



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

“Efecto de la microinyección de alcohol en POA-AHA, sobre el eje
hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata adulta”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

ESTEBAN OLVERA JUÁREZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Efecto de la microinyección de alcohol en POA-AHA, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata adulta.

Tesis presentada por: Esteban Olvera Juárez

Directora de tesis: Dra. María Esther Cruz Beltrán

**Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción
Laboratorio de Neuroendocrinología**

**Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero del PAPIIT
Convenio IN 214508 y CONACYT 81898.**

AGRADECIMIENTOS

A mi abuelita Rafaela por su amor incondicional.

A mis padres Guadalupe Miguel y Guillermina por su cariño, comprensión, apoyo pero sobretodo por darme la oportunidad de estudiar y hacer lo que a mí me gusta.

A mis hermanos Oscar y Yanín por su alegría y porque son mi mayor estímulo para salir adelante.

A mi directora de tesis la Dra. María Esther Cruz Beltrán por sus enseñanzas y cuando lo necesito siempre tiene una palabra de aliento.

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

*Dr. Roberto Domínguez Casalá
Dra. María Esther Cruz Beltrán
Dra. Patricia Rosas Saucedo
Dra. Leticia Morales Ledesma
M en IBSH. Angélica Flores Ramírez*

A todos los integrantes de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por ser mi otra familia.

A todos mis familiares por impulsarme a crecer como persona y profesional.

A todos los Perjuros ya que como los grandes amigos están en las buenas y en las malas.

A mis compañeros de generación por todas las vivencias.

Para las personas creyentes, Dios está al principio. Para los científicos está al final de todas sus reflexiones.

Max Planck (1858-1947) Físico alemán.

INDICE	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	6
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO	6
ELHIPOTÁLAMO	6
LA GnRH Y NEURONAS GnRHÉRGICAS	8
LA HIPÓFISIS	11
EL OVARIO	12
EL CICLO ESTRAL	17
LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS	18
EFECTOS FUNCIONALES ASIMÉTRICOS DEL HIPOTÁLAMO SOBRE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y LAS FUNCIONES DEL OVARIO	24
EL ALCOHOL	27
EFECTOS DEL ALCOHOL SOBRE EL SISTEMA REPRODUCTOR	32
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	35
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	38
RESULTADOS	46
OVULACIÓN	46
CONCENTRACIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE	47
CONCENTRACIÓN DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO	48
CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL	49
CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA	50
EFECTOS DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA IZQUIERDA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE- α	51
EFECTOS DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA DERECHA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE- α	51
EFECTO DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA IZQUIERDA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE- β	53
EFECTO DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA DERECHA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE- β	53
EFECTO DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA IZQUIERDA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LA GnRH	55
EFECTO DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA DERECHA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LA GnRH	55
ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

Las investigaciones llevadas a cabo para estudiar los mecanismos por los cuales el alcohol altera el eje hipotálamo-hipófisis-ovario se han llevado a cabo en la rata, específicamente en el día del proestro. Estos estudios valoran los efectos del alcohol a tiempos muy cortos, es decir, entre las 4 y 12 horas posteriores a la administración intraperitoneal o intra-gástrica de alcohol. Otro de los efectos del alcohol en el humano es el aumento del flujo sanguíneo cerebral del hemisferio frontal derecho, lo que explica porque su consumo produce euforia. En la rata, el hipotálamo regula de manera asimétrica la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

Con base en estos hechos, en esta tesis se decidió analizar los efectos de la microinyección de alcohol en la porción izquierda o derecha del área preóptica-hipotalámico anterior (POA-AHA), sobre la expresión del ARNm del receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$), de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la concentración sérica de gonadotropinas, de hormonas esteroides (17 β -estradiol y progesterona) y la ovulación en horas posteriores a la inyección; en diestro-2 (13:00 h) para evaluar los efectos inmediatos del alcohol y en proestro (09:00 y 17:00 h) para valorar los efectos sobre la secreción preovulatoria de estradiol (E_2), progesterona (P_4), hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona Luteinizante (LH). Para lo cual se utilizaron ratas adultas (3 meses de edad), cíclicas (ciclos de 4 días) de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso al alimento y agua. A las 9:00 horas del diestro-1, los animales fueron microinyectados con 1 μ l de etanol al 50%, durante un minuto, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. Los animales fueron sacrificados en el día del estro esperado, se buscaron los ovocitos en las trompas uterinas y en el suero se cuantificó por radio-inmuno-ensayo la concentración de P_4 , E_2 , LH y de la FSH. Del cerebro se extrajeron las porciones derecha e izquierda de POA-AHA, en las que se cuantificó la expresión del ARNm de la GnRH, del $RE\alpha$ y del $RE\beta$ por la técnica de retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Como grupo testigo se utilizaron animales

cíclicos, sin tratamiento, sacrificados en las mismas horas y días del ciclo que los grupos experimentales.

La inyección de etanol en la porción izquierda o en la derecha de POA-AHA provocó el bloqueo de la ovulación en todos los animales inyectados. Lo que se acompañó de bloqueo de la secreción preovulatoria de la LH en la tarde del proestro, de la disminución en las concentraciones basales y preovulatoria de estradiol, así como del aumento en la concentración de progesterona al medio día del diestro-2. Con respecto a la secreción preovulatoria de FSH en la tarde de proestro, la inyección de etanol en el lado izquierdo de POA-AHA la bloqueó, mientras que la inyección del solvente en el lado derecho no la modificó.

La inyección de etanol en el lado izquierdo de POA-AHA provocó: 1) ausencia del ARNm del $RE\alpha$ en todas las horas estudiadas, 2) ausencia del ARNm del $RE\beta$ al medio día del diestro-2 y en la mañana del proestro, así como desplazamiento del valor máximo hasta la tarde de este día y 3) disminución del mensajero al medio día del diestro-2 en ambas porciones de POA-AHA en ambos lados de POA-AHA. En cambio, la inyección del alcohol en el lado derecho resultó en: 1) la inversión el patrón de expresión del mensajero para el $RE\alpha$ respecto al animal intacto en ambos lados de POA-AHA, 2) el desplazamiento del valor máximo del mensajero hasta la tarde del proestro y 3) el aumento constante de la expresión del ARNm para la GnRH en la porción izquierda, mientras que en la derecha se invirtió el patrón de expresión de este mensajero.

El bloqueo de la ovulación, resultado de los efectos tóxicos del alcohol sobre el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, es consecuencia de alteraciones asimétricas en los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Estos mecanismos están relacionados con la expresión del mensajero del $RE\alpha$, que en consecuencia regularía la forma de secreción de la GnRH, lo que repercutió en la ausencia de la secreción preovulatoria de LH y los efectos asimétricos sobre la secreción preovulatoria de la FSH.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, existen poco más de 32.3 millones de mexicanos que consumen bebidas alcohólicas; de estos, 22.7 millones reportan como bebida preferida la cerveza, 14.7 los destilados, 7.3 los vinos de mesa, 3.8 las bebidas preparadas tipo “coolers”, y 2.4 millones ingiere aguardientes, pulque o alcohol de 96°, que son más comunes en poblaciones rurales. El 41.7% de la población de 12 a 29 años de edad consume alcohol. El 25.8% de las personas entre 12 y 17 años son bebedores, de este porcentaje el 30.7% son hombres y el 20.9% son mujeres; de las personas entre los 18 y 29 años de edad, el 52.5% son bebedores, 68.5% son varones y 40.4% son mujeres (INEGI 2002).

El alcohol que se consume oralmente es rápidamente absorbido a través de las paredes del estómago hacia el torrente sanguíneo. Una vez en el cerebro, actúa en diversas áreas como el área tegmental ventral, el núcleo *acumbens*, la corteza frontal, el hipocampo e hipotálamo, entre otras. Por lo tanto, el beber alcohol causa una amplia gama de cambios en las funciones cerebrales. Generalmente actúa como un amortiguador o tranquilizante de la actividad cerebral. Beber alcohol causa disminución en la atención, reduce las inhibiciones, provoca cambios de humor como euforia, disminuye la ansiedad y produce somnolencia. Beber demasiado puede causar letargo, confusión, conversación torpe, pérdida del control motriz, amnesia, inconsciencia, falta de respiración e incluso la muerte (<http://www.camporenacimiento.com.mx/>).

En los humanos, monos y pequeños roedores como la rata, el alcohol disminuye las funciones reproductivas (Cicero, 1997). En la rata macho adulta la administración intra-peritoneal (i.p.) de alcohol causa disminución en la secreción de testosterona (Rivier, 1999). En la rata hembra, la inyección crónica de alcohol bloquea el ciclo estral, retrasa la pubertad, eventos que están asociados con modificaciones en la secreción de las gonadotropinas. Dicho efecto parece ser

consecuencia de una rápida inhibición de la liberación pulsátil de la LH, pero no sobre la FSH (Rettori, 1997).

En la mañana del proestro, la administración de alcohol en el peritoneo, bloquea la secreción preovulatoria de LH, disminuye la secreción de E_2 e incrementa la de P_4 , causa luteinización en los folículos y reduce la activación de las neuronas GnRHérgicas en la tarde del proestro (LaPaglia, 1997).

En la rata hembra, las áreas preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) y hipotálamo medio regulan de manera asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación (Gerendai y col, 1978; Bakalkin y col, 1984; Inase y Machida, 1992; Nance y Moger, 1982; Fukuda y col, 1984; Nance y col, 1984; Morán y col, 1994; Cruz y col, 1989; Sánchez y col, 1994; Arteaga-López y col, 2003). Esta función asimétrica es provocada por el diferente contenido de GnRH entre el lado derecho del hipotálamo medio basal y el izquierdo (Gerendai y col, 1978); la síntesis del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH también es asimétrica y varía durante el ciclo estral (Arteaga-López y col, 2003): la expresión del ARNm para los $RE\alpha$, $RE\beta$ en POA-AHA cambia durante el ciclo estral (Arteaga-López y col, 2003). En el ratón macho el número de células inmunoreactivas a GnRH es mayor del lado derecho del cerebro que del lado izquierdo (Inase y Machida, 1992).

La mayoría de la información que se conoce acerca de los efectos del alcohol sobre el eje reproductor se ha realizado en el día del proestro. Sin embargo, las mujeres que consumen alcohol no lo hacen exclusivamente durante la etapa del ciclo previo a la ovulación, por lo que resulta interesante saber los efectos que causa este disolvente en otros momentos del ciclo reproductor. Por lo tanto, en este estudio se analizaron los efectos del alcohol suministrado a ratas en la etapa de diestro-1, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

Así mismo, se decidió analizar si el alcohol tiene efectos asimétricos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, ya que se conoce que el flujo sanguíneo cerebral del hemisferio frontal derecho aumenta por los efectos del alcohol y en consecuencia produce euforia (Tiihonen y col, 1994). Por ello se analizaron los efectos de la inyección de una solución de alcohol al 50%, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, realizada en el diestro-1, sobre la expresión del ARNm de la GnRH, del RE α , del RE β , de la concentración sérica de gonadotropinas (FSH y LH), de hormonas esteroideas (E₂ y P₄) y la ovulación en horas posteriores a la inyección.

ANTECEDENTES

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

La función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es regular los procesos reproductivos (Welsh y col. 1998).

Las funciones principales de los ovarios, son la síntesis de hormonas esteroides, el crecimiento y la diferenciación de los folículos, que culminan o no en la ovulación, son reguladas por la LH y la FSH (Ferin, 1998; Tresguerres, 2003; Yao y Bahr, 1998). La síntesis y liberación de estas gonadotropinas es regulada por la GnRH, cuya secreción es modulada por las hormonas esteroides, péptidos, opioides, neurotransmisores y aminoácidos (Yao y Bahr, 1998).

En los roedores, la GnRH es secretada por neuronas localizadas en el área preóptica (POA). Estas neuronas denominadas GnRHérgicas, establecen contacto con los capilares y venas del sistema porta hipotálamo-hipofisiario, donde se libera la GnRH, la que es transportada a la hipófisis anterior donde estimula la secreción de gonadotropinas de manera pulsátil (Ferin, 1998).

Las gonadotropinas son glucoproteínas constituidas por dos subunidades: una alfa (α) y otra beta (β). La actividad de estas hormonas requiere de la asociación de ambas subunidades, las que son sintetizadas y combinadas en los gonadotropos de la hipófisis anterior (Ferin, 1998; Schwartz, 2000).

EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y está dividido por el tercer ventrículo en hipotálamo derecho e izquierdo (McGeer y col, 1987). Para su estudio, el hipotálamo se divide en núcleos y áreas (Ganon, 2001).

Los núcleos son conglomerados de cuerpos neuronales (Norris, 1996), mientras que las áreas son sectores de tejido en los que se reconoce una clara delimitación arquitectónica. Según Palkovits (2000), el hipotálamo se divide en cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente: POA, hipotálamo anterior, hipotálamo medio e hipotálamo posterior. La porción del hipotálamo en la que nos enfocamos en este estudio es el área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA), localizada en la parte rostral o anterior del encéfalo (Figura 1) (Norris, 1996; Palkovits, 2000).

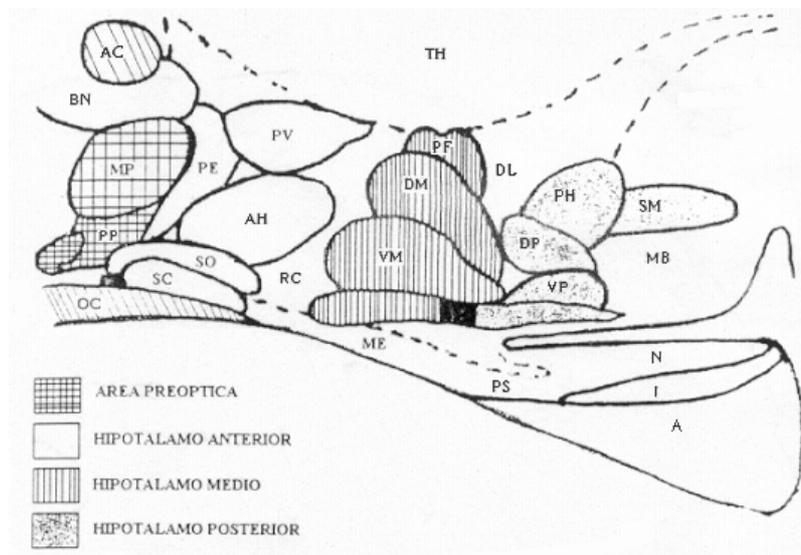
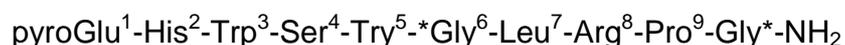


Figura 1. Corte sagital del cerebro de la rata, que muestra la distribución topográfica de los núcleos y áreas del hipotálamo. A: Hipófisis anterior, AC: comisura anterior, AH: núcleo hipotalámico anterior, Bn: base del núcleo de la estría terminal, DL: área hipotalámica dorsolateral DM: núcleo dorsomedial, DP: núcleo dorsal premamilar, I: lóbulo de la hipófisis intermedia, MB: cuerpo mamilar, ME: eminencia media, MP: núcleo preóptico medial, N: hipófisis posterior, OC: quiasma óptico, PE: núcleo hipotalámico periventricular, PF: núcleo perifornical, PH: núcleo hipotalámico posterior, PP: núcleo preóptico periventricular (medio), PS: tallo hipofisario, PV: núcleo paraventricular, RC: área retroquiasmática, SC: núcleo supraquiasmático, SM: núcleo supramamilar, SO: núcleo supraóptico, TH: tálamo, VM: núcleo ventromedial, VP: núcleo premamilar ventral (Palkovits 2000).

LA GnRH Y NEURONAS GnRHérgicas

El neuropéptido conocido como GnRH es un decapeptido cuya secuencia es la siguiente (Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000).



En la rata, las neuronas GnRHérgicas, se originan de la placoda olfatoria, migran principalmente a POA-AHA y algunas son encontradas en el hipotálamo medio basal (MBH) (Funabashi y col, 2002). En el adulto, estas neuronas se localizan como redes extensas y difusas distribuidas a lo largo de la ruta septo-preóptica-infundibular (Silverman, 1994).

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

Existen al menos 13 formas distintas de la GnRH que han sido aisladas en diferentes vertebrados. Una sola especie posee de dos a tres formas de GnRH que podrían tener distintas funciones a la de solo estimular la liberación de las gonadotropinas (Parhar, 2002). En la rata se han detectado dos de ellas, la GnRH-I y GnRH-II (Chen y col, 1998).

La GnRH se sintetiza como parte de un precursor (pro-GnRH), que consiste de 92 aminoácidos, dividido en tres partes: un péptido de 23 aminoácidos, seguido por una secuencia de Gly-Lys-Arg esencial para el procesamiento proteolítico y por un residuo de 56 aminoácidos conocido como péptido asociado con la GnRH (GAP, por sus siglas en inglés) (Adelman y col, 1986; Yen, 2001).

La GnRH es codificada por un gen integrado por 4 exones: el primero (I) contiene la región 5' no traducida; el exón dos (II) codifica para el péptido señal del

decapéptido de la GnRH, para el sitio de amidación y para el sitio del precursor, también codifica para el sitio de amino terminal de once aminoácidos de un segundo péptido asociado de 56 aminoácidos denominado GAP, el cual contiene el segmento prepro-GnRH; el exón tres (III) codifica para los siguientes 32 residuos del GAP; el exón cuatro (IV) codifica para los últimos trece aminoácidos del GAP, para el codón de terminación y para la región 3' no traducida del ARN mensajero (Fan y col, 1995; Herbison y col, 2001; Jennes, 1989; Kakar, 1997; Suzuki y col, 1995).

El procesamiento molecular en el interior de las neuronas de GnRH ocurre fundamentalmente en el núcleo. Después de la transcripción y el procesamiento del gen de la Pro-GnRH, el ARNm es transportado hasta el citoplasma, donde tiene lugar la traducción con la generación de GnRH (Figura 2). Luego los productos, GnRH y GAP son transportados hasta las terminaciones nerviosas y secretadas a la circulación (Yen, 2001).

