que se obtiene cuando el coumestrol se une a los ER.(43,44)

El coumestrol (100µg / g) en la dieta altera el desarrollo neuroendocrino en ratas lactantes de ambos sexos, mientras que en hembras adultas en lactación, con varias exposiciones orales induce un síndrome anovulatorio. Los efectos aditivos de coumestrol se observan

por vía oral y no por la vía parenteral, esto a consecuencia de la vida media prolongada de este fitoestrogeno administrado por esta vía; en machos se reporta baja de peso y libido.(45,46)

Por otra parte Galey (47) ha obtenido coumestrol de la alfalfa (*Medicago sativa*) y observó sus efectos en ratones cuando se administró por vía oral, produciendo hiperestrogenismo y crecimiento uterino significativo. Adams (48) informo que concentraciones de 25ppm de coumestrol en el alimento, baja la tasa de ovulación en borregos y la exposición prolongada genera esterilidad permanente. En el ganado bovino se presentan signos de estimulación estrogénica con 37ppm de coumestrol en el alimento. Romero asocio a un síndrome estrogénico en vacas lecheras caracterizado por abortos, quistes ováricos, estros falsos y útero turgente a la presencia de cantidades elevadas de coumestrol - 66.8 mg/kg de materia seca - en la alfalfa (*Medicago sativa*) contaminada con hongos (*Pseudopezisa medicaginis*) (49)

En el humano se ha demostrado que el coumestrol, cuando se administra de forma aguda, se une con gran afinidad a los receptores estrogénicos α y β (ER α y ER β), a este último con una efectividad similar a la de los estrógenos, incrementando el peso uterino sin aumentar el número de células en él.(50,51)

Se ha sugerido que el efecto estrogénico del coumestrol se debe a que incrementa la sensibilidad del tejido hacia los estrógenos endógenos. Sin embargo, el efecto antiestrogénico de los fitoestrógenos se debe a que inhiben la unión de los estrógenos y de la testosterona a su receptor, reduciendo su efecto biológico.(51)

Miksicek observó en cultivos celulares la especificidad y afinidad del coumestrol a los ER. La unión del coumestrol puede ser evaluada por microscopía de fluorescencia aprovechando la fluorescencia natural del coumestrol la cual tiene índice de exitabilidad UV de 343 nm (44), que como un método no isotópico puede ser útil para la caracterización y diferenciación de ER α y ER β (52).

1.6 Los Receptores estrogenicos

Hasta la fecha han sido identificados dos isoformas de ER : los ER α y los ER β ; siendo diferentes en la secuencia de aminoácidos entre ambos. Estos receptores presentan 97% de homología de sus aminoácidos constituyentes, aunque no es una regla aplicable a todas las regiones del receptor; ya que las regiones de unión al ADN (DBD) es la que mas similitud presenta y en cambio la unión al ligando (LBD) solo existe una similitud de 53% (Figura 1.6.1).

Los estrógenos presentes en el plasma penetran a sus células blanco en tejidos llamados “clásicos” que se encuentran en el útero, glándula mamaria, placenta, hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular y hueso. Las células blanco de este grupo de tejidos son ricas en ER α .

Existen otros tejidos considerados “no clásicos”, entre los que se incluyen próstata, ovarios, testículos, glándula pineal, glándula tiroides, paratiroides, adrenales y páncreas; así como la vesícula biliar, la piel, tracto urinario, tejido linfoide, tejido eritroide, pulmón, epitelio intestinal y algunas regiones del cerebro que expresan poco ER α , pero que contienen cantidades significantes de ER β . El tejido muscular estriado es único, puesto que en él se expresa de manera elevada el ER β y está casi ausente el ER α (53,54).

Como miembros de la súper familia de los receptores nucleares, los ER modulan la transcripción, interactuando con las secuencias regulatorias del ADN celular, uniéndose discriminadamente con secuencias específicas del genoma, así como a correpresores y coactivadores para regular la acción del complejo de ARN polimerasa. Los efectos moduladores de los ER sobre la transcripción se llevan a cabo en una serie secuencial de eventos. Al unirse los ER con los estrógenos, desencadenan cambios en la forma del receptor que consisten en la disociación de un complejo correpresor del ER y la unión de éste con un complejo coactivador. Estos últimos son moléculas que al interactuar con el receptor le confieren la actividad de transcripción, resultando en la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a los estrógenos (ERE). Por el contrario, en ausencia de estrógenos, los ER se asocian con los correpresores que inhiben la actividad de transcripción (55,56,57).

Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales: Receptores estrogénicos.

Juan José Pérez-Rivero^{*}
Álvaro Aguilar-Setién^{**}
Alejandro Villa-Godoy^{***}
Héctor Serrano[†]

Recibido para su publicación el 6 de febrero de 2004 y aceptado el 10 de agosto de 2004

^{*} Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F. Correo electrónico: jjperez1999@yahoo.com y perivet@terra.com.mx

^{**} Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Pediatría tercer piso Avenida Cuauhtemoc 330, 06720 México D.F.

^{***} Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F.

[†] Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Avenida Michoacán y Purísima S.N., México D.F. 09340 México D.F. Teléfono: 58084733 fax: 58044727. Correo electrónico hser@xanum.uam.mx

1.7 Hipótesis

Si el coumestrol puede causar alteraciones reproductivas en diferentes mamíferos por su capacidad de unirse a los receptores estrogénicos, entonces esta capacidad puede ser utilizada para el control reproductivo del *D. rotundus*.

1.8 Objetivos

1.8.1 Determinar la presencia de ER en testículo de *D. Rotundus* por microscopia de fluorescencia y coumestrol.

1.8.2 Producir alteraciones macro y microscópicas en testículos y ovarios con coumestrol administrado por vía oral que sean compatibles con alteraciones reproductivas en *D.rotundus*.

2.0 MATERIALES Y METODOS

Con el fin de lograr los objetivos propuestos se efectuaron dos experimentos, antes fue necesario capturar vampiros silvestres.

2.1 Captura y acondicionamiento de los *D.rotundus*

Previa consulta del calendario lunar para determinar el día en que la luna fuera visible 2 o 3 horas después del ocultamiento del sol, lo que produce las mismas horas de total oscuridad en la noche, se asistió al rancho “el Capulín” localizado a 1 km al sur del poblado de Landa, en la sierra gorda del Estado de Querétaro, el ganado de este sufre de mordidas recurrentes de vampiros, por lo que se le pidió al propietario que guardara 2 días antes al ganado en el corral evitando así el libre pastoreo de los animales, lo que “encamina” a los vampiros en su salida a comer hacia el corral.

A las seis de la tarde se colocaron redes de “neblina” de 12 metros de largo y 2.5 metros de alto en los costados norte y este del corral. los cuales eran los que presentaban fácil acceso a los vampiros, se esperó hasta que anocheciera, a las 9 de la noche los vampiros empezaron a caer en las redes.

Se desenredaron los vampiros con cuidado y estos se alojaron en jaulas de cono para posteriormente verificar que se trataba de *D. rotundus* y una vez hecho esto se pasaron a contenedores individuales los cuales se acondicionaron con algodón y agua para mantener hidratados a los vampiros. Se transportaron por vía terrestre hasta las instalaciones del CENID microbiología (INIFAP) en Cuajimalpa D.F. en este sitio los animales se alojaron en una jaula comunitaria de acero inoxidable de 1 metro de largo y alto por 60 centímetros de ancho. La jaula estaba equipada con cama sanitaria, y aquí se mantuvieron por 30 días, periodo que sirvió de cuarentena y adaptación a su nuevo hábitat.

2.2 Manejo general

1. Identificación de los animales: Con collar y cuentas de colores
2. Alimentación: Con 15 mililitros de sangre de bovino desfibrinada por animal, la cual contenía 1.0 ml de DMSO que se utilizó como vehículo para preparar el coumestrol.
3. Higiene de instalaciones: Lavado con agua y jabón de jaulas y comederos diariamente, cambio de la cama de aserrín cada 5 días.
4. Medio ambiente: temperatura de 26°C, 60% de humedad , 20 horas de oscuridad y 4 de luz.

2.3 Experimento 1.- Detección de la presencia de receptores estrogénicos β en testículos de *D. rotundus*

Se obtuvieron quirúrgicamente los testículos de dos individuos adultos de *D. rotundus*, los testículos fueron seccionados en trozos de 1 mm³, los fragmentos de tejido fueron distribuidos aleatoriamente en cada uno de los 8 tratamientos de distintas concentraciones de coumestrol diluido en dimetil sulfoxido (DMSO)

El grupo experimental se trató por inmersión del tejido en 7 concentraciones diferentes de coumestrol preparado en DMSO las cuales fueron 1000, 250, 83.3, 27.7, 9.25, 3.08, 1.028 μg / ml y cero como control negativo (0.5 ml DMSO).

El tejido se incubó a 37°C en cámara húmeda, protegida contra la luz durante 30 minutos.

Para la observación al microscopio de fluorescencia, las muestras de tejido se procesaron por la técnica de “squash” convencional, sin agregar fijador. Se utilizó azul de metileno al 0.001% p/v como colorante de contraste. Las observaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio Univar a 100 diámetros.

2.4 Experimento 2.- Determinación de la acción del coumestrol para producir alteraciones reproductivas en testículos, útero y ovarios de *D.rotundus*.

Se utilizaron 20 *D.rotundus* jóvenes (11) y adultos (9), de ambos sexos los cuales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos.

El primer grupo estuvo conformado por cinco hembras como testigo (3 adultas y 2 jóvenes) y un segundo grupo denominado tratamiento con 6 animales (2 adultos y 4 jóvenes).

El grupo de machos también se dividió en dos, el primero se le denominó testigo el cual contenía 5 vampiros (2 adultos y 3 jóvenes) y otro denominado tratamiento con 4 animales (2 adultos y 2 jóvenes), los animales de cada grupo fueron alojados en jaulas individuales debidamente marcadas, recibiendo todos el mismo manejo general bajo las mismas condiciones ambientales.

A los grupos testigo se les dio el manejo general.

Los grupos experimentales recibieron el mismo manejo que los grupos testigo siendo sustituido el DMSO por 200µg de coumestrol en 1.0ml de DMSO al alimento que se les proporciono, por 30 días.

Se sacrificaron todos los animales de cada grupo el día 30 experimental con la administración de clorhidrato de ketamina (20mg/kg) intra pleural y posteriormente los animales fueron exanguinados con una jeringa con aguja hipodérmica de calibre 25, se diseccionaron los órganos reproductivos (útero, ovarios, testículos) los órganos fueron pesados y posteriormente fijados en formalina buferada (útero y ovarios) y los testículos en liquido de Bouin.

Las muestras fueron incluidas en parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 4 a 5 micras de grosor los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina por el departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Para el análisis estadístico se realizó en la variable de peso una ANOVA por mínimos cuadrados mediante el procedimiento GLM (General Linear Model) de SAS, como prueba de hipótesis se utilizó la prueba de Duncan.

3.0 RESULTADOS

3.1 Experimento 1.- Presencia de receptores estrogénicos

La detección de ER β se obtuvo con concentraciones tan bajas como 1.028 μg (Figura 3.1.1); de hecho, se observó el 100% de fluorescencia con la concentración de 27.7 μg de coumestrol (Figura 3.1.2 A). La mejor definición de los ER β , y con ello de las estructuras anatómicas del testículo, se logró utilizando una concentración equivalente a 25.75 mM de coumestrol (1.028 μg) como se muestra en la figura 3.1.2 B. En todas las zonas testiculares analizadas con esta concentración, fue posible detectar la presencia de ER β en forma congruente con la disposición de los túbulos seminíferos, dejando libre de señal fluorescente las zonas carentes de tejido testicular. Estas observaciones se facilitaron por el contraste brindado por el azul de metileno (Figura 3.1.2 C). En las preparaciones testiculares del testigo, no se observó señal fluorescente alguna (Figura 3.1.2 D).

3.2 Hembras

Las diferencias entre pesos de útero y ovarios así como las interacciones entre el grupo testigo y el de tratamiento así como las de edad se muestran en el cuadro 3.2.1 y 3.2.2, la presencia de útero edematoso en los animales en tratamiento se observa en la figura 3.2.3 A,B.

Histológicamente los ovarios de las hembras del grupo de tratamiento se observan quistes foliculares, folículos atrésicos, y pérdida de la arquitectura folicular (figura 3.2.4 B,C), en comparación con los ovarios de los animales del grupo testigo en los que se detecta presencia de cuerpo lúteo y folículos en diferentes etapas de maduración. (figura 3.2.4 D)

3.3 Machos

Los resultados de los pesos de los testículos y las interacciones entre los machos del grupo testigo y los del grupo tratamiento y las de edad se muestran en las tablas 3.3.1 y 3.3.2

La histología evidenció en los machos tratados que el coumestrol altera la arquitectura de los túbulos seminíferos, como se muestra en la figura 3.3.3A, en donde se compara con los túbulos seminíferos de los machos control negativo, apreciándose en estos la correcta arquitectura testicular indicada por la presencia de luz en dichos tubulos, células germinales y células de Sertoli e intersticiales de Leydig (figura 3.3.3B)

3.4 Análisis Estadístico

Se realizo en la variable de peso una ANOVA por mínimos cuadrados mediante el procedimiento GLM (General Linear Model) de SAS (58), como prueba de hipótesis se utilizo la prueba de Duncan no encontrando diferencias a una $p < 0.05$

4.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La primera etapa en el desarrollo de un tratamiento específico con hormonas, sus análogos o inhibidores, está asociada a la presencia de los receptores con los cuales puedan interactuar. Una manera de realizar este tipo de estudios es mediante la competencia que habría entre el ligando natural y un anticuerpo marcado que reconociera una región del receptor que no afecte su afinidad por el ligando, o bien, utilizar un ligando marcado cuya afinidad sea conocida. Por su estructura molecular, el coumestrol es capaz de emitir una señal fluorescente cuando es excitado con luz ultravioleta. Esta señal se hace mayor si el coumestrol se encuentra unido a los receptores α y β estrogénicos, propiedades de fluorescencia las cuales fueron descritas anteriormente que lo ubican como un compuesto único para investigar las interacciones entre los ligandos y los ER α y β (44). Basados en esto, en el presente estudio se hizo posible la detección de ER β en el testículo del *D.rotundus*, de manera similar a lo documentado por Miksicek (1993) en cultivos celulares HeLa y por Van Der Oord (59) en células testiculares. La detección específica de los receptores estrogénicos utilizando el coumestrol, nos permitió explorar la hipótesis acerca de la capacidad demostrada del coumestrol de producir alteraciones reproductivas en diferentes mamíferos pudiera también ser aplicable a este quiróptero.

En los ovarios del *D. rotundus* bajo tratamiento, se observó pérdida de la arquitectura folicular como lo son folículos atrésicos y quistes foliculares así como ausencia de cuerpos lúteos. Todas estas patologías son compatibles con la baja tasa de ovulación reportada por Adams (48) por la acción del coumestrol en borregas y al síndrome estrogénico en vacas lecheras, reportado por Romero (49) con el mismo agente. Estas alteraciones también se han reportado en ratas bajo tratamiento con coumestrol.

La presencia de útero edematoso en los animales bajo tratamiento hace evidente que el coumestrol tiene un efecto estrogénico en este órgano, mismo que también ha sido reportado en roedores por Galey (47) y Medlock (42), en vacas Lecheras por Romero (49) y en humanos por Kuiper (51) y Roselli (50).

En machos las alteraciones en la arquitectura testicular son compatibles con el efecto antiestrogénico descrito por Kuiper (51) donde los fitoestrogenos inhiben la unión de los estrógenos y de la testosterona a su receptor reduciendo así su efecto biológico.

En una comunicación preliminar, nuestro grupo ha mostrado evidencias de que también el *D. Rotundus* es susceptible a la acción de los fitoestrogenos en particular al coumestrol (Pérez-Rivero et al, enviado). Este hecho posibilita el uso del coumestrol en el control reproductivo de dicho quiróptero, con la gran ventaja ecológica de que este fitoestrogeno de origen natural no contaminaría el medio ambiente.

Establecer programas de control reproductivo donde existen poblaciones importantes de vampiros que todavía no han sido infectadas con rabia puede ser una alternativa que permitiría el mantenimiento del nicho ecológico ocupado y protegido contra la migración de otras colonias de vampiros potencialmente rabiosas teniendo en cuenta que la rapidez con que se ocupan los nichos vacíos es variable y depende del tamaño del área, la especie involucrada y la facilidad de alimento.

En un problema en el cual existen una gran cantidad de variables, como ocurre con la transmisión de la RPB, es difícil pensar que utilizar una sola estrategia como el control reproductivo o cualquier otra, no será suficiente. Sin duda, el complementarlo con otros programas como el de vacunación antirrábica (60,61) aplicada a las mismas poblaciones sometidas a control reproductivo, contribuiría a formar corredores sanitarios contra RPB, los que pueden contribuir a detener la propagación territorial de esta letal enfermedad disminuyendo al mismo tiempo las pérdidas económicas que ocasiona.

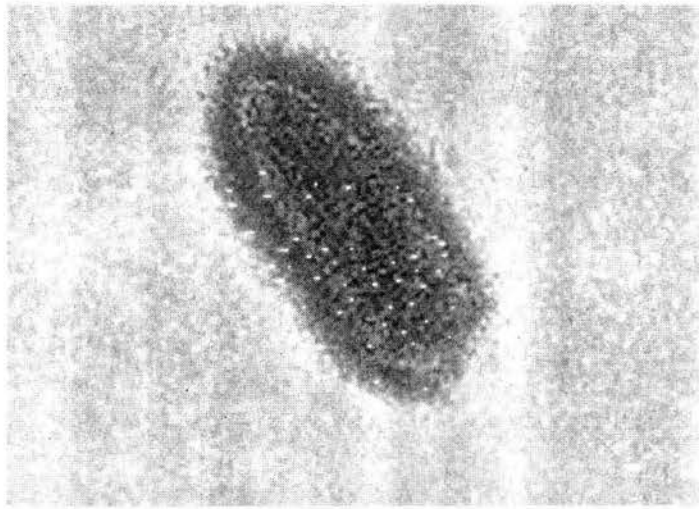


Figura 1.1.1 Virus de la Rabia: orden *Mononegavirales*, género *Lyssaviridae*, familia *Rhabdoviridae*. (X), tomada de



Figura 1.2.1 Fotografía del murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*).