La cantidad de ARNm de la GnRH del hipotálamo cambia durante el ciclo estral; existen dos máximos, uno que ocurre de las 11:00 a las 18:00 horas del diestro-2 y otro a las 15:00 horas del proestro (Gore y Roberts, 1997).

En la rata macho y hembra la cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es significativamente mayor que en el izquierdo (Gerendai y col, 1979; Bakalkin y col, 1984). Es posible que esta asimetría este definida por el momento y el tipo de participación de los diversos sistemas de neurosecreción que regulan la síntesis y liberación de la GnRH (Gerendai y col, 1979).

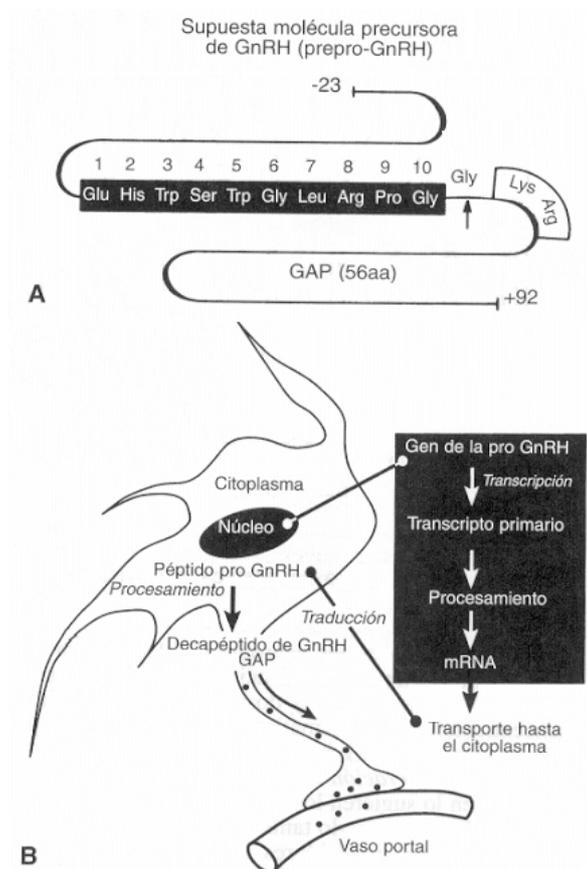


Figura 2. **A.** Representación esquemática de la estructura y la secuencia de 92 aminoácidos de la prepro-GnRH. El decapeptido (aminoácidos 1 a 10) ocupa el lugar intermedio entre el péptido señal y la secuencia Gly-Lys-Arg. La flecha indica el sitio de procesamiento proteolítico y la amidación del C-terminal de la molécula de GnRH. **B.** Procesamiento molecular del decapeptido de GnRH. En el núcleo, el gen de pro-GnRH es procesado a ARNm después de la transcripción; el ARNm es transportado hasta el citoplasma del cuerpo celular (soma), donde se genera el péptido pro-GnRH y del péptido asociado con la GnRH (GAP). Luego la GnRH y el GAP son transportados hasta las terminaciones nerviosas y secretados en la circulación porta (Yen 2001).

La secreción de GnRH es regulada por neurotransmisores (acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina), aminoácidos (ácido gama amino butírico (GABA), ácido glutámico, aspartato, glicina), opioides, péptidos y hormonas esteroides (Norris, 1996). En los roedores, el esteroide con mayor actividad biológica que regula la secreción de la GnRH es el E₂ (Ferin, 1998).

LA HIPÓFISIS

La hipófisis se encuentra en la base del cerebro alojada en el esfenoideas y cubierta por la duramadre (Fink, 2000). Está unida al hipotálamo por el tallo hipofisario el cual contiene el sistema porta hipofisario de vasos sanguíneos. Es un órgano complejo dividido en tres partes: el lóbulo anterior, el lóbulo intermedio y el lóbulo posterior. El lóbulo anterior y el intermedio forman una glándula endocrina verdadera llamada adenohipófisis. El lóbulo posterior también llamado neurohipófisis es una extensión del hipotálamo (Arimura, 2000).

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

Las hormonas hipofisarias se liberan a la circulación y estimulan la secreción hormonal en sus órganos blancos. La FSH y la LH estimulan las funciones de los ovarios. Su secreción se ve influenciada por la concentración de hormonas esteroides y el patrón de secreción de la GnRH entre otros (Figura 3) (Arimura, 2000; Brown, 1994; Guyton y Hall, 2001).

Una vez sintetizado el péptido, es transportado en la vesícula hasta la terminal sináptica que finaliza en la eminencia media, y ahí es liberado en los vasos del sistema portal hipotalámico-hipofisario. La liberación de ésta hormona se realiza

por exocitosis en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje (Sitges, 1993). Como resultado de la entrada de calcio se activan las enzimas proteolíticas que degradan la membrana plasmática, de tal forma que el péptido es liberado (Charli y col, 1991).

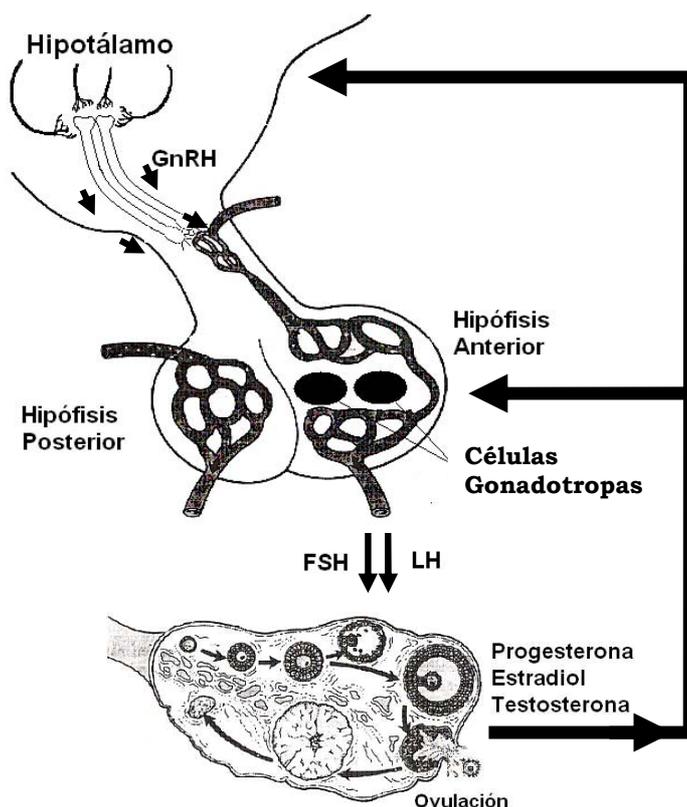


Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y en la hipófisis estimula la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas gonadotropinas llegan a los ovarios y estimulan la secreción de progesterona, testosterona y estradiol (Tomada de Berne y Levy, 1992).

EL OVARIO

El ovario es el órgano reproductor primario. En él se producen los gametos femeninos y se sintetizan hormonas que participan en la regulación de las funciones reproductivas y del metabolismo en general. En los vertebrados, este órgano es pareado y se localizan a ambos lados de la cavidad pélvica, están suspendidos en un pliegue peritoneal llamado mesovario. La arteria ovárica (o arteria útero-ovárica)

recibe el riego sanguíneo por la aorta abdominal que llega al ovario a lo largo del mesovario, rama que entra a través del hilio, por donde salen las venas (Fawcett, 1995; Yao y Bahr, 1998).

Para su estudio en el ovario se distingue una médula y una corteza. La médula está formada por estroma, nervios, abundantes vasos sanguíneos arteriales y venosos con poco tejido conectivo y la glándula intersticial. En la corteza se localizan los folículos en diferentes estadios de crecimiento y maduración embebidos en el estroma. La parte más externa de la corteza está tapizada por el epitelio germinal escamoso o cuboide que se apoya en la túnica albugínea, una capa de tejido conectivo denso, que da al ovario su color. El estroma está compuesto de al menos tres tipos celulares diferentes: células de tejido conectivo (fibroblastos) con funciones de soporte, células del músculo liso, que regulan las contracciones de los folículos y células intersticiales que incluyen células de la teca de folículos atrésicos (Yao y Bahr, 1998).

El folículo ovárico es la unidad anatómico-funcional del ovario, a partir del cual se originan los tres compartimientos del órgano; el folicular, el luteal y el intersticial. La mayoría de los folículos corresponden a folículos primordiales que consisten de un ovocito esférico rodeado de una capa de células foliculares planas o cilíndricas bajas y la membrana basal. Algunos de los folículos primordiales se desarrollan y se convierten en folículos primarios en los que el ovocito adquiere un tamaño mayor y aparece rodeado por dos o más capas de células foliculares que ahora reciben el nombre de células de la granulosa (Domínguez y col, 1991; Fawcett, 1995). EL ovocito y las células de la granulosa adyacentes quedan separados por una estrecha hendidura en la que se proyectan microvellosidades y prolongaciones más grandes desde ambos tipos celulares. En este espacio o hendidura se acumula una capa glucoprotéica que se condensa gradualmente formando la zona pelúcida (Fawcett, 1995).

En el folículo en crecimiento, las células de la granulosa proliferan rápidamente por estímulo de la FSH, evento en el cual los estrógenos actúan de manera sinérgica. Una trama densa de capilares peri-foliculares, acompañados de células fusiformes del estroma, se agrupan alrededor del folículo y forman una capa llamada teca folicular que se divide en interna y externa. La teca interna tiene una gran cantidad de capilares y células epiteliales que adquieren características de células secretoras de esteroides mientras que la teca externa está formada por un complejo sistema de fibras colágenas, células de tejido conectivo y fibras musculares lisas (Domínguez y col, 1991; Fawcett, 1995; Yao y Bahr, 1998).

Los vasos sanguíneos y nervios sólo llegan a la teca interna, ya que no penetran a la granulosa en ningún estadio del desarrollo folicular. Las células tecointersticiales tienen receptores a LH, prolactina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), noradrenalina (NA), GnRH y estrógenos (Domínguez y col, 1991; Roby y Terranova, 1998).

Cuando el folículo se encuentra rodeado por 6 a 10 filas de células de la granulosa, se comienza a acumular un líquido claro en los espacios intercelulares de diferentes formas y tamaños que quedan entre las células de la granulosa (Fawcett, 1995). Este líquido llamado "líquido folicular" se origina por extravasación de componentes plasmáticos y por la secreción de células de la granulosa. En él se encuentran proteínas, polipéptidos, FSH, LH, PRL, P₄, andrógenos, estrógenos, gonadocrininas y NA, cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral (Domínguez y col, 1991).

A medida que el folículo aumenta su volumen antral, los espacios que ocupan confluyen y forman una única "cavidad antral" con forma de semiluna. Después de su aparición, el folículo se denomina "folículo secundario o antral". Algunos de estos folículos adquieren carácter dominante y continúan su desarrollo hasta alcanzar un diámetro que los hace sobresalir en la superficie del ovario (Domínguez y col, 1991; Fawcett, 1995).

El crecimiento folicular culmina en uno de dos procesos: atresia el más frecuente o la ovulación. La atresia es un proceso que se presenta en cualquier etapa del desarrollo folicular, en el cual el ovocito pierde su capacidad para mantener el control metabólico del folículo. Las células de la granulosa pierden gradualmente los receptores a FSH y LH, disminuyendo la capacidad de aromatización de andrógenos, por lo que su concentración aumenta dentro y alrededor del folículo. También disminuye la capacidad de síntesis de andrógenos por las células tecaes, por pérdida de la actividad de la C 17-20 liasa. Sin embargo, estas células mantienen la capacidad de síntesis de progesterona hasta etapas avanzadas del mismo proceso (Domínguez y col, 1991; Wong y Adashi, 1998).

La ovulación es considerada como el resultado de un proceso inflamatorio localizado, ya que antes que se produzca la salida del ovocito hay edema en la teca interna, muerte celular y aumento de las prostaglandinas en el área. Para que se produzca la ovulación, son necesarios varios cambios en la pared del folículo y en las relaciones entre las células de la granulosa y las tecaes. Es posible que las células musculares de la teca participen en la contracción del folículo y la expulsión del ovocito durante la ovulación (Domínguez y col, 1991).

La ovulación se produce 10 a 14 horas después de la liberación preovulatoria de las gonadotropinas; una vez que éste ha alcanzado el tamaño y el grado de diferenciación adecuado, según la especie en estudio (Domínguez y col, 1991; Espey, 1998; Roby y Terranova, 1998).

Luego de la ovulación, la sangre de los vasos sanguíneos de la pared folicular se infiltra a los folículos colapsados y resulta en la formación de un cuerpo hemorrágico, el cual se reorganiza y se convierte en cuerpo lúteo. Las células luteinizadas de la granulosa y las células de la teca se dividen de manera acelerada e invaden la cavidad antral. Desde la teca interna los vasos sanguíneos crecen y penetran la masa de células luteales. Si la preñez no ocurre, el cuerpo lúteo degenera (Yao y Bahr, 1998). Las células de la teca interna de aquellos folículos que van a la

atresia y que ya tienen receptores a la LH forman la glándula intersticial (Domínguez, 1997).

Los ovarios son responsables de la síntesis de hormonas esteroides sexuales (P_4 , andrógenos y E_2) y péptidos (inhibina, activina, folistatina, prostaglandinas, péptido semejante a GnRH) necesarios para la regulación de las funciones reproductivas (Domínguez, 1997; Espey, 1998; Yao y Bahr, 1998). De acuerdo a la teoría de las dos células, la FSH secretada por la hipófisis actúa en las células de la granulosa del ovario, a través de un receptor de membrana. La unión de la hormona al receptor activa el sistema adenil-ciclase (la cual incrementa los niveles de AMPc (Adenosin monofosfato ciclico) a partir del ATP (Adenosin trifosfato) para que en último término active la enzima aromatasa, que transforma los andrógenos que provienen de la teca, en estrógenos, principalmente en E_2 . Al mismo tiempo, la FSH induce una mayor producción de sus propios receptores, la aparición de los receptores para LH e induce mitosis de células de granulosa. Estimula la producción de inhibina, activina e IGF I. A medida que va aumentando la FSH en la fase folicular del ciclo, se van produciendo cantidades cada vez mayores de E_2 , incrementando sustancialmente su efecto paracrino y endocrino. El objetivo principal de este evento es la dominancia de los folículos que han alcanzado cierto nivel de crecimiento (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

La actividad hormonal cíclica del ovario durante el crecimiento folicular, la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y su regresión se reflejan en todos los órganos que presentan receptores a las hormonas ováricas. Esta actividad cíclica recibe el nombre de "ciclo ovárico" y los cambios cíclicos celulares que se producen en la vagina y en la receptibilidad de las hembras reciben el nombre de ciclo estral (Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000).

EL CICLO ESTRAL

El ciclo estral se caracteriza por cambios hormonales y conductuales, progresivos, altamente sincronizados y repetitivos, que incluyen una etapa en la que la hembra es receptiva al macho, denominada etapa de celo. El término estral se deriva de la palabra en latín “oistros” que significa “frenesí”; y corresponde a la etapa en la que la hembra acepta sexualmente al macho llamada “calor” o celo (Kilen y Schwartz, 1998). En nuestro modelo de estudio, la rata de laboratorio, el ciclo estral es de 4 ó 5 días, lo que depende de la cepa que se utilice y del periodo luz oscuridad en que sean mantenidos los animales; para su estudio se le divide en: proestro, estro, diestro-1 y diestro-2 (Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000). En la figura 4 se muestra el perfil de secreción de P₄, E₂, PRL y gonadotropinas durante el ciclo estral.

En el día del proestro, el frotis vaginal se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas. Al medio día, la concentración de estradiol alcanza el valor máximo del ciclo, evento llamado “pico” de estrógenos. La disminución progresiva de esta concentración, induce el aumento de la concentración sanguínea de la LH y de la FSH. La concentración máxima de ambas hormonas en la sangre recibe el nombre de secreción preovulatoria, que ocurre en la tarde de este día (entre las 17:00 y 19:00 horas según la cepa). La secreción preovulatoria de LH estimula la secreción de P₄, que alcanza un primer “pico” en la noche de este día (Figura 4) (Freeman, 1994; Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000).

En el día del estro, el frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas y sin núcleo, (Kilen y Schwartz, 1998). En la madrugada de este día ocurre la ovulación. La concentración de E₂, P₄ y LH son las más bajas del ciclo estral (basales), pero la de FSH vuelve a aumentar en la mañana de este día; la función de este segundo pico es reclutar los folículos que empezarán a crecer y ovularán en ciclos posteriores (Figura 4) (Freeman, 1994; Schwartz, 2000).

En la etapa de diestro-1, la citología vaginal se caracteriza por presentar una gran cantidad de leucocitos. El cuerpo lúteo secreta P_4 por varias horas, lo que provoca que la concentración de esta hormona alcance un segundo “pico” hacia el medio día. En algunas cepas de ratas la secreción de P_4 se prolonga, lo que conducen a ciclos de 5 días (Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000). Las concentraciones de E_2 , LH y FSH son basales durante este día del ciclo.

En el día siguiente, diestro-2, en el frotis vaginal se observan una menor cantidad de leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas. La concentración de E_2 empieza a aumentar paulatinamente desde la tarde de este día (Figura 4) (Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000).

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

LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS

A pesar de su importancia, la función precisa de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica no es del todo clara. Hasta hace diez años, ni aún con la utilización de técnicas inmuno-histoquímicas se había podido detectar el receptor a estrógenos en la neurona GnRHérgica de diferentes especies (Herbison, 1998). De igual forma, a partir de estudios *in vivo* existía poca evidencia acerca de la acumulación de estradiol radiactivo en estas células (Kuiper y col, 1996).

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

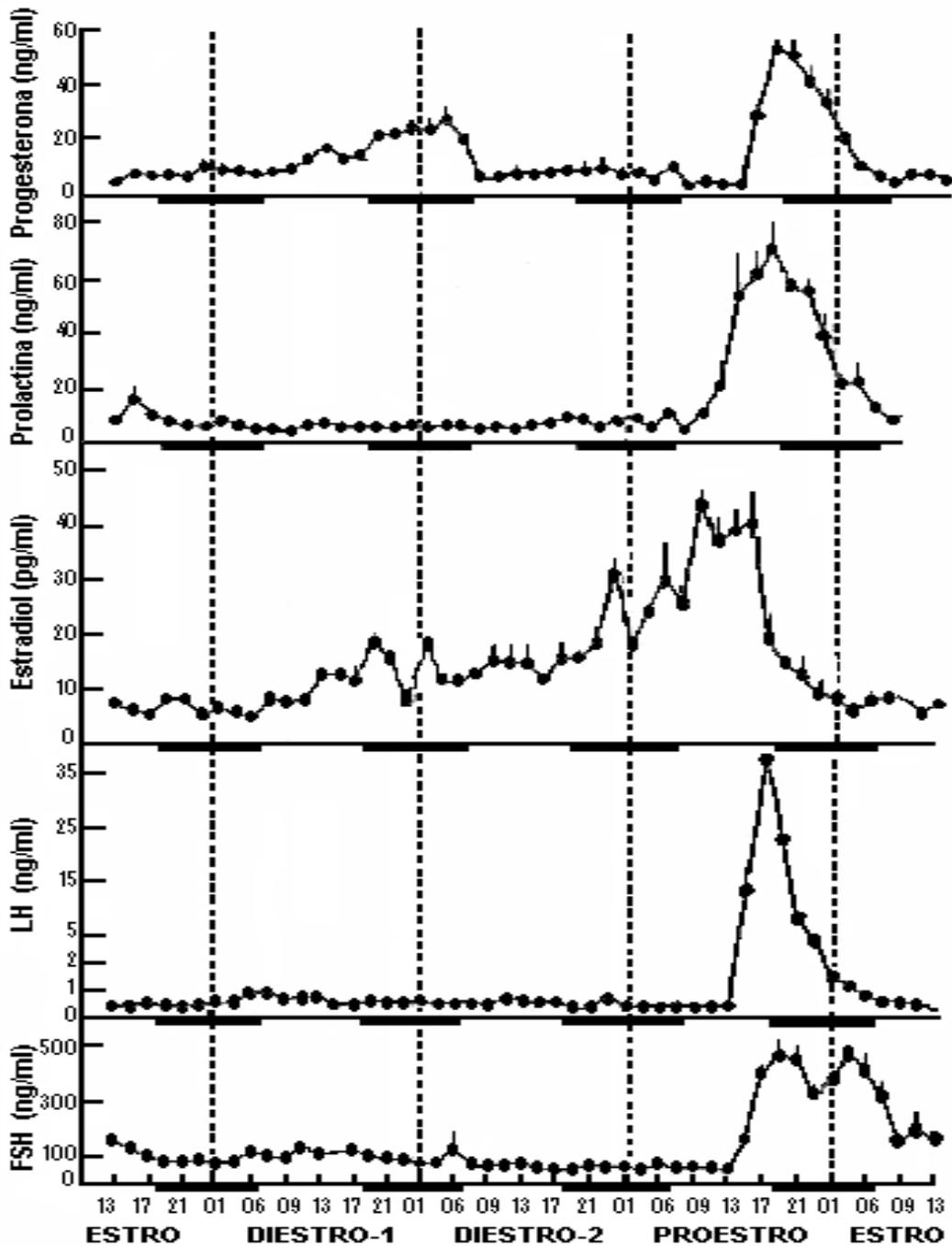


Figura 4. Concentración de LH, FSH, progesterona, prolactina y estradiol obtenido en plasma cada 2 horas en cada día del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de la concentración de hormona de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan intervalos de oscuridad en el cuarto del animal (Tomada de Freeman, 1994).

Los RE son proteínas activadoras ligando-dependientes, que median la actividad de los estrógenos en las células que los poseen o las células blanco (Mangelsdorf y col 1995; O'Malley y Strott. 2001).

Son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de transcripción, los cuales comparten una estructura química en común. El RE consta de seis dominios funcionales: A/B, C, D, E y F (Figura 5) (Rollerova y Urbancikova 2000).

El dominio A/B, localizado en el extremo amino terminal (*terminal-N*) es altamente variable en su secuencia y longitud, contiene una región que regula la actividad transcripcional, conocida como AF-1 (*Activation Function 1*) (Rollerova y Urbancikova 2000).

El dominio C es el sitio de unión específico al ADN, denominado "*DNA binding domain*" (DBD, por sus siglas en inglés), el cual constituye una sección hidrofílica del receptor y es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares. Esta formado por 66-68 aminoácidos, entre los cuales se encuentran cisteínas capaces de unir zinc las cuales forman dos proyecciones peptídicas de coordinación tetraédrica con el zinc, denominados dedos de zinc. Contiene dos dedos de zinc que tienen interacciones específicas con los elementos de respuesta a los estrógenos "*estrogen responsive elements*" (ERE, por sus siglas en inglés). La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de los aminoácidos Glu, Gly y Ala, localizada en el primer dedo de zinc, conocida como la caja proximal (*P-box*). En el segundo dedo de zinc, la secuencia de 5 a 6 residuos de cisteínas conforma la llamada caja distal (*D-box*), la cual discrimina entre los ERE con secuencias similares (Rollerova y Urbancikova 2000).

El dominio D o región de bisagra ("*hinge*") permite al receptor flexibilidad o alterar su conformación. Mediante la técnica de mapeo proteolítico del RE se ha mostrado que una porción de el dominio D es necesaria para unir un ligando con máxima afinidad. También se ha mostrado que participa en la unión a la proteína chaperona de golpe de calor hsp90 (*heat shock protein 90*), la cual permanece unida

al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo (Rollerova y Urbancikova 2000).

El dominio E ó sitio de unión del esteroide o ligando “*ligand-binding domain*” (LBD, por sus siglas en inglés), consiste en una cadena de aproximadamente 250 aminoácidos, que forman una sección hidrofóbica, la cual determina la alta especificidad de la unión de la hormona al receptor. Es importante para la dimerización del receptor, la localización nuclear y las interacciones con co-activadores y co-represores transcripcionales. Contiene una de las dos regiones que regulan la actividad transcripcional el dominio AF-2 (Rollerova y Urbancikova 2000).

El dominio F contiene alrededor de 42 aminoácidos, los cuales no son bien conservados entre los RE de los vertebrados. Es importante en la activación de la transcripción y la represión de las actividades de antiestrógenos. Las secuencias en el dominio F son inhibitorias para la señal de dimerización que están presentes en la región E (Rollerova y Urbancikova 2000).

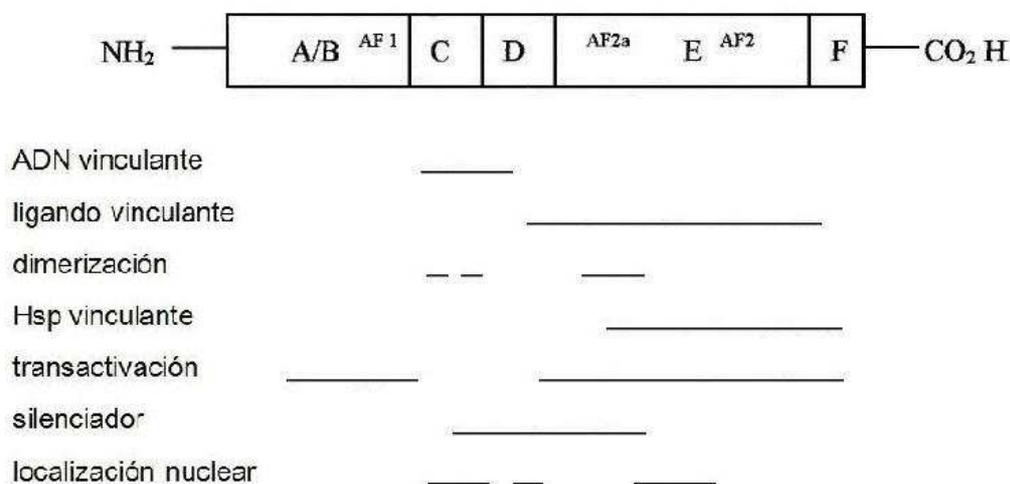


Figura 5. Función de los dominios de los receptores a estrógenos RE y su localización. La estructura del RE puede ser dividida en seis dominios A-F. Las líneas indican la función de cada dominio. AF2a función de transactivación único para RE. Modificado de: Grandien y col 1997; MacGregor y Jordan 1998; Norris y col. 1997; Tsai y O'Malley 1994; Rosen y col. 1995; Weigel 1996.

Cada isoforma es expresada por un gen diferente. Los RE α y RE β tienen el mismo número de exones y los cDNAs (ADN complementario) clonados de humanos, ratas y ratones comparten secuencias homólogas, especialmente con los dominios de ligando y unión al ADN (figura 6) (Kuiper y col. 1996).

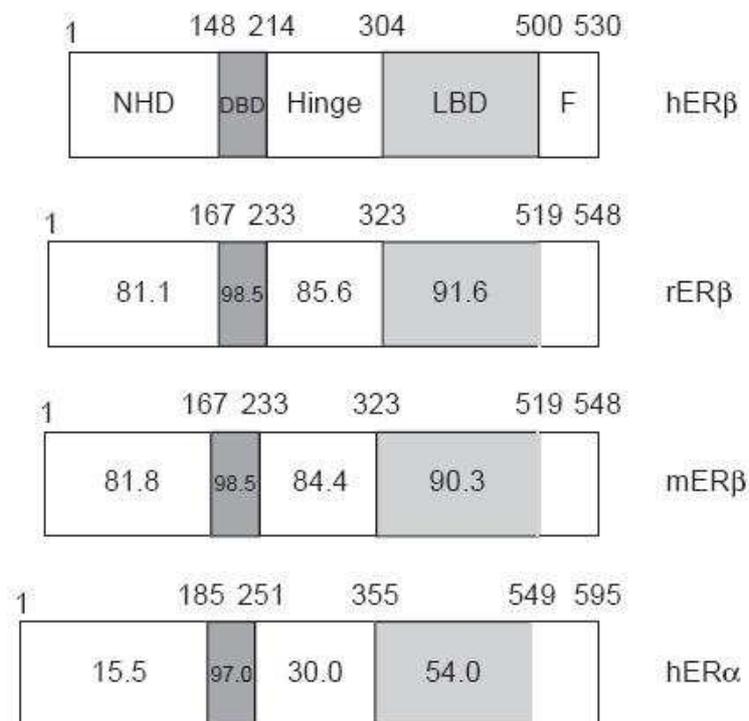


Figura 6. Porcentaje de aminoácidos identificados de receptores a estrógenos: RE β humano (hER β), RE β rata (rER β), RE β ratón (mER β) y RE α humano (hER α). Los números por encima de las cajas representan el número de aminoácidos, mientras que los números dentro de cada una refieren el porcentaje de homología entre los RE. Tomado de Enmark y Gustafsoon 1999.

La importancia biológica de los dos subtipos del RE aún no es muy clara. Sin embargo, su existencia explica en parte los diferentes efectos del RE en varios órganos blanco. Mediante la detección del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (por hibridización *in situ*) y la cuantificación de los RE (por la técnica de unión con estrógeno tritiado) en neuronas GnRHérgicas (identificadas por inmuno-histoquímica) (Hrabovszky y col, 2000), se mostró que la mayoría de las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE β pero el ARNm para el RE α no fue detectado. Otros investigadores (Butler y col, 1999) mostraron que en las áreas rostrales del cerebro anterior (estría terminal, núcleo medial de la amígdala y el núcleo preóptico periventricular e incluso el área preóptica), hay neuronas GnRHérgicas que co-expresan el ARNm para ambos tipos de RE, otras expresan sólo el ARNm del RE α y otras sólo el del RE β (Shughrue y col, 1998).

Las evidencias experimentales indican que los efectos de los estrógenos sobre la actividad de la neurona GnRH, serían tanto genómicos como no genómicos. Los genómicos están relacionados con un factor transcripcional, que al unirse al ADN estimula la transcripción de ciertos genes, por lo que este receptor estaría localizado en el núcleo de la célula (Evans, 1998; Beato y col, 1996). El no genómico implica un proceso rápido, que no requiere de los mecanismos de transcripción y de síntesis de nuevas proteínas, su efecto es en el flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas kinasas, por lo que este receptor estaría localizado en la membrana (Falkenstein y col, 2000; Nemere y col, 1998; Pietras y col 2001; Levin, 1999).

Lagrange y colaboradores (1995) mostraron que los estrógenos tienen un efecto rápido sobre la excitabilidad eléctrica de la neurona GnRHérgica del cuyo. Mediante la cuantificación de la fosforilación de la proteína CREB (proteína de unión al elemento de respuesta del AMP cíclico), como índice de señalización intracelular, se ha mostrado que el RE β tiene que ver con los efectos rápidos de los estrógenos sobre la neurona GnRH (Abraham y col, 2003). En POA, el RE β parece ser

exclusivamente nuclear en neuronas que expresan GnRH (5 a 10% de las neuronas) (Kalló y col, 2001).

Aún se desconoce cuál es el papel del RE α y del RE β sobre la neurona GnRHérgica; diferentes grupos de investigación sugieren que tanto el RE α como el RE β estarían involucrados en los efectos “feedback” negativos de los estrógenos (Herbison, 1998; Abraham y col, 2003). Herbison (1998) ha propuesto que los estrógenos están ejerciendo sus efectos sobre la neurona GnRH por medio de mecanismos transinápticos indirectos, dependientes de las células gliales, en los cuales estarían involucrados los RE α .

En POA de ratón hembra adulto, el 45% de las neuronas identificadas como GnRHérgicas expresan el ARNm para el RE α y el 11% expresa el del RE β ; algunas otras co-expresan el ARNm para ambos receptores. Esta proporción de neuronas que expresan uno u otro receptor cambia durante el ciclo estral: el RE α se expresa en el 46% de las neuronas GnRHérgicas en el día del diestro-2, en el proestro son el 18% y el 75% en el estro; para el RE β , los porcentajes respectivos son 6%, 0% y 19% (Skynner y col, 1999). En POA, el 54% de las neuronas de ratones en diestro-2 expresan RE α , el 22% en proestro y el 25% en estro; para el caso del RE β , los porcentajes respectivos son 12%, 0% y 17%; hay que aclarar que ninguna de estas neuronas de POA medial expresan el ARNm para GnRH (Skynner y col, 1999).

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

Resultados experimentales de varios autores han mostrado que la regulación neuroendocrina que ejerce el hipotálamo, sobre la función de los ovarios, es asimétrica (Advis y col, 1989; Cook, 1987; Cruz y col, 1989; Cruz y col.1990^b; Fukuda y col, 1984; Gerendai, 1980, 1986; Gerendai y col, 1984; Mizunuma y col, 1983; Nance y Morger, 1982; Nance y col, 1984; Nordeen y Yahr, 1982).

El área POA-AHA responde de manera asimétrica a las hormonas esteroides, ya que el implante de estradiol en el lado derecho del POA o del núcleo ventromedial, de ratas hembras de cinco días provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta (estas hembras prefieren sexualmente a otras hembras). En cambio, cuando el estradiol se implanta en las zonas hipotalámicas del lado izquierdo ocurre defeminización (los animales no tienen ciclos estrales) (Nordeen y Yahr, 1982).

Asimismo, el lado derecho del AHA parece jugar un papel preponderante en la regulación del proceso de hipertrofia compensadora del ovario, ya que en la rata con ovariectomía unilateral, la lesión por radio frecuencia del lado derecho de esa área, previene la hipertrofia compensadora del ovario remanente, en tanto que la lesión del lado izquierdo no la modifica (Fukuda y col, 1984). La lesión unilateral de esta misma área del hipotálamo con ácido kaínico, bloquea la hipertrofia compensadora sólo si la lesión y la ovariectomía unilateral se hacen del mismo lado (Nance y col, 1984).

En la rata prepúber, el proceso de hipertrofia compensadora del ovario parece estar controlado por el hipotálamo izquierdo, ya que su deaferentación bloquea la hipertrofia compensadora del ovario, en tanto que la deaferentación del hipotálamo derecho no modifica este proceso (Nance y col, 1984).

Cada lado de POA-AHA regula la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario ipsilateral, la cual es asimétrica respecto al ovario contralateral; mientras que el hipotálamo medio (que comprende a los núcleos arcuato y ventro-medial) regulan la ovulación de uno u otro ovario de manera estimulante, y de manera asimétrica a la hipertrofia compensadora del ovario (Cruz y col, 1990^a).

Los receptores muscarínicos de POA-AHA regulan en forma asimétrica la secreción de la GnRH y la ovulación, asimetría que cambia durante el ciclo estral (Cruz y col, 1989; Cruz y col, 1992). Esta afirmación se basa en los siguientes hechos: el implante de atropina en la porción derecha de POA-AHA (a las 13:00 horas del día del estro) bloquea la ovulación, mientras que el implante del lado izquierdo no

lo hace. Si el fármaco se coloca en el día del diestro-1, ambos implantes (los del lado izquierdo y del lado derecho) bloquean la ovulación; en el día del diestro-2, sólo los implantes del lado izquierdo la afectan, y en el día del proestro los implantes en uno u otro lado de POA-AHA no la modifican (Cruz y col, 1989).

La estimulación del sistema colinérgico de POA-AHA, mediante implantes de pilocarpina, tiene un efecto opuesto al bloqueo del sistema por atropina: en el día del estro, los implantes en el lado izquierdo provocan bloqueo de la ovulación, mientras que los del lado derecho no la afectan. En los días de diestro, tanto el implante del lado izquierdo o derecho impiden la ovulación; y en el día del proestro los efectos son muy semejantes a los observados en el día del estro (López y col, 1997).

La falta de ovulación en animales con implante unilateral de atropina en POA-AHA resulta de modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de LHRH sintético a las 14:00 horas de este día, induce la ovulación en ratas con implante de atropina (Cruz y col, 1992).

Esta modificación en la secreción fásica de la GnRH parece ser el resultado de una alteración en el efecto "feedback" estimulante de los estrógenos en la porción derecha de POA-AHA, ya que al reestablecer esta señal ovárica en la tarde del diestro-2 (inyección sc. de 10µg benzoato de estradiol), induce la ovulación sólo en aquellos animales con implante de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA (Cruz y col, 1992).