Figura 1.4.1. El área sombreada indica los estados y regiones en fase de control de Rabia Parálítica Bovina, nótese la porción marcada (flecha) en donde existen poblaciones importantes de vampiros en las cuales no se ha informado de casos de Rabia Parálítica Bovina. (2004)

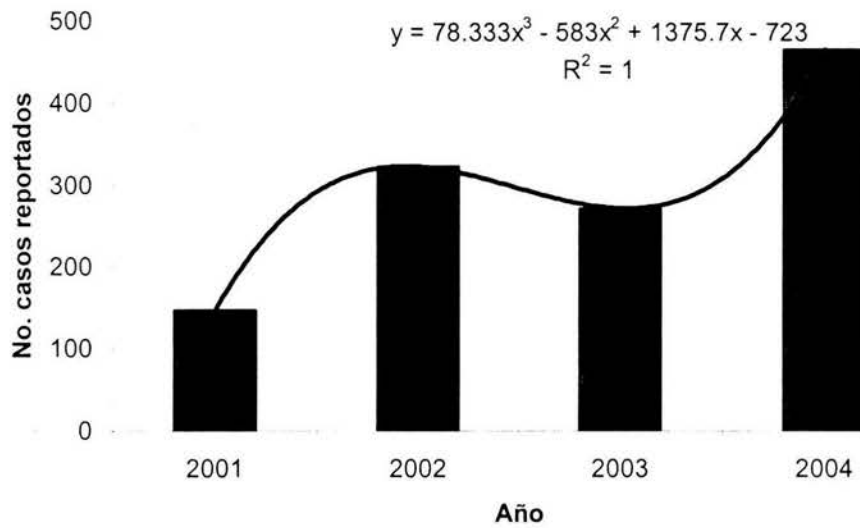


Figura 1.4.2. Focos de Rabia Paralítica Bovina 2001-2004 en donde se muestran en el tiempo diferentes medidas, en 2001 al estimado de 2004. (25-33)

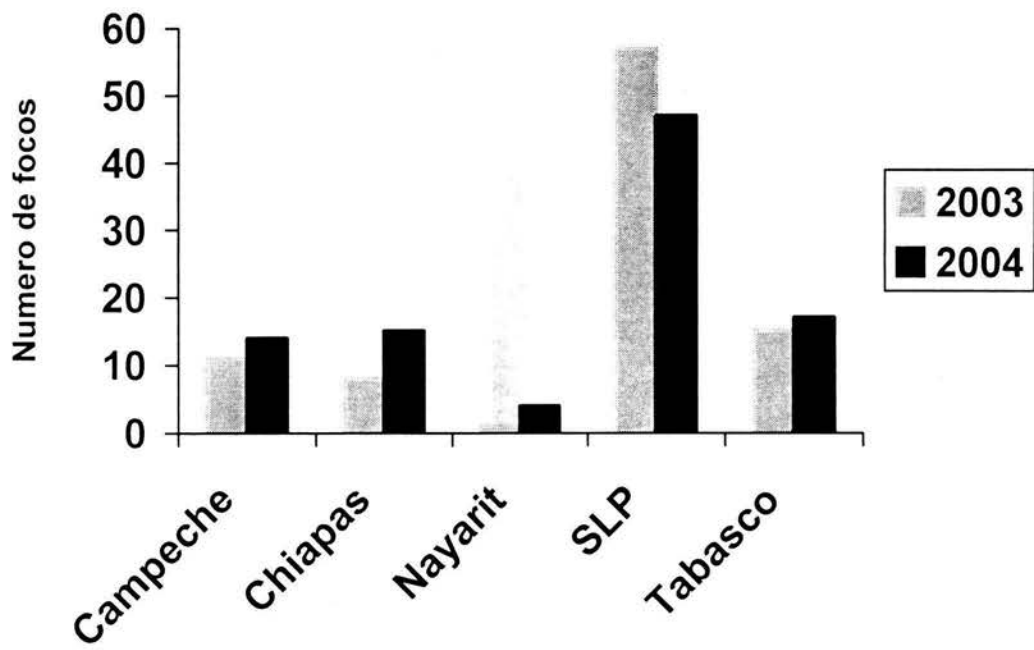


Figura 1.4.3. Estados de la Republica Mexicana en donde se presentan aumentos en el numero de focos durante 2004 en comparación con 2003 (29-33).

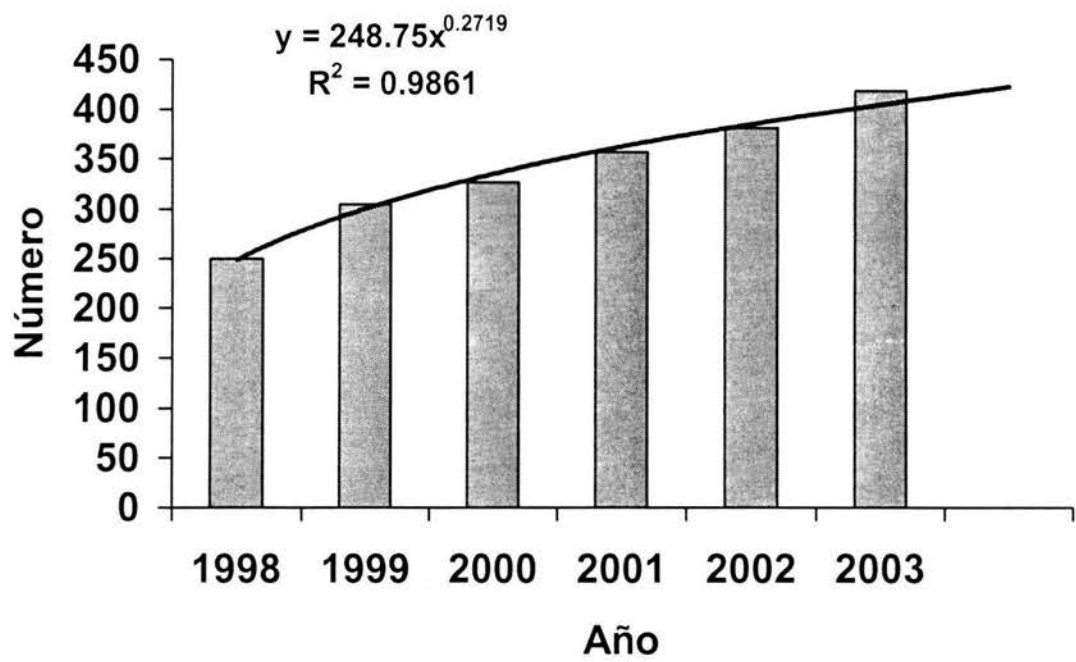


Figura 1.4.4. Numero de municipios con antecedentes de Rabia Parálitica Bovina en México

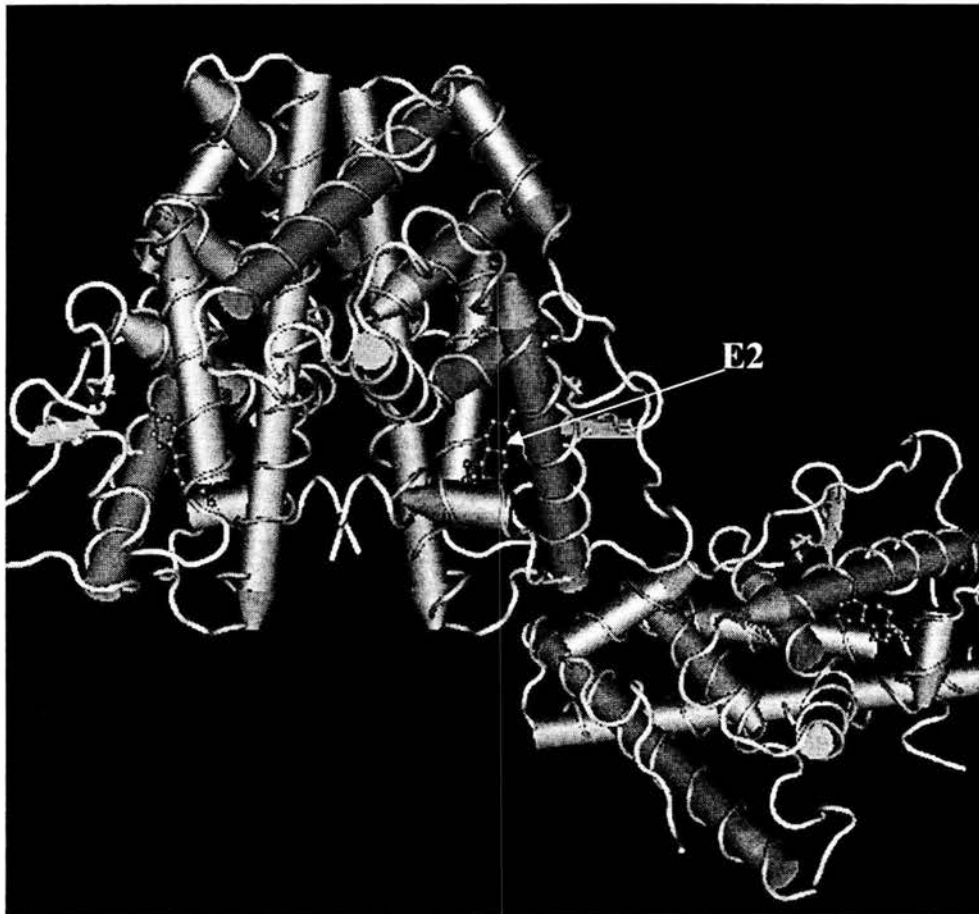


Figura 1.6.1 Fotografía tridimensional de un receptor estrogénico unido a una molécula de estradiol. fuente <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=structure>

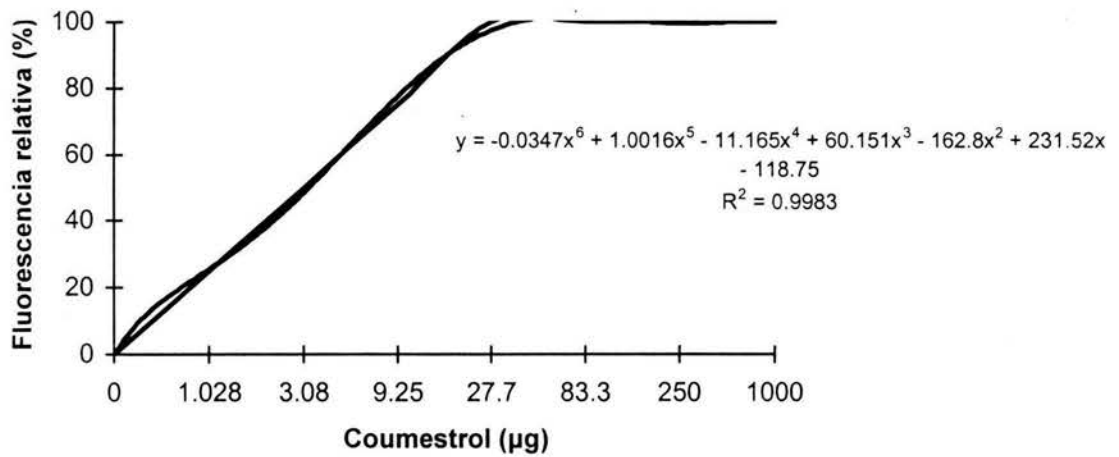


Figura 3.1.1 Fluorescencia relativa de coumestrol en testículo de *Desmodus rotundus*. Preparaciones tratadas con coumestrol a diferentes concentraciones la evaluación se efectuó con un microscopio de fluorescencia. La fluorescencia relativa se determinó arbitrariamente tomando como base las imágenes del control negativo y la muestra de mayor contenido de fitoestrogeno como 0 y 100%, respectivamente.

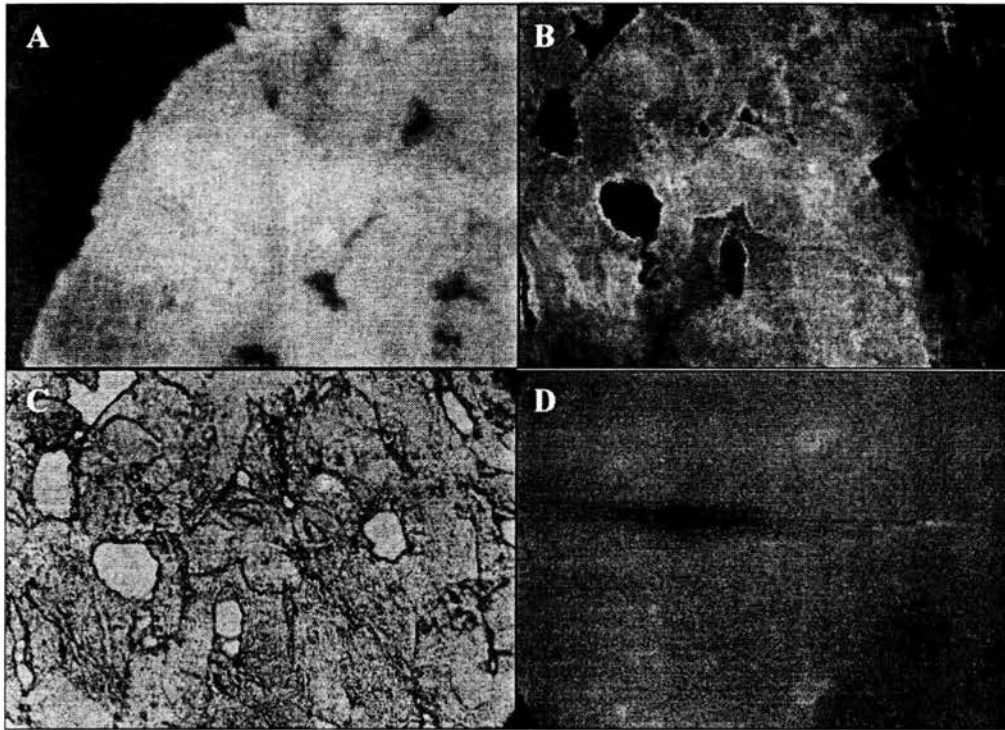


Figura 3.1.2 Detección de los receptores estrogénicos β en testículo de *D. Rotundus*, (A) control positivo, (B) detección de los ER β , (C) contraste con azul de metileno, (D) control negativo.

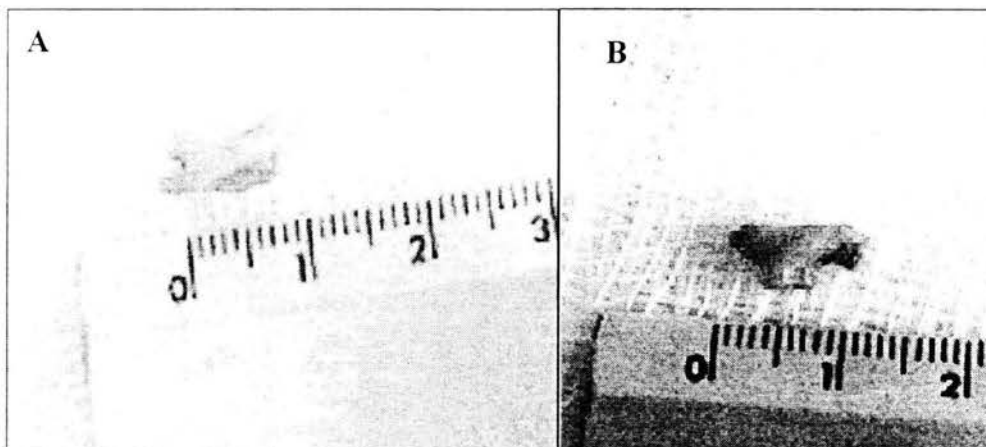


Figura 3.2.3 Comparación del útero de *Desmodium rotundus*. Control (A), contrastado con útero edematizado de hembra tratada (B)

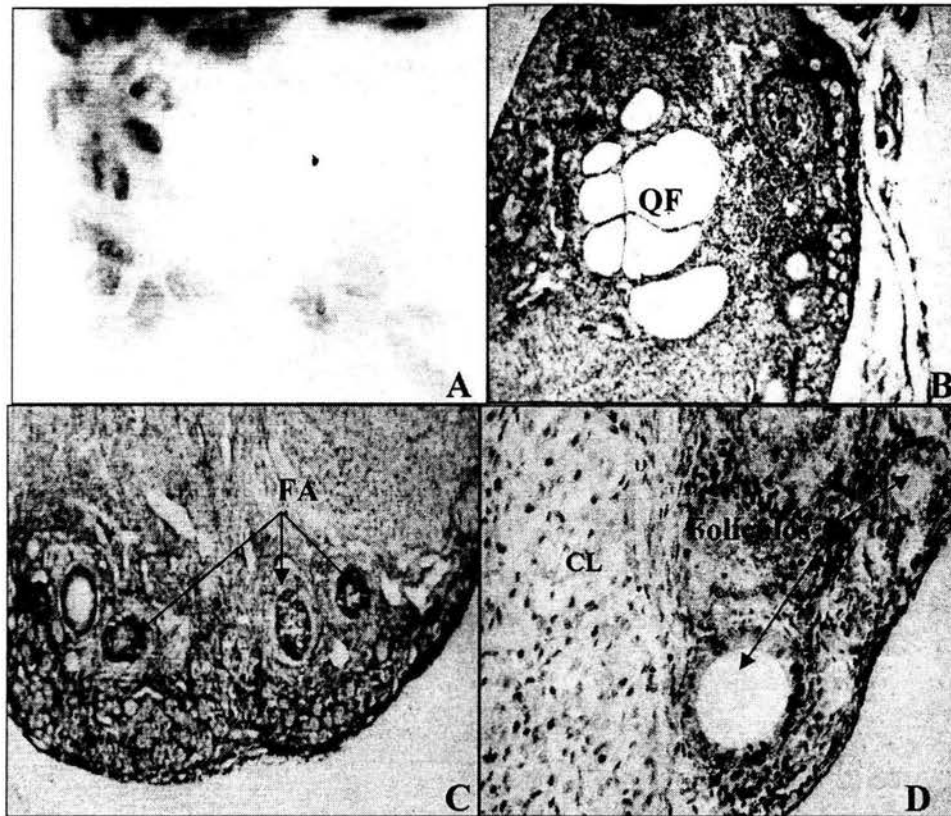


Figura 3.2.4 Comparación Citológica e Histológica en hembras. Frotis vaginal de hembra en tratamiento en el que se observan células superficiales (A), imagen histológica en las que se observa quistes foliculares (B) y folículos atrésicos (C), nótese la presencia de cuerpo lúteo, así como folículos en diferentes etapas de maduración en las hembras testigo (D).

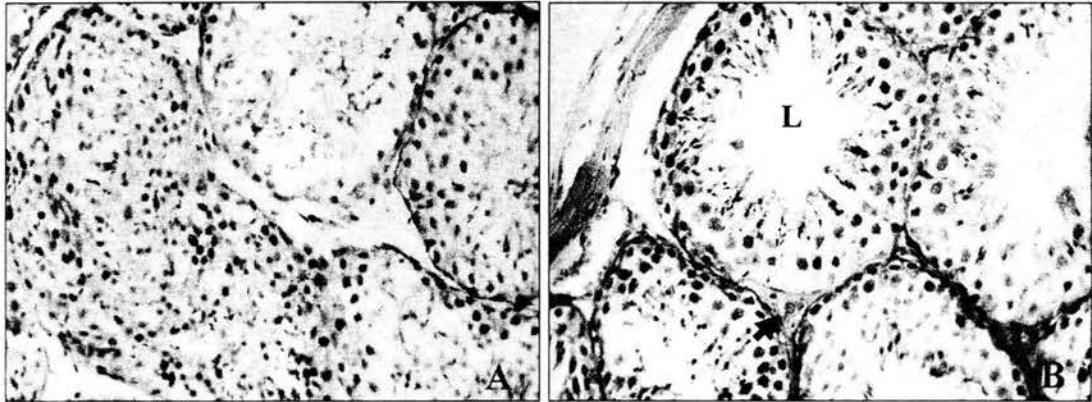


Figura 3.3.4 Imagen histológica de testículo en tratamiento (A) comparado con testículo de vampiro control negativo (B) Nótese la pérdida de la arquitectura histológica en los testículos de los machos del grupo tratamiento evidenciada por la falta de lumen en los tubulos seminíferos y la ausencia de células de Leydig, comparada con la de los machos del grupo testigo en donde se aprecia la presencia de lumen (L) y células de Leydig (cabeza de flecha).

Cuadro 3.2.1 Medias de los pesos de ovarios de *D.rotundus* hembras tratados con 200µg de coumestrol por vía oral durante 30 días y testigos y grupos de edad.

<i>Tratamiento</i>	Media de los pesos de ovarios (mg)	Error estándar
Testigo (n=5)	3.66	±0.39
Tratado (n=6)	4.4	±0.31
<i>Edad</i>		
Adulto (n=5)	4.16	±0.33
Joven (n=6)	3.9	±0.31

Cuadro 3.2.2 Interacciones entre los diferentes niveles de tratamiento de las hembras

Interacción	Peso medio de los ovarios (mg)	Error estándar
Adultos-testigos (n=3)	3.35	±0.41
Adultos-tratamiento (n=2)	4.97	±0.51
Jóvenes-testigos (n=2)	3.97	±0.51
Jóvenes-tratamiento (n=4)	3.82	±0.36

Cuadro 3.3.1 Medias de los pesos de testículos de *D.rotundus* machos tratados con 200µg de coumestrol por vía oral durante 30 días y testigos y grupos de edad.

<i>Tratamiento</i>	Media de los pesos de testículos (mg)	Error estándar
Testigo (n=5)	42.56	±3.56
Tratado (n=4)	45.75	±3.90
<i>Edad</i>		
Adulto (n=4)	49.61	±3.90
Joven (n=5)	38.70	±3.56

Cuadro 3.3.2 Interacciones entre los diferentes niveles de tratamiento de los machos

Interacción	Peso medio de los ovarios (mg)	Error estándar
Adultos-testigos (n=2)	49.25	±5.51
Adultos-tratamiento (n=2)	49.97	±5.51
Jóvenes-testigos (n=3)	35.86	±4.50
Jóvenes-tratamiento (n=2)	41.52	±5.51

Referencias

1. McColl KA, Tordo N, Aguilar Setién A. Bat Lyssavirus infections. OIE Scientific and technical Review. 2000;19(1):177-196
2. Aguilar-Setién. A, Loza.R.E. El Árbol Genealógico de la Rabia en México. Ciencia y Desarrollo. 1999 ; 146: 17-23
3. World Health Organization. Guidelines for dog rabies control. Geneva;1994: 1-5
4. Loza-Rubio. E, Aguilar-Setién JA, Bahlou C, Brochier E, Pastoret PP, Tordo N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. Arch Med Res. 1999 ; 30 (2) : 144-149
5. Ramírez-Pulido J A, Castro-Campillo J, Arroyo-Cabrales J, Cervantes FA. Lista Taxonómica de los mamíferos terrestres de México. Occasional Papers of the Museum Texas Tech University 1996 ;158:1-62
6. Bhatnagar KP. Anatomy. In :Greenhall AM, Schmidt U. editors.: Natural History of Vampire Bats : CRC press Florida USA, 1988: 41-69
7. Villa R B. El Acto de tomar la sangre en los murciélagos hematófagos (familia Desmodontidae). Tomo XXVIII, Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México 1957.
8. Linhart SB, Flores CR, Mitchell GC. Control de murciélagos vampiros por medio de un anticoagulante. En Combate químico de los murciélagos vampiros. Mitchell GC , Burns RJ. editors Centro regional de ayuda técnica. Agencia para el desarrollo internacional México/Buenos Aires 1974 :21-28
9. Wilkinson GS. Social Organization and behavior. In: Greenhall AM, Schmidt U. editors.: Natural History of Vampire Bats : CRC press Florida USA, 1988: 86-95
10. Greenhall A.M., Joermann G, Schmidt V. *Desmodus rotundus* . Mammalian Species. 1983; 202: 1-6
11. Schmidt C. Reproduction. In: Greenhall AM, Schmidt U. editors: Natural History of Vampire Bats : CRC press Florida USA, 1988 : 100-107
12. Linhart S. The biology and control of vampire bats. En : Baer GM, editor. The natural history of rabies. Vol II New York : Academy Press; 1975 : 221-239.

13. Flores CR, Fernandez SS, Burns RJ, Mitchell GC. Observaciones sobre el comportamiento del vampiro común (*Desmodus rotundus*) al alimentarse en condiciones naturales. *Técnica Pecuaria en México*. 1971; 27 :39-45
14. Acha PN, Málaga AA. Economic losses due to *Desmodus rotundus* . In: Greenhall AM, Schmidt U. editors: *Natural History of Vampire Bats* : CRC press Florida USA, 1988: 207-214
15. DeNault LK, McFarlane. Reciprocal altruism between male vampire bats, *Desmodus rotundus*. *Anim Behav*. 1995;49:855-856
16. Ratcliffe JM, Fenton MB, Calef BG. An exception to the rule: common vampire bats do not learn taste aversions. *Anim Behav* 2003;65:385-389
17. Nelson B, Kverno, Mitchell GC. Vampire bats and their effect on cattle production in Latin America. *World Animal Review* 1976;17:1-7
18. Mitchell GC, Burns RJ, Flores CR, Fernandez SS. El control del Murciélago vampiro 1934-1971. En *Combate químico de los murciélagos vampiros*. Mitchell GC , Burns RJ. editores Centro regional de ayuda técnica. Agencia para el desarrollo internacional México/Buenos Aires 1974 :31-34
19. Villa R. The ecology and biology of vampire bats and their relationship to paralytic rabies report to the Government of Brazil. UNPD/FAO Report No TA 2656 . 1969: 1-16
20. Aguilar-Setién A, Labrandero E, De Paz O ,Alvarado IA, Ferreira D, Brochier B, Pastoret PP. Controle des populations de vampires (*Desmodus rotundus*) au Mexique: captures de chiropteres non cibles. *Cahiers d' Ethologie*, 1996,16(3): 273-284
21. Flores CR, Morales RJ. Métodos para combatir los vampiros. *Técnica Pecuaria en México* 1975; 29: 73-80
22. Agency for International Development. *Agriculture Technology for Developing Countries Technical series bulletin No 9. Controlling Vampire Bats*. Agency for International Development August 1973 :1-6
23. Flores CR, Burns RJ, Fernández SS. Evaluación de una técnica para combatir a los vampiros en sus refugios. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 1974 Vol. LXXVI :5 : 427-432

24. Thompson RD, Mitchell GC, Burns RJ. Combate de los vampiros mediante el tratamiento sistémico del ganado con un anticoagulante. *Science* 1972;177:806-808
25. Flores C.R. El mundo de los vampiros, crónica de una investigación. Ed INIFAP, SARH, PAIPEME México 1992
26. Organización Panamericana de la Salud. Boletín de Vigilancia Epidemiológica de Rabia en las Américas. Organización Panamericana de la Salud.2001;33:23-41
27. Organización Internacional de Salud Animal. Situación Zoonositaria de México respecto a las enfermedades de la lista A, B y C de la OIE Cuestionario FAO/OIE/OMS-2002. Disponible en el URL:
<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc537>
28. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Informe semanal sobre enfermedades de reporte obligatorio inmediato. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en el URL:
<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc540/>
29. Organización Internacional de Salud Animal. Sanidad Animal Mundial en 2003,México, OIE Hadistatus II. Disponible en el URL :
http://www.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=120&c_mald=26#
30. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Situación de cuadros y mapas por enfermedades y estados. Rabia Parálitica Bovina. Disponible en el URL:
http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc937/RPB_04_MAPA.pdf
31. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Situación de cuadros y mapas por enfermedades y estados. Rabia Parálitica Bovina. Disponible en el URL:
http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc1014/RPB_04_MAPA.pdf
32. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Situación de cuadros y mapas por enfermedades y estados. Rabia Parálitica Bovina. Disponible en el URL:
http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc1046/rpb_1junio2004.pdf

33. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Situación de cuadros y mapas por enfermedades y estados. Rabia Paralítica Bovina. Disponible en el URL:
http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc1130/RPB_050704_MAPA.pdf
34. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Informe semanal sobre enfermedades de reporte obligatorio. Sistema Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en el URL:
<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc1299/SEM36.pdf>
35. Secretaria de Salud. Boletín de Epidemiología semana 33 de 2004. Disponible en el URL:
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2004/sem33/pdf/cua1y2.pdf>
36. Zhang Z. Mathematical models of wildlife management by contraception. *Ecological modeling*. 2000;132:105-113
37. Bomford M, O'Brien P. Potential use of contraceptives for managing wildlife pests in Australia. In Kreeger TJ editor. *Contraception in Wildlife Management*. USDA/APHIS 1997; Technical Bulletin No 1853: 205-214
38. Ericsson RJ. Male antifertility compounds: U-5897 as a rat chemosterilant. *J. Reprod. Fertil* 1970;22:213-222
39. Curnow, RD. What are research needs and skills of the future. In : *Proceedings of the Ninth Wildlife Damage Management Conference (Oct 5-8, 2000, State College, PA) Pennsylvania State University, University Park PA. 2001.* MC Brittingham, J Kays and R Mcpeake, editors. Disponible en el URL:
<http://www.aphis.usda.gov/ws/nwrc/is/01pubs/01-8.pdf>
40. Miller LA. and Fagerstone KA. Induced infertility as a wildlife management tool. *Proceedings Vertebrate Pest Conference*. 2000 March; 19:160-168. Disponible en el URL: <http://www.aphis.usda.gov/ws/nwrc/is/00pubs/00-46.PDF>
41. Burroughs, CD. Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally with coumestrol. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 Jan; 208(1):78-81
42. Medlock, KL, Branham WS and Sheehan DM. Effects of coumestrol and equol on the developing reproductive tract of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 Jan; 208(1):67-71.
43. Branham WS *et al.* Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *J. Nutr.* 2002 ; 132:658-664

44. Miksicek RJ. In situ localization of the estrogen receptor in living cells with the fluorescent phytoestrogen coumestrol. *J.Histochem Cytochem* 1993 ;41 (6): 801-810
45. Whiten PL, Lewis C, Russell E and Naftolin F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. *Proc Soc Exp Biol Med.*1995 Jan;208(1): 82-86
46. Whiten PL, Russell E and Naftolin F. Influence of phytoestrogen diets on estradiol action in the rat uterus. *Steroids.* 1994; 59: 443-449
47. Galey FD, Mendez LE, Whitehead WE, Holstege DM, Plumlee KH, Johnson B. Estrogenic activity in forages: diagnostic use of the classical mouse uterine bioassay. *J Vet Diagn Invest* 1993 Oct; 5 (4):603-8
48. Adams NR. Detection of the effects of Phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 1994; 73:1509-1514
49. Romero CM, Castellanos MT, Mendoza RM, Reyes RA, Garcia AR. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Vet Mex.* 28(1) ;1997:25-30
50. Roselli M, Reinhart K, Imthurn B, Keller PJ and Dubey RK. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Human Reproduction Update.* 2000; 6 (4):332-350
51. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Sagg PT. Interaccion of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 1998. Oct; 139: 4252-4263
52. de Boer T, Oijtens D, Muntendam A, Meulman E, van Oostijen M, Ensing K. Development and validation of fluorescent receptor assays based on the human recombinant estrogen receptor subtypes alpha and beta. *J Pharm Biomed Anal* .2004 ;34: 671-679
53. Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson J. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 2003 ; 546:17-24
54. Mosselman J, Polman R. Dijkema, ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* 1996;392: 49-53

55. Montano MM, Müller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxyterminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 1995;9(7):814-825
56. Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*. 2002; 416:499-506
57. Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for estrogen receptors α and β in reproductive tissues. *Reproduction* 2003 ; 125 : 143-149
58. Statistical Analysis System. SAS. User's guide: Statistics Cary (NC): SAS Institute. 1985
59. Van Der Oord CJR, Jones GR, Shaw DA, Munro IH, Levine YK, Gerritsen HC. High-Resolution confocal microscopy using cynchrotron radiation. *J. Microsc* 1995;182:217-224.
60. Aguilar-Setién A, Brochier B, Tordo N, De Paz O, Desmetre P, Peharpre D, Pastoret PP. Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine* 1998; 16 (11/12):1122-1126
61. Aguilar-Setién A, León-Campos Y, Tesoro Cruz E, Kretschmer R, Brochier B, Pastoret PP. Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies virus. *Journal of wildlife diseases* 2002;38(3):530-544

Abstract

Functions exerted by estrogens in animal reproduction are tuned delicately by various mechanisms. Among them, specific receptors for estrogens are paramount. Recently developed techniques for biochemical and genetic molecular studies allowed to the discovery of the modular structure of the nuclear receptors. A notorious group of this type of receptors is the estrogen-receptors family (ER). Each module has a unique structural composition that allows its interaction with a variety of molecules. As a result of this interaction between the receptor and the molecules, several effects are evoked, some of them are inhibitory while others are stimulatory of the transcription rate. Indeed some of the reactions resulting from a synthetic ligand-receptor interaction are as unexpected as the conformational change of the ER tridimensional structure, allowing the ER itself to exert functions that are undecribed in te classical review articles in this topic. In the present review, we established a connection among structure, function and regulatory mechanisms of the nuclear receptors, emphazaising the ER, to make these knowledge available to a broad spectrum of readers.

Key words: NUCLEAR RECEPTOR, ESTROGEN RECEPTOR, LBD, DBD.

Resumen

La exquisita regulación de la función ejercida por los estrógenos en diversos aspectos de la reproducción animal, se debe básicamente a los receptores con los que interactúan en los órganos blanco. El uso de técnicas moleculares bioquímicas y de genética ha permitido dilucidar la estructura modular de los receptores nucleares, entre los que se encuentran los estrogénicos. Cada módulo del receptor tiene características estructurales particulares que le permiten interactuar con una diversidad de moléculas. Como resultado de la interacción entre el receptor y diversas moléculas, desencadena efectos tan diferentes como una inhibición de la acción hormonal, hiperactivación de la misma, reflejada en el aumento en la tasa de transcripción de genes específicos o, incluso, reacciones inesperadas resultantes de la interacción con compuestos sintéticos que presentan una estructura tridimensional reconocible por el receptor. Con esta interacción se puede alterar la propia estructura tridimensional del receptor, permitiéndole ejercer funciones no descritas en los artículos recapitulativos clásicos. En esta revisión hemos establecido una correlación entre la estructura, función y regulación de los receptores nucleares y, en especial, los estrogénicos, para ofrecer de manera accesible estos aspectos .

Palabras clave: RECEPTOR NUCLEAR, RECEPTOR DE ESTRÓGENOS, LBD, DBD.

Introducción

Durante la última década varios grupos de investigadores han descrito una pléyade de conocimientos relacionados con las estructuras proteínicas que funcionan como receptores específicos de las hormonas esteroidales. La mayoría de estos avances han sido publicados en inglés. Si bien han aparecido algunos artículos recapitulativos sobre el tema, en ninguno se engloban los complejos mecanismos que explican el funcionamiento de los citados receptores. En este contexto, es necesario integrar la información generada y plasmarla de tal manera que facilite su estudio a los lectores. En la presente revisión se cree pertinente hacer una síntesis de los aspectos más relevantes de la relación entre la estructura y las funciones de los receptores nucleares, enfatizando lo referente a receptores estrogénicos.

El primer paso en la acción de una hormona es la interacción con una proteína de unión específica. Ésta puede estar situada en la membrana o en el interior de las células que componen los tejidos donde una hormona ejerce su efecto fisiológico. En las células blanco, la interacción que se lleva a cabo entre la hormona y el receptor es una acción dinámica de unión y separación continuas, que depende de las constantes de asociación y disociación entre ambas entidades.

Debido a que las concentraciones de hormonas en los fluidos corporales se encuentran en concentraciones relativamente bajas (del orden de los picogramos o nanogramos), el receptor debe tener gran afinidad para su hormona o varios sitios de unión que actúen sinérgicamente entre sí, puesto que el número de receptores es finito; por tanto, su población en una célula y tejido blanco es saturable.

De acuerdo con sus propiedades de solubilidad, se tienen dos grandes grupos de hormonas: las hidrosolubles, tales como la insulina, la hormona folículo estimulante, los factores de crecimiento y los factores inductores de diferenciación, entre muchas otras que tienen en común su naturaleza proteínica; si bien algunas no están constituidas exclusivamente por aminoácidos sino que están combinadas con carbohidratos (hormonas folículo estimulante, luteinizante y estimulante de la tiroides). El segundo grupo que está integrado por moléculas liposolubles, con excepción de algunas hormonas constituidas por

aminoácidos modificados (hormonas tiroideas), tiene la estructura básica del ciclopentano-perhidro-fenantreno característico del colesterol. Ejemplos de estas últimas son progesterona, estradiol, la testosterona y glucocorticoides.

Las hormonas liposolubles tienen acceso directo al interior de la célula, atravesando la membrana plasmática hasta alcanzar al núcleo celular. Los receptores estrogénicos son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, integrada por varias familias, que han sido nombradas de acuerdo con los tipos de hormonas a las que se unen de manera selectiva. Estas subfamilias son los receptores para andrógenos (AR), estrógenos (ER), progestágenos (PR), glucocorticoides (GR), hormonas tiroideas (TR), de ácido retinoico (RXR) y receptores huérfanos (OR) (1,2).

La localización de estos receptores dentro de la célula es motivo de controversia; algunos autores apoyan el concepto de que dichos receptores son citoplasmáticos (3), mientras que otros sostienen que se localizan en el núcleo (4). En la presente revisión, se utiliza el término receptores nucleares, ya que, independientemente de su localización, cuando éstos se unen con el ligando específico, la unidad ligando-receptor efectúa su acción fisiológica en el núcleo.

Estructura y acciones de receptores nucleares

La estructura de los receptores nucleares es modular y la mayoría de ellos presentan cuatro o cinco diferentes módulos o estructuras con funciones específicas (Figura 1).

Las evidencias experimentales indican que la región aminoterminal, permite la interacción del ligando con los factores de transcripción que se encuentran en la región A/B (5). Esta interacción es necesaria para la acción del receptor. Estudios de mutagénesis sitio-específica han permitido la detección de secuencias de aminoácidos importantes para la activación del receptor. Se ha establecido que en la mayoría de los receptores nucleares existen dos dominios de activación de la transcripción: El primero, denominado t_1 , es característico de los GR y equivalente al tipo 1 del dominio activador de la transcripción, simbolizado "TAF1", de los ER. Este dominio se encuentra en la región A/B. El segundo dominio, el t_2 o "TAF2", se presenta en la región E de todas las familias de receptores nucleares, incluidos los dos antes mencionados (6).

El funcionamiento de ambos dominios es específico. A diferencia de lo que ocurre con la expresión constitutiva de genes comunes a todo tipo de célula (denominados también coloquialmente como house keeping), la estructura de la región del ADN que tiene secuencias de nucleótidos específicas y que controlan la frecuencia con la que se sintetiza el ARN a partir de la información contenida en el ADN denominada promotor, en los genes controlados por los receptores nucleares se tiene una estructura ligeramente diferente, como se muestra en la Figura 2. En el promotor del gen de la hexocinasa, responsable del catabolismo de los azúcares, se presenta una secuencia TATTAAT, a la que se le denomina CAJA TATA, y que está localizada hacia la izquierda del sitio donde se inicia la síntesis del ARN. Esta señal es suficiente para que se unan a ella los factores generales de la transcripción y, mediante interacciones proteína-proteína, estabilizar la unión de la ARN polimerasa. Por el contrario, en los genes que están regulados por los receptores nucleares, se presentan secuencias específicas denominados “elementos de respuesta”, a los cuales se unen los complejos hormona-receptor para permitir que se transcriban los genes específicos. La secuencia específica que presenta el elemento de respuesta a la hormona (HRE), así como la concentración relativa tanto de receptores como de hormonas, resulta en una estructura tridimensional de mayor o menor capacidad inductora de la transcripción.

La eficiencia de la inducción varía igualmente en la manera en que se lleva a cabo. En cultivos celulares se ha demostrado que la región TAF1 puede actuar uniéndose a un promotor simple, auxiliando en la unión de los factores generales de la transcripción a la caja TATA; la unión de TAF2 requiere de promotores complejos en los que existen, además de HRE y caja TATA, secuencias reconocidas por otras proteínas que en conjunto actúan como un gran complejo multiproteínico reconocido por la ARN polimerasa para iniciar la transcripción (1,2,5).

El número y tipo de secuencias de ADN al que se unen los receptores es también importante. Como ya se mencionó, las secuencias reconocidas por los complejos hormona-receptor son generalmente llamadas HRE. Los cuales específicamente son nombrados remplazando la H en la primera letra por la inicial particular de la hormona en cuestión; por ejemplo, el ERE es la abreviatura común para reconocer al elemento de respuesta al estrógeno, mientras el GRE es el elemento de respuesta a los glucocorticoides. En experimentos in vitro, se ha demostrado que la unión de TAF1 al ADN requiere varias

copias del ERE para que pueda ejercer su actividad óptima. Por el contrario, la unión de TAF2 actúa con un número reducido de ERE (6).