En la rata (tanto en el macho como en la hembra), la cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es significativamente mayor que en el izquierdo (Gerendai y col, 1979; Bakalkin y col, 1984). En POA-AHA de rata, la cantidad de ARNm para RE α tiene un máximo en la tarde del estro (17:00 horas), seguido de un aumento de menor magnitud al mediodía del diestro-2 (13:00 horas); mientras que para el RE β , la máxima expresión del gen se observa al mediodía del diestro-2 (13:00 horas). Estas variaciones durante el ciclo estral son asimétricas, de

tal forma que el lado de POA-AHA que más expresa el RE α es el lado derecho, mientras que el RE β se expresa en ambos lados: en el lado izquierdo a las 09:00 horas y en el lado derecho a la una de la tarde del diestro-2 (Arteaga y col, 2003).

No sólo cada lado del hipotálamo regula en forma asimétrica la función de una y otra gónada sino que éstas responden de manera asimétrica a los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Así, el número de ovocitos liberado por el ovario izquierdo de la rata adulta es mayor que el del derecho (Domínguez y col, 1988). Cuando se extirpa el ovario derecho, el número de animales que ovulan es significativamente menor que cuando se extirpa la gónada izquierda (Chávez y col, 1987). En la cerda, el número de receptores a la gonadotropina coriónica humana (hCG), la concentración de progesterona, la actividad de la β -N-acetil-D-glucosaminidasa y de la glucosa-fosfato deshidrogenasa son mayores en los cuerpos lúteos del ovario izquierdo que en los del derecho (Rao y Edgerton, 1984). La concentración de testosterona en la vena testicular aumenta al doble en el 58% de los animales hemicastrados del lado izquierdo, mientras que sólo ocurre en el 27% de los que fueron hemicastrados del lado derecho (Frankel y col, 1989).

EL ALCOHOL

El término alcohol es utilizado como sinónimo de etanol o alcohol etílico. El etanol es un alcohol primario de bajo peso molecular, su fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ dado que es un compuesto polar, es soluble en agua y solventes orgánicos, pero prácticamente insoluble en grasas y aceites (Windholz, 1976).

En los mamíferos, el etanol es un metabolito natural presente en el organismo, cuya concentración varía 0.1 y 1 nM; la mayor parte del etanol es de origen microbiano, por acción de la flora presente en el tracto gastrointestinal (Baraona y col, 1986; Fisher, 1988; McManus y col, 1966). De hecho se ha detectado etanol en el intestino de ratas no expuestas a alcohol (Krebs y Perkins, 1970). Otra fuente de

etanol endógeno se debe a la producida principalmente el hígado (Krebs y Perkins, 1970; McManus y col, 1966).

Diversos estudios muestran que los animales en condiciones normales pueden estar expuestos a grandes cantidades de alcohol. Un ejemplo es el elefante africano, cuando ingiere la fruta podrida del árbol marula (Jolly, 1966). En el hombre, sin embargo, la mayor fuente es el consumo directo a través de las bebidas alcohólicas.

Tras la ingestión de etanol, su absorción empieza inmediatamente a través de la mucosa bucal y como vapor en los alvéolos pulmonares (Batt, 1989). Sin embargo, la cantidad de etanol que es absorbido por medio de estos dos sistemas es prácticamente despreciable, y se considera que todo el alcohol ingerido va al estómago y es absorbido por simple difusión a través del epitelio gástrico y en la primera porción del intestino delgado, de manera similar a como ocurre con el agua (Watson, 1989). Con el estómago vacío, el etanol es absorbido rápidamente, de tal manera que a los cinco minutos ya se detecta su presencia en la sangre y la máxima concentración plasmática se alcanza a los 30 minutos (Watson, 1989).

Una vez absorbido, el etanol entra en la vena porta, llega al hígado, del que sale por medio de la vena hepática hacia el corazón, el que lo envía a los pulmones y, tras su retorno, alcanza la circulación periférica. Una vez en la sangre, el etanol se distribuye por todos los tejidos y fluidos del organismo, atravesando libremente todas las membranas y barreras biológicas (Batt, 1989), resultado del pequeño tamaño de la molécula.

El etanol es eliminado por medio de dos procesos oxidativos, mediante los cuales se convierte primero en acetaldehído y posteriormente en acetato. El acetato pasa a torrente sanguíneo y a todos los tejidos, donde se incorpora al ciclo de Krebs en forma de acetil-coenzima A y es metabolizado a dióxido de carbono y agua (Figura 7) (Lieber, 1994).

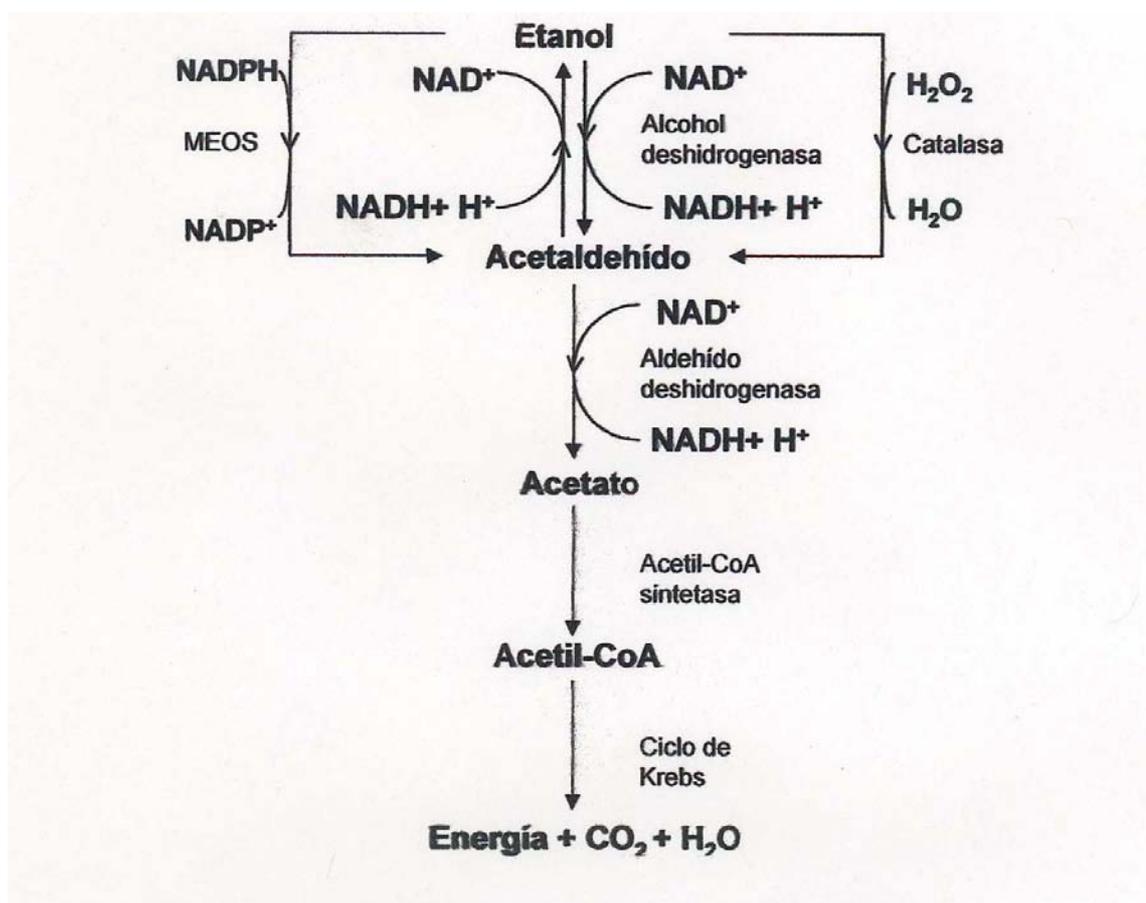


Figura 7. Sistema enzimático de oxidación del etanol (Tomado de Lieber, 1994)

Se considera que la mayor parte de la eliminación del etanol, aproximadamente el 90%, tiene lugar por la vía enzimática de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), localizada en el citosol de las células. Se han descrito otros dos sistemas enzimáticos de eliminación: el sistema microsomal de oxidación de etanol (MEOS) del retículo endoplásmico liso y la catalasa localizada en los peroxisomas (Lieber, 1997).

En el hígado la ADH₁ es la principal responsable de la eliminación de etanol, con una capacidad de oxidación de 2 nmol/min (Li, 1983), la que aumenta con la concentración sanguínea de etanol. En los tejidos extra-hepáticos, la oxidación de etanol se realiza por medio de la ADH₁ y ADH₄. La ADH₁ se localiza en intestino,

riñón, pulmón, glándula adrenal, epidídimo, testículos, útero, ovarios, corteza cerebral, cerebelo e hipotálamo. La ADH₄ se localiza en ojo, piel, glándula adrenal y en la mucosa del sistema gastrointestinal, respiratorio y genitourinario (Boleda y col, 1989; Parés y Farrés, 1995; Parés y col, 2001). La capacidad de oxidación de estas dos enzimas es de 0.4 mmol/min, la que aumenta con la concentración sanguínea de etanol (Li, 1983).

El acetaldehído, resultado del primer paso de oxidación del alcohol, es de 10 a 30 veces más tóxico que el etanol. La toxicidad del acetaldehído se debe, en parte, a su capacidad de formar aductos con diversas moléculas, principalmente proteínas (Rintala y col, 2000), lo que resulta en la producción de anticuerpos, inactivación de moléculas con actividad biológica e inhibición de la reparación de ADN. Puede afectar la síntesis y liberación de proteínas; inducir alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias, por lo que disminuye la capacidad respiratoria de la célula (Lieber, 1995); estimula la liberación de catecolaminas de las células cromafines de la médula adrenal y de las terminaciones sinápticas (Akabane, 1979), así como la liberación de histamina, bradiquinina y prostaglandinas en diferentes tipos celulares (Lieber, 1995).

La oxidación del acetaldehído a acetato, segundo paso de la eliminación del etanol, se produce casi en su totalidad en el hígado por medio de tres sistemas enzimáticos; aldehído deshidrogenasa (ALDH), que requiere NAD⁺ como aceptor de electrones (Arnon y col, 1995; Ehrig y col, 1990), aldehído oxidasa, dependiente de oxígeno (Mira y col, 1995) y el sistema microsomal de oxidación de acetaldehídos (MAOS), que requiere la participación del citocromo P-450 y la cataliza la oxidación acoplada a la oxidación de NADPH, análoga a la descrita por el MAOS (Kunitoh y col, 1996; Terelius y col, 1991). De estos tres sistemas, el más importante es el ALDH, el cual es responsable no solo del metabolismo del acetaldehído sino también en otros grupos aldehídos, como los presentes en las monoaminas biogénicas, diaminas y poliaminas, en la oxidación del retinal y de aldehídos generados en los procesos de peroxidación lipídica (Ambroziak y Pietruszko, 1991).

Cuando las concentraciones de acetaldehído incrementan, aumenta la presencia de aminas vasoactivas en el plasma, desencadenando una sintomatología de origen alérgico, conocida con el nombre genérico de enrojecimiento facial o “flushing”, caracterizada por aumento de la temperatura dérmica, vasodilatación periférica y eritema cutáneo, aceleración del ritmo cardiaco, mareos cefaleas, náuseas, vómito ocasionales, hipotensión y bronco constricción (Whitfield y Martín, 1993). La euforia, es el resultado del aumento en el flujo sanguíneo cerebral del hemisferio frontal derecho (Tiihonen y col, 1994).

El alcohol es un anti-elemento, por lo que disminuye notablemente el apetito, produce calorías vacías (que no generan energía), afecta la mucosa del sistema digestivo e impide la absorción adecuada de los alimentos que se ingieren, y aumenta notablemente las necesidades de vitaminas del organismo. Aunque cada gramo de alcohol aporte siete calorías, estas no son capaces de producir energía ni de almacenarse para uso posterior, se utilizan por las células para su metabolismo basal (MINSAP. Programa de prevención, atención y control del alcoholismo.1992).

Aunque el alcohol no es un elemento que induzca cáncer por acción directa sobre los tejidos, al ser un disolvente muy efectivo de las sustancias cancerígenas, favorece la libre circulación de estas por todo el organismo, lo que aumenta el riesgo de cáncer de lengua, boca, faringe, laringe, esófago e hígado, colon, recto, mama y pulmones (MINSAP. Programa de prevención, atención y control del alcoholismo.1992).

El alcohol puede producir comportamiento anormal, trastornos de personalidad y conductas antisociales. Una madre bebedora descuida la atención de sus hijos, lo cual ocasiona desajustes infantiles, abandono de la escuela y problemas sociales. Existe relación directa entre la ingestión de bebidas alcohólicas y las muertes violentas (suicidio, accidentes del tránsito, homicidios) (Piña y col, 1991).

Luego de actuar inicialmente sobre las inhibiciones dependientes de la corteza cerebral, inhibe también los centros cerebrales subcorticales donde se encuentran las estructuras responsables básicamente de las funciones relacionadas con la satisfacción de las necesidades biológicas, como las sexuales, las de alimentación y las inmunológicas (Tiihonen y col 1994).

En los casos más graves se puede producir desmielinización de la médula espinal, proceso que implica complicaciones en la transmisión de los impulsos nerviosos (Piña y col, 1991).

Una ingestión diaria de 10 mL de etanol se difunde rápidamente a los tejidos y se elimina lentamente, ya que se puede cuantificar un 70 % de alcohol después de 12 h de haberse ingerido (Bolet y Socarrás, 2003).

EFFECTOS DEL ALCOHOL SOBRE EL SISTEMA REPRODUCTOR

Según estudios del Instituto Nacional de Psiquiatría, en zonas urbanas el 9% de las mujeres entre los 18 y los 65 años beben cinco copas o más en cada consumo y el 1% de ellas son dependientes al alcohol. Se calcula que el 10% de las bebidas alcohólicas que se venden en México es consumido por mujeres y que 32 millones de mexicanos -esto es, una tercera parte de la población nacional-, son bebedores regulares (Medina-Mora, 2001).

En cuanto a las mujeres, las mayores de 60 años de edad son el grupo más afectado y usualmente se trata de población que empezó a beber en la juventud y continúa haciéndolo ahora. Las mujeres actualmente beben a la par que los hombres, lo que las pone en desventaja en cuanto a los riesgos en su salud y dado que cuentan con más grasa corporal, ello impide que el alcohol se pueda diluir, por lo cual son más vulnerables, además de que las concentraciones de hormonas relacionadas con los ciclos menstruales, el embarazo y la menopausia, así como el hecho de tener

una menor proporción de agua en el cuerpo femenino, se relacionan con mayor grado de intoxicación con menores dosis de alcohol (Medina-Mora, 2001).

El alcohol provoca disfunciones sexuales, si el consumo es excesivo y mantenido, puede producir serias lesiones en órganos responsables de la respuesta sexual, como dificultad o imposibilidad de que el hombre logre la erección o que la mujer logre el orgasmo, resultado del efecto depresor sobre el sistema nervioso, el cerebro y la médula espinal (Tiihonen y col, 1994).

En la mujer otros efectos dañinos son infertilidad o incapacidad de concluir de forma exitosa un embarazo (abortos habituales). Pueden ocurrir partos prematuros y muerte intrauterina porque el feto no está preparado para neutralizar la acción del alcohol y metabolizarlo. Se han observado nacimientos de niños con lesiones hepáticas debido a la inmadurez de esta glándula. También el alcohol puede producir retraso mental en el 30 y 40 % de los nacimientos (Piña y col, 1991).

Cuando el hombre es alcohólico, el consumo del alcohol repercute sobre la producción de hormonas hipofisarias y testiculares; disminuye del vello facial, afina la voz, atrofia los testículos e incrementa del volumen de las mamas. El consumo excesivo de alcohol conduce, a largo plazo, a la aceleración de los procesos arterioscleróticos que afectan el calibre de las arterias que conducen la sangre al pene (cuerpos cavernosos) (Tiihonen y col, 1994).

Así como en los humanos, en los monos y pequeños roedores como la rata, el alcohol puede disminuir las funciones reproductivas (Cicero, 1997). En la rata macho adulta la administración i.p. de alcohol causa disminución en la secreción de testosterona (Rivier, 1999).

En la rata hembra, la inyección crónica de alcohol bloquea el ciclo estral, retrasa la pubertad, eventos que están asociados con modificaciones en la secreción

de las gonadotropinas. El alcohol provoca una rápida inhibición de la liberación pulsátil de LH pero no tiene ningún efecto en la liberación de FSH (Rettori, 1997).

La administración de alcohol en el peritoneo, en la mañana del proestro bloquea la secreción preovulatoria de LH, disminuye la secreción de estradiol E_2 y de progesterona P_4 , causa luteinización en los folículos, reduce la activación de las neuronas GnRHérgicas en la tarde del proestro (LaPaglia y col, 1997).

En ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol, la inyección i.p. de alcohol a las 8 y 12 horas del día inhibe la secreción de LH. Este mismo efecto se observó en animales adrenalectomizados que recibieron alcohol en las mismas horas del día del proestro, es decir, provocó bloqueo de la secreción preovulatoria de LH y la ovulación; en estos animales la inyección de la hormona liberadora de la LH (LHRH) o GnRH restablece la secreción preovulatoria de LH y la ovulación (Kathleen y Rivier, 1997).

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Diversos estudios han mostrado que el hipotálamo en la rata hembra, específicamente en POA-AHA, regula de manera asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación. Aún cuando se ha mostrado que la inyección de etanol al medio día del proestro no modifica la cantidad del ARNm de GnRH pero provoca disminución significativa en la concentración de la misma en el hipotálamo y disminución de la concentración de LH, E_2 y P_4 a las 14:00 hrs del mismo día, se desconoce cuáles son los efectos del alcohol en los otros días del ciclo estral de la rata y si éste regula de manera asimétrica el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Por lo tanto en este estudio se analizaron los efectos de la microinyección de alcohol en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre la expresión del ARNm del $RE\alpha$, $RE\beta$, y de la GnRH, sobre la concentración sérica de gonadotropinas, de hormonas esteroides (E_2 y P_4) y la ovulación en horas posteriores a la inyección, es decir, en diestro-2 (13:00 h) para evaluar los efectos inmediatos del alcohol y en proestro (09:00 y 17:00 h) para valorar los efectos sobre la secreción preovulatoria de estradiol, progesterona, FSH y LH, así como a las (09:00 h) del estro para verificar la presencia de ovocitos.