Otras dos funciones frecuentemente atribuidas a la región A/B son el sinergismo de receptores y la selectividad de los genes. El sinergismo se presenta cuando se activa la transcripción en varios HRE, siendo éste mayor que la suma del efecto de HRE individuales. En los GR, ER y PR, este sinergismo depende de la secuencia y estructura que se presente en la región t_1 / TAF1. Con las diferentes regiones TAF1 y TAF2, es posible activar distintas secuencias de genes, ya que son capaces de unirse de manera diferencial a secuencias similares y no exclusiva y específicamente a una determinada.

En la región C se encuentra el dominio de unión del ADN (DNA Binding Domain o DBD) que se encuentra conservado estructuralmente en los receptores nucleares. El DBD está formado por dos sitios de unión de zinc que establecen enlaces covalentes coordinados con dos pares de cisteína, separados por diez a 15 aminoácidos. A esta estructura se le ha denominado “dedos de zinc”; está constituida por dos porciones α helicoidales, una al inicio de cada dedo y que se extiende más allá de ellos. La porción cercana a la región aminoterminal interactúa con el surco mayor helicoidal para unirse con la secuencia específica del ADN; mientras que el extremo cercano a la terminación carboxilo se continúa con la porción globular de la proteína (7).

Se han encontrado diversas variaciones estructurales que permiten una interacción específica. Por ejemplo, a nivel de la cisteína 9 del receptor para el ácido retinoico (RXR), existe una secuencia adicional de unión al ADN denominada “caja A”, localizada entre el aminoácido 23 al 29 después del segundo dedo de zinc; es decir, al más próximo a la terminal carboxilo (2). La “caja A” refuerza la unión del ADN al permitir una mayor estabilización estructural del DBD (1). A pesar de estar presente, esta región no es funcional en GR y ER. Sin embargo, es posible que la “caja A” sea necesaria para estabilizar la estructura de estos dos receptores.

Junto con la región E, la región D es un componente del extremo carboxilo terminal, cuya función principal es la de actuar como bisagra, ya que se encuentra localizada entre el dominio de unión al ADN o DBD y el dominio de unión al ligando (LBD).

En la región D se encuentra un segmento de aminoácidos con características ácidas, que es reconocido por proteínas transportadoras (NIF) que le permiten interactuar con los

componentes del complejo de poro, a través del cual el complejo hormona-receptor es transportado hacia el interior del núcleo, por lo que se le ha denominado a esa secuencia específica de aminoácidos como “secuencia de localización nuclear” (NLS) (8).

Los análisis, tanto de mutagénesis de sitio específico como el de la utilización de organismos knock out, han demostrado que en la región E se encuentra la secuencia de aminoácidos que le permiten unirse a la hormona o ligando en una forma estereo-específica al receptor (9). Dicha secuencia es el dominio LBD, el cual ocupa la mayor parte del receptor y sus dos funciones están asociadas, la primera con la unión del ligando, y la segunda con la interacción de proteínas específicas de más de una variante de un tipo de receptores. Como producto de la interacción con un receptor específico y en ocasiones con sus variantes, este dominio permite la dimerización representada en la Figura 3 (1). De forma equivalente, la interacción del complejo hormona-receptor con el TFIId, uno de los factores generales de la transcripción, favorece un ensamble más eficiente del aparato de transcripción permitiendo la síntesis del ARNm (10). Finalmente, en este dominio se unen también proteínas que inducen la variación estructural del complejo, especialmente las proteínas de choque térmico (hsp), que actúan como proteínas estabilizadoras del receptor que se encuentra en espera de unirse al ligando. Weihua *et al.* (11), consideran que la región terminal del receptor coadyuva a la estructuración total del propio receptor, permitiendo una estabilización del dominio de unión al ligando y la interacción proteínica, que le permite distinguir entre sustancias agonistas y antagonistas del ligando. Este fenómeno sólo ocurre en los ER, lo que es crucial desde el punto de vista de la regulación de la transcripción celular y de aplicaciones terapéuticas, como se discutirá posteriormente (1, 12, 13). La región F solamente difiere de la región E en que no está bien conservada cuando se compara entre los diferentes vertebrados, por lo que algunos textos la consideran a E y F como una sola región denominada E/F (14,15).

La interacción de los ER con otras proteínas como la proteína p160 permite que se una a este complejo la Histona acetil transferasa (HAT) que permite la modificación de la Histona H1 de los nucleosomas por lo que se ensambla un complejo activador en el sitio ERE. En este caso, la proteína p160 actúa como co-activador de la transcripción iniciada por el ER. Aunque no implicando la interacción con HAT, la unión de la proteína activadora de la transcripción (TRAP) al ER, permite la modificación del complejo nucleosomal del ERE

por lo que la maquinaria de transcripción, incluyendo a la ARN polimerasa II, tiene un acceso más eficiente. Este tipo de regulación de la interacción ER – ADN está equilibrado fisiológicamente por la presencia de correpresores. La unión de la proteína Dax-1 permite que la transcripción de genes importantes para la diferenciación sexual masculina y la espermatogénesis sea atenuada en ratones tratados perinatalmente con citrato de tamoxifeno. En este caso, la unión de ER-Dax 1 forma un complejo que en lugar de permitir la interacción de la ARN polimerasa en los sitios ERE, esta se ve interferida por lo que no se ensambla adecuadamente evitando la expresión de genes (16).

Aunque el proceso mediante el cual la función de los receptores está descrito con cierto detalle, aún existen aspectos que se hacen por analogía con otros modelos existentes. En resumen, el primer paso en la activación es la unión de la hormona, que por sus características anfípáticas, atraviesa la membrana celular y se une al receptor. Esta interacción induce un cambio conformacional del mismo. El sitio donde el receptor se une a las proteínas de choque térmico de 90 KDa de peso molecular (hsp90) permanece poco claro, ya que algunos autores (17,18) favorecen la idea de su localización citoplasmática, mientras que otros (19) apoyan el concepto de su localización e interacción con el receptor a nivel nuclear.

Los sitios de unión de la hormona varían de receptor a receptor. Algunos de ellos muestran sitios únicos de unión mientras otros tienen sitios múltiples. Aún más, las interacciones entre moléculas homólogas de receptores promueven la dimerización, tanto homóloga como heteróloga. Tal es el caso de los receptores a estrógenos (8).

Una consecuencia del cambio conformacional es la exposición de sitios (secuencias) de localización nuclear (NLS). Éstas, al quedar expuestas, interactúan con proteínas citoplasmáticas del tipo de las NIF 1 y NIF 2, lo que permite que la unidad ligando-receptor sea posicionada primeramente en la vecindad del complejo del canal o poro de la membrana nuclear, en donde se asocia con las proteínas que conforman dicho canal. Su nueva posición lo coloca en forma tal que lo hace capaz de interrelacionarse con las láminas LM1 y LM2, proteínas nucleoplásmicas, que, a su vez, actúan como acarreadores vectoriales de los complejos hormona-receptor hacia el interior del núcleo (19). Las condiciones nucleares de pH, concentración y actividad iónica permiten que el receptor actúe como un activador de los factores de transcripción específica, que mediante

interacciones productivas e improductivas localiza la estructura del ADN. El ADN contiene la secuencia de su elemento de respuesta específico (HRE), al cual se une el receptor activado. El reconocimiento del HRE por el complejo hormona-receptor, permite la interacción de éstos con los factores de transcripción (TF), principalmente el TFIID, para que en conjunto con el TIFA estabilizan a los ARN polimerasa II, fosforilar su dominio carboxilo terminal (carboxy-terminal domain, CTD); para que finalmente se lleve a cabo la transcripción del gene estructural (20).

La intervención del receptor en la activación de la transcripción culmina cuando se inicia su camino de regreso al citoplasma con el ocultamiento de la NLS, la disociación del complejo dimérico, y finalmente, la disociación del complejo hormona-receptor. Dependiendo de las concentraciones relativas de la hormona, se puede reasociar el complejo, o bien ser transportada de acuerdo con su gradiente de concentración hacia el exterior de la célula.

Para la activación de los receptores es necesario que estos se fosforilen, en un proceso que requiere de dosis fisiológicas del ligando (21). Se ha detectado la fosforilación de la tirosina en el ER α de origen humano en la posición 537 tanto in vivo como in vitro (22). Cuando se utilizan células que han sido transformadas para expresar un tipo particular de receptor (23), se ha encontrado que tras la estimulación con estradiol, la mayoría de los residuos de fosfoserina se localizan en la región amino terminal en la posición 236 en el DBD, 294 en la región de la bisagra, 305 en el LBD y 104, 106, 118, 154 y 167 del dominio A/B las enzimas responsables de este proceso son tirosin cinasa , casein cinasa II (24). En ausencia de estradiol, otras proteínas que modulan la fosforilación del ER β incluyen a la proteincinasa A, proteincinasa C (25), señales extracelulares como los factores de crecimiento peptídico, citosina y neurotransmisores.

Si bien la función principal de los receptores ER β no es la promoción o regulación de la división celular, hay algunas células en las cuales es importante la participación de los ER en este aspecto. Tal es el caso de la hiperplasia de glándula mamaria en las cuales el ER forma parte del complejo que interactúa con las ciclinas para que estas puedan llevar a cabo la regulación del ciclo celular. Al mismo tiempo, la interacción de ER con estas proteínas permite un aumento en la eficiencia de la estimulación evidenciada como la síntesis específica de proteínas esteroideogénicas. Así por ejemplo cuando se induce la sobre

expresión de la ciclina A en cultivos celulares de osteosarcomas o de células HeLa, al estimular con estradiol, se incrementa la fosforilación del ER mientras que cuando no se induce la sobre expresión de Ciclina A y su asociación con la Cdk2 (cinasa dependiente de ciclina), esta fosforilación no ocurre. Al fosforilarse el ER, se incrementa la tasa de transcripción de genes reporteros. Por otro lado, la fosforilación del ER dependiente de la expresión de ciclina D1, no requiere de la intervención de la porción reguladora de la cinasa dependiente de ciclina (26). En ambos casos, las concentraciones de estradiol que se requieren son inferiores a las que se necesitarían si no se hace la sobre expresión de las ciclinas.

Receptores estrogénicos

Hasta la fecha han sido identificados dos isoformas de receptores estrogénicos (ER): los ER α y los ER β . Los estrógenos presentes en el plasma penetran a sus células blanco en tejidos llamados “clásicos” que se encuentran en el útero, glándula mamaria, placenta, hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular y hueso. Las células blanco de este grupo de tejidos son ricas en ER α .

Existen otros tejidos considerados “no clásicos”, entre los que se incluyen próstata, ovarios, glándula pineal, glándula tiroides, paratiroides, adrenales y páncreas, así como la vesícula biliar, la piel, tracto urinario, tejido linfoide, tejido eritroide, pulmón, epitelio intestinal y algunas regiones del cerebro que expresan poco ER α , pero que contienen cantidades significantes de ER β . El tejido muscular estriado es único, puesto que en él se expresa de manera elevada el ER β y está casi ausente el ER α (11,12).

Como miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, los estrogénicos modulan la transcripción interactuando con las secuencias regulatorias del ADN celular, uniéndose discriminadamente con secuencias específicas del genoma, así como a correpresores y coactivadores para regular la acción del complejo de ARN polimerasa. Los efectos moduladores de los ER sobre la transcripción se llevan a cabo en una serie secuencial de eventos. Al unirse los ER con los estrógenos, desencadenan cambios en la forma del receptor que consisten en la disociación de un complejo correpresor del ER y la unión de éste con un complejo coactivador. Estos últimos son moléculas que al interactuar con el receptor le confieren la actividad de transcripción, resultando en la transcripción de genes que

contienen elementos de respuesta a los estrógenos (ERE). Por el contrario, en ausencia de estrógenos, los ER se asocian con los correpresores que inhiben la actividad de transcripción (17,27,28). Como veremos posteriormente, la interacción de ligandos, represores, correpresores, proteínas activadoras así como análogos son mecanismos altamente regulados.

Estructura de los ER

En el caso de los receptores estrogénicos, hasta la fecha se han identificado las variedades ER α y ER β . Estos receptores son diferentes en cuanto a la eficiencia con que inducen la transcripción (27,29). Inicialmente, se había encontrado que la principal función la llevan a cabo los receptores ER α . Sin embargo, el empleo de las metodologías de ADN recombinante permitieron la clonación, caracterización y estudio tanto de los ER β así como de variantes adicionales de estos genes. Actualmente sabemos que de las dos variantes generales, hay moléculas que presentan a su vez cambios en su secuencia y estructura sin que se traten de genes adicionales. La explicación de estas nuevas variaciones depende de la forma en que se procesa el ARNm desde que se transcribe, hasta que es transportado al citoplasma donde finalmente será traducido en una proteína.

Al igual que una gran cantidad de genes eucariontes, el ADN contiene secuencias que son transcritas y además traducidas, mientras que otras aún siendo colineares con las anteriores son transcritas pero no traducidas por lo que no están representadas en la proteína. Al primer tipo de secuencias, Wally Gilbert les denominó exones, para diferenciarlas de los transcritos que conforma a los intrones y que permanecen dentro del núcleo.

Aún así, no en todos los casos la remoción de intrones y el empalme de exones proceso que en inglés se denomina splicing, implica la remoción total de los intrones y el empalme de todos los exones para formar el ARN que será finalmente traducido.

Cuando no están excluidos todos los intrones y/o solo algunos exones son selectivamente empalmados, a la proteína resultante se le denomina variante proteínica derivada de un empalme alternativo cuyo termino en inglés es splice variant con lo que se indica que no se trata de un gen alternativo, sino de un proceso en donde uno de los módulos de la proteína es cambiado por otro sin que tenga lugar mutación, recombinación o algún otro proceso que altere al gen. Los mecanismos moleculares tanto del proceso de

corte y empalme general como el alterno están bien documentados e incluso hay algunos autores que lo toman como un mecanismo que amplía la variabilidad con que cuenta el organismo (30)

En el caso particular de los ER β , los dominios carboxilo terminal, el de unión al ADN y amino terminal son los que presentan variantes en el corte y empalme. En el testículo humano la variante ER β cx presenta variación a partir del exon 8 en el cual se presenta un exon alterno que codifica para 23 residuos de aminoácidos en lugar de los 65 que deberían estar presentes si se empalmara el exon 8 clásico. Obviamente la consecuencia funcional de este cambio es la eficiencia con que se induce la transcripción al estar comprendida dentro de la región que activa la transcripción (TAF2). Comparativamente, la variante que incluye al exon 8 el receptor puede unirse con el ligando pero no así con el ERE en al ADN. Aunque este funcionamiento pudiera parecer inadecuado, también es importante pues regula la población de ligando unido a receptores que tengan una conformación adecuada para llevar a cabo la transcripción por lo que solamente una población adecuada de receptores bien conformados son los encargados de que se transcriban a un determinado nivel los genes específicos, aunque el tejido se encuentre en un ambiente en donde la presencia de ligandos sea mucho mayor a la requerida para el óptimo funcionamiento (31). De la misma forma, la variante ER β cx puede formar dímeros con el ER α mas que con el ER β por lo que interfiere en el proceso de transcripción dependiente de ER α (31).

Si se compara la secuencia de aminoácidos entre los ER α y ER β , ambos receptores presentan 96% de homología de sus aminoácidos constituyentes, aunque no es una regla aplicable a todas las regiones del receptor; ya que en las regiones DBD y LBD solo existe una similitud de 53% (Figura 4). Aunque no se han demostrado experimentalmente, estos datos sugieren que el ER β puede reconocer y unirse a ERE similares a los que el ER α reconoce y une. Sin embargo, cada uno de ellos tienen una afinidad diferente por los distintos ligandos. Por otro lado, la poca similitud entre los dos receptores en las porciones TAF1 y TAF2 sugiere que diferentes tipos de proteínas interactúan en los complejos de transcripción y éstas actúan sobre tejidos específicos (11,32).

Existen evidencias experimentales que muestran cómo los dos receptores se unen a ERE clásicos, con similar afinidad como lo es el 17 β -estradiol, con 0.06nM para el ER β y

con 0.02nM para el ER α . Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando diferentes ligandos, como el coumestrol y la genisteína, muestran preferencia por el ER β (33,34).

El ER α juega un papel importante en la proliferación de células y el aumento de peso del útero. El ER β ejerce acciones similares a nivel uterino, pero requiere concentraciones mayores del ligando que el ER α (34). Cuando el ER α se encuentra ocupado por estrógenos, disminuye marcadamente la cantidad de ARNm que codifica para los receptores de progesterona (PR) y de andrógenos (AR). En contraste, cuando el ER β se encuentra unido a su ligando con baja afinidad, solamente induce una disminución marginal en PR y AR. Cuando ambos ER, α y β se encuentran ocupados, aparentemente trabajan en cooperación incrementando la supresión de ARNm del PR. La acción sinérgica de ambos tipos de ER sobre los PR sólo se ha observado en las células epiteliales del lumen uterino. Algunos autores sugieren que el ER α es el que regula a los PR en el útero por sí solo, mientras que la expresión del AR es predominantemente regulada por el ER α , pero puede ser modulada por el ER β (35,36).

Tanto los estrógenos como los ER α y ER β son de importancia en los tejidos del ovario; los estrógenos son producidos por las células de la granulosa en el folículo ovárico durante la vida reproductiva, siendo el ER α el que más se expresa en las células intersticiales del estroma y en las células de la teca. El ER β se sintetiza principalmente en la granulosa de los folículos en crecimiento, aunque también se puede expresar en algunas células del estroma ovárico de algunas especies (11).

En modelos experimentales tales, como los ratones, en los cuales no se expresa el receptor estrogénico β (ER β -/-); los folículos ováricos muestran atresia progresiva y por consiguiente, reducción en la ovulación.(11).

Los estrógenos también juegan un papel importante en la reproducción del macho, ya que en los vasos deferentes y rete testis del testículo se expresa gran cantidad de ER α , mientras que en el epidídimo se expresan tanto los ER α como los β . La rete testis transporta los espermatozoides al epidídimo para su maduración. Aquí se lleva a cabo la absorción de una buena parte del líquido que acompaña a las células espermáticas provenientes de la rete testis. Esta acción es mediada por estrógenos, que al incrementar la concentración espermática, favorecen su sobrevivencia y maduración. La deficiencia de

estrógenos o la insensibilidad tisular a ellos resulta en la acumulación de fluidos en los vasos deferentes, un incremento del peso testicular y una atrofia posterior de dichas gónadas (37).

Además de las funciones en los órganos reproductivos, los ER α juegan un papel muy importante en la remodelación ósea. Se ha demostrado que la ausencia del ER α o una baja cantidad de estrógenos, disminuyen la remodelación ósea. La sola presencia de los escasos ER β aun ante elevadas concentraciones de estrógenos no es suficiente para este fin (38,39).

En el SNC, el ER α está presente en las neuronas localizadas en el área preoptica medial, en los núcleos hipotalámicos arqueado, ventromedial y en la amígdala. Todas estas áreas están involucradas en la regulación de la función gonadal y son responsables de la conducta sexual (40). El ER β se expresa en la corteza cerebral, el hipocampo, así como en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, donde el ER α no se encuentra o al menos no ha sido identificado (11).

El patrón de distribución de ambos receptores sugiere que tienen diferentes funciones en el cerebro. En modelos experimentales con ratones knocked out, es decir, que no expresan el ER α (ratones ER $\alpha^{-/-}$); no se han encontrado alteraciones en el SNC. Sin embargo, se han detectado cambios importantes en la morfología del cerebro en ratones ER $\beta^{-/-}$, tales como la hipocelularidad en el cerebro, así como un déficit de tipo somatosensorial a nivel de la corteza cerebral; siendo, en cambio, marcada la proliferación de células de la astrogliia en el sistema límbico, mas no en la corteza (41).

En el sistema cardiovascular se expresan tanto los ER α como los ER β (42). Aquí los estrógenos inhiben la respuesta vascular al daño y el desarrollo de aterosclerosis. El efecto protector de los estrógenos probablemente se deba a la inhibición de la proliferación celular en el músculo liso vascular y a la estimulación del tamaño de las células endoteliales, produciendo vasodilatación (43).

Efectos no genómicos de los estrógenos

En contraste con los efectos genómicos de los estrógenos, a los cuales ya se hizo referencia y que están mediados por un ER α o β , se han descubierto efectos adicionales de los estrógenos que no son explicados por las interacciones tradicionales del ligando con el ER. A diferencia de la respuesta que implica la síntesis, primero de un ARNm para luego, ser

traducido en una proteína específica, recientemente se han examinado acciones de los estrógenos que se ejecutan en segundos. En estos casos se ha determinado que no tiene lugar la estimulación de la expresión génica, por lo que a este tipo de respuestas se les ha denominado como “efectos no genómicos” de los estrógenos, observados en diferentes tipos celulares (44). El uso de inhibidores de la transcripción del ADN como la actinomicina o la cicloheximida, no son eficientes para inhibir las acciones estrogénicas de tipo no genómico. Por el contrario, se ha demostrado que intervienen procesos como el reclutamiento de señales de localización de la membrana celular, los cuales incluyen al segundo mensajero AMP cíclico, calcio y óxido nítrico, así como la activación de cinasas como tirosin cinasa, proteincinasa A (PKA), proteincinasa C (PKC), ERK (extracellular signal-regulated kinase) y la proteincinasa B (PKB), entre otras. Estos procesos que semejan a los evocados por receptores transmembranales unidos a sus ligandos, se han observado en los sistemas neuronal, vascular y óseo (44-46).

Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos

Los estudios de la fisiología de los ER han tomado ventaja de la acción de sustancias moduladoras selectivas de los receptores estrogénicos (SERM), fármacos que actúan como ligando en el LBD del receptor estrogénico. Al unirse un SERM y un LBD de los ER, promueven los cambios de conformaciones del receptor, activándolo así de diferentes maneras, como agonista o antagonista. Lo anterior depende del tipo de célula y la presencia de los promotores y correguladores asociados (14,47). Actualmente, los principales usos que se le ha dado a los SERM es como un componente en la terapia de tumores dependientes de estrógenos que se desarrollan en la glándula mamaria y la próstata. (48). Un prometedor descubrimiento se refiere al uso del raloxifeno como un inhibidor potencial de la proliferación de tumores mamarios, siendo su aplicación principal la prevención de osteoporosis, con la consecuente disminución del riesgo de fracturas por el incremento de la densidad mineral ósea. También se han demostrado efectos benéficos del raloxifeno en el sistema cardiovascular y en el útero, donde actúa como antagonista estrogénico. (49).

En esta escueta revisión se proporciona un panorama actualizado de los estudios disponibles de los receptores estrogénicos. Aun en la literatura especializada, no quedan

muy claros algunos de los procesos que deben llevarse a cabo para que la estimulación estrogénica pueda inducir la respuesta del tejido blanco. Sin tratar de llegar a los extremos de la constitución, estructuración y regulación fina de la expresión de los genes implicados en el proceso, se ha establecido una correlación entre la estructura, función y regulación de los receptores para poder brindar de manera accesible estos aspectos a los lectores.

Agradecimiento

Al MVZ Juan Jesús Tadeo Trejo por su apoyo artístico, en el diseño y elaboración de la imagen que aparece en este documento.

Referencias

1. Egea PF, Klaholz BP, Moras D. Ligand protein interactions in nuclear receptor hormones. *FEBS Lett* 2000; 476: 62-67
2. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: An Overview. *Endocrine Reviews* 2002; 23: 175-200.
3. DeFranco DB. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol* 2002; 16:1449-1455
4. Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B. The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 597- 599
5. Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER α and ER β . *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:165-175
6. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 1996;15:2174-2183.
7. Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev.* 1992; 13 (2): 129-145
8. Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM. DNA binding domains in diverse nuclear receptor function as nuclear export signal. *Curr Biol.* 2001; 11: 1749-1758
9. Bapat AR, Frail DE. Full-length estrogen receptor α and its ligand-binding domain adopt different conformations upon binding ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86:143-149
10. Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai M, Edwards DP, et al . The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 1998;279 :12101-12108.
11. Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson J. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 2003 ; 546:17-24
12. Mosselman J, Polman R. Dijkema, ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters* 1996;392: 49-53

13. Westin S, Kurokawa R, Nolte RT, Wisely GB, McInerney EM, Rose DW, Milburn MV, Rosenfeld MG, Glass CK. Interactions controlling the assembly of nuclear receptor heterodimers and co activators. *Nature* 1998;395:199-202
14. Brozozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RD, Bonn T, Engström O, Ögman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. *Nature* 1997;389:753-758.
15. Hu X, Lazar MA. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 1999;402:93-96
16. Nillson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Anderson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81:1535-1565
17. Montano MM, Müller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxyterminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 1995;9(7):814-825
18. Knoblauch R, Garabedian MJ. Role for Hsp90-Associated chaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999;19(5):3748-3759
19. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 2000; 65:227-251
20. Forbes DJ. Structure and function of the nuclear pore complex. *Annu.Rev.Cell.Biol.* 1992; 8:495-527
21. Aronica SM, Katzenellenbogen BS. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* .1993;7:743-752
22. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vivo. *Mol Endocrinol.* 1995;9:24-33
23. Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem* 1994;269:4458-4466

24. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: consequence on DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995;55:163-172
25. Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS. Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* 1996;137:1735-1744
26. Trowbridge JM, Rogatsky I, Garabedian MJ. Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:10132-10137.
27. Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature.* 2002; 416:499-506
28. Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for estrogen receptors α and β in reproductive tissues. *Reproduction* 2003 ; 125 : 143-149
29. Levin ER. Genome and hormones: Gender differences in physiology. Invited Review: Cell localization, physiology and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 2001;91:1860-1867
30. Maniatis T, Tasic B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoas. *Nature* 2002;48:236-243
31. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor β cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acid Res* 1998;26:3505-3512
32. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptor α and β form heterodimers and DNA. *J Biol Chem* 1997;272(32):19858-19862
33. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5925-5930
34. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998;139: 4252-4263.

35. Fasan J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) α activity by ER β in the uterus. *Endocrinology* 2003 ; 144 : 3159-3166
36. Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ;97: 5936-5941
37. Hess RA, Bunick D, Lee K, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997 ;390 : 509-511
38. Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L. Bone adaptation requires oestrogen receptor α . *Nature* 2003; 424: 389
39. Vasudevan N, Ogawa S, Pfaff D. Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: Physiological flexibility by molecular specificity. *Physiol Rev* 2002;82:923-944
40. Rodriguez-Medina MA, Reyes A, Chavarria ME, Vergara-Onofre M, Canchola E, Rosado A. Asymmetric calmodulin distribution in the hypothalamus: role of sexual differentiation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 72:189-195.
41. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:2792-2796
42. Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Arnovitz M, Chambon P, Mendelson ME. Estrogen receptor- α mediates the protective effect of estrogen against vascular injury. *Circ Res.* 2002;90:1087-1092
43. Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens:molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80: 369-381
44. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO rep* 2001;2(9):775-781
45. Ho KJ, Liao JK. Non-nuclear actions of estrogen: New targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Mol interv* 2002; 2(4):219-228

46. Wong C, McNally C, Nickbarg E, KommBS, Cheskis B. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:14783-14788
47. Khosla S. Estrogen ,selective estrogen receptor modulators and now mechanism-specific ligands of the estrogen or androgen receptor?. Trend Pharmacol Sci 2003;24:261-263
48. Macgregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanism of antiestrogen action. Pharmacol Rev 1998;50:151-196.
49. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, et al. Effects of raloxifene on body mineral density, serum cholesterol concentrations and uterine endometrium in postmenopausal women. N Engl J Med 1997; 337: 1641-1647

Estructura de un receptor nuclear

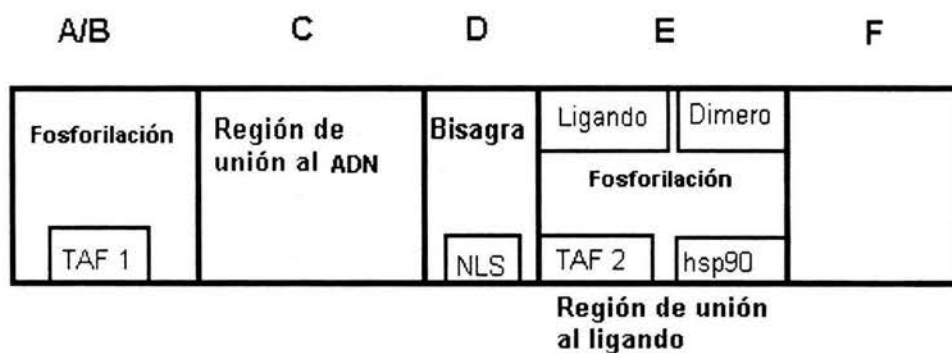


Figura 1. Estructura de un receptor nuclear.

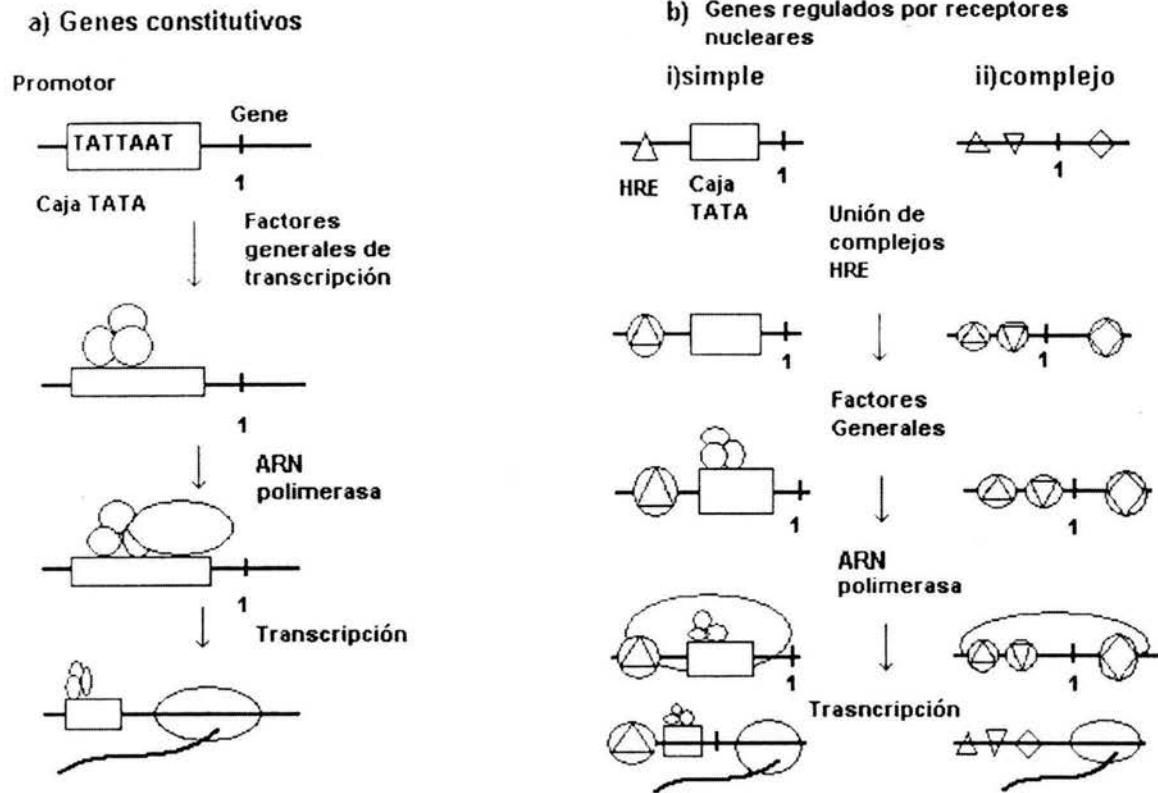


Figura 2. Comparación estructural entre los procesos de transcripción de genes de expresión constitutiva o House keeping y los “Regulados” por complejos hormona-receptor.

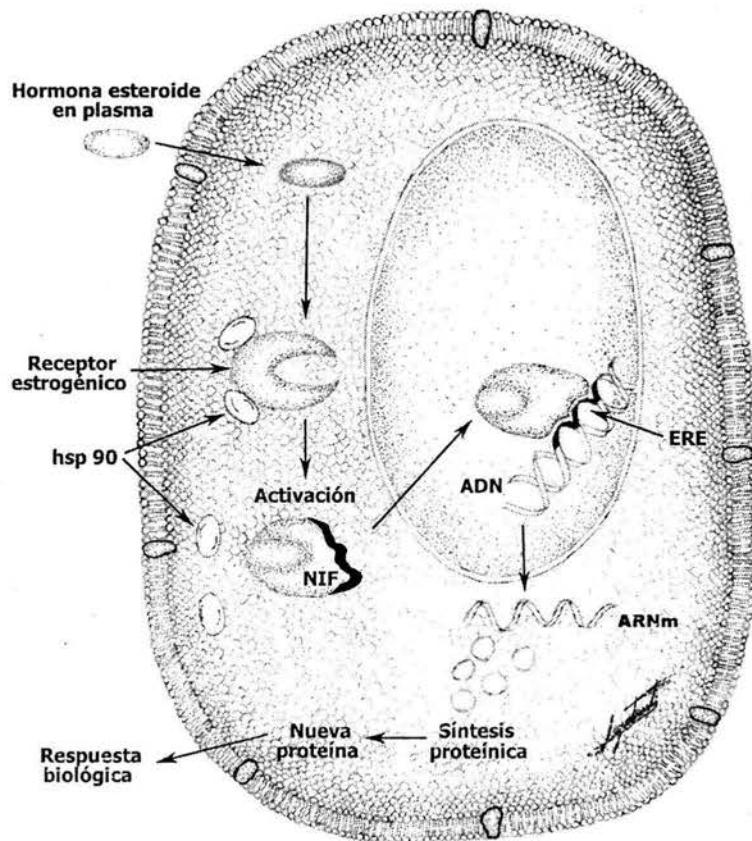


Figura 3. Activación del receptor estrogénico: Al unirse el receptor con los estrógenos se desprende de las proteínas de choque térmico 90 (hsp90), por ello, cambia su conformación y expone la señal de localización del núcleo (NLS). El receptor entra al núcleo y se une a los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) en el genoma, para iniciar la transcripción.

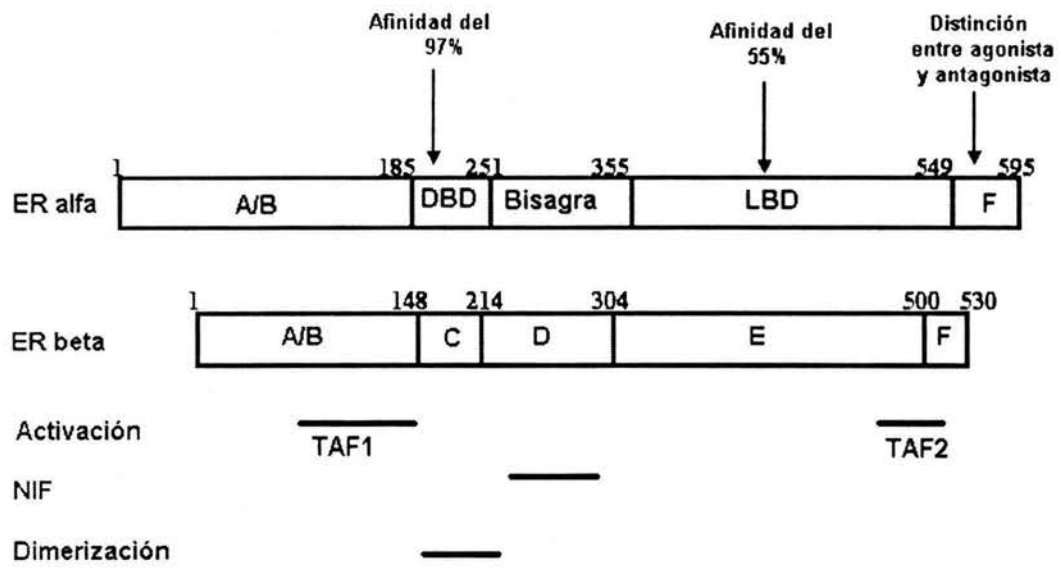


Figura 4. Comparación estructural entre receptores estrogénicos α y β .

Reproductive Control of Vampire Bat (*Desmodus rotundus*): An Environmentally Friendly Alternative

Juan José Pérez-Rivero

Postgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

Héctor Serrano

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Octavio De Paz

CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias

Alejandro Villa Godoy

Departamento de Fisiología y Farmacología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

Nuria De Buen

Departamento de Patología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

Álvaro Aguilar-Setién

Instituto Mexicano del Seguro Social. Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

ABSTRACT: Vampire bat control strategies have not changed in México for more than 40 years. Anticoagulants and strychnine are frequently used to reduce bat populations and the prevalence of rabies. Despite these control efforts, vampire bat-borne rabies continues to have a significant economic impact. A new control method is being developed that takes advantage of the reproductive changes induced by phytoestrogens in mammals. In this study, we fed bats the phytoestrogen coumestrol, for 30 days and examined its effect on the reproductive organs of male and female vampire bats in laboratory tests. For males, coumestrol resulted in an increase in weight and loss of the typical histological structure of testes. Treated females had no corpora lutea in their ovaries and fewer primordial folliculi were observed. These results suggest that coumestrol might be a candidate replacement for anticoagulants used for vampire bat control.

KEY WORDS: bat control, coumestrol, *Desmodus rotundus*, fertility control, reproductive control, vampire bat

Proc. 21st Vertebr. Pest Conf. (R. M. Timm and W. P. Gorenzel, Eds.)
Published at Univ. of Calif., Davis. 2004. Pp. 279-280.

INTRODUCTION

Vampire bat (*Desmodus rotundus*) control strategies in México have not changed in 40 years, with anticoagulants and strychnine commonly used. Despite control efforts, the economic impact of cattle rabies continues to grow. Bovine paralytic rabies is the main vampire bat-bite derived disease (McColl et al. 2000). New control techniques are required to complement present procedures.

A new control method that takes advantage of the reproductive changes induced by phytoestrogens such as coumestrol in mammals (Burroughs 1995, Medlock et al. 1995) is being developed and tested for vampire bat control. The aim of this strategy is to reduce vampire bat populations by reducing their reproductive rate. Such a strategy would decrease vampire bat populations but not affect other species, thereby keeping the ecological niches occupied and avoiding their occupancy for other newcomer rabid vampire bats.

MATERIALS AND METHODS

Three males and 3 females were assigned randomly into either a control group (1 male and 1 female) or to the experimental group (2 males and 2 females). We fed

experimental animals a 15-ml mixture of coumestrol (200 µg) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and bovine defibrinated blood daily for 30 days. The control group was fed 15 ml of bovine defibrinated blood and DMSO.

After treatment, all animals were sacrificed by anesthesia and heart puncture, and the reproductive organs were analyzed for gross anatomical and cytological changes. All animals were from our rabies-free breeding colony. All animals were maintained in individual containers in an environment-controlled room (26°C, 60% humidity, 20 hours of darkness) in our animal facility.

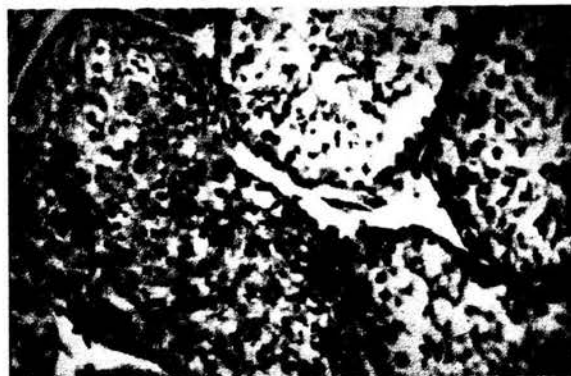
RESULTS

Testes of treated males were heavier (160 ± 18 mg) than those of the control male (139.1 mg). We did not observe any other macroscopic differences in the reproductive organs of males. Treated males did not have the typical histological structure, and interstitial Sertoli and sperm cells were no longer structured. The untreated male had well-structured seminal tubules with sperm cells in different maturation steps (Figure 1).