HIPÓTESIS

Dado que una hora después de la administración intra-peritoneal de alcohol en el día del proestro provoca disminución de la concentración de GnRH en el hipotálamo, así como disminución de la concentración plasmática de LH, estradiol y progesterona; y de que el hipotálamo regula de forma asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación, entonces, la inyección unilateral de alcohol en POA-AHA provocará efectos asimétricos en la expresión del ARNm para la GnRH, para el RE β y para el RE α , lo que se traducirá en modificaciones en la concentración plasmática de gonadotropinas, de las hormonas esteroides y por ende en la ovulación.

OBJETIVOS

- Estudiar los efectos de la microinyección unilateral de alcohol en POA-AHA (realizada a las 09:00 h del diestro-1), sobre el porcentaje de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados en la mañana del estro esperado y vaginal.
- Estudiar los efectos de la microinyección unilateral de alcohol en POA-AHA (realizada a las 09:00 h del diestro-1), sobre la expresión del ARNm del RE α , del RE β y de la GnRH en los lados izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 horas del diestro-2, a las 09:00 y 17:00 horas del proestro y a las 09:00 horas del estro esperado.
- Estudiar los efectos de la microinyección unilateral de alcohol en POA-AHA (realizada a las 09:00 h del diestro-1), sobre la concentración plasmática de gonadotropinas a las 13:00 horas del diestro-2, a las 09:00 y 17:00 horas del proestro y a las 09:00 horas del estro esperado.
- Estudiar los efectos de la microinyección unilateral de alcohol en POA-AHA (realizada a las 09:00 h del diestro-1), sobre la concentración plasmática de P₄ y E₂ a las 13:00 horas del diestro-2, a las 09:00 y 17:00 horas del proestro y a las 09:00 horas del estro esperado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes (190-230 g) cíclicas de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso al alimento (Purina S.A., México) y agua. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Anestosal, Smith Kline Norden de México) (40 mg/kg p.c.) por vía intra-peritoneal, a las 09:00 horas del diestro-1. Se colocaron en un aparato estereotáxico y a cada animal se le microinyectó 1 μ l de una solución de etanol (alcohol etílico absoluto anhidro, J. T. Baker) al 50%, durante un minuto, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, siguiendo las coordenadas del atlas del cerebro de la rata de Köning y Klippel (1963) (Figura 8).

Todos los animales fueron sacrificados en los siguientes horarios posteriores a la microinyección del fármaco:

- 13:00 horas del diestro-2 esperado
- 09:00 horas del proestro esperado
- 17:00 horas del proestro esperado
- 09:00 horas del estro esperado
- 09:00 horas del estro vaginal

Como grupos testigo absoluto se utilizaron animales intactos sacrificados a las mismas horas que los tratados con alcohol. Otros grupos de animales inyectados en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA fueron sacrificados hasta la presencia del estro vaginal.

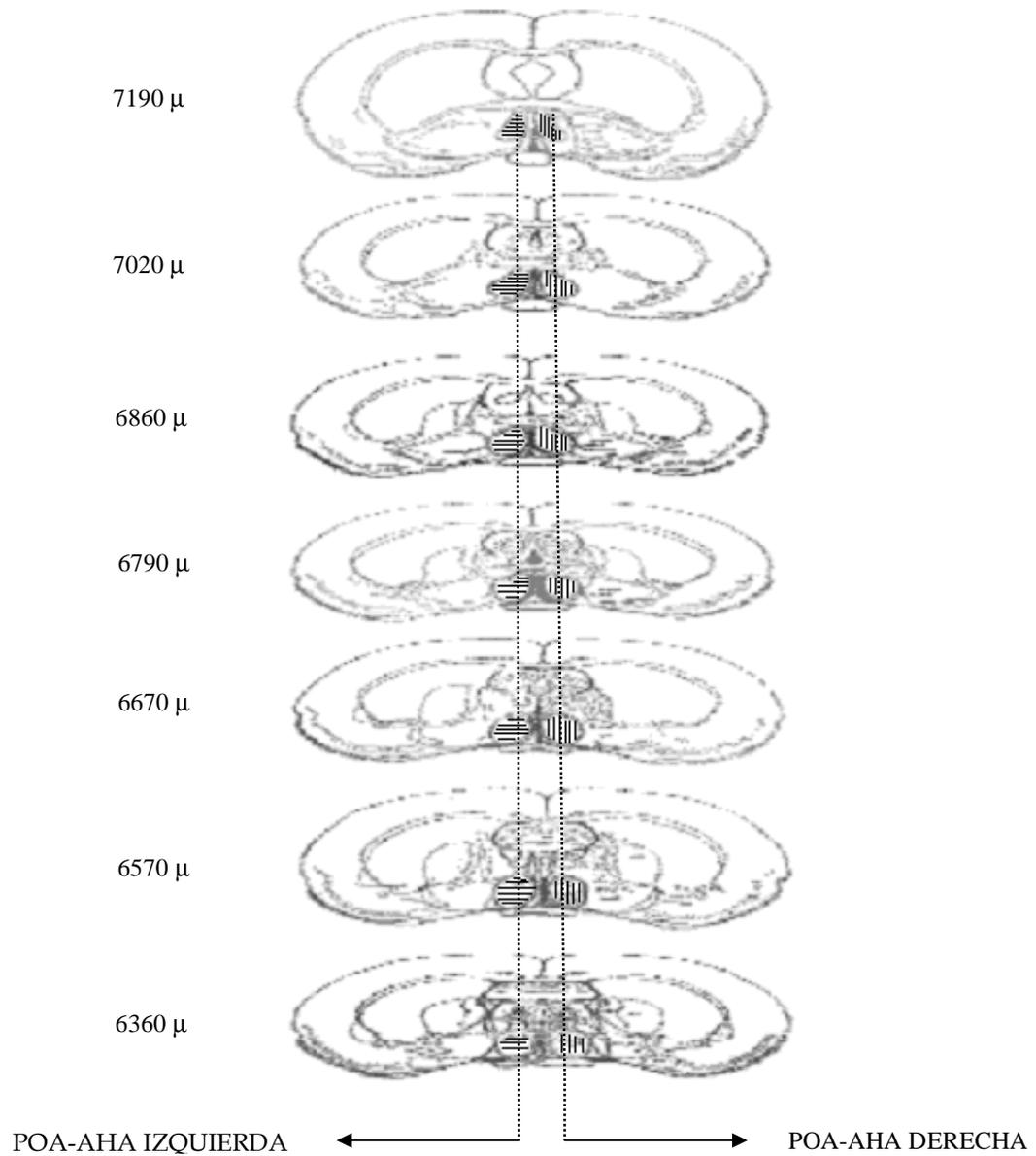


Figura 8. Esquema que muestra el área izquierda y derecha de POA-AHA en cortes coronales antero-posteriores sucesivos Köning y Klippel (1963).

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación. Se recogió la sangre del tronco, la que se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero se almacenó a -20°C , hasta la cuantificación de E_2 , P_4 , LH y FSH por radio-inmuno-análisis (RIA). En los animales sacrificados a las 13:00 horas del Diestro-2, 09:00 ó 17:00 horas del proestro y 09:00 horas del estro, se disecaron las porciones izquierda y derecha de POA-AHA, según la técnica propuesta por Palkovits (1973) y se obtuvo el ARNm total, el cual se almacenó a -70°C hasta la medición de la expresión del ARNm de la GnRH y del RE α ó RE β por la técnica de retro-trascrición de la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR). A los animales sacrificados en la mañana del estro se les extrajeron las trompas uterinas para verificar por medio de un microscopio estereoscópico la presencia de ovocitos.

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS

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

variación intra e inter ensayo fueron de 5.3% y 9.87 para P₄, 6.9% y 10.8% para E₂. El límite de detección para P₄ fue 0.03091 ng/ml y para E₂ fue de 2.12 pg/ml.

La cuantificación de LH y FSH se realizó por RIA con el anticuerpo rLH-RP3 (NIAMDD-Rat), para la cuantificación de LH y rFSH-RP2 (NIAMDD-Rat) para el caso de FSH, proporcionados por la National Hormona and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). A 100 ml de suero se le adicionó 100 µl de hormona marcada con ¹²⁵I y 100µl del primer anticuerpo de suero de borrega para LH o para FSH, y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se le agregaron 100 µl del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubaron durante dos horas; los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a -4 °C por 30 min. El sobrenadante se decantó, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en un contador de centelleo gamma para su análisis. Los datos de la concentración de cada hormona se expresaron en ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.91% y 5.74% para LH y 9.3% y 6.82% para FSH. El límite de detección de LH y FSH fue de 0.05 y 0.01 ng/ml, respectivamente.

EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE LAS ÁREAS IZQUIERDAS Y DERECHAS DE POA-AHA.

A la porción izquierda o derecha de POA-AHA, contenidas en tubos eppendorf estériles se le agregaron 300 µl de trizol y se homogenizó con un Politron, modelo PT-MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza).

Al tejido homogenizado se le agregaron 100 µl de cloroformo y se agitó durante 30 segundos en un vortex, con la finalidad de extraer el ARNm.

Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 25 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: una fase inferior orgánica de color rojo y la fase superior acuosa incolora. El ARN quedó en esta última fase, mientras que el ADN y las proteínas se mantienen en la interfase y en la fase orgánica.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de isopropanol, con la finalidad de precipitar el ARN. La muestra se mantuvo a 4° C durante 72 horas.

Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm, por 25 minutos, a 4° C. El ARN se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80 %. La pastilla de ARN se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después de una segunda separación del sobrenadante, los tubos se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril y la pastilla se secó a temperatura ambiente para evitar la insolubilidad de la misma. La pastilla de ARN se disolvió en 30 µl de H₂O inyectable (lo que consistió la muestra experimental).

Se hicieron alícuotas de 0.4 µl de la muestra en 100 µl de H₂O inyectable. Se leyó la absorbancia de estas muestras a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La concentración de ARN se determinó por la siguiente relación: una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 mg de ARN ml⁻¹. La pureza del ARN se determinó por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm (260/280 nm).

Para obtener el ADN complementario (ADNc) se realizó la retro transcripción del ARN total. El control negativo consistió de una muestra de agua que sustituyó al ARN. Los volúmenes utilizados en la técnica se especifican en el cuadro 1.

Cuadro 1. Reactivos utilizados en el desarrollo en la técnica de retro-transcripción.

Reactivo	Para c/ muestra
ARN total	2 µg
Buffer RT 1x	2 µl
DTT	1 µl
DNTP's	0.5 µl c/u
RT M-MLV	0.5 µl + 0.5 µl H ₂ O
Oligo dt	0.05 µl
H ₂ O	Aforado a 10 µl

Por medio de la técnica RT-PCR, se amplificó un fragmento de los genes de los RE- α , RE- β y el de GnRH. Se utilizó GAPDH como gen control interno. En el cuadro 2 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la técnica.

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

Reactivo	Para c/muestra
Producto de RT	10 µl
Buffer PCR	5 µl
MgCl ₂	2.5 µl
Taq polimerasa	0.8 µl
DNTP's	0.5 µl c/u
Oligo 1	2.0 µl c/u
H ₂ O	25.7 µl

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador de gradientes (marca Eppendorf Scientific Inc, Alemania), a las temperaturas y ciclos que se muestran en el cuadro 3.

Cabe señalar que las temperaturas de alineación, así como el número de ciclos utilizados para los genes en cuestión fueron previamente estandarizados para la optimización del experimento.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se corrieron los productos en gel de agarosa al 2%, preparado con TBE al 1% y teñido con BrET. Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal, modelo Horizon 11-14 (Life Technologiestm, gibco brl, USA). Se tomaron fotografías del gel con una cámara Kodak EDAS 216.

Los negativos de las fotografías de los geles se cuantificaron por densitometría por medio del programa Scion Image de Inc. Y los resultados se mostraron en expresión relativa.

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

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Temperatura (°C)	Ciclos
GnRH	CAA CCC ATA GGA CCA GTG CTG G	CAC TAT GGT CAC CAG CGG GG	53.0	32
RE α	TTC ACA CCA AAG CCT CGG G	TGC AGC AGC ATC AGC GGA	64.2	32
RE β	TCC CGG CAG CAC CAG TAA C	CCC AGA TGC ATA ATC GCT GC	55	32
GAPDH			55.1 ° C	32

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

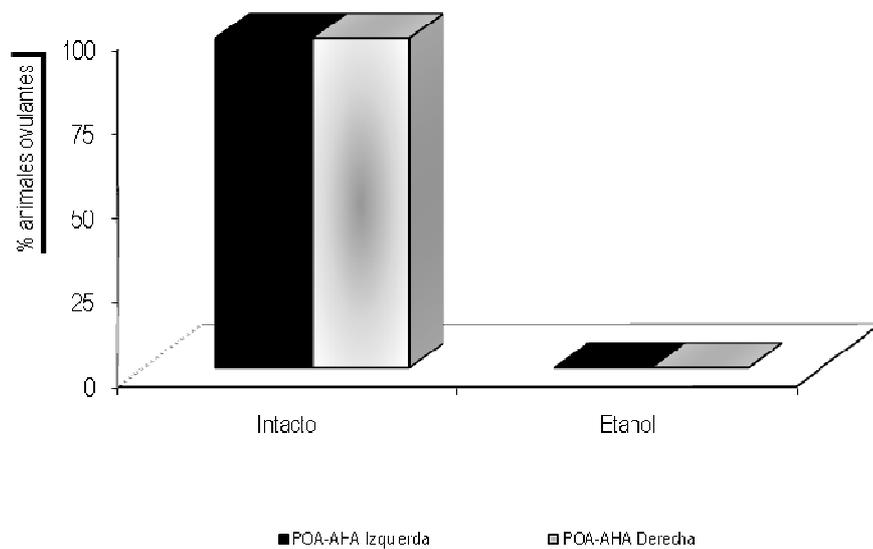
Los resultados del porcentaje de animales ovulantes se analizó por la prueba de X^2 y los del número de ovocitos por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" Mann-Withney. Los datos de las concentraciones séricas de las hormonas y de la expresión relativa del ARNm para RE- α , RE- β , y la de GnRH fueron analizados mediante la prueba de análisis de las varianzas (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de "t" de Student. En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS

OVULACIÓN

La inyección de etanol en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a las 9:00 horas del diestro-1 bloqueó la ovulación de todos los animales sacrificados en la mañana del estro esperado (Gráfica 1).

Nueve días después de la inyección unilateral de etanol, los animales presentaron el estro vaginal y todos ovularon. El número de ovocitos liberados fue semejante al grupo de animales intactos (etanol POA-AHA izquierda: 12.22 ± 1.31 , etanol POA-AHA derecha: 11.66 ± 2.18 , intacto: 12.5 ± 0.75).

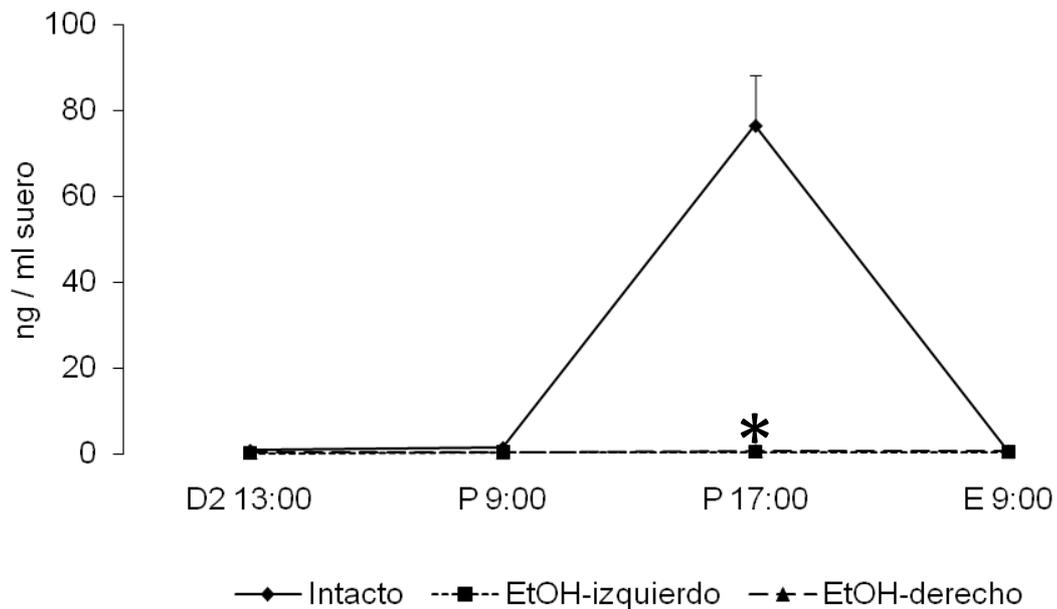


Gráfica 1. Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado, después de ser inyectados con etanol en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA.

CONCENTRACIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

En el animal intacto, la secreción preovulatoria de la LH se observó a las 17:00 horas del día del proestro.

La inyección de etanol en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA bloqueó la secreción preovulatoria de la LH (Gráfica 2).