The mean ovary weight of treated females was higher in treated females (105 ± 6.5 mg) than the untreated



(a) Control male



(b) Treated male

Figure 1. Histological changes in the seminiferous tubuli of testes in male vampire bats treated with 200 µg coumestrol/day compared to the control male. The control male had well structured seminal tubules with sperm cells in different maturation steps. Treated males have lost the typical architecture, and interstitial Sertoli and sperm cells are no longer structured.



(a) Control female



(b) Treated female

Figure 2. Histological changes in the ovary structure induced by coumestrol in treated female vampire bats compared to the control female. In the control female, a conspicuous luteum body occupies most of the image but some folliculi can also be seen. Treated females have no corpora lutea in their ovaries and fewer primordial folliculi are observed.

female (95 mg). Coumestrol also induced a reduction in uterus weight (98.4 ± 1.4 mg) compared to the untreated female. Vaginal smears of treated bats indicated a continuous estrous. Treated females had no corpora lutea in their ovaries and fewer primordial folliculi were observed (Figure 2). In the untreated female, a conspicuous luteum body occupied most of the image although some folliculi were observed.

DISCUSSION

A more effective, specific, and environmentally-safe alternative to the current anticoagulant strategy for vampire bat population control in México and other countries is needed. In this study we have explored the potential of phytoestrogens to impair the reproductive capacity of vampire bats. Our results indicate that the phytoestrogen coumestrol induced gross anatomical and cytological changes in both male and female reproductive organs. These results indicate that a phytoestrogen-based strategy may be a potentially useful alternative for vampire bat population control. Further studies are

needed to assess the reproductive impact of coumestrol on biochemical and endocrine processes of vampire bats, and to further develop this concept to provide a more effective, specific, environmentally-safe and acceptable strategy for vampire bat population control in México and other countries.

LITERATURE CITED

- BURROUGHS, C. D. 1995. Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally with coumestrol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208(1):78-81.
- MCCOLL, K. A., N. TORDO, AND A. AGUILAR-SETIEN. 2000. Bat lyssavirus infections. *Rev. Sci. Tech. OIE.* 19(1):177-196.
- MEDLOCK, K. L., W. S. BRANHAM, AND D. M. SHEEHAN. 1995. Effects of coumestrol and equol on the developing reproductive tract of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208(1):67-71.

Detección de Receptores Estrogénicos Beta (ER β) en Testículo de *Desmodus rotundus* Mediante el Uso de Coumestrol.

Juan José Pérez-Rivero¹
Álvaro Aguilar-Setién²
Alejandro Villa-Godoy³
Héctor Serrano⁴

¹ Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. jjperez1_1999@yahoo.com

² Unidad de Investigación Médica en Inmunología. Instituto Mexicano del Seguro Social.

³ Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

⁴ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Avenida Michoacán y Purísima S/N, Iztapalapa D. F. 09340. Teléfono 58084733, Fax 58044727, Correo Electrónico: hser@xanum.uam.mx

Abstract

Desmodus rotundus is the most important vector of bovine paralytic rabies (BPR). Campaigns for controlling its population in Mexico are not satisfactory, since the BPR national reports in 2004 show that relative to 2003, number of BPR cases in many States was incremented. The current strategy for controlling *D. rotundus* is to kill as many individuals as possible by the application of a warfarin ointment to captured animals, which spread the drug to other members of the colony during the grooming activities. In the present, a new no-killing culture is predominant throughout the world, thus new control methods are required to maintain populations of pest low. Based on data produced in rodents in which reproductive alterations were induced by phytoestrogens, we are developing a method to induce infertility with coumestrol in *D. rotundus*. In this short communication we are reporting the demonstration by fluorescence that coumestrol binds to estrogen receptor β in testis of *D. rotundus*. This finding is an evidence that coumestrol is a potential reproductive control agent for vampires.

Key words

Reproductive control, *Desmodus rotundus*, estrogen receptor β , coumestrol

Resumen

Las campañas de control del *Desmodus rotundus*, transmisor de la rabia paralítica bovina, no han sido satisfactorias. Los casos reportados a junio de 2004 son superiores en algunas entidades de la República Mexicana, que los de 2003. Cuando se diseñó la estrategia en uso (warfarina aplicada tópicamente), la investigación en el manejo de fauna silvestre dañina consistía en lograr su eliminación. Actualmente, a nivel mundial, se exigen nuevas estrategias enfocadas hacia el control no letal de la fauna silvestre nociva. Una posibilidad de control no letal del *D. rotundus* es mediante el uso del fitoestrógeno coumestrol. El coumestrol se une al receptor estrogénico β (ER β), produciendo alteraciones reproductivas en diferentes mamíferos. En este trabajo se detectó por primera vez, mediante la aplicación *in vitro* de coumestrol y usando técnicas de fluorescencia, la existencia de ER β en testículos de *D. Rotundus*, Este hallazgo permite proponer al coumestrol como un elemento con potencial en el control reproductivo de los murciélagos vampiros.

Palabras clave

Control reproductivo, *Desmodus rotundus*, Receptor estrogénico β , coumestrol.

Introducción

Pese a los esfuerzos encaminados al control de la rabia parálitica bovina (RPB) transmitida por el vampiro *Desmodus rotundus*, hasta la fecha la diseminación de esta enfermedad la cual continúa en aumento territorio nacional.

El numero de bovinos en el país en el año 1999, fue de 30,177,135 cabezas (1); de estos, 19,889,477 se encuentran en estados donde la campaña contra la RPB está en fase de control. Según la Organización Internacional de Salud Animal (OIE), durante 2003 en México (2) se vacunaron 8,365,829 bovinos contra la rabia y se documentaron 272 focos de rabia en esta especie y 16 focos en quirópteros, durante el mismo período.

La revisión de los informes de casos de RPB de 2003 y 2004, elaborados mensualmente por la Dirección de Vigilancia Epidemiológica (3), muestran que lejos de haberse establecido un control de este padecimiento, la tendencia es que en 2004, se superará el número de casos registrados hasta noviembre de 2003; particularmente en algunas entidades como Campeche en donde reporto 11 casos acumulados para noviembre de 2003 y al reporte preliminar del julio de 2004 reporta 14 casos, en el mismo periodo Chiapas reporta 8 y 15 respectivamente, Nayarit 1 y 4, San Luis Potosí 57 y 47 y Tabasco 15 y 17 casos.

Las medidas de control del *Desmodus rotundus* empleadas actualmente fueron diseñadas en los años setenta, y se basan principalmente en el estudio del comportamiento de este quiróptero, así como el uso de estrategias de tratamientos tópicos con anticoagulantes en forma de pasta, principalmente warfarina; a individuos capturados para que después de

regreso a sus refugios, mediante acicalamiento comunal diseminan el anticoagulante a otros individuos de la colonia. (4). Esta que parece ser la principal ventaja del esquema de control, al mismo tiempo es una gran desventaja ya que en muchos casos deja al nicho ecológico vacío.

Las estadísticas oficiales indican que las estrategias en uso son insuficientes para establecer un control efectivo del *D. Rotundus*; por lo que es necesario complementarlas o sustituirlas con otros esquemas de control que incorporen criterios tales como: selectividad, efectividad, protección al medio ambiente y el mantenimiento del nicho ecológico ocupado. Esto último, para evitar que vampiros infectados de rabia provenientes de otras zonas ocupen el nicho, ahora vacío, que anteriormente ocuparan los vampiros no rabiosos eliminados por la warfarina (5).

En la década de 1960, la investigación en el manejo de fauna silvestre dañina se encaminó hacia el diseño de la mejor forma de eliminar a los animales, aceptando las consecuencias que esto generara, como la eliminación de especies no blanco. Las tendencias cambiaron en la década de los 80; cuando se inició la regulación de los plaguicidas. Por primera vez se tomaron en cuenta los entornos ecológicos y la calidad del medio ambiente y hacia mediados la década de 1990 y primeros años del nuevo milenio, se planteó la necesidad de desarrollar nuevas estrategias no letales de control de la fauna silvestre nociva. Se asume que al haber menos individuos dañinos, su impacto nocivo al entorno ecológico disminuye considerablemente (6).

Los fitoestrógenos son compuestos naturales derivados de las plantas, los cuales son reconocidos por los receptores estrogenitos de los tejidos animales; por lo que mimetizan y en algunos casos suplen a los estrógenos endógenos (7). Los fitoestrógenos se dividen en tres grandes categorías: las isoflavonas, los coumestanos y los lignanos. Una sola planta es

capaz producir diferentes tipos de fitoestrogenos, por ejemplo los frijoles de soya son ricos en isoflavonas, aunque las plantas de soya en crecimiento tienen cantidades importantes de coumestanos (7). Dentro del grupo de los coumestanos se encuentra el coumestrol (3,9-dihidroxy-6h-benzofuro [3,2-c][1]benzo-pyran-6-one), que se une con afinidad similar a la del estradiol al receptor estrogénico β (8).

Las líneas de investigación en contracepción animal son diversas y han sido adaptadas para la especie de interés. El anticonceptivo ideal para *Desmodus rotundus* será aquel que sea efectivo, económico, de fácil administración y específico. Miller y Fagerstone (9), mencionan la posibilidad de utilizar fitoestrogenos para inducir infertilidad en animales silvestres. En roedores, el tratamiento con coumestrol induce cornificación vaginal persistente, folículos ováricos hemorrágicos, apertura vaginal prematura en neonatos y reducción de la tasa de ovulación cuando se administra oralmente de 50 y 100 μ g (10).

Medlock y colaboradores (11), compararon el efecto de diferentes dosis y tipos de fitoestrógenos en el útero de ratas neonatas en desarrollo y encontraron que entre el día 1 a 5 de la administración se presenta una hipertrofia que es más severa de manera dependiente de la concentración y no del tipo de fitoestrógeno utilizado. Sin embargo, cuando se utilizan 100 μ g de coumestrol por un periodo prolongado, produce bloqueo de los receptores estrogénicos con la consecuente disminución del tamaño uterino.

Además de las alteraciones estructurales en el tracto reproductor, el coumestrol administrado por vía oral induce alteraciones en el desarrollo neuroendocrino de ratas lactantes, así como la inducción de ciclos anovulatorios en ratas adultas. (11). Con tratamientos similares, en machos se ha documentado una baja de peso y de la libido (12).

Miksicek (1993) observó en cultivos celulares la especificidad y afinidad del coumestrol a los receptores estrogénicos. La unión del coumestrol puede ser evaluada por microscopía de fluorescencia (13), que como un método no isotópico puede ser útil para la caracterización y diferenciación de receptores estrogénicos α y β (14). En este trabajo se examinó la presencia de receptores estrogénicos beta en testículos de *Desmodus rotundus* por microscopía de fluorescencia, para evaluar la posibilidad de utilizar al coumestrol en el control reproductivo de este quiróptero.

Se obtuvieron quirúrgicamente los testículos de dos individuos adultos de *D. rotundus*, los cuales fueron seccionados en trozos de 1 mm³. Los fragmentos de tejido fueron distribuidos aleatoriamente en cada uno de los dos tratamientos: control negativo y grupo experimental. El grupo experimental se trató por inmersión del tejido en 7 concentraciones diferentes de coumestrol (1000, 250, 83.3, 27.7, 9.25, 3.08 y 1.028 μ g). Como control negativo se utilizó Dimetil sulfóxido (DMSO: 0.5 ml) que fue usado como diluyente del coumestrol.

La incubación se realizó a 37°C en cámara húmeda protegida contra la luz durante 30 minutos. Para la observación al microscopio de fluorescencia, las muestras de tejido se procesaron por la técnica de "squash" convencional, sin agregar fijador. Se utilizó azul de metileno al 0.001% p/v como colorante de contraste. Las observaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio Univar a 100 diámetros.

La detección de receptores β para estrógenos se obtuvo con concentraciones tan bajas como 1.028 μ g (Figura 1); de hecho, se observó el 100% de fluorescencia con la concentración

de 27.7 μg de coumestrol (Figura 2). La mejor definición de los receptores β , y con ello de las estructuras anatómicas del testículo, se logró utilizando una concentración equivalente a 25.75 mM de coumestrol (1.028 μg ; Figura 2). En todas las zonas testiculares analizadas con esta concentración, fue posible detectar la presencia de receptores estrogénicos β en una forma congruente con la disposición de los túbulos seminíferos, dejando libre de señal fluorescente las zonas carentes de tejido. Estas observaciones se facilitaron por el contraste brindado por el azul de metileno utilizado como colorante vital (Figura 2). En las preparaciones testiculares del testigo, no se observó señal fluorescente alguna (Figura 4).

La primera etapa en el desarrollo de un tratamiento específico mediante hormonas, sus análogos o inhibidores, está asociada a la presencia de los receptores con los cuales puedan interactuar. A pesar de que en la literatura aparecen informes de las alteraciones inducidas por fitoestrógenos en distintas especies animales diferentes al vampiro, son pocos los artículos en los que se intenta la localización de receptores (15). Esto se debe principalmente a la dificultad que implica manejar una población heterogénea como lo es la de los receptores α y β estrogénicos. En la literatura examinada, se encontraron pocos trabajos en los que se identifican los receptores β estrogénicos en asociación con la aplicación de coumestrol. Dichos estudios se efectuaron en cultivos de células (Cos-7) y receptores estrogénicos de origen humanos (13, 14). En el presente trabajo el coumestrol hizo factible la detección de receptores β estrogénicos en el testículo de *D. rotundus*. Estos resultados generados en tejidos de *D. rotundus*, junto con los de otros artículos que documentan los daños que el coumestrol produce en tejidos reproductivos de otras especies, indican que es factible explorar la posibilidad de utilizar el coumestrol en el control reproductivo del vampiro. A diferencia de los compuestos que actualmente se están

utilizando en el control de *D. rotundus*, el coumestrol es un compuesto de origen natural por lo que no contaminaría el medio ambiente y permitiría un control paulatino poblacional manteniendo el nicho ecológico ocupado.

Referencias

1. SAGARPA Inventario Total de Ganado Bovino, 1997-1999 .Disponible en el URL
<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/FTP/invbt.pdf>
2. Organización Internacional de Salud Animal. Sanidad Animal Mundial en 2003,México, OIE Hadistatus II. Disponible en el URL
http://www.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=120&c_mald=26#
3. Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Dirección General de Salud Animal, Dirección de Vigilancia Epidemiológica. Situación de cuadros y mapas por enfermedades y estados disponible en el URL:
<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc484/>
4. Linhart SB , Flores-Crespo R, Mitchell GC. Control de murciélagos vampiros por medio de un anticoagulante. En: Combate químico de los murciélagos vampiros. Mitchell GC y Burns RJ editores. Centro regional de ayuda técnica ,Agencia para el desarrollo internacional México-Buenos Aires 1974 :21-28
5. Zhang Z. Mathematical models of wildlife management by contraception.
Ecological modeling 2000;132:105-113
6. Curnow,RD. What are research needs and skills of the future. In : *Proceedings of the Ninth Wildlife Damage Management Conference* (Oct 5-8,2000,State College,PA)

- Pennsylvania State University, University Park PA. 2001. MC Brittingham, J Kays and R Mcpeake, editors.
7. Roselli M, Reinhart K, Imthurn B, Keller PJ and Dubey RK. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Human Reproduction Update* 2000 6 (4):332-350
 8. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson J. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 1998. Oct; 139: 4252-4263
 9. Miller LA. and Fagerstone KA. Induced infertility as a wildlife management tool. *Proceedings Vertebrate Pest Conference*. 2000 March; 19:160-168.
 10. Burroughs, CD. Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally with coumestrol. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 Jan; 208(1):78-81
 11. Medlock, KL, Branham WS and Sheehan DM. Effects of coumestrol and equol on the developing reproductive tract of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 Jan; 208(1):67-71
 12. Whiten PL, Lewis C, Russell E and Naftolin F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 Jan; 208(1): 82-86
 13. Miksicek RJ. In situ localization of the estrogen receptor in living cells with the fluorescent phytoestrogen coumestrol. *J Histochem Cytochem* 1993 41 (6): 801-810
 14. de Boer T, Otjens D, Muntendam A, Meulman E, van Oostijen M, Ensing K. Development and validation of fluorescent receptor assays based on the human

recombinant estrogen receptor subtypes alpha and beta. *J Pharm Biomed Anal* .2004 ;34: 671-679

15. Romero CM, Castellanos MT, Mendoza RM, Reyes RA, García AR. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Vet Mex*. 28(1) 1997:25-3

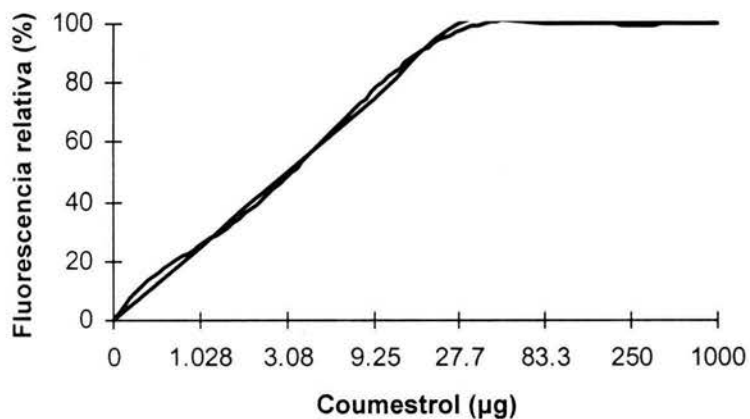


Figura 1. Fluorescencia relativa de coumestrol en testículo de *Desmodus rotundus*. Preparaciones tratadas con coumestrol a diferentes concentraciones se evaluaron al microscopio de fluorescencia. La fluorescencia relativa se determinó arbitrariamente tomando como base las imágenes del control negativo y la muestra de mayor contenido de fitoestrógeno como 0 y 100%, respectivamente.

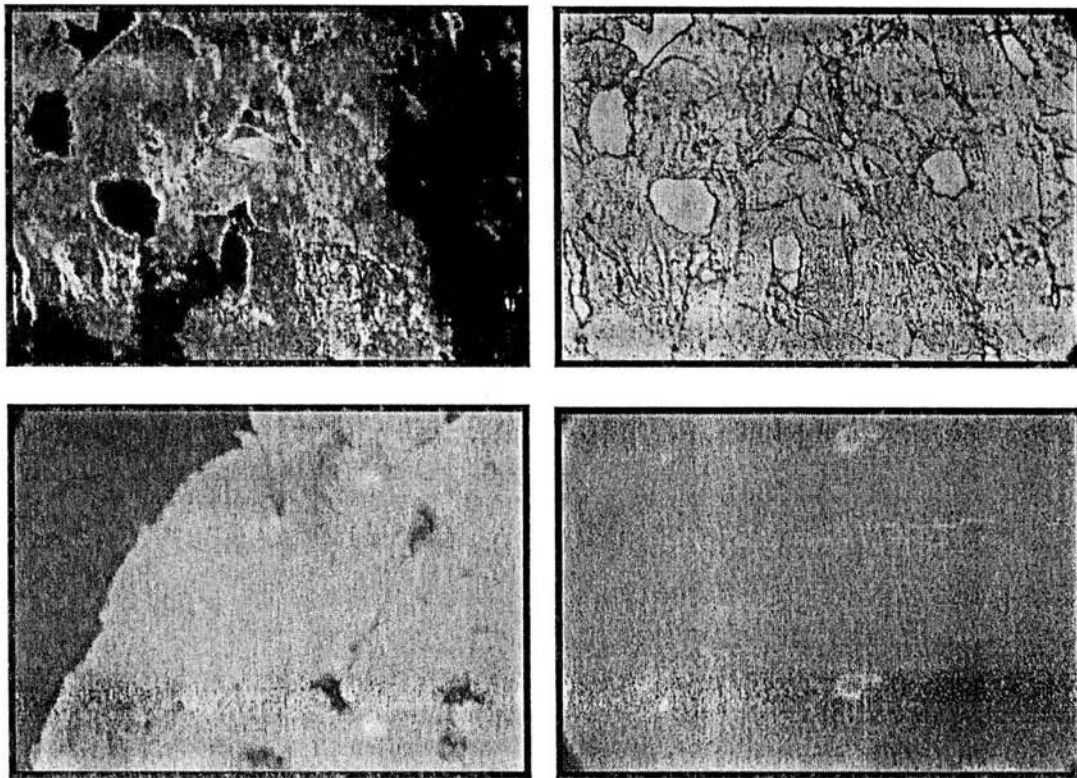


Figura 2. Detección de receptores estrogénicos β en el testículo de *Desmodus rotundus* mediante la unión con coumestrol. Arriba izquierda: La microfotografía al microscopio de fluorescencia se obtuvo con la fluorescencia producida por la unión del fitoestrógeno en la concentración de 1.028 μg . Nótese la definición que se tiene de los túbulos seminíferos proporcionada por la unión a receptores β estrogénicos comparada con la vista a campo claro contrastada con azul de metileno 0.001 % p/v (Arriba derecha). Abajo izquierda: Con la concentración de 27.7 μg de coumestrol se observa el 100% de fluorescencia y poca definición en el tejido testicular, contrastada con el control negativo (Abajo derecha)

La súper familia de los receptores nucleares.

Héctor Serrano y Juan José Pérez-Rivero Cruz y Celis

Dentro de la práctica profesional, nos encontramos que ocasionalmente tenemos que aplicar medicamentos cuyos efectos principales son muy poco conocidos. El efecto esperado en su mayoría de veces es mucho menor a los efectos no deseados. Uno de estos casos es el manejo de hormonas. ¿cómo es posible que se presenten variaciones tan grandes cuando se utiliza un mismo tipo y dosis de hormona? ¿cuál es la razón de que mientras una inyección de FSH/LH induce la ovulación en una vaca, a la vaca vecina, mantenida bajo las mismas condiciones, esa dosis no tenga efecto? ¿qué sucede cuando una vaca tiene una preñez gemelar en donde uno de los productos debería ser un macho y lo que se obtiene es un hermafrodita, fenómeno conocido como free martin?. La respuesta al menos al último cuestionamiento radica en la manera en que se lleva a cabo la estimulación por hormonas esteroidales, la interacción con receptores específicos y la respuesta que inician permitiendo la expresión de genes. En este capítulo se estudiarán la estructura y función de los receptores nucleares, tomando como modelo de estudio a los receptores a estrógenos.

El funcionamiento de un organismo depende tanto de las condiciones internas como su capacidad de respuesta ante las condiciones del medio. Dentro de las primeras se encuentra el componente genético mientras que en las segundos sobresale la alimentación, y el medio ambiente.

El punto medio se encuentra a nivel molecular en la interacción de sustancias exógenas o endógenas y receptores. El primer punto de contacto para algunos de ellos se encuentra a nivel de membrana, tema tratado en otro capítulo de esta misma obra. Sin embargo, existe un grupo de protagonistas cuya interacción se realiza dentro de la célula y cuya acción se define directamente en el núcleo de la célula. A este último tipo de interacción es a lo que nos abocaremos en este capítulo. En términos generales, y dado que la acción de los receptores se lleva a cabo en el núcleo, se les ha denominado genéricamente como receptores nucleares. Al inicio de la década de 1980, estos receptores estaban representados

únicamente por los receptores a andrógenos, progestágenos y con menor importancia, a receptores que en algunos animales inferiores promovían efectos específicos como el del ácido retinoico, mejor conocido como precursor de la vitamina A. Con el advenimiento de los estudios de clonación génica, mapeo y secuenciación de genes que tuvo su auge en las décadas de 1980 y, primordialmente, 1990, el número de genes cuya secuencia se parece a la de estos permitió establecer no solo una gran variedad de receptores, sino una relación incluso filogenética entre ellos. Actualmente ya no es suficiente con hablar de receptores nucleares, sino que es necesario explicar la súper familia que conforman. La súper familia de los receptores nucleares esta conformada por los receptores a andrógenos (AR), a estrógenos (ER), a progesterona (PG), a glucocorticoides (GR), a hormonas tiroideas (TR), para el ácido retinoico (RXR) y los receptores para vitamina D3 (VDR). A partir de estudios de comparación de secuencias se ha caracterizado una serie de proteínas que comparten con los receptores nucleares rasgos estructurales que en su mayoría están asociados a la inducción de la transcripción pero cuyo ligando no está caracterizado. Este grupo de receptores recibe el poco atractivo nombre de receptores huérfanos para denotar que se desconoce el ligando al cual responderían. Este campo es importante pues a partir de ellos se están realizando proyectos que demuestran su alto potencial farmacológico.

La terminología empleada por los especialistas en ocasiones es difícil. Sin embargo, la relación entre ella y lo que trata de explicar es relativamente sencilla. Así pues, el primer paso en la acción de una hormona es la interacción con una proteína de unión específica que puede estar situada en el exterior o interior de las células que componen aquellos tejidos donde una hormona determinada ejerce su efecto fisiológico. A dichas células se les denomina blanco, a la proteína específica se le conoce como receptor y a la hormona que se une al receptor se le conoce como ligando.

El receptor para una hormona determinada tiene una distribución apropiada en los tejidos donde la hormona ejerce su efecto fisiológico y está ausente en los tejidos donde la hormona no ejerce su efecto biológico. Debido a que las concentraciones de hormonas en los fluidos corporales son relativamente bajas, del orden de los pico gramos y nano gramos (millonésimas o mil millonésimas de gramo), el receptor debe tener una gran afinidad para

su hormona o varios sitios de unión que actúen de forma conjunta y potenciada entre sí. Para una célula blanco, el número de receptores es finito en un tiempo determinado por lo que la población de receptores es saturable, es decir, el exceso de una hormona determinada en circulación no implica que tenga un efecto superior al efecto fisiológico esperado pues estaría respondiendo solamente con la misma cantidad de receptores que tienen los sitios ocupados. Una analogía que podríamos presentar es el equivalente a tener cincuenta dardos somníferos disparados por una sola escopeta de dos tiros. A pesar de que podría eventualmente disparar todos los dardos, en cada ocasión tendrá solamente dos y disparará solamente uno cuando se jale del gatillo.

Una consecuencia de la interacción entre la hormona y el receptor es su temporalidad. Difícilmente podríamos explicar la razón por la cual un organismo es capaz de responder a un estímulo tan rápidamente si no se atendiera a la cinética de interacción. En ella, se tiene una velocidad de unión dependiente de la afinidad existente entre el receptor y la hormona. Un receptor que tenga una alta afinidad al ligando lo retendrá de manera preferente sobre aquel en el cual la afinidad es menor. De la misma manera, los receptores de baja afinidad raramente serán ocupados por el ligando. Esta interacción entre diferentes receptores y sus ligandos permiten que el efecto de una hormona con frecuencia decaiga rápidamente, debido a la reversión de la unión de la hormona con su receptor.

Cuando se introduce una hormona esteroidal marcada radiactivamente, después de un tiempo se puede detectar en el núcleo de las células blanco. Esto se debe a la interacción con su receptor específico. Sin embargo, ¿cuales son las características de este receptor?, ¿como se lleva a cabo la respuesta que implica la interacción de la hormona? A que se debe que no todos los organismos respondan a la misma dosis de estradiol cuando se trata de inducir el celo o sea necesario la aplicación de varias dosis de prostaglandinas para disminuir la cantidad de progestágenos que no permiten un nuevo servicio a una vaca?

Estructura de los receptores nucleares

Los receptores nucleares tienen una estructura modular, presentan 4 ó 5 diferentes dominios. Como se muestra en la figura 1, en el extremo amino terminal se encuentra una

serie de aminoácidos colocados en posiciones específicas a cada receptor que permiten la interacción del receptor con el aparato de transcripción que sintetiza el ARN durante la transcripción. En la mayoría de los receptores nucleares existen dos dominios de activación de la transcripción, el t_1 en los receptores de glucocorticoides (GR) y TAF1 en los receptores estrogénicos (ER) en la región A/B y sus análogos. El otro elemento activador de la transcripción, t_2 o TAF2, dependiendo del receptor, se encuentran en la región E. Ambos dominios son totalmente independientes en base al tipo de células, el promotor, el elemento de respuesta a la hormona (HRE), la concentración de receptores y de hormonas. En las diferentes regiones TAF1 / TAF2 pueden activar diferentes secuencias de genes ya que contienen diferentes factores específicos, a lo que se le llama selectividad de genes.

El número y tipo de secuencias de ADN que reconocen los receptores es también importante, a estas generalmente se les llama elementos de respuesta a la hormona o HRE por sus siglas en inglés. Para referirse específicamente a un HRE, se reemplaza la H en la primera inicial por la letra en particular de la hormona en cuestión, por ejemplo el ERE es el elemento de respuesta hormonal al estrógeno. TAF1 en los ER requiere varias copias del ERE para su actividad óptima, es estrógeno independiente y requiere grandes concentraciones de ER, mientras que TAF2 es estrógeno dependiente y actúa con bajas concentraciones de ER.

Otras dos funciones que frecuentemente se han atribuido a la región A/B las cuales son sinergismo de receptores y la selectividad de genes. El sinergismo de receptores es cuando se activa la transcripción en varios HREs, siendo esta mayor que la suma del efecto de HREs individuales, en los GR, ER y los de progesterona (PR) este sinergismo se encuentra en la región t_1 / TAF1.

Región C

Conocida como el dominio de unión del DNA (DBD), está formada por dos sitios de unión de zinc los cuales son coordinados por dos pares de cisteína separados por 10-15

aminoácidos, a esta estructura se le ha denominado dedos de zinc. La estructura esta formada por dos hélices, una al inicio de cada dedo extendiéndose mas allá de los dedos, la hélice localizada hacia el extremo amino terminal se une al surco mayor para poder unirse con la secuencia específica del DNA mediante la exposición que se hace de residuos de aminoácidos básicos. En las posición cisteína 9 en el receptor del ácido retinoico (RXR) existe una secuencia adicional de unión al DNA denominada “caja A“ localizada entre el aminoácido 23 al 29 después del segundo dedo, esta caja aumenta la eficiencia de unión al DNA ya que estabiliza el DBD. Esta región no se presenta en GR y ER, siendo posible que este elemento sea necesario para estabilizar la estructura del RXR.

Región D

Es una región que actúa como bisagra ya que se encuentra localizada entre el dominio de unión al DNA (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD).

En ella se encuentra un segmento de aminoácidos con características ácidas que son reconocidos por proteínas transportadoras que le permiten interactuar con los componentes del complejo de poro a través del cual el complejo hormona-receptor es transportado. Esa secuencia específica de aminoácidos es conocida como secuencia de localización nuclear (NLS). Esta región no se encuentra expuesta mientras el receptor no interactúe con su ligando. Por consiguiente, mientras no exista una estimulación hormonal, el receptor se mantiene en el citoplasma. Al interactuar con el ligando, la región de bisagra se modifica estructuralmente quedando expuesta la región de aminoácidos ácidos. Solo entonces, la hormona es capaz de ser transportada por el complejo de poro hacia el interior del núcleo.

Región E

El extremo carboxilo terminal de los receptores nucleares representa el punto de regulación más importante de la proteína. En él, se une el ligando, dándole la denominación al módulo. Sin embargo, y como señalamos anteriormente, contiene Cuatro funciones principales residen en la región E (LBD) .

La región que permite la activación de la transcripción. La función que permite tanto la activación de la transcripción como la regulación de la actividad del receptor radica igualmente en este módulo. A través de él, pueden interactuar otros receptores, dimerizándolos, o proteínas que eviten la activación de la transcripción, bloqueen la interacción del ligando con el receptor o que afecten su estructura tridimensional con lo que el receptor aunque esté presente, es incapaz de llevar a cabo la función biológica específica.

Una de estas proteínas que interactúan con el dominio LBD es la proteína de shock térmico hsp90. Las hsp reciben su nombre ya que son inducidas durante el choque de calor u otro estrés; estas proteínas son designadas por su masa molecular en KDa, las mas importantes en los receptores nucleares son la hsp 90, hsp70 y las hsp 56/59.

En la forma inactiva, el receptor se encuentra unido a un complejo proteínico en el cual se incluyen la hsp-56 y dos subunidades de la hsp-90. La hsp-90 mantiene una conformación espacial del receptor apropiada para ligar la hormona y previene a manera de una proteína chaperona, la traslocación del receptor vacío al interior del núcleo.

Región F

En la mayoría de los receptores nucleares, el LBD representa el extremo de la proteína. Sin embargo, en algunos casos como los ER, el extremo de la proteína está formado por una decena de residuos de aminoácidos a los cuales se les llama dominio F. Se considera que la región terminal del receptor coadyuva a la estructuración total del mismo permitiendo una estabilización del dominio de unión al ligando y de interacción proteica, distinguiendo los agonistas de los antagonistas en los receptores estrogenicos por lo que la denominan región E/F

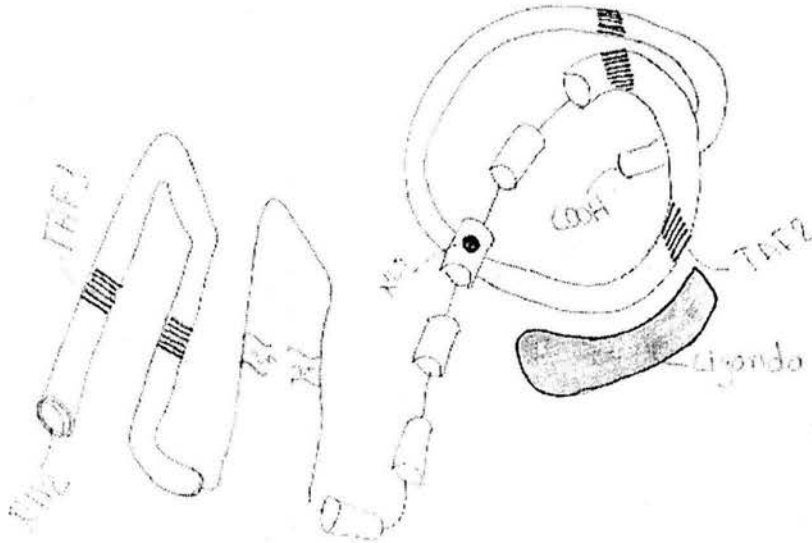


FIGURA # 1

Figura 1.- Estructura modular de un receptor nuclear. Las regiones sombreadas permiten la activación de la transcripción, la región de color sólido (NLS) permite a la proteína ser transportada del citoplasma al núcleo. El objeto sólido a la derecha representa el ligando.

Se presentan cinco regiones necesarias para la activación de la transcripción (zonas sombreadas) dos en el extremo aminoterminal (TAF1) del dominio A/B y tres en el carboxilterminal (TAF2) del dominio E/F, la línea continua corresponde al dominio C, conteniendo la zona de unión al ADN mediante los dedos de zinc (Zn), la estructura tubular representa a la región de la bisagra en donde se presenta la secuencia de localización nuclear (NLS)

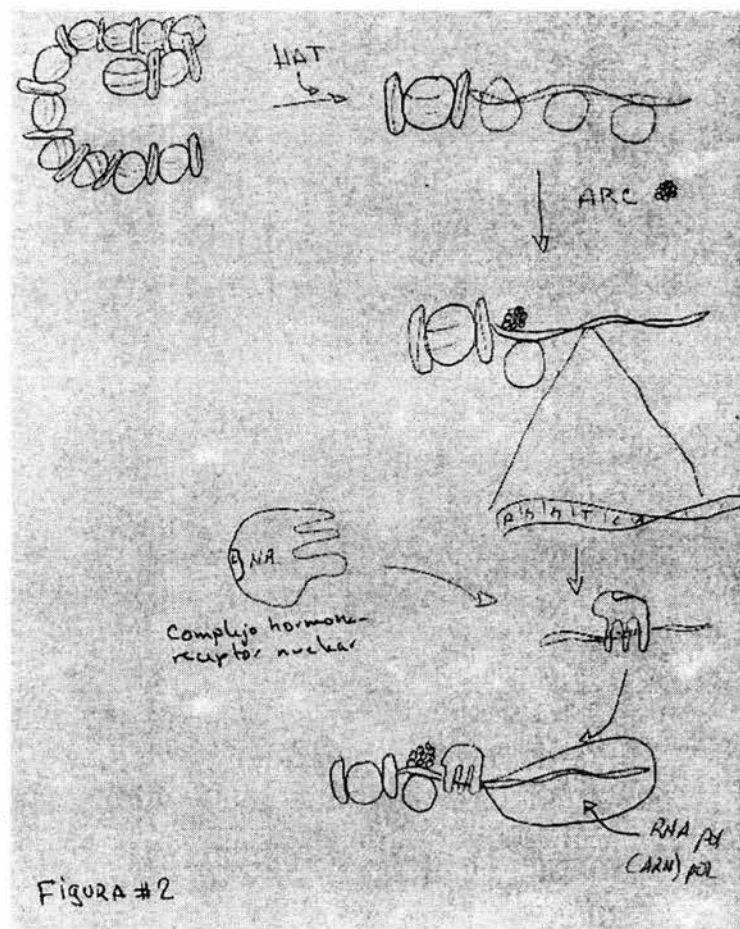


Figura 2.- Secuencia de eventos asociados a la acción de los receptores nucleares. La cromatina compacta en forma de nucleosomas asociada con represores pierde las histonas H1, H2a, H2b, por acción de la histona acetil transferasa (HAT). La disminución en la condensación exhibe la secuencia del elemento de respuesta (HRE) así como la asociación con complejos de activación (ARC). La interacción con el receptor nuclear asociado con la hormona con el HRE establece el vínculo necesario para la unión del ARN polimerasa II que lleva a cabo la transcripción.