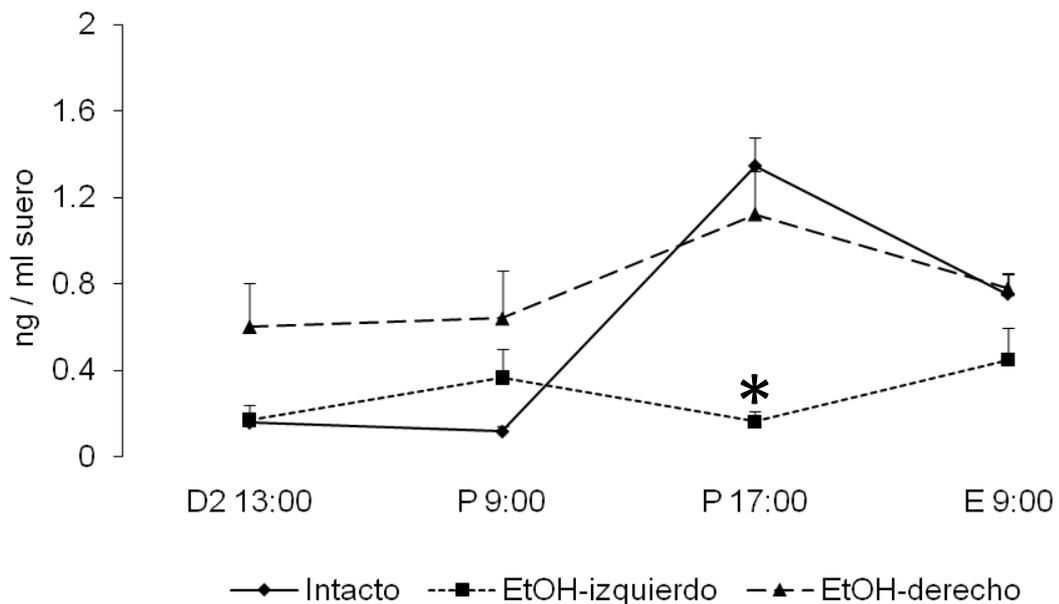


* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

Gráfica 2. Media + e.e.m. de la concentración de hormona luteinizante en el suero de ratas intactas o microinyectadas con etanol en la porción izquierda o derecha de POA-AHA.

CONCENTRACIÓN DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO

En el animal intacto, la secreción preovulatoria de la FSH se observó en la tarde del proestro. La inyección de etanol en el lado izquierdo de POA-AHA provocó disminución de la secreción preovulatoria de FSH en la tarde de proestro. En cambio, la inyección del etanol del lado derecho no la modificó (Gráfica 3).

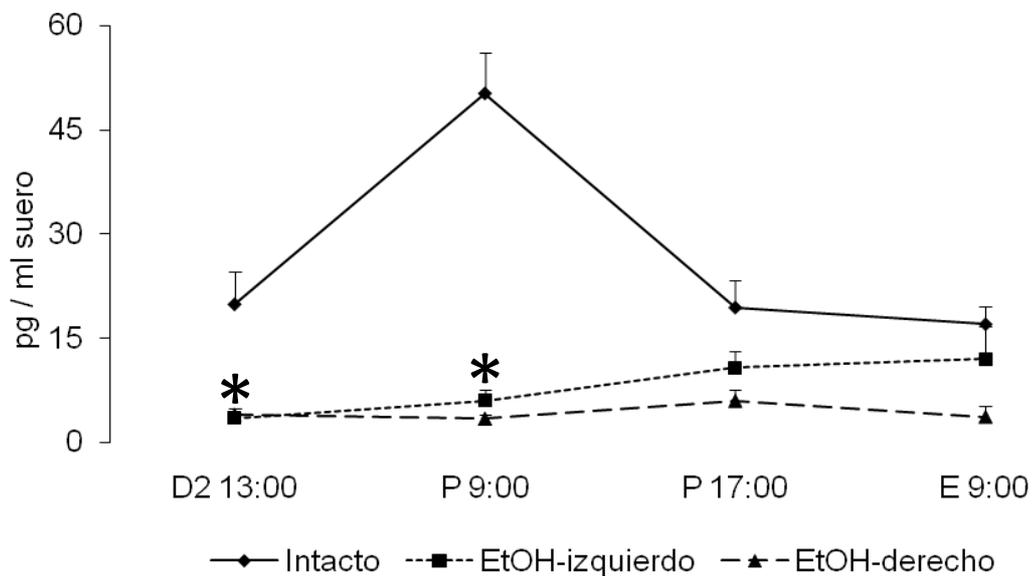


* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

Gráfica 3. Media + e.e.m. de la concentración de la hormona estimulante del folículo en el suero de ratas intactas o microinyectadas con etanol en la porción izquierda o derecha de POA-AHA.

CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL

La inyección de etanol en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA disminuyó significativamente las concentraciones de estradiol en sangre a las 13:00 horas del diestro-2, así como la secreción preovulatoria de la mañana del proestro (Gráfica 4).

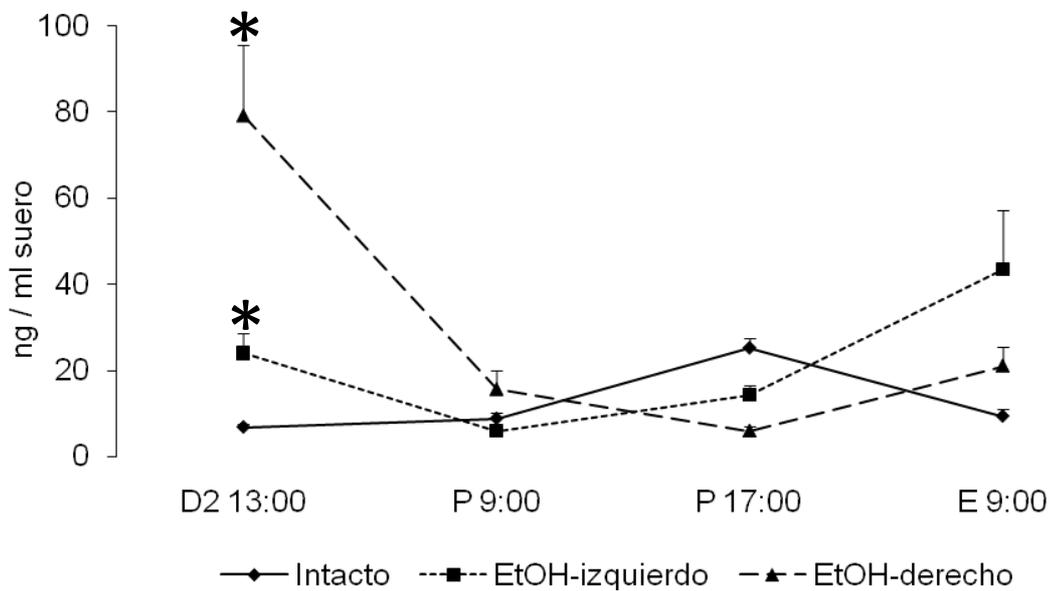


* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

Gráfica 4. Media + e.e.m. de la concentración de estradiol en el suero de ratas intactas o microinyectadas con etanol en la porción izquierda o derecha de POA-AHA.

CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA

La inyección de etanol en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA provocó aumento en la concentración sérica de progesterona a las 13:00 horas del diestro-2 (Gráfica 5).



* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

Gráfica 5. Media + e.e.m. de la concentración de progesterona en el suero de ratas intactas o microinyectadas con etanol en la porción izquierda o derecha de POA-AHA.

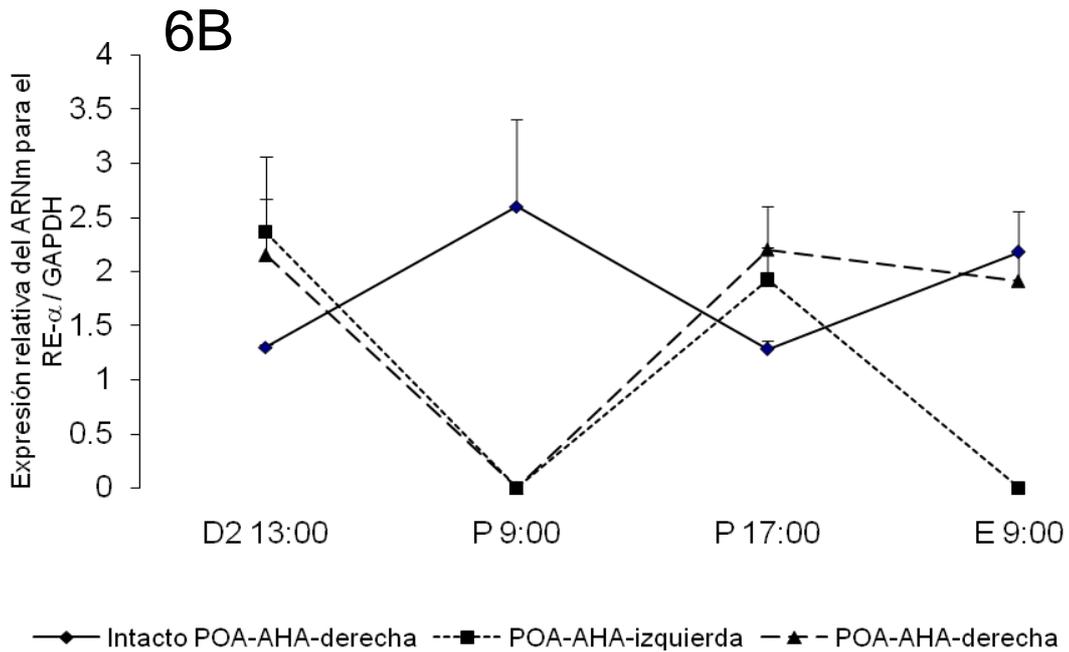
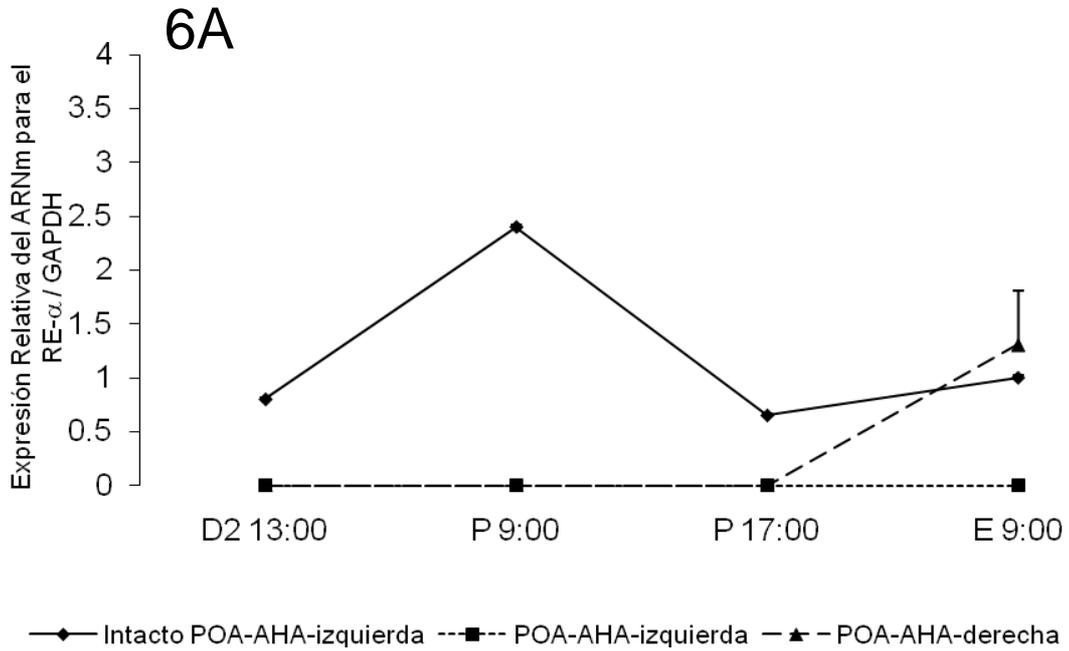
EFFECTOS DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA IZQUIERDA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE- α

En POA-AHA izquierda o derecha del grupo de animales intactos, la máxima expresión del ARNm del RE- α se observó en la mañana del proestro.

La inyección de etanol en el lado izquierdo de POA-AHA provocó que en ninguna de las horas estudiadas se expresara este mensajero en el lado inyectado. Este mismo efecto se observó en la porción derecha de POA-AHA, excepto que en la mañana del estro el mensajero alcanzó valores que fueron semejantes a la del grupo de animales intactos (Gráfica 6A).

EFFECTOS DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA DERECHA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE- α

La inyección de etanol en el lado derecho de POA-AHA provocó la inversión en el patrón de expresión de este mensajero en ambas porciones de POA-AHA (Gráfica 6B).



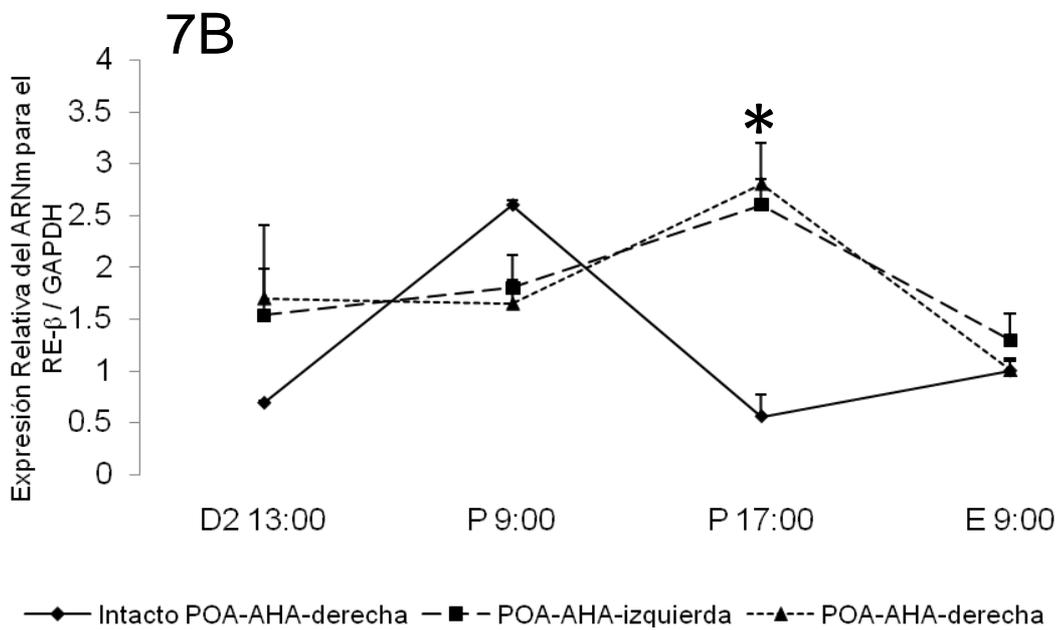
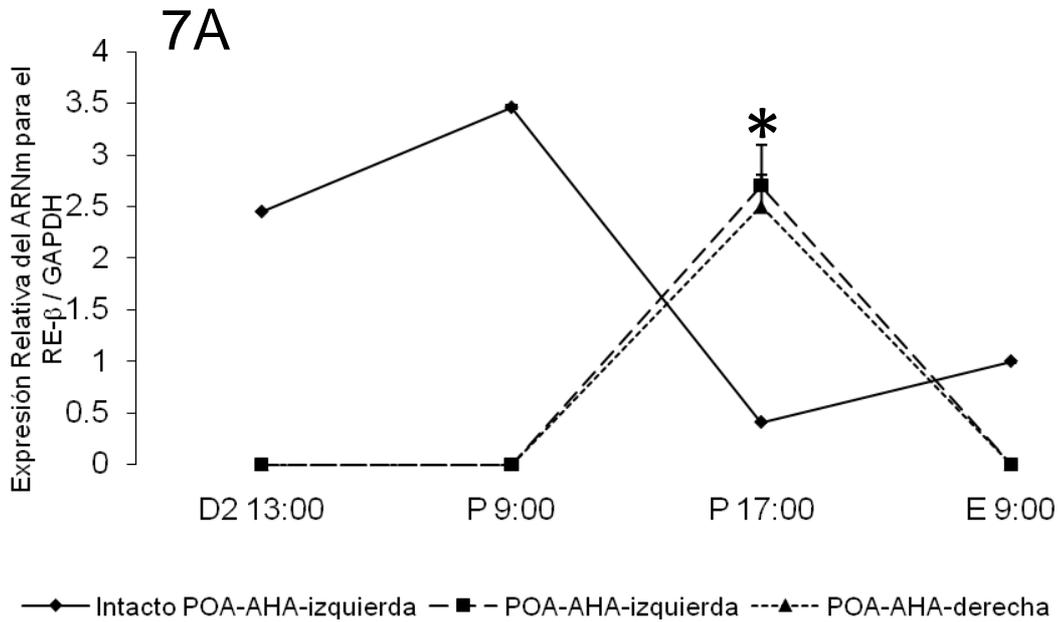
Gráfica 6.- Media + e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para RE- α en el lado izquierdo (Panel A) o derecho (Panel B) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o microinyectadas con etanol en la porción izquierda ó derecha de POA-AHA.

EFFECTO DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA IZQUIERDA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE- β

En el animal intacto, la máxima expresión del ARNm del RE- β en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA se observó en la mañana del proestro. La inyección de alcohol en el lado izquierdo provocó en ambas porciones hipotalámicas ausencia del mensajero al medio día del diestro-2 y en la mañana del proestro, así como desplazamiento del valor máximo hasta la tarde de este día (Gráfica 7A).

EFFECTO DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA DERECHA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE- β

La inyección de etanol en esta porción de POA-AHA provocó el desplazamiento del valor máximo del mensajero hasta la tarde del proestro en ambos lados de POA-AHA (Gráfica 7B).



* $p < 0.05$ vs. Intacto (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

Gráfica 7.- Media + e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para RE- β en el lado izquierdo (Panel A) o derecho (Panel B) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o microinyectadas con etanol en la porción izquierda ó derecha de POA-AHA.

EFFECTO DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA IZQUIERDA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LA GnRH

En el animal intacto, el valor máximo de la expresión del ARNm de la GnRH del lado izquierdo de POA-AHA se observó en la tarde del proestro.

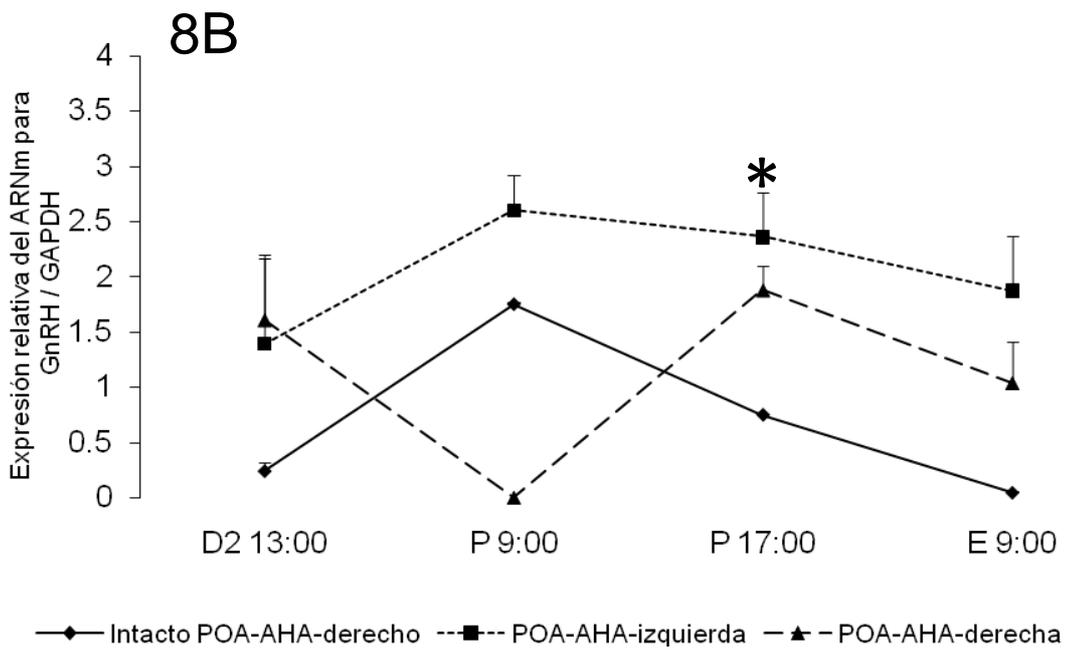
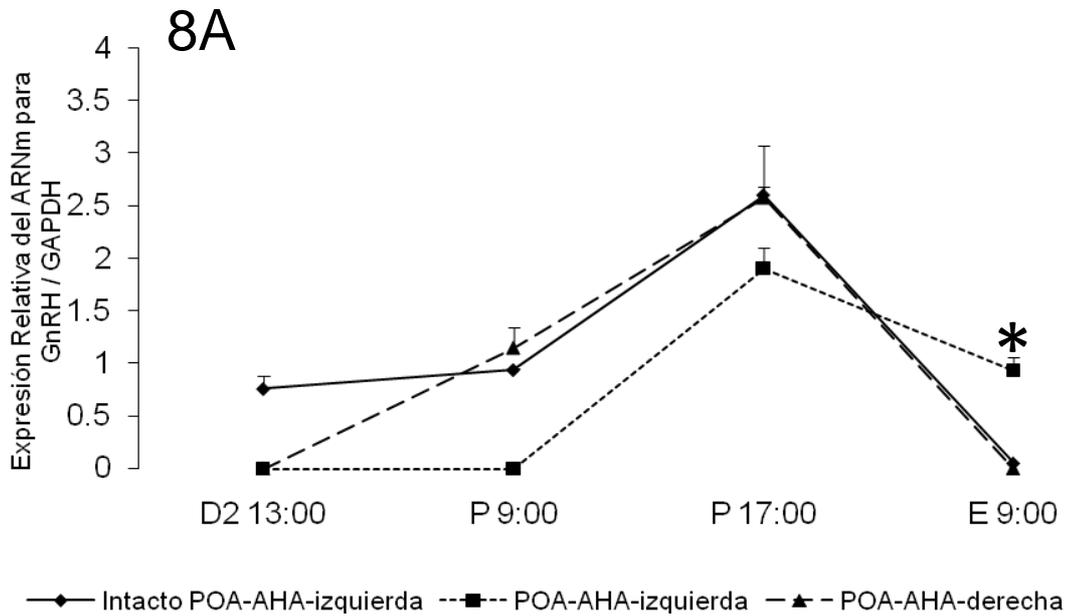
La inyección de etanol en POA-AHA izquierda provocó disminución del mensajero al medio día del diestro-2 en ambas porciones de POA-AHA. Este efecto se mantuvo hasta la mañana del proestro solamente en el lado izquierdo y en el lado derecho el valor fue semejante al grupo de ratas intactas.

En la mañana del estro, la expresión del mensajero en la porción izquierda de POA-AHA fue significativamente mayor respecto al grupo de ratas intactas (Gráfica 8A).

EFFECTO DE LA INYECCIÓN DE ETANOL EN POA-AHA DERECHA SOBRE LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LA GnRH

En el animal intacto, la expresión del ARNm de la GnRH del lado derecho de POA-AHA mostró su valor máximo en la mañana del proestro.

La inyección de etanol en el lado derecho de POA-AHA incrementó de manera constante la expresión del ARNm para la GnRH en la porción izquierda, mientras que en la derecha se invirtió el patrón de expresión del ARNm de la GnRH (Gráfica 8B).



*p<0.05 vs. Intacto (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

Gráfica 6.- Media + e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para GnRH en el lado izquierdo (Panel A) o derecho (Panel B) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o microinyectadas con etanol en la porción izquierda ó derecha de POA-AHA.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el bloqueo de la ovulación, resultado de los efectos tóxicos del alcohol sobre el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, es consecuencia de alteraciones asimétricas en los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Estos mecanismos están relacionados con la expresión del mensajero del RE α , lo que en consecuencia regularía la secreción de la GnRH, lo que repercutió en la ausencia de la secreción preovulatoria de la LH y los efectos asimétricos sobre la secreción preovulatoria de la FSH.

La microinyección de alcohol en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA indujo un efecto semejante (simétrico) sobre la secreción preovulatoria de la LH, ya que en ambos grupos experimentales se bloqueó la secreción fásica de hormona en la tarde del proestro, lo que resultó en la falta de ovulación.

En cambio, la inyección unilateral de etanol provocó efectos asimétricos sobre la secreción preovulatoria de FSH, ya que cuando el alcohol se inyectó en el lado izquierdo se observó el bloqueo de la misma, mientras que en el lado derecho no la modificó. Estos resultados nos permiten sugerir que el alcohol modifica de manera asimétrica los pulsos de secreción de la GnRH del lado izquierdo y del lado derecho de POA-AHA. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que pulsos de baja frecuencia de GnRH favorecen la síntesis de la cadena beta de la FSH y no la de la LH (Levine, 1998). Dado que en los animales tratados del lado izquierdo se bloqueó la secreción de ambas gonadotropinas, se sugiere que en este día del ciclo y en este lado de POA-AHA se regula la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH para ambas gonadotropinas; mientras que en el lado derecho, se regularían los pulsos que modulan la secreción de la LH. Otra posible explicación sería la existencia de dos neuro-hormonas que regulan de manera diferente la secreción de la LH y la FSH, lo que apoyaría la hipótesis planteada por (Shupnik y col, 1989).

La falta de secreción preovulatoria de LH y FSH en los animales tratados del lado izquierdo es el resultado de la alteración en la expresión del ARNm que codifica para la GnRH, ya que no se detectó el ARNm de éste péptido a las 29 (14:00 h del diestro 2) y 48 (9:00 h del proestro) horas de haberse inyectado el alcohol. Según Gore y Roberts (1997) el ARNm de la GnRH es traducido a proteína aproximadamente entre las 8 y 16 horas de expresarse el mensajero. En la rata cíclica, el máximo en la expresión del ARNm para la GnRH ocurre en la tarde del diestro-2 (Gore y Roberts, 1997; Arteaga-López y col, 2003) y al medio día del proestro (Gore y Roberts, 1997). Dado que la primer medición de la expresión del ARNm para la GnRH se realizó a las 14:00 del día del diestro-2, sugerimos que el alcohol inhibió la síntesis del mensajero. Se ha sugerido que en el día del proestro, el alcohol disminuye la reserva liberable de la LHRH (hormona estimulante de la liberación de la LH), resultado de la disminución de la conversión del pro-LHRH a LHRH, por aumentar la degradación local de la LHRH o por ambos (LaPaglia y col, 1997).

Por el contrario, la inyección de etanol en el lado derecho de POA-AHA provocó alteraciones opuestas en la expresión del ARNm de la GnRH a las observadas por la inyección del alcohol en el lado izquierdo, ya que en la porción izquierda de POA-AHA aumentó la expresión del mensajero de GnRH desde las 14:00 horas del diestro-2. Este resultado puede ser explicado por modificaciones en la velocidad de traducción del mensajero, por la disminución de las señales neuroendócrinas que regulan los pulsos de secreción de la GnRH o por ambas. Cualquiera de estas explicaciones aclararía que la secreción preovulatoria de FSH haya ocurrido, pero la falta de LH provocara bloqueo de ovulación en los animales tratados con la solución de alcohol del lado derecho.

La secreción de GnRH es regulada por los estrógenos (Silverman y col, 1998). Las neuronas GnRH son inmunoreactivas al RE- β pero no al RE- α (Hrabovszky y col, 2000); en los animales tratados con la solución de alcohol del lado derecho de POA-AHA se expresó el ARNm para el RE- β pero el valor máximo de las 9:00 h del

proestro se presentó ocho horas después. Con base en estos resultados, podemos sugerir que la falta de ovulación en los animales tratados en el lado derecho es el resultado de la disminución en la secreción basal y preovulatoria de estrógenos, aún cuando el RE- β hubiera estado presente en ese lado de POA-AHA. En cambio, en los animales inyectados con el alcohol en el lado izquierdo de POA-AHA, el ARNm del RE- β no se expresó hasta las 17:00 h del proestro, momento en el que se presentó el valor máximo que debió observarse en la mañana del proestro, lo que indujo el retraso de los picos preovulatorios hormonales y en consecuencia el de la ovulación.

Según Wintermantel y colaboradores (2007), el RE- α pero no el RE- β es necesario para que el estradiol ejerza el efecto “feedback” estimulante sobre la neurona GnRH. Mediante el uso de un ligando selectivo para el RE- α mostraron que este receptor no sólo es necesario, sino que es suficiente para estimular la secreción preovulatoria de LH. En nuestro modelo experimental, la inyección del alcohol en el lado izquierdo de POA-AHA bloqueó la expresión del ARNm para el RE- α , hasta las 9:00 h del estro esperado (cuando se midió en el lado derecho de POA-AHA), con un valor semejante al de las 09:00 h del proestro. Un efecto semejante en la expresión del ARNm para el RE- α ha sido observado al bloquear el sistema colinérgico muscarínico (Arteaga, 2005; García, 2007), por lo que sugerimos que los efectos del alcohol en POA-AHA izquierda estarían relacionados con el sistema muscarínico (Eckardt y col, 1998).

En los animales inyectados con alcohol en el lado derecho de POA-AHA, el mecanismo que responde a la falta de la ovulación no parece ser semejante al del lado izquierdo, ya que en estos se expresó el mensajero para el RE β pero el valor máximo de la mañana del proestro se retrazó ocho horas. Aún cuando estos receptores estuvieran presentes, no serían estimulados en el momento óptimo, dado que las concentraciones plasmáticas de estrógenos disminuyeron de manera constante.

Según Eckardt y colaboradores (1998) el consumo de alcohol afecta la función del sistema colinérgico. Floyd (1997) sugiere que este sistema juega un papel importante en mediar los efectos del alcohol sobre el sistema nervioso central. Por ejemplo, en la corteza frontal medial, el etanol provoca disminución de la liberación de acetilcolina a los 40 min de su administración (Jamal y col, 2005). En el hipocampo, tanto la administración aguda como crónica de etanol también disminuye la liberación de acetilcolina (Henn y col, 1998). Recientemente se ha mostrado que en la corteza frontal y el hipocampo, tanto el etanol como el acetaldehído disminuyen la expresión de la colino-acetil-transferasa entre los 40 y 240 minutos después de la administración de alcohol, lo que explica la disminución en la liberación de acetilcolina por estas estructuras cerebrales (Jamal y col, 2007)

La baja concentración de estradiol durante el tiempo que duró el experimento nos lleva a sugerir que el alcohol también regula la secreción basal de gonadotropinas, por lo que en los ovarios de esos animales el crecimiento folicular podría estar alterado.

Otra explicación a la falta de ovulación por la inyección unilateral de alcohol en POA-AHA estaría relacionada con el incremento de la transmisión inhibitoria, mediada por los receptores GABA. El etanol tiene un efecto potenciador sobre los receptores GABA_A (Dahchour y De Witte, 2000), lo que resulta en aumento del paso de los iones cloruro, hacia el interior de la célula, lo que provoca la hiperpolarización de la misma. Dado que las neuronas GABAérgicas hacen sinapsis con las GnRHérgicas (Conn, 1998), los efectos del etanol sobre las neuronas GnRHérgicas explicaría la falta de ARNm de la GnRH y en consecuencia de la ovulación.

El etanol y el acetaldehído también afectan la transmisión sináptica mediada por glicina, taurina, glutamato, dopamina, serotonina y opiáceos (Eckardt y col, 1998; Zuo y col, 2007), cada una de las cuales tienen efectos sobre la actividad de la neurona GnRH.

El aumento en la concentración plasmática de progesterona a las 24 horas de inyectado el alcohol, sería el resultado de la alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. En la rata, el incremento en la concentración plasmática de acetaldehído provocó aumento del ARNm del CRF (factor liberador de corticotropina, por sus siglas en inglés) en el núcleo paraventricular, del ARNm de la POMC (propiomelanocortina, por sus siglas en inglés) en la hipófisis anterior y de la concentración de corticosterona (Kinoshita y col, 2001).

Finalmente, el hecho de que ambos lados de POA-AHA respondan de manera semejante a la inyección de etanol en uno de los lados nos permite sugerir que se lleva a cabo la difusión de este disolvente hacia el lado opuesto a la inyección o que de alguna manera ocurre una comunicación química entre ambos lados de POA-AHA.

CONCLUSIONES

- ❖ En el día del diestro-1, la inyección unilateral de etanol en POA-AHA bloquea la **ovulación**.
- ❖ Los efectos tóxicos del etanol en el lado izquierdo o en el lado derecho de POA-AHA disminuye la concentración basal y preovulatoria de **estradiol**.
- ❖ Los efectos tóxicos del etanol en el lado izquierdo o en el lado derecho de POA-AHA bloquean la secreción preovulatoria de la **LH**.
- ❖ Los mecanismos neuroendócrinos generados en el lado derecho de POA-AHA resultado de la inyección del alcohol no participan en la secreción preovulatoria de la **FSH**; éstos están regulados por el lado izquierdo.
- ❖ La inyección de etanol en el lado izquierdo o en el lado derecho provoca efectos asimétricos sobre la expresión del ARNm del **RE α** . En el lado izquierdo, el etanol bloquea la expresión de este mensajero en ambos lados de POA-AHA, mientras que en el lado derecho invierte el patrón de expresión
- ❖ La inyección de etanol en el lado izquierdo o en el lado derecho provoca retraso de ocho horas de la expresión máxima del ARNm del **RE β** en ambos lados de POA-AHA.
- ❖ La inyección de etanol en el lado izquierdo o en el lado derecho provoca efectos asimétricos sobre la expresión del ARNm de la **GnRH**. En el lado izquierdo, el etanol bloquea la expresión de este mensajero hasta la mañana del proestro, en el mismo lado en que se inyectó el etanol, sin cambios en el lado opuesto. La inyección de etanol en el lado derecho invierte el patrón de expresión del ARNm de la GnRH en el mismo lado del tratamiento, mientras que en el lado opuesto (el izquierdo) la estimuló.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham IM, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE. (2003). Estrogen receptor β mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J. Neurosci* 23: 5771-5777.

Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg PH. (1986). Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 179-183.

Advis JP, Ahmed CE, Ojeda SR. (1989). Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. *Brain Res. Bull.* 22: 605-610.

Akabane J. (1979) Aldehydes and related compounds. En: International encyclopedia of pharmacology and therapeutics vols. II, section 20, Tremolières, J. ed, Pergamon, Oxford, pp 523-560.

Ambroziak W, Pietruszko R. (1991). Human aldehyde deshydrogenase. Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines. *J Biol. Chem.* 266, 13011-13018.

Arimura A. (2000). Hypothalamic hormones. En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine, Editores: Conn PM, Freeman ME. Humana Press Inc., Totowa, N.J., capítulo 3: 41-58.

Arnon R, Esposti SD, Zern MA. (1995). Molecular biological aspects of alcohol-induced liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19, 247-256.

Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza-Rodríguez CA, Cruz ME. (2003). Differential mRNA expresión of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine* 21:251-260.

Arteaga-López PR. (2005). Expresión asimétrica de la GnRH y del receptor a estrógenos en POA-AHA durante el ciclo estral de la rata. Posible participación del sistema colinérgico. Tesis de Doctor en Ciencias Biomédicas. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Bakalkin GY, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID, Krivosheev OG. (1984). Lateralization of LHRH in rat hypothalamus. *Brain Res;* 296: 361-364.

Baraona E, Julkunen R, Tannenbaum L, Lieber CS. (1986). Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats. *Gastroenterology* 90, 103-110.

- Batt RD.** (1989). Absorption, distribution, and elimination of alcohol. *Human Metabolism of Alcohol, vol I: Pharmacokinetics, Medicolegal Aspects and General Interest*, Crow, K.E. y Batt, R.D., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 3.
- Beato M, Chavez S, Truss M.** (1996). Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61(4), 240-51.
- Berne RM, Levy MN.** (1992). Revisión de la función reproductora. Fisiología. Mosby/Doyma Libros, España, 579-589.
- Boleda MD, Julià P, Moreno A, Parés X.** (1989). Role of extrahepatic alcohol deshydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 74-81.
- Bolet A, Socarrás MM.** (2003). El alcoholismo, consecuencias y prevención. *Rev Cubana Invest Biomed* 22 (1).
- Brown RE.** (1994). The pituitary gland and its hormones En: Introduction to neuroendocrinology. Cambridge University Press; 30-39.
- Butler JA, Sjöberg M, Coen CW.** (1999). Evidence for estrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J. Neuroendocrinol* 11: 331-335.
- Charli JL, Ponce G, Joseph-Bravo P.** (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRGérgicas hipotálamicas. Tópicos selectos de biología de la reproducción. Edit. R Domínguez , UNAM-PORRUA. México. 59-85.
- Chavez R, Cruz ME, Domínguez R.** (1987). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi-and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinol.* 113: 397-401.
- Chen A, Yahalom D, Ben-Aroya N, Kaganovsky E, Okon E, Koch Y.** (1998). A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS. Letters* 453 199-203.
- Cicero TJ, Badger TM, Wilcox CE, Roy D, Meyer ER.** (1997). Morphine decreases luteinizing hormone by an action on the hypothalamic-pituitary axis. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* Vol. 203, No. 3. pp 548-555.
- Conn PM, Janovick JL.** (1998). GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 2:464-477.
- Cook B.** (1987). Endocrine asymmetry (Comentary). *J. Endocrinol.* 113: 331-332.

- Cruz ME, Castro J, Domínguez R.** (1992). Comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J. Endocrinol*; 133: 205-210.
- Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R.** (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J. Endocrinol* ; 123: 437-439.
- Cruz ME, Moran JL, Jaramillo LP, Domínguez R.** (1990). Differential effects of a unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rat. *J. Endocrinol.* 124: 37-41.
- Cruz ME, Moran JL, Jaramillo LP, Domínguez R.** (1990^a). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Res Bull.* 24: 739-742.
- Dahcour A, De Witte P.** (2000). Ethanol and amino acids in the central nervous system: assessment of the pharmacological actions of acamprosate. *Prog, Neurobiol.* 60: 343-362.
- Domínguez R, Chávez R, Cruz ME.** (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción.* Editor: Domínguez R. Ed. UNAM-Porrúa, México, capítulo 7: 161-192.
- Domínguez R, Cruz ME, Chávez R.** (1988). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: *Growth factors and the ovary.* Editor A. Hirshfield. Plenum Press, Nueva York. 321-325.
- Domínguez R.** (1997). Endocrinología de las gónadas. En: *Curso internacional Precongreso. Actualización en Fisiología.* Ed. SMCF y PUIS-UNAM, México. 271-279.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B.** (1998). Effects of Moderate Alcohol Consumption on the Central Nervous System. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 22, 998-1040.
- Ehrig T, Bosron WF, Li TK.** (1990). Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Alcohol.* 25, 105-116.
- Enmark E, Gustafsson JA.** (1999) Oestrogen receptor – an overview. *Journal of Internal Medicine* 246 133-138.
- Espey LL.** (1998). Ovulation. En: *Encyclopedia of Reproduction*, Editores: Knobil E, Neill JD. Academic Press, USA, En: *Enciclopedia of Reproduction*, vol. 3: 605-614.

- Evans RM.** (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854), 889-95.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M.** (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52(4), 513-56.
- Fan NC, Peng C, Krisinger J, Leung PC.** (1995). The Human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiples promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol Cell Endocrinol* 107:R1-R8.
- Fawcett DW.** (1995). Tratado de Histología. Duodécima Edición. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp: 885-893.
- Ferin M.** (1998). Ovarian Cycle, mammals. Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 3: 547-553.
- Fink G.** (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary Function. Neuroendocrinology in physiology and medicine. Humana Press. Inc. Totowa, N.Y. pp 107-133.
- Fisher SE.** (1988). Ethanol levels in vivo. *FASBE J.* 2, 2324.
- Floyd EA, Young-Seigler AC, Ford BD, Reasor JD, Moore EL, Townsel JG, Rucker HK.** (1997). Chronic ethanol ingestion produces cholinergic hypofunction in rat brain. *Alcohol* 14:93-98.
- Frankel AI, Chapman JC, Cook B.** (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *J. Endocrinol.* 122: 485-488.
- Freeman ME.** (1994). The Neuroendocrine control of the ovarian cycle of rat. The Physiology of Reproduction, Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. Vol 1: 613-654.
- Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y.** (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy. *Neurosci Lett*; 51:367-370.
- Funabashi T, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K Kimuraf.** (2002). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. En: *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors.* Parhar I. 141: 165-173.
- Ganon WF.** (2001). Regulación central de la función visceral. Fisiología Medica. Medina CA El Manual Moderno. Capitulo 14: 253-303.

- García JE.** (2007). Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos de las porciones izquierda o derecha de POA-AHA, realizado en el día del diestro-2, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata. Tesis de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Gerendai I, Drago F, Continella G, Scapagnini V.** (1984). Effects of mastectomy and vagotomy on grooming behavior of the rat: Possible involvement of prolactin. *Physiol Behav.* 33: 1-4.
- Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U.** (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the medio basal hypothalamus. *Neurosc Lett;* 9: 333-336.
- Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Scapagnini V.** (1979). LH-RH content changes in the medio-basal hypothalamus after unilateral ovariectomy. *Neuroendocrinology: Biological and Clinical Aspects. Proceedings of Sorono Symposia, Vol 19, editors A. Polleri y R. MacLeod. New York. Academic Press.* 97-102.
- Gerendai I.** (1980). Unilateral complete isolation of the medial basal hypothalamus interferes with the compensatory ovarian growth following unilateral ovariectomy. *Neuroendocr. Let.* 2: 39.
- Gerendai I.** (1986). Laterality in the Neuroendocrine Systems. Duality and unity of the brain. Unified functioning and specialization of the hemispheres. Editor Ottoson, D., *Proceedings of an International Symposium held at The Wenner Green Center, Stockholm.* 17-28.
- Gore AC, Roberts JL.** (1997). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro. *Frontiers in neuroendocrinology* 18: 209-245.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT.** (1994). Follicular steroidogenesis and its control. *The Physiology of reproduction.* Knobil E y Neill D. Raven Press. New York. USA. 571-611.
- Grandien K, Berkenstam A, Gustafsson JA.** (1997). The estrogen receptor gene: Promoter organization and expression . *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 1343-1369.
- Guyton AC, Hall JE.** (2001). *Tratado de Fisiología Médica.* Décima edición, McGraw- Hill Interamericana. México. pp: 100 -110.
- Henn C, Loffelholz K, Klein J.** (1998). Stimulatory and inhibitory effects of ethanol on hippocampal acetylcholine release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:640-647.

Herbison AE, Pape J-R, Simonian SX, Skynner MJ, Sim JA. (2001). Molecular and cellular properties of GnRH neurons revealed through transgenics in the mouse. *Mol Cell Endocrinol.* 185(1-2):185-94.

Herbison AE. (1998). Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19: 302-330.

Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. (2000). Detection of receptor- β messenger ribonucleic acid and ^{125}I -estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinol* 141 (9): 3506-3509.

<http://www.camporenacimiento.com.mx/>

<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/default.asp?c=269&e>

Inase Y, Machida T. (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Res;* 580:338-340.

Jamal M, Ameno K, Wang W, Kumihashi M, Ameno S, Ikuo U, Shinji A, Ijiri I. (2005). Inhibition of acetaldehyde metabolism decreases acetylcholine release in medial frontal cortex of freely moving rats. *Brains Res.* 10039: 90-96.

Jamal M, Ameno K, Ameno S, Morishita J, Wang W, Kumihashi M, Ikuo U, Miki T, Ijiri I. (2007). Changes in cholinergic function in the frontal cortex and hippocampus of rat exposed to ethanol and acetaldehyde. *Neuroscience* 144 232–238.

Jennes L. (1989). Prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone-containing systems in rat brain. *Brain Research;* 482(1):97-108.

Jolly A. (1966). Lemur social behavior and primate intelligence. *Science.* 153, 501-506.

Kakar SS. (1997). Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 137:183-192.

Kalló I, Butler JA, Barkovics-Kalló M, Goubillon ML, Coen CW. (2001). Oestrogen Receptor β -immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurons: regulation by oestrogen. *Neuroendocrinology* 13: 741-748.

Kathleen MO, Rivier C. (1997). Effect of alcohol on the proestrous surge of luteinizing hormone (L.H.) and the activation of L-H Releasing Hormone (LHRH) neurons in the female rat. *The journal of neuroscience* 17(7): 2595-2604.

Kilen SD, Schwartz B. (1998). Estrous cycle. *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 2: 127-136.

Kinoshita H, Jessop DS, Finn DP, Coventry TL, Roberts DJ, Anemo H, Jiri I, Harbuz MS. (2001). Acetaldehyde, a metabolite of ethanol, activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Alcohol and alcoholism*. Vol. 36 No. 1 pp 59-64.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 46(7), 1053-61.

Köning JFR, Klippel RA. (1963). The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system. Eds. Williams and Wilkins Co. Baltimore U.S.A.

Krebs HA, Perkins JR. (1970). The physiological role of liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. J.* 118, 635-644.

Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JÅ. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930.

Kunitoh S, Asai H, Imaoka S, Funae Y, Monna T. (1996). Metabolism of acetaldehyde to acetate by rat hepatic P-450s: presence of different metabolic pathway from acetaldehyde dehydrogenase system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20, 22A-24A.

Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. (1995). Estradiol-17 β and μ -opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback. *Endocrinol* 136: 2341-2344.

LaPlagia N, Steiner J, Kirsteins L, Emanuele MA, Emanuele N. (1997). The impact of acute ethanol on reproductive hormone synthesis, processing, and secretion in female rats at proestrous. *Clinical and Experimental Research*, Vol.21, No. 9 pp. 1567-1572.

Levin ER. (1999). Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. *Trends Endocrinol Metab* 10(9), 374-377.

Levine JE. (1998). GnRH pulse generator. *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 2: 478-483.

Li, TK. (1983). The absorption, distribution and metabolism of ethanol and its effects on nutrition and hepatic function. *Medical and Social Aspects of Ethanol Abuse* (Tabakoff, B., Sutker, P.B., Randall, C.L., eds) pp 47-77. Plenum Press, New York, USA.

Lieber CS. (1994). Alcohol and the liver: update. *Gastroenterology* 106, 1085-1105.

- Lieber CS.** (1995). The metabolic of alcohol and its implications for the pathogenesis of disease. En: *Alcohol and the gastrointestinal tract*. (Preedy, V.R. y Watson, R.R. eds), pp 19-39. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Lieber CS.** (1997). Ethanol metabolism cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta* 257, 59-84.
- Lieberman BA.** (1997). The estrogen receptor activity cycle: dependence on multiple protein-protein interactions. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7(1-2), 43-59.
- López E, Cruz M.E, Domínguez R.** (1997). Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamica area on spentaneous ovulation of the rat. *Arch. Med. Res*; 28(3): 343-348.
- MacGregor JI, Jordan VC.** (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol. Rew.* 50 151-196.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM.** (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 15;83 (6) :835-839.
- McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG.** (1987). Molecular neurobiology of the mammalian brain. Segunda edición. Nueva York. 150.
- McManus IR, Brotsky E, Olson RE.** (1966). The origin of ethanol in mammalian tissues *Biochem. Biophys Acta*: 121, 167-170.
- Medina-Mora ME.** (1988). Patrones de consumo de alcohol en México. En: *Alcohol Consumption among Mexicans and Mexican- Americans: A Binational perspective*. University of California at Los Angeles (UCLA): Spanish Speaking Mental Health Research Center, California, (Ed. by Jean Gilbert),: 27-52.
- Ministerio de Salud Pública (MINSAP).** (1992). Programa de prevención, atención y control del alcoholismo. La Habana, Cuba.
- Mira L, Maia L, Barreira L, Manso CF.** (1995). Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 53-58.
- Mizunuma H, Depalatis LR, McCann SM.** (1983). Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: Evidence for direct neural connection between testes and CNS. *Neuroendocrinology.* 37: 291-296.
- Morán JL, Cruz ME, Domínguez R.** (1994). Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic and anterior hypothalamic area performed on each day of the oestrous cycle of adult rat. *Brain Res Bull*; 33:663-668.

- Nance DM, Bhargava M, Myatt GA.** (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Res. Bull.* 13: 651-655.
- Nance DM, Morger WH.** (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemi-castration. *Brain Res. Bull.* 8: 299-302.
- Nemere I, Farach-Carson MC.** (1998). Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 248(3), 443-9.
- Nordeen EJ, Yahr P.** (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science.* 218: 391-393.
- Norris JD, Fan D, Kerner SA.** (1997). Identification of a third autonomous activation domain within human estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 11 747-754.
- Norris OD.** (1996). An Overview of Chemical Regulation. *Vertebrate Endocrinology.* Academic Press. 1-22: 146-150.
- O'Malley BW, Strott AC.** (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. *Endocrinología de la Reproducción.* 4ª. Edición. Eds. Yen S, Jaffe R y R. Barbieri. Editorial Médica Panamericana: México. Págs. 119-143.
- Palkovits M.** (1973). Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res.* 59: 449.
- Palkovits M.** (2000). Micro and Macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine.* Conn PM y Freeman ME. Human Press. 23-31.
- Parés X, Farrés J.** (1995). Alcohol and aldehyde dehydrogenases in the gastrointestinal tract. *Alcohol and the gastrointestinal tract.* (Preedy, V.R. y Watson, R.R., eds) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Parés X, Martínez SE, Borrás E, Martras S, Rossell A, Farrés J, Vaglenova J.** (2001). Distribution of ADH in human organs. Relevance of alcohol metabolism and pathology. En: *Alcohol in Health and Disease.* (Agarwal, P.D. y Seitz H.K., eds). Pp 87-102. Marcel Dekker. New York. USA.
- Parhar IS.** (2002). Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes. *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors.* Parhar I. 141: 3-17.
- Pietras RJ, Nemere I, Szego, CM.** (2001). Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine* 14(3), 417-27.
- Piña CA, Madrigal BE, Cassuri GM.** (1991). Daño genético producido por las bebidas alcohólicas. *Ciencia y Desarrollo.* Vol XVII. México.

- Rao ChV, Edgerton LA.** (1984). Dissimilarity of corpora lutea within some ovaries or those from right and left ovaries of the pigs during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 70: 61-66.
- Rettori V, McCann SM.** (1997). The mechanism of action of alcohol to suppress gonadotropin secretion. *Molecular Psychiatry* 2. pp.350-354.
- Rintala J, Jaatinen P, Parkkila S, Sarviharju M, Kiianmaa K, Hervonen A, Niemela O.** (2000). Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol.* 35, 458-463.
- Rivier C.** (1999). Alcohol rapidly lowers plasma testosterone levels in the rat: evidence that a neural brain-gonadal pathway may be important for decreased testicular responsiveness to gonadotropin. *Clinical and experimental research.* Vol. 23, No. 1. pp. 38-45.
- Roby KF, Terranova F.** (1998). Theca cells. En: *Encyclopedia of Reproduction*, Editores: Knobil E, Neill JD. Academic Press, USA, En: *Encyclopedia of Reproduction* Eds. Academic. 4: 790-803.
- Rollerova E, Urvancikava M.** (2000). Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (review). *Endocrine regulation.* 34 203-218.
- Rosen J, Day A, Jones TJ.** (1995). Intracellular receptor and signal transducers and activators of transcription superfamilies: Novel for small-molecule drugs discovery. *J. Med. Chem.* 38 4855- 4874.
- Sánchez MA, Lopez-García JC, Cruz ME, Tapia R, Domínguez R.** (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrus cycle of the rat. *Neuroreport*; 5: 433-434.
- Schwartz NB.** (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. En: *Neuroendocrinology in Physiology and medicine.* Eds PM Conn & Mefreema. EEUU. Raven Press. 135-145.
- Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I.** (1998). Evidence for the colocalization of estrogen receptor- β mRNA and estrogen receptor- α immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinol* 139: 5267- 5270.
- Shupnik MA, Weinmann CM, Notides AC, Chin WW.** (1989). An upstream region of the rat luteinizing hormone β gene bind estrogen receptor and confers estrogen responsiveness. *J Biol. Chem.* 261 80-86.
- Silverman AJ, Levine I, Within JW.** (1998). The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction.* Knobil E. Y Nelly JD editores. Vol. 1, Cap. 28, Raven Press, Nueva York, pp 1683-1709.

- Silverman AJ.** (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill D. Raven Press. 1: 1638-1709.
- Sitges M.** (1993). Comunicación entre las células nerviosas. Sinapsis. Comunicación neuroendocrina. Bases celulares moleculares. Sociedad mexicana de ciencias fisiológicas CONACy y SEP. p.22.
- Skyner MJ, Sim JA, Herbison AE.** (1999). Detection of estrogen receptor α and β messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinol* 140: 5195-5201.
- Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M.** (1995). Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrous cycle. *Endocrine Journal*; 42(6):789-796.
- Terelius Y, Norsten-Hoog C, Cronholm T, Ingelman-Sundberg M.** (1991). Acetaldehyde as a substrate for ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 689-694.
- Tiihonen J, Kuikka J, Hakola P, Paanila J, Airaksinen J, Eronen M, Hallikainen T.** (1994). Acute ethanol induced changes in cerebral blood flow. *Am J Psychiatr*;151(10):1505-8.
- Tresguerres JAF.** (2003). Fisiología del ovario. En: *Fisiología humana*. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. Fisiología del sistema endocrino. 1037.
- Tsai MJ, O'Malley BW.** (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63 451-486.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C.** (2000). Biochemical And functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive Bio Medicine Online*. 1: 48-62.
- Watson PE.** (1989). Total body water and blood alcohol levels: updating the fundamentals. *Human Metabolism of Alcohol*, vol. I: *Pharmacokinetics, Medicolegal Aspects and General Interest* (Crow, K.E y Batt, R.D., eds.), pp 41. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Weigel NLW.** (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.* 319 657-667.
- Welsh TH, Nann KG, Kimberly N, Livingston.** (1998). Stress and reproduction. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.). Academic Press. U.S.A. 4: 662, 665, 668.
- Whitfield JB, Martin NG.** (1993). Aversive reactions and alcohol use in Europeans. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17, 131-134.

Windholz M. (1976). *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals and drugs*. Ninth edition. Meck y Co., Inc., Rahway, N.J., USA.

Wintermantel TM, Campbell E, Porteous R, Bock D, Gröne HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schütz G, Herbirson AE. (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin - releasing hormone neuron and fertility. *Neuron*. 52: 271-280.

Wong KHH, Adashi EY. (1998). Granulosa Cells. En: *Encyclopedia of Reproduction*, Editores: Knobil E, Neill JD. Academic Press, USA, vol. 3: 569-571.

Yao HH, Bahr JM. (1998). Ovary, overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 3: 590-595.

Yen SS. (2001). Neuroendocrinología de la reproducción. En: *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri RI. Editorial Medica Panamericana. Argentina. 31-85.

Zuo GC, Yang JY, Hao Y, Dong YX, Wu CF. (2007). Ethanol and acetaldehyde induce similar changes in extracellular levels of glutamate, taurine and GABA in rat anterior cingulate cortex. *Toxicology Letters* 169 253–258.