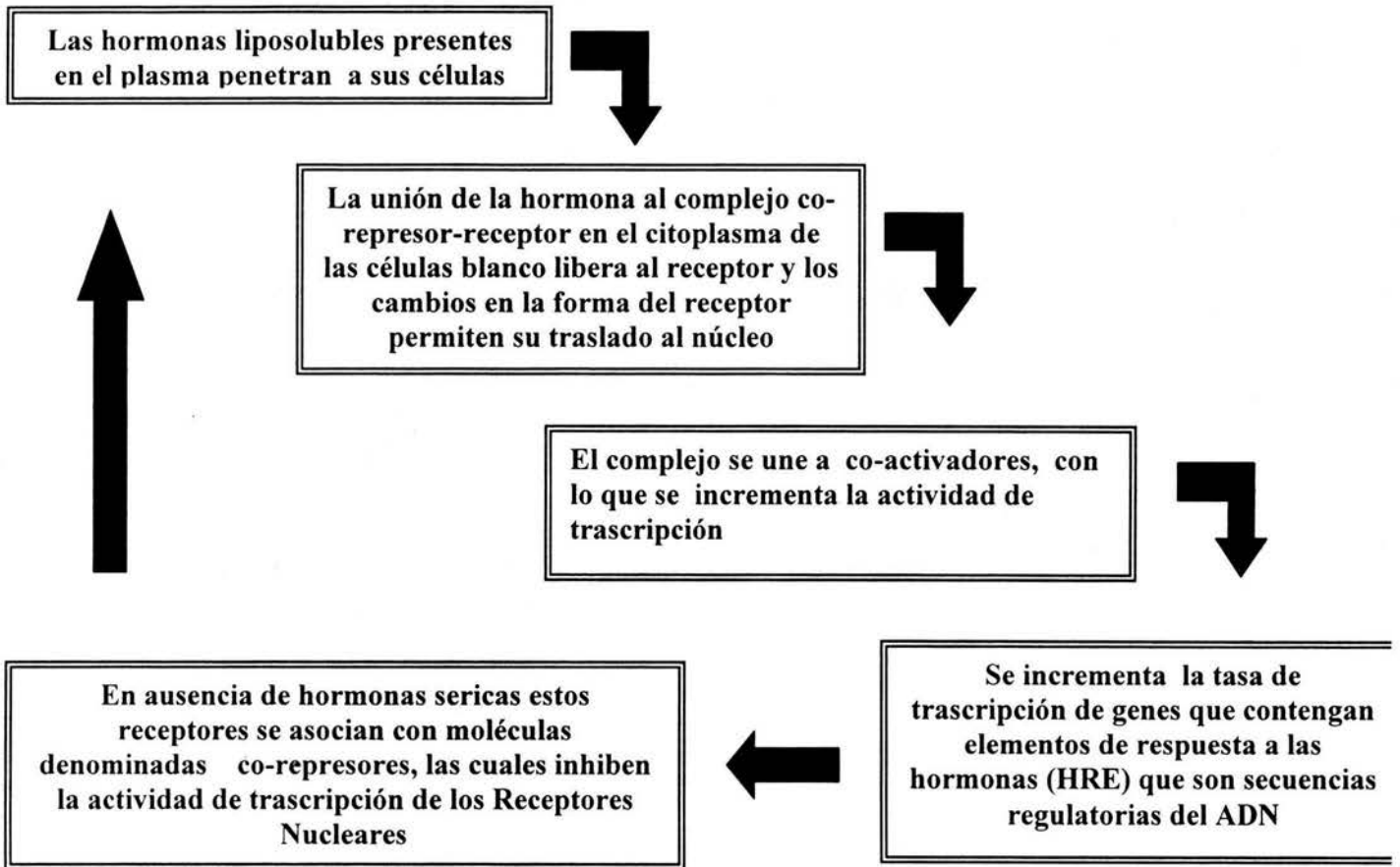
Modo de acción

Los receptores nucleares tienen tres formas de actuar: represión, desrepresión y la activación de la transcripción. La represión es característica de los receptores nucleares sin

ligando, quienes cuando se inyectan experimentalmente en el núcleo de las células, reclutan a complejos correpresores los cuales contienen actividad histona desacetilasa.

La desrepresión ocurre en seguida de la unión con el ligando cuando se separa del complejo correpresor y se asocia al primer complejo coactivador con actividad de histona acetil transferasa (HAT por sus siglas en inglés), lo que induce la descondensación de la cromatina, necesaria aunque no suficiente para la activación de los genes específicos en el ADN. En el tercer caso, la acción de las proteínas con actividad de HAT permite que los represores así como las histonas que mantenían inaccesible los sitios de regulación de la transcripción así como el impedimento físico para que se ensamble adecuadamente el complejo de transcripción con la ARN polimerasa II como complejo proteico efector. Esta disociación permite que al mismo tiempo se asocie a esas regiones los complejos activadores, del tipo TRAP/DRIP/ARC quienes establecen el contacto con la maquinaria de transcripción dando como resultado la activación de la transcripción en el genoma. esta es una visión muy esquemática siendo el orden preciso de los eventos todavía discutido, se debe hacer notar que este mecanismo no es general ya que algunos receptores nucleares pueden actuar como activadores sin la necesidad de ligando, siendo otros incapaces de unirse a su promotor en el genoma en ausencia de ligando siendo este conocido como represión.

Figura 3.- Modo de acción de los receptores nucleares



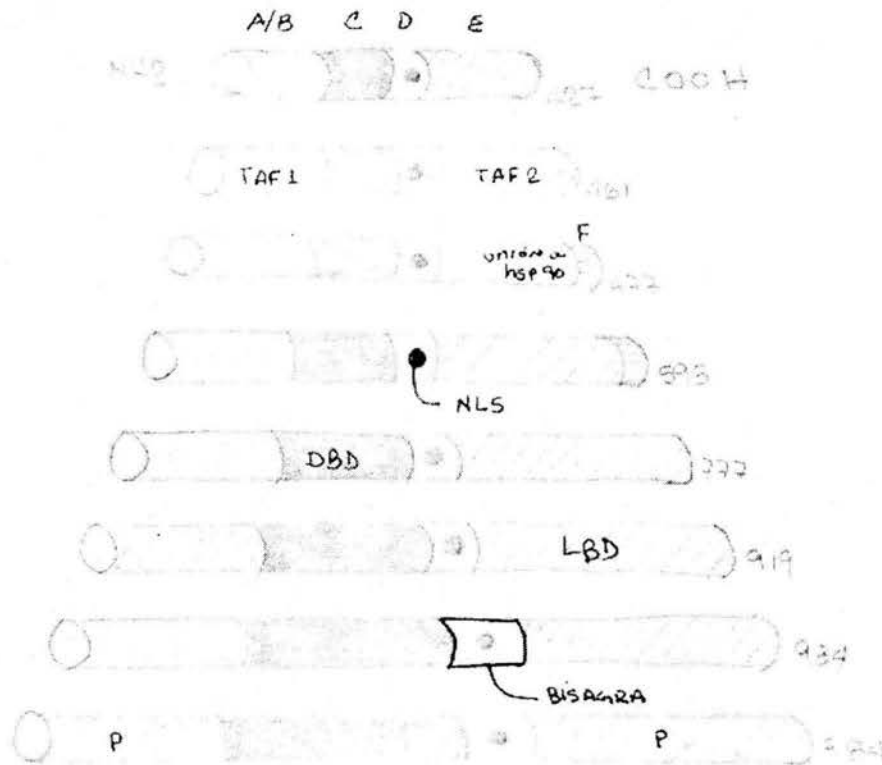


FIGURA # 4

Figura 4.- Receptores nucleares para diferentes ligandos. El numero de secuencias de amino ácidos cambia entre los diferentes receptores nucleares. Se representan las diferentes regiones de los receptores nucleares siendo la región A/B representada con puntos, la C en color sólido, la D sin color y un punto sólido al centro, la E con rayas diagonales y por último la región F con rayas horizontales. Se han colocado sobre las diferentes regiones de los receptores sus principales características las cuales son iguales para todos los receptores representados, con una excepción en la región F la cual es propia de los receptores estrogénicos α y β . La P marca los dominios del receptor en los cuales fosforila.

Receptores estrogénicos

Hasta la fecha han sido identificados dos isoformas de receptores estrogénicos (ER): los ER α y los ER β . Los estrógenos presentes en el plasma penetran a sus células blanco en

tejidos llamados “clásicos” que se encuentran en los ovarios en las células de la teca, el útero, glándula mamaria, placenta, hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, en las células intersticiales en el testículo y hueso. Las células blanco de este grupo de tejidos son ricas en ER α .

Existen otros tejidos considerados “no clásicos”, entre los que se incluyen próstata, las células de la granulosa del ovario, glándula pineal, glándula tiroides, paratiroides, adrenales y páncreas, así como la vesícula biliar, la piel, tracto urinario, tubulos seminíferos tejido linfoide, tejido eritroide, pulmón, epitelio intestinal y algunas regiones del cerebro que expresan poco ER α , pero que contienen cantidades significantes de ER β . El tejido muscular estriado es único, puesto que en él se expresa de manera elevada el ER β y está casi ausente el ER α .

Se ha podido establecer la pauta evolutiva de las proteínas que funcionan como receptores a estrógenos. Los dominios más conservados son los que tienen especial mantenimiento de sus secuencias. Así pues, comparando la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al ADN entre los ER β de bovino, humano y ratón se ha conservado en niveles superiores al 80%; en el extremo de unión al ligando, la conservación de la secuencia es entre el 86% y 89% comparado con el del ratón y el humano, respectivamente. En el extremo aminoterminal, y a pesar de que la función no está tan conservada, las variaciones son inferiores al 20%. Estas comparaciones se han demostrado igualmente mediante el análisis de las secuencias de ADN de los genes que los codifican. Podemos pensar que el ER β con 527 residuos de aminoácidos es una proteína importante para el funcionamiento no solo de los mamíferos, sino que ha sido conservada evolutivamente.

Ambos ER α y β son diferentes en cuanto a la eficiencia con que inducen la transcripción. Inicialmente, se había encontrado que la principal función la llevan a cabo los receptores ER α . Sin embargo, el empleo de las metodologías de ADN recombinante permitieron la clonación, caracterización y estudio tanto de los ER β así como de variantes adicionales de estos genes. Actualmente sabemos que de las dos variantes generales, hay moléculas que presentan a su vez cambios en su secuencia y estructura sin que se traten de genes adicionales. La explicación de estas nuevas variaciones depende de la forma en que se procesa el ARNm desde que se transcribe, hasta que es transportado al citoplasma donde finalmente será traducido en una proteína.

Al igual que una gran cantidad de genes eucariontes, el ADN contiene secuencias que son transcritas y además traducidas, mientras que otras aún siendo colineares con las anteriores son transcritas pero no traducidas por lo que no están representadas en la proteína. Al primer tipo de secuencias, Wally Gilbert les denominó exones, para diferenciarlas de los transcritos que conforma a los intrones y que permanecen dentro del núcleo.

Aún así, no en todos los casos la remoción de intrones y el empalme de exones proceso que en inglés se denomina splicing, implica la remoción total de los intrones y el empalme de todos los exones para formar el ARN que será finalmente traducido.

Cuando no están excluidos todos los intrones y/o solo algunos exones son selectivamente empalmados, a la proteína resultante se le denomina variante proteínica derivada de un empalme alternativo cuyo termino en inglés es splice variant con lo que se indica que no se trata de un gen alternativo, sino de un proceso en donde uno de los módulos de la proteína es cambiado por otro sin que tenga lugar mutación, recombinación o algún otro proceso que altere al gen. Los mecanismos moleculares tanto del proceso de corte y empalme general como el alterno están bien documentados e incluso hay algunos autores que lo toman como un mecanismo que amplía la variabilidad con que cuenta el organismo .

En el caso particular de los ER β , los dominios carboxilo terminal, el de unión al ADN y amino terminal son los que presentan variantes en el corte y empalme. En el testículo humano la variante ER β cx presenta variación a partir del exon 8 en el cual se presenta un exon alterno que codifica para 23 residuos de aminoácidos en lugar de los 65 que deberían estar presentes si se empalmara el exon 8 clásico. Obviamente la consecuencia funcional de este cambio es la eficiencia con que se induce la transcripción al estar comprendida dentro de la región que activa la transcripción (TAF2). Comparativamente, la variante que incluye al exon 8, el receptor puede unirse con el ligando pero no así con el ERE en al ADN. Aunque este funcionamiento pudiera parecer inadecuado, también es importante pues regula la población de ligando unido a receptores que tengan una conformación adecuada para llevar a cabo la transcripción por lo que solamente una población adecuada de receptores bien conformados son los encargados de que se transcriban a un determinado nivel los genes específicos, aunque el tejido se encuentre en un ambiente en donde la presencia de ligandos sea mucho mayor a la requerida para el óptimo funcionamiento . De

la misma forma, la variante ER β cx puede formar dímeros con el ER α más que con el ER β por lo que interfiere en el proceso de transcripción dependiente de ER α .

Si se compara la secuencia de aminoácidos entre los ER α y ER β , ambos receptores presentan 96% de homología de sus aminoácidos constituyentes, aunque no es una regla aplicable a todas las regiones del receptor; ya que en las regiones DBD y LBD solo existe una similitud de 53%. Aunque no se han demostrado experimentalmente, estos datos sugieren que el ER β puede reconocer y unirse a ERE similares a los que el ER α reconoce y une. Sin embargo, cada uno de ellos tienen una afinidad diferente por los distintos ligandos. Por otro lado, la poca similitud entre los dos receptores en las porciones TAF1 y TAF2 sugiere que diferentes tipos de proteínas interactúan en los complejos de transcripción y éstas actúan sobre tejidos específicos.

Existen evidencias experimentales que muestran cómo los dos receptores se unen a ERE clásicos, con similar afinidad como lo es el 17 β -estradiol, con 0.06nM para el ER β y con 0.02nM para el ER α . Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando diferentes ligandos, como el coumestrol y la genisteína, muestran preferencia por el ER β (33,34).

El ER α juega un papel importante en la proliferación de células y el aumento de peso del útero. El ER β ejerce acciones similares a nivel uterino, pero requiere concentraciones mayores del ligando que el ER α . Cuando el ER α se encuentra ocupado por estrógenos, disminuye marcadamente la cantidad de ARNm que codifica para los receptores de progesterona (PR) y de andrógenos (AR). En contraste, cuando el ER β se encuentra unido a su ligando con baja afinidad, solamente induce una disminución marginal en PR y AR. Cuando ambos ER, α y β se encuentran ocupados, aparentemente trabajan en cooperación incrementando la supresión de ARNm del PR. La acción sinérgica de ambos tipos de ER sobre los PR sólo se ha observado en las células epiteliales del lumen uterino. Algunos autores sugieren que el ER α es el que regula a los PR en el útero por sí solo, mientras que la expresión del AR es predominantemente regulada por el ER α , pero puede ser modulada por el ER β .

Tanto los estrógenos como los ER α y ER β son de importancia en los tejidos del ovario; los estrógenos son producidos por las células de la granulosa en el folículo ovárico durante la vida reproductiva, siendo el ER α el que más se expresa en las células intersticiales del

estroma y en las células de la teca. El ER β se sintetiza principalmente en la granulosa de los folículos en crecimiento, aunque también se puede expresar en algunas células del estroma ovárico de algunas especies .

En modelos experimentales tales, como los ratones, en los cuales no se expresa el receptor estrogénico β (ER β -/-); los folículos ováricos muestran atresia progresiva y por consiguiente, reducción en la ovulación.

Los estrógenos también juegan un papel importante en la reproducción del macho, ya que en los vasos deferentes y rete testis del testículo se expresa gran cantidad de ER α , mientras que en el epidídimo se expresan tanto los ER α como los β . La rete testis transporta los espermatozoides al epidídimo para su maduración. Aquí se lleva a cabo la absorción de una buena parte del líquido que acompaña a las células espermáticas provenientes de la rete testis. Esta acción es mediada por estrógenos, que al incrementar la concentración espermática, favorecen su sobre vivencia y maduración. La deficiencia de estrógenos o la insensibilidad tisular a ellos resulta en la acumulación de fluidos en los vasos deferentes, un incremento del peso testicular y una atrofia posterior de dichas gónadas .

Además de las funciones en los órganos reproductivos, los ER α juegan un papel muy importante en la remodelación ósea. Se ha demostrado que la ausencia del ER α o una baja cantidad de estrógenos, disminuyen la remodelación ósea. La sola presencia de los escasos ER β aun ante elevadas concentraciones de estrógenos no es suficiente para este fin.

En el SNC, el ER α está presente en las neuronas localizadas en el área preoptica medial, en los núcleos hipotalámicos arqueado, ventromedial y en la amígdala. Todas estas áreas están involucradas en la regulación de la función gonadal y son responsables de la conducta sexual. El ER β se expresa en la corteza cerebral, el hipocampo, así como en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, donde el ER α no se encuentra o al menos no ha sido identificado .

El patrón de distribución de ambos receptores sugiere que tienen diferentes funciones en el cerebro. En modelos experimentales con ratones knocked out, es decir, que no expresan el ER α (ratones ER α ^{-/-}); no se han encontrado alteraciones en el SNC. Sin embargo, se han detectado cambios importantes en la morfología del cerebro en ratones ER β -/-, tales como la hipocelularidad en el cerebro, así como un déficit de tipo somatosensorial a nivel de la

corteza cerebral; siendo, en cambio, marcada la proliferación de células de la astroglia en el sistema límbico, mas no en la corteza .

En el sistema cardiovascular se expresan tanto los ER α como los ER β (42). Aquí los estrógenos inhiben la respuesta vascular al daño y el desarrollo de aterosclerosis. El efecto protector de los estrógenos probablemente se deba a la inhibición de la proliferación celular en el músculo liso vascular y a la estimulación del tamaño de las células endoteliales, produciendo vaso dilatación .

Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos

Los estudios de la fisiología de los ER han tomado ventaja de la acción de sustancias moduladoras selectivas de los receptores estrogénicos (SERM), fármacos que actúan como ligando en el LBD del receptor estrogénico. Al unirse un SERM a un LBD de los ER, promueven los cambios de conformaciones del receptor, activándolo así de diferentes maneras, como agonista o antagonista. Lo anterior depende del tipo de célula y la presencia de los promotores y correguladores asociados . Actualmente, los principales usos que se le ha dado a los SERM es como un componente en la terapia de tumores dependientes de estrógenos que se desarrollan en la glándula mamaria y la próstata.

Un promisorio descubrimiento se refiere al uso del raloxifeno como un inhibidor potencial de la proliferación de tumores mamarios, siendo su aplicación principal la prevención de osteoporosis, con la consecuente disminución del riesgo de fracturas por el incremento de la densidad mineral ósea. También se han demostrado efectos benéficos del raloxifeno en el sistema cardiovascular y en el útero, donde actúa como antagonista estrogénico (figura 5).

Figura 5.- Efectos de dos diferentes SERM Tamoxifeno y Raloxifeno

Efectos de → ↓ Sobre	<i>Tamoxifeno</i>	<i>Raloxifeno</i>
Útero	Agonista aumento de tamaño	Antagonista bloquea implantación
Glándula mamaria	Antagonista no lactación	Antagonista no acción de oxitocina
Hueso	Antagonista desmineralización osea	Agonista activación osteoclastos
Sistema Cardiovascular	Episodios tromboembolicos	Efectos benéficos vasodilatación

Paginas web recomendadas.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=structure>

<http://nrr.georgetown.edu/NRR/nrrhome.htm>

Lecturas recomendadas.

Robinson-Rechavi M, Escribia GH, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. Journal of cell science 2003;116:585-586.

Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setién A, Villa-Godoy A, Serrano H. Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales: Receptores estrogénicos. Revista Veterinaria México (en prensa).

Nillson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Anderson G ,et al. Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev.2001;81:1535-1565

Control reproductivo del vampiro. ¿Otra alternativa de control?

Juan José Pérez-Rivero Cruz y Celis¹

Héctor Serrano²

Octavio de Paz³

Álvaro Aguilar-Setién⁴

Resumen.

El control del *Desmodus rotundus* no han cambiado desde los años 70. Las técnicas de control empleadas hasta la fecha son basadas en anticoagulantes.

Las restricciones cada vez mayores en el uso de sustancias tóxicas a nivel mundial, genera la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control de este quiróptero. Una de estas, es el control reproductivo utilizando coumestrol, un fitoestrogeno, que se une con afinidad similar al estradiol a los receptores estrogénicos beta (ER β) y produce alteraciones reproductivas en diferentes mamíferos.

Para la detección de los ER β , se utilizaron porciones de 1mm³ de testículos, de dos *D. Rotundus*, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente y sumergidos en varias concentraciones de coumestrol, posteriormente se realizó un squash convencional sin fijador observándose al microscopio de fluorescencia, detectando la presencia de abundantes ER β en la concentración equivalente a 25mM en el tejido testicular del *D. rotundus*.

En un segundo estudio utilizando 5 machos y 5 hembras de *D. rotundus* en grupos experimentales a los cuales se les administró coumestrol 200 μ g/día por vía oral durante 30 días y 5 machos y 5 hembras en el grupo control, los cuales solo recibieron vehículo (DMSO) por vía oral por 30 días, se encontró que el coumestrol induce alteraciones reproductivas microscópicas en los animales tratados, como la pérdida de la arquitectura celular en testículos y ovarios.

La presencia de ER β en el testículo del *D. rotundus*, abre la posibilidad de utilizar al coumestrol como una alternativa en el control reproductivo de este quiróptero.

¹ Estudiante de Postgrado Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM .
jjperez1_1999@yahoo.com + 52 55 55 31 71 56 y + 52 55 21 36 64 22

² Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa

³ CENID-Microbiología, INIFAP (Retirado)

⁴ IMSS Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI