



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

**Laboratorio De Neuroendocrinología  
UMIEZ**

“Efectos del bloqueo del RE- $\alpha$  de POA-AHA en el día del diestro-1, sobre la ovulación, la secreción de hormonas esteroideas y la expresión del ARNm de la GnRH en el hipotálamo”

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

**HILDA GUTIERREZ HUESCA**

Directora de Tesis: Dra. María Esther Cruz Beltrán

MEXICO D.F.

SEPTIEMBRE DEL 2012



Financiamiento: CONACyT (81898) y DGAPA (PAPIIT: IN-21450)



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 MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Efectos del bloqueo del RE- $\alpha$  de POA-AHA en el día del diestro-1, sobre la ovulación, la secreción de hormonas esteroides y la expresión del ARNm de la GnRH en el hipotálamo.**

**Tesis presentada por: Hilda Gutiérrez Huesca**

**Directora de Tesis: Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán**

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

**Laboratorio de Neuroendocrinología**

Financiamiento: CONACyT (Convenio 81898) y DGAPA-PAPIIT (IN214508)

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. <b>ADN</b> .....	Acido Desoxirribonucleico
2. <b>AHA</b> .....	Área Hipotalámica Anterior
3. <b>AMPc</b> .....	Adenosin Monofosfato Cíclico
4. <b>AP</b> .....	Antero Posterior
5. <b>ARN</b> .....	Acido Ribonucleico
6. <b>ARNm</b> .....	Acido Ribonucleico Mensajero
7. <b>AVPV</b> .....	Núcleo Paraventricular Anteroventral
8. <b>DBB</b> .....	Banda Diagonal de Broca
9. <b>DBD</b> .....	Dominio de Unión al ADN
10. <b>DHEA</b> .....	Dehidro-epiandrosterona
11. <b>E<sub>1</sub></b> .....	Estrona
12. <b>E<sub>2</sub></b> .....	Estradiol
13. <b>EM</b> .....	Eminencia Media
14. <b>FSH</b> .....	Hormona Folículo Estimulante
15. <b>GABA</b> .....	Acido Gamma Aminobutírico
16. <b>GAPDH</b> .....	Guanin Adenosin Difosfato
17. <b>GnRH</b> .....	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
18. <b>HRE</b> .....	Elemento de Respuesta a Hormonas
19. <b>IMO</b> .....	Factor Inhibidor de la Maduración del Ovocito
20. <b>LBD</b> .....	Dominio de Unión al Ligando
21. <b>LDL</b> .....	Lipoproteína de Baja Densidad
22. <b>LH</b> .....	Hormona Luteinizante
23. <b>ML</b> .....	Medio Lateral
24. <b>MPOA</b> .....	Área Preóptica Medial
25. <b>MPP</b> .....	Metil-Piperidino-Pirazol
26. <b>NPY</b> .....	Neuropéptido Y
27. <b>P<sub>4</sub></b> .....	Progesterona
28. <b>PGE</b> .....	Prostaglandina E
29. <b>POA-AHA</b> .....	Área Preóptica Hipotalámica Anterior
30. <b>RE</b> .....	Receptor a Estrógenos
31. <b>RE<math>\alpha</math></b> .....	Receptor a Estrógenos Alfa
32. <b>RE<math>\beta</math></b> .....	Receptor a Estrógenos Beta
33. <b>RT-PCR</b> .....	Técnica de la Retrotranscripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
34. <b>SERMs</b> .....	Modulador Selectivo de los Receptores Estrogénicos
35. <b>SPRMs</b> .....	Modulador Selectivo de los Receptores de Progesterona
36. <b>SRMs</b> .....	Modulador Selectivo de Receptores
37. <b>StAR</b> .....	Proteína Reguladora de la Esteroidogénesis Aguda
38. <b>T</b> .....	Testosterona
39. <b>TGF-<math>\beta</math></b> .....	Factor de Crecimiento Tumoral $\beta$
40. <b>V</b> .....	Vertical
41. <b>VIP</b> .....	Péptido Intestinal Vasoactivo

## **LISTA DE IMÁGENES.**

<b>Figura 1</b> .....	Compartimentos del folículo
<b>Figura 2</b> .....	Desarrollo y Diferenciación del folículo ovárico en el ratón
<b>Figura 3</b> .....	Molécula conocida como ciclo-pentano-perhidro-fenantreno
<b>Figura 4</b> .....	Molécula de la Progesterona
<b>Figura 5</b> .....	Molécula de la Testosterona
<b>Figura 6</b> .....	Molécula de Estradiol
<b>Figura 7</b> .....	Biosíntesis de Hormonas Esteroides
<b>Figura 8</b> .....	Vía $\Delta_4$ y $\Delta_5$ de síntesis de las hormonas esteroides
<b>Figura 9</b> .....	Biosíntesis de esteroides en los compartimentos del ovario
<b>Figura 10</b> .	Perfil de las concentraciones plasmáticas de P4, E2, LH y FSH durante los cuatro días del ciclo estral de la rata
<b>Figura 11</b> .....	Organización estructural de los receptores nucleares
<b>Figura 12</b> .....	Modelo de acción del RE
<b>Figura 13</b> .....	Configuración tridimensional de los RE
<b>Figura 14</b> .....	Morfología Bipolar de una neurona GnRHérgica
<b>Figura 15</b> .....	Diferentes modos de acción de los estrógenos en la neurona GnRHérgica
<b>Figura 16</b> .....	Estructura del MPP
<b>Tabla 1</b> .	Secuencia de aminoácidos de las diferentes moléculas de GnRH en diferentes especies

<b><u>INDICE</u></b>	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
EL CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO OVÁRICO DE LA RATA.....	<b>3</b>
EVENTOS OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL.....	<b>4</b>
LAS FUNCIONES DEL FOLÍCULO OVÁRICO.....	<b>6</b>
LA SECRECIÓN DE ESTRÓGENOS.....	<b>7</b>
PATRÓN DE SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y ESTEROIDES OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL.....	<b>13</b>
RECEPTORES NUCLEARES.....	<b>16</b>
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES NUCLEARES (RN).....	<b>18</b>
ESTRUCTURA DE LOS ELEMENTOS QUE RESPONDEN A LOS ESTEROIDES.....	<b>23</b>
BASE ESTRUCTURAL DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS SOBRE LOS RECEPTORES NUCLEARES.....	<b>24</b>
MODULADORES SELECTIVOS DE RECEPTORES.....	<b>25</b>
RECEPTOR A ESTRÓGENOS.....	<b>25</b>
MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO.....	<b>26</b>
LAS NEURONAS GNRHÉRGICAS.....	<b>26</b>
DIFERENTES MOLÉCULAS DE GNRH.....	<b>28</b>
CITOLOGÍA DE LA NEURONA GNRH.....	<b>29</b>
REDES NEURONALES GNRHÉRGICAS.....	<b>29</b>
LIBERACIÓN DE GNRH.....	<b>30</b>
INTERACCIONES ESTROGÉNICAS EN LA RED GNRHÉRGICA.....	<b>30</b>
ACCIÓN DE LOS ESTROGENOS EN LA NEURONA GNRHÉRGICA.....	<b>31</b>
FEEDBACK POSITIVO DE LOS ESTRÓGENOS.....	<b>32</b>

FEED BACK NEGATIVO DE LOS ESTRÓGENOS.....	33
ASIMETRIAS NEUROENDOCRINAS.....	33
MPP (METIL-PIPERIDINO-PIRAZOL).....	35
TWEEN 20® .....	36
<b>PROPÓSITO DEL ESTUDIO.....</b>	<b>37</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

La secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es modulada por diferentes sustancias, como el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), este es secretado por el ovario y una de sus principales funciones es regular la secreción de la GnRH, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH).

Esta función del  $E_2$  ocurre al unirse a dos tipos de receptores, el alfa ( $RE\alpha$ ) y el beta ( $RE\beta$ ). Aunque la mayoría de las neuronas que sintetizan la GnRH poseen el  $RE\beta$  y no el  $RE\alpha$ , se desconoce cuál es el papel específico del  $E_2$  al unirse a uno u otro receptor. Por lo que el propósito de este proyecto de investigación fue estudiar el papel del  $RE\alpha$  en el lado izquierdo del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) sobre la ovulación, el peso de los ovarios y del útero, la secreción de hormonas esteroides y la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH.

Para ello se utilizaron ratas hembras, adultas y cíclicas de la cepa CIIZV, que fueron micro-inyectadas con  $25\mu\text{g}$  de MPP (metil-piperidino-pirazol; antagonista de los  $RE\alpha$ ) disuelto en  $1\mu\text{l}$  de una solución de Tween 20® durante un minuto, en el lado izquierdo de POA-AHA. Ésta micro-inyección se realizó a las 09:00h del diestro-1. Todos los animales fueron sacrificados a las 2, 26, 50 y 98 horas posteriores a la micro-inyección del fármaco. Como grupos absolutos de comparación se utilizaron ratas cíclicas sin tratamiento sacrificadas en las mismas horas que los grupos experimentales.

Los resultados obtenidos muestran que el bloqueo de los  $RE\alpha$  en el lado izquierdo de POA-AHA a las 09:00 h del día del diestro-1 regula a la baja la expresión del ARNm de la GnRH, así como la secreción de  $E_2$ . Con respecto a los resultados obtenidos sobre el número de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados, los efectos del MPP fueron semejantes a los obtenidos por la micro-inyección del Tween 20®. Ya que este surfactante bloqueó la ovulación, disminuyó la expresión del ARNm de la GnRH, la secreción de  $E_2$  y de progesterona.

Con base en los resultados obtenidos sugerimos que la unión del  $17\beta$ -estradiol al  $RE\alpha$  en la mañana del diestro-1, regula de manera estimulante la expresión del ARNm de la GnRH, así como la secreción de estradiol, sin modificar la de progesterona. Además, proponemos no usar el Tween 20® como un vehículo adecuado para micro-inyectar fármacos de naturaleza lipídica a la hora, día del ciclo y lado de POA-AHA en los que se realizó éste estudio, ya que interfiere con mecanismos centrales y periféricos que culminan con la ovulación.



## INTRODUCCIÓN

El eje hipotálamo-hipófisis-ovario regula los mecanismos neuroendocrinos y las conductas que culminan con la reproducción. El hipotálamo es el “centro nervioso” en el que se inicia la cascada de eventos neuroendocrinos que culminan con la ovulación. En los roedores, este “centro nervioso” lo conforman un tipo de neuronas del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) que secretan la neurohormona llamada hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH (por sus siglas en inglés: Gonadotrophin Releasing Hormone). La GnRH al actuar sobre sus células blanco; los gonadotropos de la hipófisis anterior estimulan la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). A su vez estas gonadotropinas regulan las funciones del ovario al estimular el crecimiento y la diferenciación de los folículos, la secreción de hormonas esteroideas y la ovulación <sup>(24)</sup>.

La secreción de la GnRH es modulada por diferentes sustancias entre las que podemos citar a neurotransmisores como la noradrenalina, la serotonina, la acetilcolina, el GABA, neuropéptidos, opioides y hormonas esteroideas como la progesterona y el  $17\beta$ -estradiol <sup>(24)</sup>.

Existen dos tipos de receptores a estrógenos (RE), el  $\alpha$  y el  $\beta$ . En POA-AHA se han identificado ambos receptores <sup>(40, 41, 42,43)</sup>, sin embargo, la mayoría de las neuronas GnRHérgicas poseen sólo el RE $\beta$  <sup>(24)</sup>.

A la fecha se desconoce el papel específico de cada uno de estos receptores al unírseles el estradiol; tampoco se conoce si su función cambia durante el ciclo estral y si la activación de los receptores de POA-AHA de un lado del cerebro es diferente a la del otro.

Por lo que en este estudio, se analizaron los efectos del bloqueo de los RE $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA a las 9:00 hrs. de la fase del diestro-1, sobre la expresión del ARNm de la GnRH en ambos lados de POA-AHA, la concentración sérica de estradiol y progesterona a las 2, 26, 50 y 98 horas posteriores a la micro-inyección del fármaco. También se analizaron los efectos del bloqueo de los RE $\alpha$  sobre el peso de los ovarios y del útero, el número de ovocitos liberados y la ovulación.

## MARCO TEÓRICO

### EL CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO OVÁRICO DE LA RATA

En la rata, la duración del ciclo ovárico puede ser modificada en función de los ciclos de luz/obscuridad en el que se mantienen a los animales. La palabra *estro* es una adaptación al latín de la palabra “oistros” que significa frenesí. Este término fue usado primeramente por Heape <sup>(1,2)</sup> que describe el “periodo especial de deseo sexual de la hembra”. Heape uso los prefijos *pro -*, *di-* y *met-*, con el sufijo *estro* para describir los estadios del ciclo ovárico durante el ciclo sexual <sup>(1)</sup>.

La fase de proestro está caracterizada por el tiempo en que el animal “comienza a entrar en calor”. El siguiente periodo se llama *estro*, Heape lo describe como “el tiempo en que la hembra esta preparada para recibir al macho y tener un coito fructífero”. En ausencia de la concepción, el *estro* es seguido por un periodo corto llamado *metaestro* o *diestro-1*, es de variable duración en diferentes especies. La última etapa, llamada *diestro* o *diestro-2* es la fase en que el ovario secreta de manera progresiva, mayores concentraciones de progesterona que preparan al útero para recibir al óvulo fertilizado.

La rata no se reproduce estacionalmente, sino que lo hace varias veces al año, de aquí que sea una especie poliéstrica que ovula de manera espontánea, es decir, la ovulación no depende de la estimulación neural provocada por los diferentes sistemas sensoriales que se activan durante las conductas de apareamiento. La ovulación ocurre cada cuatro a cinco días durante toda su vida reproductiva, la longitud de las fases del ciclo estral se definen en función de la citología que se observa al tomar un frotis de la vagina <sup>(1)</sup>.

El ***proestro*** se caracteriza por la presencia abundante de células epiteliales nucleadas, redondas, que aparecen agrupadas. Ocasionalmente se observa en baja cantidad células cornificadas escamosas. Según Freeman, el proestro tiene una duración de 12 a 14 hrs <sup>(1)</sup>.

El **estro** es la fase en la que dominan las células escamosas cornificadas, son célula sin núcleo, su citoplasma contiene una gran cantidad de gránulos, su forma es irregular y aparecen en grupos. El estro dura de 25 a 27 hrs <sup>(1)</sup>.

En el **Diestro-1** el tipo de célula dominante es el leucocito, pero también se presentan células epiteliales nucleadas. Los leucocitos son pequeñas células con citoplasma granular y usualmente contienen núcleos vesiculados; el metaestro o diestro-1 tiene una duración de 6 a 8 hrs.

En el **Diestro-2** se observan células de todo tipo (nucleadas, cornificadas y leucocitos). Esta fase dura de 55 a 57 hrs <sup>(1)</sup>.

### **EVENTOS OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL**

El folículo ovárico es la unidad anátomo-funcional del ovario, a partir del cual se originan los tres compartimentos del órgano: el folicular, el luteal y el intersticial. Las funciones del folículo son liberar al ovocito, así como secretar las hormonas que estimulan el crecimiento y diferenciación de los órganos del sistema reproductor, la secreción de GnRH y de las gonadotropinas. El folículo está formado por el ovocito, las células de la granulosa, una membrana basal y las células tecales; estas últimas conforman la denominada teca interna, por fuera de ella se encuentra la teca externa; constituida por fibras colágenas, células de tejido conectivo y fibras musculares lisas <sup>(3,4)</sup> (Figura 1).

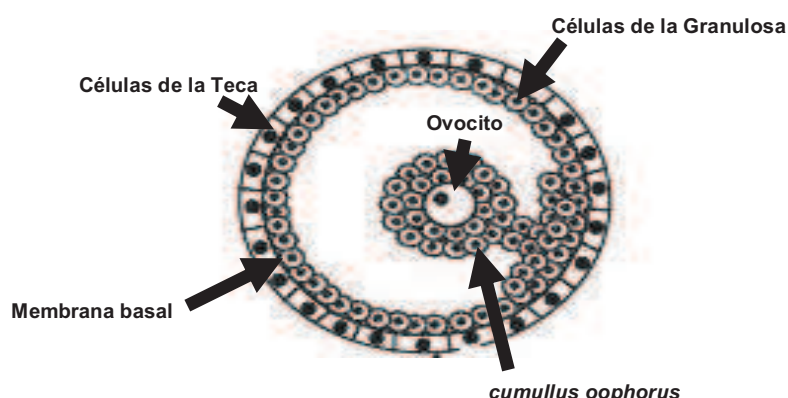


Figura 1. Esquema en el que se representan los componentes de un folículo (Tomado de Rajkovic <sup>4</sup>).

El ovocito de un ratón es una célula cuyo tamaño es menor a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro en los folículos primordiales, presenta numerosas micro-vellosidades y está rodeado por las células de la granulosa. En el folículo con antro las células de la granulosa, forman el denominado *cumulus oophorus*, el cual es expulsado junto con el ovocito, el cual alcanza un diámetro de 70  $\mu\text{m}$  en el momento de la ovulación <sup>(4)</sup>.

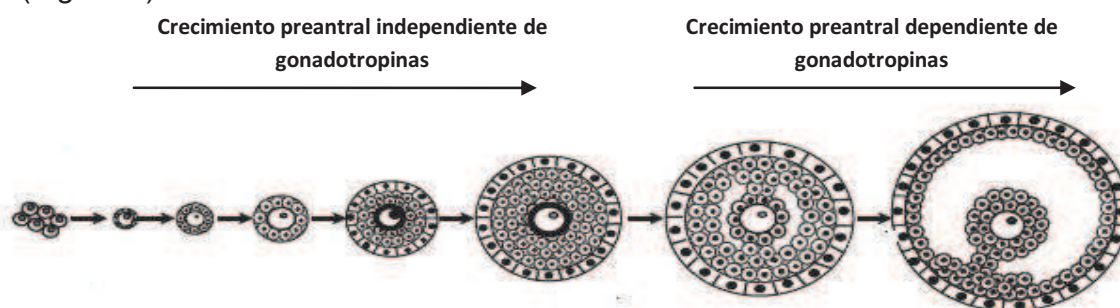
Después del nacimiento, el ovocito se encuentra en la etapa de diploteno de la primera profase de la división meiótica. Antes de que se produzca la ovulación, el ovocito completa la primera fase de la meiosis y se convierte en un ovocito secundario que es expulsado en el momento de la ovulación <sup>(4)</sup>.

En los folículos sin antro o con antro pequeño, el proceso de maduración final del ovocito está inhibido por una hormona o factor inhibidor de la maduración del ovocito (IMO), secretado por las células foliculares. La transformación del ovocito I a ovocito II es estimulada por la LH y la GnRH <sup>(1,3)</sup>.

*Las células de la granulosa.* Estas forman una capa continua que rodean completamente al ovocito y lo aísla del resto del ovario. El primer indicio de crecimiento folicular es el aumento del tamaño del ovocito y el crecimiento y proliferación de las células de la granulosa. Una vez iniciado el crecimiento folicular, este no se detiene y culmina en la ovulación o la atresia. La mayoría de los folículos terminan en la atresia <sup>(1,3)</sup>.

En el folículo en crecimiento las células de la granulosa proliferan rápidamente por estímulo de la FSH y los estrógenos, los cuales actúan de manera sinérgica. En la rata, las células de la granulosa sólo poseen receptores a FSH, cuyo número es constante durante el ciclo estral, mientras que los de LH comienzan a expresarse en los folículos que existen en la etapa de diestro-1 y aumentan en la tarde del diestro-2, y alcanzan su máximo antes del pico de LH en el día del proestro <sup>(1,3)</sup>.

Una vez que las células de la granulosa forman siete u ocho capas alrededor del ovocito, comienza a observarse la presencia de pequeños acúmulos del licor folicular, denominados cuerpos de Call-Exner, que se origina por extravasación de componentes plasmáticos y la secreción de células foliculares. En el licor folicular se encuentran proteínas, polipéptidos, FSH, LH, prolactina, estrógenos, progesterona, gonadocrininas y noradrenalina cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral. La acumulación del licor folicular forma el antro folicular el cual aumenta de tamaño con el desarrollo del folículo. Después de la ovulación, las células tecales se transforman en células teco-luteínicas del cuerpo lúteo <sup>(1,3)</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Desarrollo y diferenciación del folículo ovárico en el ratón.** De izquierda a derecha se representan las modificaciones que va sufriendo el folículo desde su etapa primordial hasta la preovulatoria. (Tomada y modificada de Rajkovic <sup>4</sup>).

*Las células teco-intersticiales.* Estas células tienen receptores a LH, a prolactina, a la hormona adeno-corticotropica, noradrenalina, GnRH y los estrógenos. En el folículo en crecimiento las células diferenciadas sintetizan andrógenos, los que sirven de sustrato a las células de la granulosa en la producción de estrógenos.

En el folículo preovulatorio, las células tecales pierden la capacidad de sintetizar andrógenos y secretan progesterona, por efecto de la LH <sup>(1,3)</sup>.

### **LAS FUNCIONES DEL FOLÍCULO OVÁRICO**

El ovario tiene tres funciones principales que son; el crecimiento y diferenciación de los folículos, la secreción de hormonas esteroides y peptídicas, y la ovulación <sup>(3)</sup>.

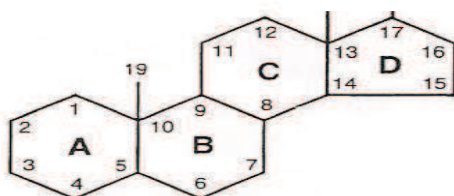
*La ovulación.* Uno de los procesos en los que culmina el crecimiento y la diferenciación folicular es la salida del ovocito I; este proceso recibe el nombre de ovulación <sup>(3)</sup>.

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. La secreción preovulatoria de la LH estimula la síntesis y liberación de la prostaglandina E (PGE), la que a su vez, estimula la secreción de plasminógeno. Este último activa la secreción de fibrolisina por las células de la granulosa, enzima que degrada las fibras de colágeno que resulta en la desintegración de los desmosomas entre las células de la granulosa y de la teca <sup>(3)</sup>.

Cuando ocurre la secreción preovulatoria de la LH, la síntesis de estrógenos disminuye mientras que aumenta la de progesterona. La plasmina degrada la colágena de la pared folicular y en consecuencia disminuye su rigidez, lo que favorece la expulsión del ovocito <sup>(1,3)</sup>.

### LA SECRECION DE ESTRÓGENOS

Las hormonas esteroides se clasifican según su estructura química y su actividad biológica, en: progestágenos, andrógenos y estrógenos, los cuales tienen un núcleo esteroide compuesto por 21 átomos de carbono, agrupados en tres ciclohexanos y un ciclopentano, molécula conocida como ciclo-pentano-perhidro-fenantreno <sup>(5,6)</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** La molécula conocida como ciclo-pentano-perhidro-fenantreno es el núcleo básico de los esteroides. Los átomos de carbono de los esteroides están numerados y las estructuras del anillo se designan con letras <sup>(7)</sup>.

En condiciones normales el folículo secreta progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T), estradiol ( $E_2$ ) y estrona ( $E_1$ ).

La  $P_4$ , tiene un núcleo esteroide pregnano de 21 átomos de carbono, con un átomo de oxígeno en la posición C3 y un doble enlace en C20 (Figura 4) (5,6).

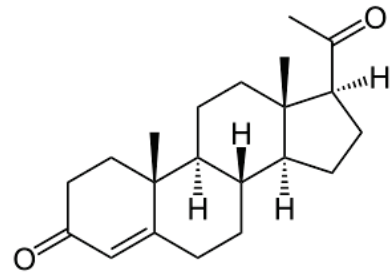


Figura 4. Molécula de la progesterona

El andrógeno con más actividad biológica es la T, la cual tienen un núcleo esteroide androstano, que es un compuesto orgánico con 19 átomos de carbono, con un átomo de oxígeno con doble enlace en la posición C3 y un grupo hidroxilo en la posición C17 (5,6) (Figura 5).

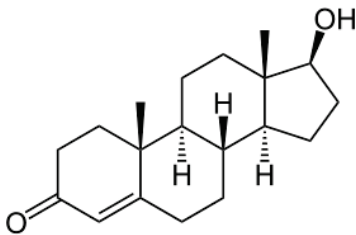


Figura 5. Molécula de testosterona

Los estrógenos comprenden la estrona, el estriol y el  $E_2$ ; este último es el de mayor actividad biológica. El estradiol tiene un núcleo esteroide estrano que es un compuesto que contiene 18 átomos de carbonos, tienen un grupo hidroxilo en la posición C3 y otro en C17 (8) (Figura 6).

En la hembra, las hormonas esteroideas son sintetizadas a partir de colesterol por tejidos endocrinos como los ovarios, las adrenales y la placenta, además de sitios extra glandulares como el cerebro, tejido adiposo

la piel, el hueso, varios tejidos fetales (5). Las células con función esteroideogénica pueden obtener el colesterol de tres maneras: a) incorporarlo de la sangre a partir de las lipoproteínas circulantes, b) del almacenado bajo la forma de ésteres presentes en las inclusiones de lípidos del citoplasma, y c) al sintetizarlo de "novo" a partir de acetato (9).

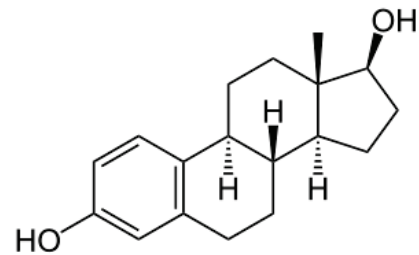
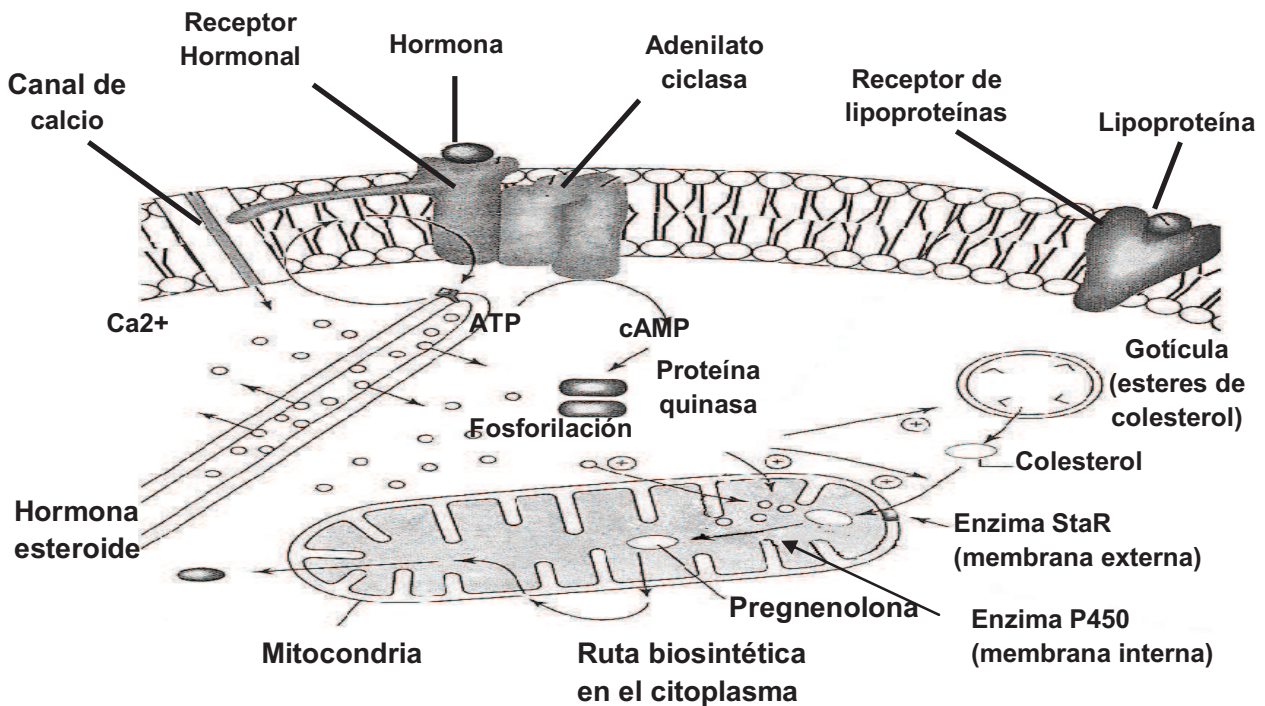


Figura 6. Molécula del estradiol



La mayor parte del colesterol llega unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y entra a la célula por endocitosis, formando gotitas lipídicas de esteres de colesterol que se hidrolizan formando colesterol libre, el cual es transportado de la membrana mitocondrial externa a la interna<sup>(9)</sup>.

La etapa inicial en la biosíntesis de los esteroides es la transferencia del colesterol al interior de la mitocondria que es realizada por la StAR (proteína reguladora de la estereidogénesis aguda). En las membranas mitocondriales el colesterol es convertido en pregnenolona por la enzima citocromo P<sub>450</sub><sub>scc</sub> (20, 22 desmolasa) (Figura 7).

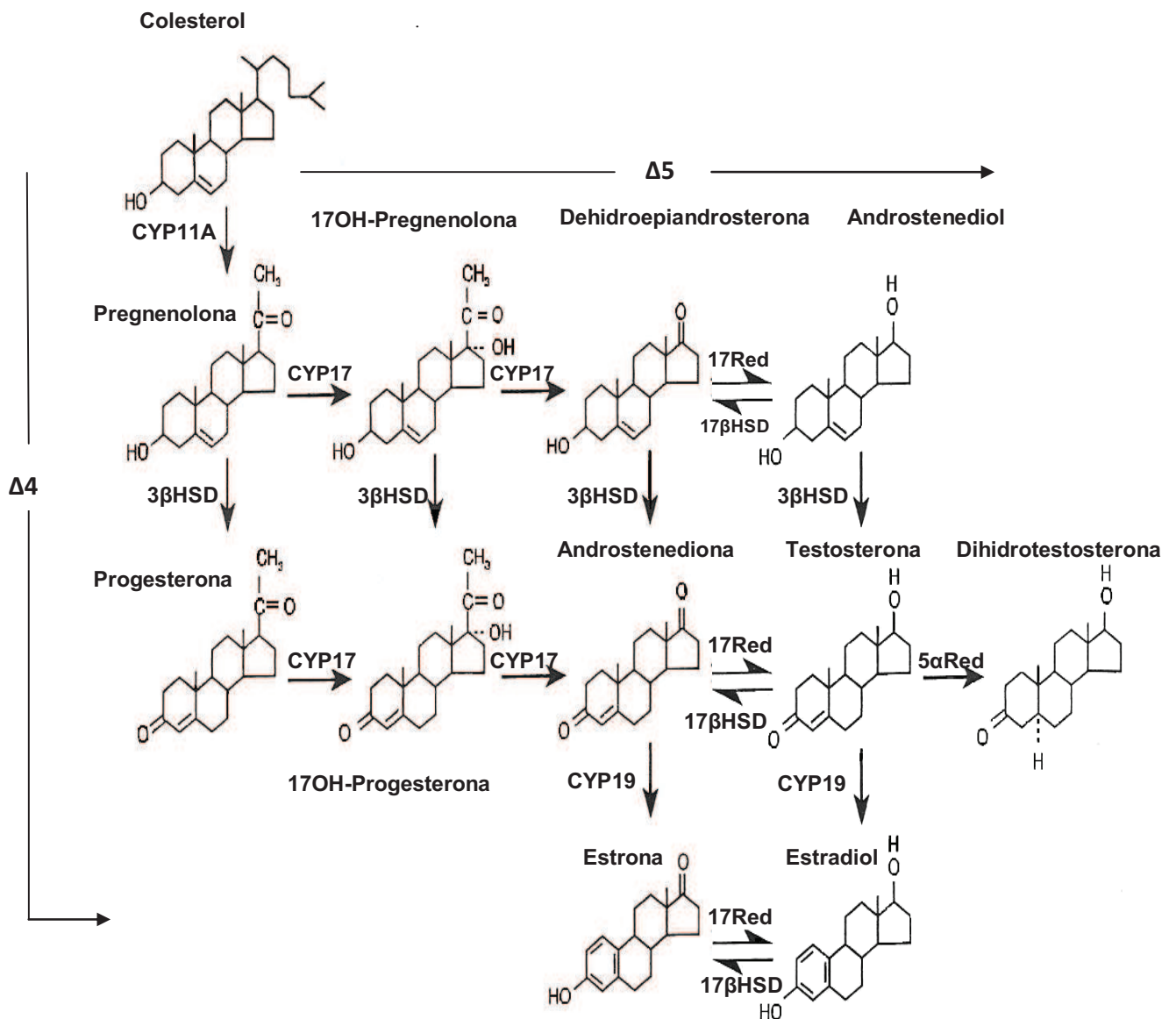


**Figura 7.** Biosíntesis de hormonas esteroides. La etapa inicial es el paso de colesterol a pregnenolona que se realiza en la membrana mitocondrial por la acción de la enzima P<sub>450</sub>. La unión de las LDL (lipoproteínas de baja densidad), a sus receptores específicos provoca que el colesterol penetre por endocitosis al interior de las células con actividad esteroidogénica. Parte del colesterol se almacena en gotas lipídicas que se hidrolizan produciendo colesterol libre, que es usado como sustrato. El colesterol es transportado a la membrana interna de la mitocondria por la proteína StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis), donde se encuentra la enzima P<sub>450</sub>, la que rompe la cadena lateral de carbonos del colesterol. Una vez sintetizada la pregnenolona, sale de la mitocondria y sufre una modificación secuencial que dará lugar a la síntesis de progesterona, sustrato principal en la síntesis de los distintos esteroides <sup>(Tomada de Litwack 16)</sup>.



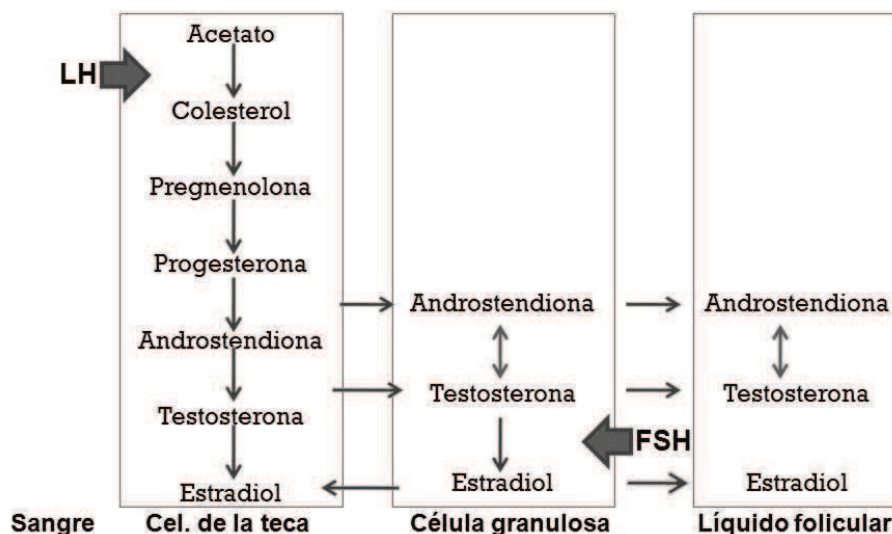
Una vez fuera de la mitocondria, en el retículo citoplasmático, la pregnenolona puede ser transformada al compuesto inmediato por dos rutas, la  $\Delta_4$  ó  $\Delta_5$ . En la ruta  $\Delta_4$  la pregnenolona es transformada a progesterona por la enzima 3-beta-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD). La progesterona es convertida a  $17\alpha$ -hidroxi-progesterona por la enzima  $P450_{c17\alpha}$ . La desmolasa (17,20-esteroide liasa) la convierte a androstenediona. Este metabolito es modificado en testosterona por la enzima 17-beta-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD). Tanto la androstenediona como la testosterona pueden ser modificados a estrógenos por la enzima  $P450_{arom.}$  <sup>(8,10,11)</sup>.

En la ruta  $\Delta_5$  la pregnenolona es transformada a  $17\alpha$ -hidroxi-pregnenolona por la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa. Después, la  $C_{17,20}$ -liasa convierte  $17\alpha$ -hidroxi-pregnenolona en dehidro-epiandrosterona (DHEA), ésta a su vez es modificada a androstenediona por la enzima  $17\beta$ -HSD. A partir de aquí la androstenediona sigue la ruta  $\Delta_4$  (Figura 8) <sup>(11)</sup>.



**Figura 8.** Vía  $\Delta_4$  y  $\Delta_5$  de síntesis de las hormonas esteroides. Las enzimas son: Clivaje de la cadena lateral del colesterol (CYP11A); 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa (17 $\alpha$ -CYP17); 17-reductasa (17Red); 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ HSD); 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD); 5 $\alpha$ -reductasa (5 $\alpha$ Red); aromatasa (CYP19) <sup>(7)</sup>.

En las especies animales que se han estudiado, el folículo ovárico es el sustrato anatómico más importante en la síntesis del  $17\beta$ -estradiol. La biosíntesis de estrógenos en esta glándula es explicada por la teoría de “las dos células” o “doble célula”, en la cual se plantea la participación combinada de las células de la teca interna y las células de la granulosa (Figura 9) <sup>(12,13)</sup>.



**Figura 9.** Biosíntesis de esteroides en los compartimentos del ovario. La unión de la LH a su receptor membranal en las células de la teca interna, induce la activación del complejo enzimático de la desmolasa del colesterol, localizada en la membrana interna de la mitocondria <sup>(13)</sup>. La desmolasa es una oxidasa con funciones mixtas, miembro del grupo enzimático citocromo P-450, que separa la cadena lateral de colesterol del carbono 17, convirtiendo el colesterol en pregnenolona (constituida de 21 carbonos), por la pérdida de un fragmento de 6 carbonos (reacción que requiere NADPH y oxígeno molecular) <sup>(14)</sup>. La pregnenolona es el precursor de todas las hormonas esteroides. La transformación de pregnenolona a androstendiona y testosterona en los mamíferos sucede a través de dos vías metabólicas. Estas vías se han designado como “ $\Delta^5$ ” y “ $\Delta^4$ ”, según la localización del punto de insaturación (doble enlace) de los compuestos intermedios (Figura 7) <sup>(14,15)</sup>. Los andrógenos: androstendiona y testosterona, sintetizados en las células de la teca, atraviesan la membrana basal, y se difunden hasta las células de la granulosa cercanas, que contienen aromatasas <sup>(13,14)</sup>.

La FSH estimula el proceso de aromatización. La conversión de los andrógenos en estrógenos requiere que ocurran tres oxidaciones consecutivas, cada una de las cuales consumen un mol de oxígeno y un mol de NADPH. El proceso inicia con hidroxilación enzimática en el carbono 19, que constituye el paso limitante, y se cataliza por medio de la 19-esteroide hidroxilasa <sup>(12,13)</sup>.

A continuación se introduce un segundo grupo hidroxilo, con la consecuente eliminación estereoespecífica de un átomo de hidrógeno y por la pérdida de una molécula de H<sub>2</sub>O, el diol formado se transforma en un 19-aldehído. Finalmente el anillo A es aromatizado con la subsecuente remoción del carbono 19 <sup>(13,14)</sup>.

La FSH estimula la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa al unirse a su receptor en la membrana celular. Los efectos de la FSH sobre la síntesis de estrógenos son mimetizados por el AMPc. A diferencia de la FSH, la LH regula la síntesis de estrógenos por sus efectos sobre la hidrólisis del éster de colesterol, al catalizar la enzima colesterol esterasa por sus efectos estimulantes en la producción de andrógenos por las células tecaes y en la síntesis y actividad del complejo enzimático aromatasa en las células de la granulosa <sup>(3)</sup>.

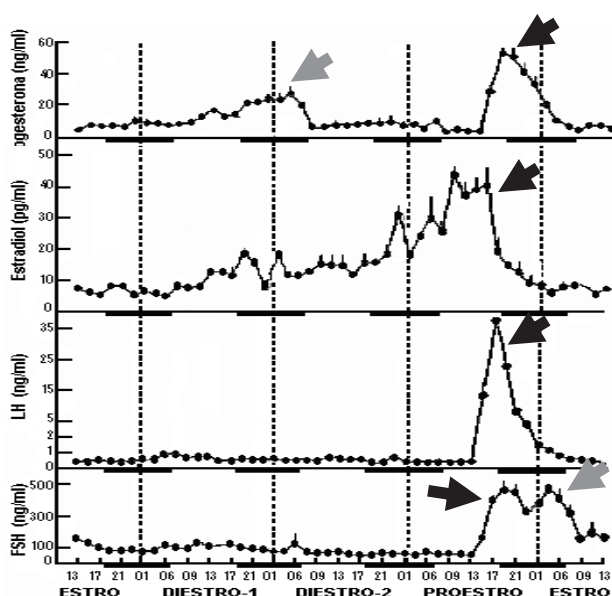
La LH estimula la actividad de la aromatasa en aquellas células de la granulosa que fueron previamente estimuladas por la FSH. En el caso de la rata adulta, esto ocurre en la tarde del diestro-2. En los folículos pre-antrales, las células de la granulosa carecen de receptores a LH y su síntesis es estimulada por la FSH y los estrógenos. Según Hsueh y col. <sup>(17)</sup>, la LH es la hormona más importante en la regulación de la producción de estrógenos. Después de la secreción preovulatoria de LH, esta hormona inhibe a sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que resulta en la disminución de la síntesis de estrógenos. La prolactina inhibe la actividad de la aromatasa y bloquea los efectos de la FSH sobre las células de la granulosa, lo que resulta en la disminución de la producción de estrógenos <sup>(17)</sup>.

#### **PATRÓN DE SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y ESTEROIDES OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL (FIGURA 10).**

El periodo preovulatorio del ciclo estral es caracterizado por el crecimiento de los folículos ováricos y un aumento en la secreción de estrógenos. En la rata, la secreción de 17β-estradiol al plasma venoso del ovario es bajo en el estro, comienza a elevarse significativamente en el diestro-1 y durante la mañana del diestro-2, y alcanzan los valores más altos en la mañana y medio día del proestro,

pero caen rápidamente a concentraciones basales en la tarde del proestro, las que se mantienen hasta el estro <sup>(1, 18,19)</sup>.

El aumento en la concentración plasmática de progesterona durante la tarde del diestro-1 proviene de la formación de los cuerpos lúteos. Un segundo valor máximo en la concentración de progesterona toma lugar durante la tarde y noche del proestro. El incremento en la concentración sanguínea de progesterona de la tarde y noche del proestro ocurre casi simultáneamente al aumentar la liberación de la hormona luteinizante (LH), que induce la ovulación <sup>(1)</sup>.



**Figura 10.** Perfil de las concentraciones plasmáticas de progesterona, estradiol, LH y FSH durante los cuatro días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan el período de oscuridad en el que se encuentran los animales (18:00 - 06:00 h). Las flechas indican las concentraciones por arriba de las basales ("picos") de las diferentes hormonas, las cuales en general ocurren en el día del proestro y que son conocidas como pre-ovulatorias, excepto para progesterona en la tarde del diestro-1 y para la FSH en la madrugada del estro <sup>(1)</sup>.

Las concentraciones séricas de LH son bajas durante la mayor parte del ciclo estral, en la mañana del estro (poco después de la ovulación), durante el diestro-1, el diestro-2 y antes del medio día del proestro <sup>(1)</sup>.

Desde el estro hasta el diestro-2, la LH se secreta de manera circádica, que consiste en una pequeña elevación de LH al medio día, con concentraciones bajas a la media noche de cada día. En la tarde del proestro, entre las 14:00 y 15:00 horas, la concentración circulante de LH comienza a incrementarse rápidamente y llega a un valor máximo, "secreción preovulatoria", entre las 17:00 y 19:00 horas.

Después de este tiempo, la concentración circulante de LH empieza a disminuir hasta llegar a las concentraciones basales que se observan en la mañana del estro. La secreción preovulatoria de LH induce la ruptura folicular y la ovulación<sup>(1)</sup>.

La liberación de LH ocurre por medio de pulsos, con frecuencias de alrededor de 55 a 60 minutos, cuya amplitud varía de 15 a 40 ng/ml; concentraciones que se pueden detectar desde el diestro-1 a la mañana del proestro. Durante la tarde del proestro, la LH va a inducir la ovulación como resultado del aumento en la amplitud de los pulsos, que alcanzan hasta 600 ng/ml, sin que varíe la frecuencia de los mismos. La frecuencia y amplitud de los pulsos disminuye en la mañana del estro hasta que llegan a ser ausentes, y regresan a valores basales desde la mañana del diestro-1 y hasta el proestro<sup>(20, 21, 1)</sup>.

Los patrones de secreción de la FSH son similares a los de la LH. En el día del proestro la liberación de FSH aumenta simultáneamente con la de LH, entre las 14:00 y 15:00 horas, y las concentraciones llegan al máximo entre las 17:00 y 19:00 horas. Durante la mañana del estro ocurre otro aumento de FSH, la que comienza a disminuir y llega a su concentración basal en la tarde del estro<sup>(1)</sup>.

La liberación preovulatoria de FSH y de LH en la tarde del proestro depende del aumento en la amplitud y la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH hacia el sistema porta hipotálamo-hipófisis, se sugiere que el segundo aumento en la secreción de la FSH en el día del estro, puede ser independiente del control hipotalámico. El primer "pico" en la liberación de FSH en el día del proestro es bloqueada al inyectar pentobarbital, ya que este anestésico atraviesa la barrera hematoencefálica y modifica el componente lipídico de la membrana, provocando el fenómeno de fluidificación, e interfiriendo con el intercambio rápido de los iones cloro, sodio, potasio, calcio y con la liberación de neurotransmisores<sup>(22)</sup>.

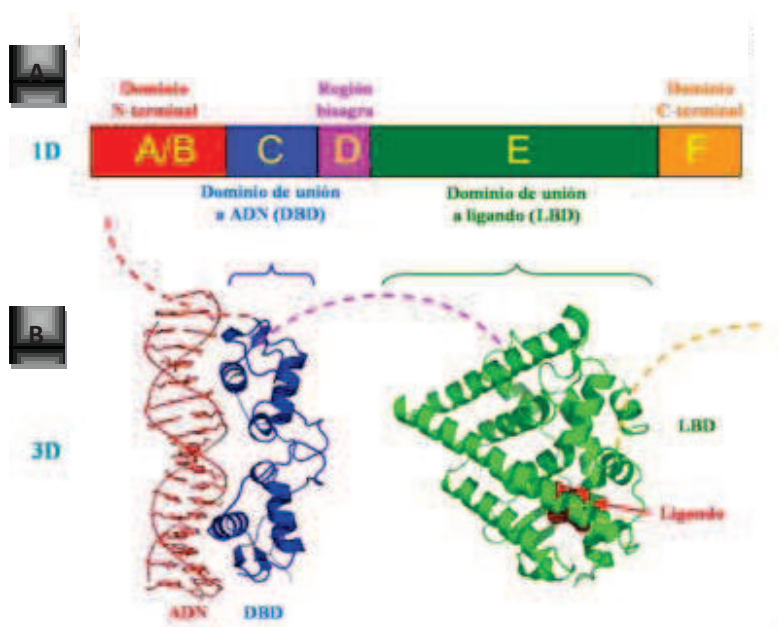
. Pero al inyectar de nuevo GnRH en el día del proestro se vuelve a restaurar esta liberación de FSH. Esto indica que esta liberación de FSH depende directamente de un estímulo hipotalámico, pero el segundo pico que se da en el día del estro temprano es independiente del control hipotalámico y aparentemente es inducido por la disminución en la concentración de inhibina<sup>(20, 23, 24)</sup>.

La LH y la FSH son glicoproteínas que se encuentran en todos los mamíferos y están formadas por dos subunidades: la alfa, que es común para la LH y la FSH ( $\alpha$ -gly), y otra, la beta, que es estructuralmente específica para cada gonadotropina ( $\beta$ -LH,  $\beta$ -FSH), y le confiere la actividad biológica específica <sup>(25)</sup>.

### RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares están constituidos por seis dominios funcionales: A/B, C, D, E y F (figura 11).

**Figura 11.** Organización estructural de los receptores nucleares.



**A:** Esquema de la secuencia de amino-ácidos de un receptor nuclear.

**B:** Estructura en tercera dimensión de las regiones DBD (de unión a ADN) y LBD (de unión a ligando) de un receptor nuclear. Las estructuras mostradas corresponden al receptor de estrógeno. Las estructuras del dominio N-terminal (A/B), de la región bisagra (D) y del dominio C-terminal (F) aun no han sido determinadas, por lo que han sido representadas con líneas punteadas de color rojo, morado y naranja, respectivamente <sup>(26)</sup>.

El Dominio A/B ó Dominio regulador N-terminal: contiene la función de activación 1 (AF-1), cuya acción es independiente de la presencia de ligando <sup>(26)</sup>. La activación transcripcional de AF-1 suele ser muy débil, pero presenta un efecto sinérgico con AF-2 en el dominio LBD que da a lugar a una regulación de la expresión génica mucho más fuerte. Este dominio es muy variable entre los distintos receptores nucleares <sup>(26)</sup>.

El Dominio C ó Dominio de unión al ADN (DBD), esta muy conservado contiene dos dedos de zinc, los cuales unen específicamente una secuencia del ADN denominada elemento de respuesta a hormonas (HRE) <sup>(26)</sup>.

El Dominio D ó Región de Bisagra, región estructural que muestra una gran flexibilidad y conecta los dominios DBD y LBD. Tiene un importante papel en el tráfico celular y en la distribución subcelular <sup>(26)</sup>.

El Dominio E ó Dominio de Unión al Ligando (LBD). Este dominio se encuentra moderadamente conservado en la secuencia y muy conservado en estructura entre los distintos receptores nucleares. Junto con el dominio DBD, LBD contribuye a la dimerización del receptor nuclear y, además, es capaz de unir coactivadores y correpresores. El dominio LBD también contiene la función de activación 2 (AF-2) cuya acción es dependiente de la presencia de ligando unido<sup>(26)</sup>.

El Dominio F ó Dominio C-terminal: Este dominio muestra variabilidad entre los distintos receptores nucleares <sup>(26)</sup>.

Los receptores nucleares pueden ser clasificados con base en dos criterios: su mecanismo de acción o su localización en la célula en ausencia de ligando.

- Tipo I: La unión del ligando a los receptores nucleares de tipo I en el citosol da lugar a la disociación de las proteínas de choque térmico, la homodimerización, la translocación desde el citoplasma al interior del núcleo<sup>(27)</sup>.
- Tipo II: Se mantienen en el núcleo independientemente de si su correspondiente ligando está o no unido, y se unen al ADN en forma de heterodímeros. En ausencia de ligando, los receptores nucleares de tipo II forman un complejo con proteínas correpresoras. Entre los receptores nucleares de tipo II se incluye a el receptor de la hormona tiroidea, el receptor X retinoide<sup>(27)</sup>.
- Tipo III: Estos son similares a los receptores nucleares de tipo I en cuanto a que ambos se unen en forma de homodímeros, sin embargo estos se unen a repeticiones directas, en lugar de repeticiones invertidas, de los HREs en el ADN. Los receptores nucleares de tipo III son receptores huérfanos, ya que sus ligandos aún son desconocidos<sup>(27)</sup>.



- Tipo IV: Los receptores nucleares de tipo IV se unen al ADN en forma tanto de monómeros como de dímeros, pero sólo uno de los dominios de unión a ADN del receptor se une a la mitad de la secuencia del HRE <sup>(27)</sup>.

### **MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES NUCLEARES**

La unión del ligando a los receptores nucleares de tipo I en el citosol, da lugar a la disociación de las proteínas de choque térmico, la homo-dimerización, la translocación desde el citoplasma al interior del núcleo y la unión a HRE. Estas secuencias HRE consisten en dos repeticiones invertidas separadas por una secuencia de ADN de longitud variable <sup>(27)</sup>.

Entre los receptores nucleares de tipo I se incluyen miembros de la subfamilia 3, tales como los receptores a los andrógenos, estrógenos, progesterona y glucocorticoides <sup>(27)</sup>.

La unión del receptor nuclear a la cadena de ADN forma el llamado complejo RN/ADN, el cual recluta otra serie de proteínas implicadas en la transcripción de los genes diana y su traducción a proteínas que resultaran en un cambio de la función celular <sup>(27)</sup>.

### **PROTEÍNAS CORREGULADORAS**

Los receptores nucleares unidos al HRE reclutan un significativo número de proteínas adicionales (referidas como *correguladores transcripcionales*), que facilitan o inhiben la transcripción de los genes diana <sup>(28, 29)</sup>. Las funciones de estos correguladores son variadas e incluyen mecanismos que implican la remodelación de la cromatina (permitiendo una mayor o menos accesibilidad de la maquinaria transcripcional de los genes diana) o la estabilización de la unión de otras proteínas correguladoras <sup>(28, 29)</sup>.

### COACTIVADORES

La unión de ligandos agonistas a los receptores nucleares induce un cambio conformacional del receptor que implica un incremento de la afinidad de unión por *proteínas coactivadoras*. Estas proteínas suelen poseer actividad histona acetiltransferasa (HAT), que debilita la asociación de las histonas al ADN, y de este modo, facilita la transcripción de los genes diana <sup>(29)</sup>.

### CORREPRESORES

Por el contrario, la unión de ligandos antagonistas a los receptores nucleares induce un cambio conformacional del receptor que implica un incremento de la afinidad de unión por *proteínas correpresoras*.

Estas proteínas reclutan enzimas con actividad histona deacetilasa (HDAC), que incrementa la afinidad de las histonas por el ADN, y de este modo, reprime la transcripción de los genes diana <sup>(29)</sup>.

### PROMOTORES

El *promotor* es el sitio de iniciación de la transcripción de un gen, es absolutamente necesario para la transcripción génica. En ausencia de un promotor, el gen no es transcrito a una velocidad constante. Si el promotor es “fuerte”, la velocidad de transcripción es alta, y si el promotor es “débil” se expresa a una velocidad más baja. En este caso la transcripción del gen no es sometida a estimulación por las hormonas esteroides <sup>(29)</sup>.

### INTENSIFICADORES QUE RESPONDEN A LOS ESTEROIDES

Los intensificadores son secuencias cortas de ADN (15 pares de bases), que sobre estimulan la transcripción y que pueden estar localizados cerca de sus genes afines o a cierta distancia de ellos. Estos responden a las señales de las hormonas esteroides, sirven como sitios de fijación del ADN de los complejos esteroide-receptor activados <sup>(30, 31)</sup>.

### SILENCIADORES

Por el contrario, los silenciadores son elementos *cis* que funcionan en una forma opuesta a la de los intensificadores. Actúan para disminuir o silenciar la transcripción de los genes. Un gen puede tener uno o más silenciadores. Si hay un silenciador presente, el gen adyacente no posee un ritmo basal de transcripción en ausencia de la estimulación de las hormonas esteroides. Sin embargo, la activación del elemento que responde a los esteroides superará el efecto silenciador y activará la expresión del gen <sup>(31)</sup>.

### INTENSIFICADORES INDEPENDIENTES DE LAS HORMONAS

Están localizados en el interior de la región reguladora del gen. Estos elementos *cis* tienden a aumentar la función del elemento que responde a los esteroides al elevar aún más la velocidad máxima de expresión de los genes inducibles <sup>(31)</sup>.

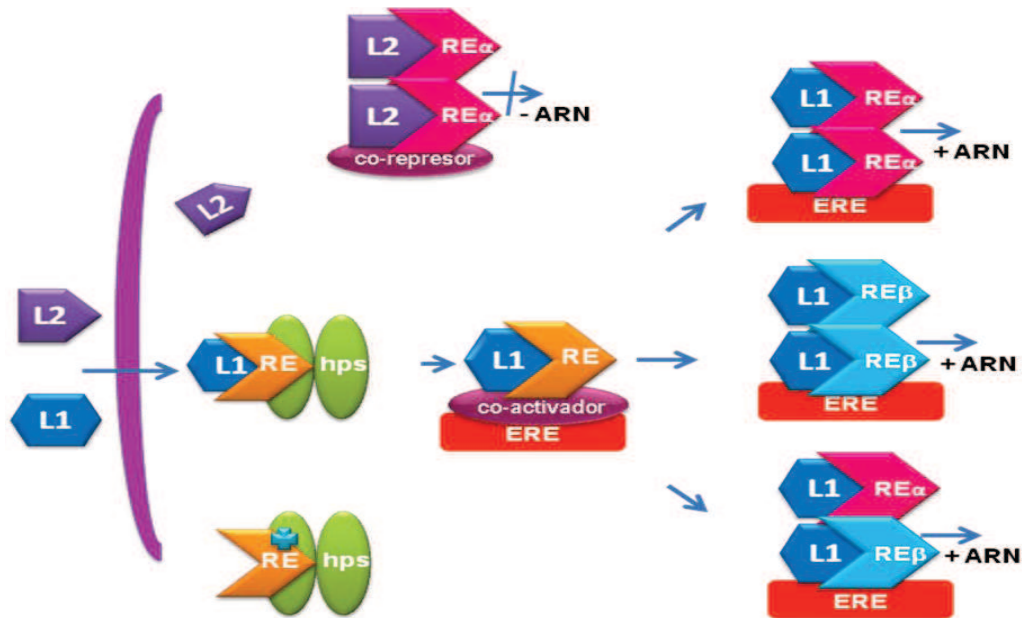
### MECANISMOS RESULTANTES DE LA UNIÓN DE LA HORMONA ESTEROIDE A SU RECEPTOR EN LA CÉLULA

#### BLANCO

Los receptores a esteroides son sintetizados en los microsomas citoplasmáticos a partir de ARNm. Los receptores a glucocorticoides, progesterona, testosterona y estrógenos pueden ser aislados del citosol en ausencia del ligando correspondiente, mientras que después de la adición de la hormona, estos receptores sólo pueden ser extraídos del núcleo <sup>(32)</sup>.

Una vez que los estrógenos se encuentran dentro de la célula, se unen a receptores inactivos localizados en el compartimento citoplasmático o nuclear (estos receptores son clasificados como factores de transcripción). El complejo hormona-receptor sufre un cambio conformacional alostérico que lo convierte en una forma activa, capaz de afectar la transcripción nuclear de los genes. Para funcionar de manera eficiente y directa, el receptor debe dimerizarse, interactuar con secuencias específicas del ADN y luego acoplarse con otros factores de transcripción para formar un complejo multimérico, estable que estimule a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción en ese gen. Se sintetiza un pre-ARNm grande que incluye todos los exones y todos los intrones del gen. El pre-ARNm es

procesado por un “complejo de empalme” que separa todos los intrones y reúne los exones en una secuencia continua que codifica el producto proteico respectivo del gen (Figura 12) <sup>(30, 33,34)</sup>.



**Figura 12.** Modelo de acción del RE. El RE sin ligando está representado por el heterocomplejo unido a las proteínas hsp, y otros chaperones. La unión cooperativa del antagonista (L2) induce la liberación del receptor del agregado o conjunto formado. La unión al agonista (L1) induce la unión de co-reguladores necesarios en la función del receptor, el cambio conformacional, la activación de la dimerización, la unión cooperativa de múltiples copias de EREs localizadas en las regiones reguladoras de los genes blanco <sup>(36)</sup>.

Después de su síntesis citoplasmática y antes de su activación, muchos receptores a esteroides forman complejos con proteínas llamadas de choque térmico, tales como hsp 90 y hsp 70 <sup>(32)</sup>. La última función de los receptores es provocar efectos específicos en la transcripción. La transcripción es el proceso por el cual los genes del ADN son copiados a ARNs precursores para producir ARN mensajeros (ARNm). Los ARNm, a su vez, serán traducidos para producir proteínas. La síntesis del ARN la llevan a cabo enzimas llamadas ARN-polimerasas, las cuales copian la secuencia nucleotídica de una de las cadenas de ADN. Existen dos tipos de secuencias específicas en el ADN importantes para el inicio de la transcripción: la región promotora y la región potencializadora <sup>(35)</sup>.

La región promotora contiene 3 regiones con diferentes funciones: una conocida como caja CAAT, que es el sitio de unión inicial de la ARN-polimerasa al ADN; otra conocida como caja TATA que alinea a la ARN-polimerasa en un sitio específico; para iniciar la transcripción y por último, una región donde se inicia la transcripción del ARN <sup>(35)</sup>.

La región potencializadora consiste de dos secuencias idénticas de pares de bases, que al ser eliminadas reducen el índice de transcripción. Por ello se le considera como potencializadora de este proceso <sup>(35)</sup>.

Los receptores a esteroides activan la transcripción aumentando el ensamblaje de un complejo de factores de transcripción en la caja TATA, después de lo cual estos factores interactúan para formar un complejo de iniciación rápida necesario para que la ARN-polimerasa inicie la transcripción. La estimulación de la transcripción genera más ARN-ribosomal (maquinaria esencial para la síntesis proteica) y más ARN-mensajero para especificar la secuencia de aminoácidos de las proteínas que serán sintetizadas durante la respuesta hormonal <sup>(35)</sup>.

La mayoría de las respuestas hormonales son reversibles o de duración finita. En apoyo a esto se ha observado que el complejo hormona-receptor ocupa los sitios aceptores del ADN hasta por 12 o 16 horas, después de lo cual los abandona o es degradado. La salida del complejo hormona-receptor da lugar a otro complejo recién formado siempre y cuando se mantenga el aporte de la hormona. La proteína receptora es sintetizada comúnmente o reciclada del núcleo al citoplasma, por lo que el paso limitante está dado por el suministro de la hormona <sup>(35)</sup>.

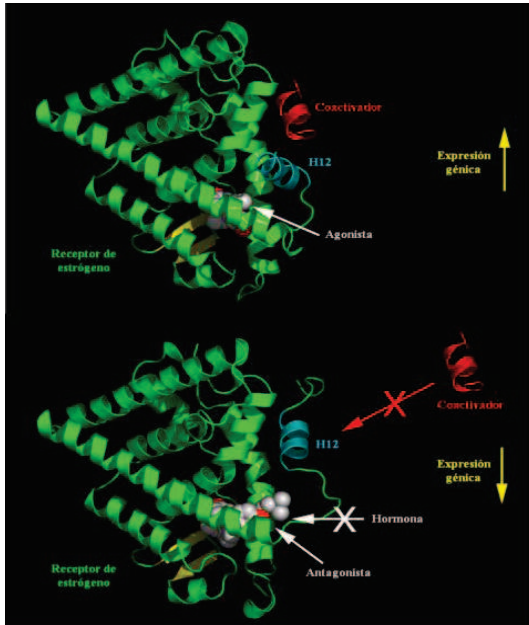
## ESTRUCTURA DE LOS ELEMENTOS QUE RESPONDEN A LOS ESTEROIDES

Los elementos cis están compuestos por dos hemi-sitios para la unión al receptor del esteroide. En general los hemi-sitios de los elementos que responden a los esteroides se localizan sobre cadenas complementarias de ADN y señalan en la dirección opuesta para formar un eje doble de simetría (palíndromo). Su secuencia varía sólo ligeramente para una diferente capacidad de respuesta a la hormona, lo que indica una reacción de gran especificidad. Si bien actualmente no se conocen los mecanismos precisos de fijación del receptor al elemento que responde a los esteroides, algunas evidencias recientes sugieren que una molécula del complejo esteroide-receptor activado se unirá a cada uno de los hemi-sitios para formar un dímero (Figura 12)<sup>(30)</sup>.

Los genes que codifican para los receptores se encuentran bajo control hormonal. Por ejemplo, el gen que dirige la síntesis del receptor de la progesterona, es un gen complejo de más de 40000 pb (pares de bases) de longitud, compuesto por 8 exones, que cuando es procesado al producto final, el ARNm, dirige a la célula en la síntesis del receptor. A su vez, el gen del receptor de la progesterona es estimulado por los estrógenos. Esta observación experimental demuestra la cooperación que se desarrolla entre las hormonas en el sistema endocrino y se ajusta a la observación clínica que para que la progesterona actúe sobre el útero femenino y permita la implantación y el crecimiento del ovocito fertilizado, debe haber ocurrido una exposición previa a estradiol endógeno o a agentes estrogenicos exógenos<sup>(30)</sup>.

El complejo hormona-receptor “regula a la baja” la síntesis de su propio receptor, a través de la inhibición de la síntesis o del incremento en el recambio del ARNm del receptor de la hormona. De esta forma se minimiza la sobre-estimulación potencial con la hormona, y la célula es protegida del daño resultante<sup>(30)</sup>.

**BASE ESTRUCTURAL DEL MECANISMO DE ACCION DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS SOBRE  
LOS RECEPTORES NUCLEARES**



Las estructuras mostradas en la Figura 13 corresponden al dominio de unión al ligando (LBD) del receptor de estrógenos (diagrama de cintas verdes) cuando forma un complejo con un agonista (arriba) o con un antagonista (abajo). Los ligandos son representados mediante esferas sólidas.

Cuando un agonista se une a un receptor nuclear, la hélice alfa del extremo c-terminal del dominio LBD (azul brillante) se sitúa de tal modo que el coactivador (rojo) puede unirse a la superficie del dominio.

**Figura 13.-** Configuración tridimensional de los receptores a estrógenos cuando son ocupados por un antagonista o un agonista

En la figura 13 se muestra únicamente una pequeña parte de la proteína coactivadora, concretamente, la región denominada caja NR, que contiene la secuencia de aminoácidos LXXLL.

Los antagonistas ocupan el mismo surco de unión al ligando de los receptores nucleares. Sin embargo, los ligandos antagonistas poseen una cadena lateral que desplaza por un efecto estérico, la hélice alfa, y así puede ocupar la misma posición en el espacio que un coactivador unido. Por ello, en esta conformación, la unión de los coactivadores al dominio LBD queda bloqueada <sup>(37,38, 39)</sup>.

Los ligandos agonistas actúan mediante la inducción de un cambio conformacional en el receptor, que favorece la unión del coactivador. Los ligandos antagonistas actúan mediante la inducción de un cambio conformacional en el receptor, que impide la unión del coactivador y favorece la unión del correpresor<sup>(37,38, 39)</sup>.

### **MODULADORES SELECTIVOS DE RECEPTORES**

Existen un cierto número de fármacos que, actuando a través de receptores nucleares, presentan una respuesta agonista en algunos tejidos y una respuesta antagonista en otros. Este comportamiento puede ser muy útil, ya que permite mantener un efecto terapéutico benéfico y deseado de un fármaco, minimizando los efectos secundarios adversos.

Los fármacos que poseen este perfil mixto agonista/antagonista son denominados moduladores selectivos de receptor (SRMs), como por ejemplo el modulador selectivo de los receptores estrogénicos (SERMs) y el modulador selectivo de los receptores de progesterona (SPRMs). El mecanismo de acción de los SRMs puede variar dependiendo de la estructura química del ligando y del receptor implicado, pero parece ser que muchos SRMs actúan promoviendo en el receptor un cambio conformacional intermedio entre el agonismo y el antagonismo<sup>(37, 38, 39)</sup>.

En aquellos tejidos donde la concentración del coactivador es más elevada que la del correpresor, el equilibrio virará hacia el agonismo. Por el contrario, si la concentración del correpresor es mas elevada, el ligando se comportará como un antagonista.

### **RECEPTOR A ESTROGENOS**

El receptor a estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la “súper familia de receptores nucleares”. Este fue identificado hace aproximadamente 40 años, en 1962, por Jensen y sus colaboradores, quienes describieron la presencia de sitios de unión a estrógeno en diferentes tejidos de la rata. Cuatro años mas tarde Toft y Gorski aislaron por primera vez receptores de estrógeno del útero de ratas.



Ambos grupos desarrollaron distintos modelos para explicar como el estradiol lleva a cabo su acción en el núcleo, al unirse a un receptor específico, el receptor de estrógeno. Sin embargo en 1996 fue descubierto un nuevo receptor que comparte gran homología con el RE conocido, por lo que se decidió denominarlos como RE $\beta$  al recientemente descubierto y RE $\alpha$  al previamente conocido <sup>(40, 41, 42, 43)</sup>.

### **MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO**

El efecto de los estrógenos es mediado por dos receptores conocidos como RE $\alpha$  y RE $\beta$ , que se unen al dominio LBD, eso origina la liberación de proteínas llamadas chaperonas y se induce un cambio en la configuración del receptor, lo cual a su vez permite su unión a la región promotora del gen diana, responsable de la actividad reguladora del gen.

Una vez que el receptor estrógeno dímérico se ha unido al ligando, se produce el reclutamiento de proteínas adicionales llamadas correguladoras, que disparan la activación o represión de genes específicos. En general, la diferencia en la composición de aminoácidos de los LBD de los RE $\alpha$  y  $\beta$  es que están involucradas para crear RE con diferentes papeles transcripcionales lo que permite a ambos receptores regular la actividad de genes diferentes y promover distintos efectos clínicos. Es posible plantear que los RE $\alpha$  realizan funciones como activadores de genes de transcripción y los RE $\beta$ , como represores.

Los RE $\alpha$  se expresan en útero, hígado, mama, riñón ovario, testículo y cerebro. Los RE $\beta$  se expresan en hueso, cerebro, hipófisis, tracto urinario, aparato cardiovascular, próstata, ovario y testículo <sup>(44-60)</sup>.

### **LAS NEURONAS GNRHÉRGICAS**

En extractos de eminencia media, McCann <sup>(61)</sup> y Harris <sup>(62)</sup> sugirieron la existencia de una hormona hipotalámica que estimulaba la liberación de la hormona luteinizante (LHRH). En 1971, Schally y colaboradores <sup>(63)</sup> aislaron el decapeptido e identificaron su estructura química.

Posteriormente, por medio de inmunoensayos e inmunohistoquímica se localizaron las neuronas (GnRHérgicas) responsables de la secreción de la GnRH. El decapeptido cumple con todas las características de una neurohormona: se localizan en neuronas, se libera hacia el sistema porta hipofisario y muestra actividades relacionadas con la liberación de LH y FSH en el plasma periférico <sup>(1, 61, 62, 63, 64)</sup>.

Wheaton y colaboradores <sup>(65)</sup> midieron la GnRH por inmunoensayos en secciones congeladas de cerebro de rata y encontraron mayor actividad en el tallo infundibular y en la eminencia media; pequeñas pero significantes cantidades de GnRH fueron medidas en el hipotálamo anterior, el núcleo supraquiasmático y en la zona rostral del área preóptica.

La GnRH se encuentra en regiones de los órganos circunventriculares, particularmente en el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT: estructura vascular en la punta del tercer ventrículo dentro del área preóptica).

Por medio de estudios inmunocitoquímicos se ha mostrado que las neuronas GnRHérgicas son pequeñas y se distribuyen rostro-caudalmente desde la diagonal Banda de Broca (DBB), la estría terminal, núcleo medial del septum, el área preóptica medial (MPOA), y el área hipotalámica anterior (AHA) hacia la región premamilar y se extiende lateralmente hasta 2 mm de la línea media en la región preóptica y en el cerebro medio. También se ha detectado GnRH en el área supraquiasmática del hipotálamo medio basal <sup>(66, 67)</sup>.

Las neuronas GnRHérgicas que se proyectan hacia la eminencia media (EM), están concentradas basalmente en las regiones de la línea media desde MPOA hasta el área retroquiasmática. Esas fibras terminan en los capilares del plexo primario del sistema portal hipotálamo–hipofisario <sup>(64)</sup>.

**DIFERENTES MOLECULAS DE GnRH**

En vertebrados, se han identificado 13 formas de GnRH (Tabla 1) <sup>(68)</sup>. Sin embargo, sólo dos o posiblemente tres pueden existir en cada especie de mamíferos: La GnRH de mamíferos o GnRH-I y el otro deca péptido encontrado en mamíferos, la GnRH-II <sup>(46, 51)</sup> difiere en tres aminoácidos de la GnRH-I (pGlu – His – Trp – Ser – His – Gly – Trp – Tyr – Pro – Gly). La GnRH-II fue inicialmente aislada en el cerebro de pollo, por lo que se le denominó GnRH de pollo. La GnRH-II representa el más antiguo y es expresado en múltiples órganos del cuerpo de mamíferos <sup>(24, 69)</sup>.

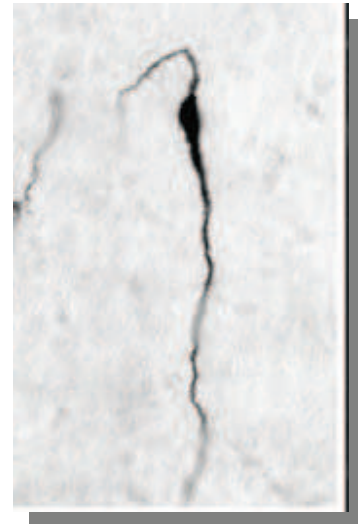
La GnRH-II puede estimular la secreción de la LH y de la FSH en monos, ovejas y roedores, es más potente que la GnRH I en cuanto a la estimulación en la secreción de gonadotropinas <sup>(24, 70)</sup>. En la lamprea se ha identificado otro tipo de GnRH, la cual se nombró GnRH-III, que en el cerebro de humanos y ratas se distribuye de manera muy similar a la GnRH-I. La GnRH-III regula en forma muy específica la liberación de FSH <sup>(24)</sup>.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vertebrados con Mandíbula	Mamífero	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Cobayo	pGlu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Pollo I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Rana	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Mojarra	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Salmón	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Medaka	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Bagre	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Arenque	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Cazon	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Peces sin Mandíbula	Pollo II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Lamprea III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
	Lamprea I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly NH <sub>2</sub>

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de las diferentes moléculas de GnRH en diferentes especies <sup>(70)</sup>

## CITOLOGÍA DE LA NEURONA GnRH

En varias especies, la neurona GnRHérgica es de tipo bipolar con una orientación oblicua que puede reflejar la dirección de la migración embrionaria a través del cerebro. En algunas especies tales como la oveja, la orientación y distribución se mantiene, pero son de tipo multipolar <sup>(24, 69, 71)</sup>. En la rata, el ratón y el mono, las neuronas GnRHérgicas bipolares se han clasificado como lisas o espinosas <sup>(24)</sup>. Estructuralmente las neuronas espinosas son caracterizadas por varias protusiones citoplasmáticas y reciben conexiones sinápticas de las neuronas GnRHérgicas lisas, pero no hay diferencias en el número de sinapsis entre estos dos tipos neuronales <sup>(72, 24, 73, 69, 74)</sup>. La relevancia funcional entre estos dos tipos de células se desconoce, ya que estas se distribuyen de igual forma en el hipotálamo <sup>(24)</sup>.



**Figura 14.-** Morfología bipolar de una neurona GnRHérgica <sup>(24)</sup>

## REDES NEURONALES GnRHÉRGICAS

Las neuronas GnRHérgicas reciben contactos sinápticos de neuronas que secretan glutamato, ácido gamma aminobutírico (GABA), GnRH, galanina,  $\beta$ -endorfinas, neurotensina, neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo, (VIP), orexina, endotelina y acetilcolina <sup>(24,68)</sup>.

Además de estos moduladores directos de la actividad de la neurona GnRHérgica, se ha mostrado que también participan: norepinefrina, dopamina, serotonina, histamina, epinefrina, cannabinoides, somatostatina, bombesina, orexina, endothelina, dinorfina, sustancia P, vasopresina, encefalina, oxitocina, angiotensina <sup>(24)</sup>.

## **LIBERACIÓN DE GnRH**

En la oveja, la liberación de la GnRH cambia de un patrón estrictamente episódico a uno no episódico, de liberación intermitente, con pulsos de alta frecuencia que se manifiestan poco antes de la liberación preovulatoria de la FSH y la LH <sup>(24, 68)</sup>. La secreción preovulatoria de la GnRH parece estar compuesta por eventos pulsátiles que se sobrepone a la liberación tónica de GnRH <sup>(24, 68)</sup>. Este incremento masivo en la secreción de GnRH continua por 24 horas, más allá de la secreción preovulatoria de la LH, antes de regresar al patrón tónico de liberación. En ratas, estudios realizados por microdiálisis en la EM, se mostró que la secreción de GnRH aumenta junto con la liberación de la LH, la cual es máxima en el día del proestro, como resultado del incremento en la amplitud y la frecuencia de los pulsos, así como en la cantidad de GnRH liberada. Se postula que este fenómeno podría ser resultado del aumento en el estímulo entre las neuronas GnRHérgicas, al activarse mutuamente por varias horas <sup>(24)</sup>.

## **INTERACCIONES ESTROGÉNICAS EN LA RED GnRHÉRGICA**

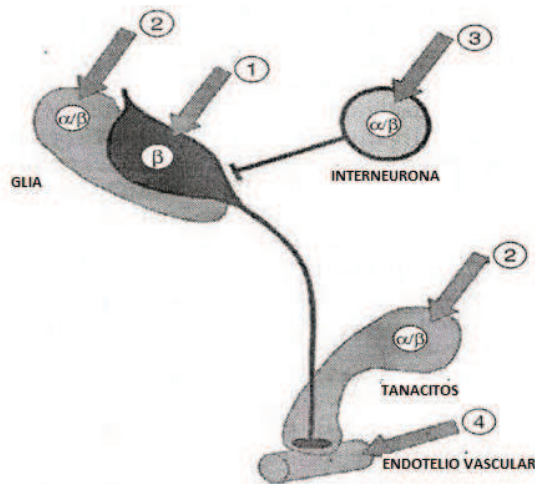
En especies con ovulación espontánea, a medida que aumenta la concentración de estrógenos, actúan en la red GnRHérgica, induciendo el mecanismo estimulante ó “feedback” positivo, que induce la liberación preovulatoria de gonadotropinas. En otros momentos del ciclo, el estrógeno es responsable de un efecto supresivo de la secreción de FSH y LH ó “feedback” negativo <sup>(75,76)</sup>.

Por medio de inmunocitoquímica e hibridación *in situ*, se ha demostrado que las neuronas de muchas especies no expresen la proteína o el ARNm del RE $\alpha$ . En cambio, la proteína y el ARN para el RE $\beta$  se ha detectado en neuronas GnRHérgicas de embriones de ratón, ó en ratones prepúberes y adultos, así como en ratas adultas <sup>(75, 77, 78, 79,80)</sup>.

### ACCIÓN DE LOS ESTROGENOS EN LA NEURONA GNRHÉRGICA

Herbison <sup>(24)</sup> propone tres formas de acción de los estrógenos sobre la red neuronal que regulan la actividad de la neurona GnRHérgica:

- 1) Acción directa sobre la neurona GnRHérgica, que ocurriría por medio del RE $\beta$ .
- 2) Transmisión transináptica por medio de neuronas que hacen sinapsis con la neurona GnRHérgica y que expresen el RE $\alpha$ .
- 3) Transmisión por medio de la glía y las células endoteliales, en la que los estrógenos alterarían la relación ultraestructural entre la glía y la neurona GnRHérgica ó por medio de la secreción de interleucinas como el TGF- $\beta$  (TGF-1: factor de crecimiento tumoral beta), del factor de crecimiento semejante a la insulina ó de óxido nítrico <sup>(24)</sup>.



**Figura 15.** Diferentes modos de acción de los estrógenos en la neurona GnRHérgica <sup>(24)</sup>.

### TRANSMISIÓN DE ESTROGENOS EN LAS CÉLULAS DE LA GLIA Y ENDOTELIALES

Los astrocitos y células ependimales expresan ambos receptores a estrógenos y son consideradas como un importante componente en los mecanismos involucrados en la dinámica funcional del hipotálamo al interactuar con las células de la red GnRHérgica <sup>(81,82)</sup>.

Los estrógenos pueden actuar en la glía al alterar las relaciones ultraestructurales con las neuronas GnRH, al cambiar el patrón de secreción del factor del crecimiento (TGF- $\beta$ , TGF-1) o ambas<sup>(83)</sup>.

Durante la secreción preovulatoria de la GnRH en la EM, los estrógenos promueven el re-arreglo de la relación entre los tanacitos y las terminales GnRHérgicas; que resulta en el incremento del número de terminales de la neurona GnRHérgica dentro del espacio pericapilar. Este hecho promueve la liberación de la GnRH hacia el sistema portal. De los esteroides gonadales dependen los cambios en la ultraestructura de las células gliales, promoviendo la aposición con el cuerpo de las neuronas GnRHérgicas. *In vitro* estos efectos llegan a ocurrir en un tiempo de 5 horas<sup>(83, 84,85)</sup>.

La otra forma en la que las células gliales pueden regular la actividad de la neurona GnRHérgica es por medio del incremento en la secreción de factores de crecimiento. Estudios *in vitro* han mostrado que los estrógenos incrementan la síntesis del TGF- $\beta$  por los astrocitos, modulador que estimula la secreción de la GnRH<sup>(86)</sup>.

#### **FEEDBACK POSITIVO DE LOS ESTROGENOS**

En la rata, el denominado “feedback” positivo de los estrógenos implica, según Herbison (2006)<sup>(24)</sup> un incremento simple en la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH. Sin embargo, un análisis más detallado de la secreción de GnRH en la oveja, muestra que el primer cambio ocurre 15 a 20 minutos después de la presencia de estradiol, cuando se presentan interpulsos durante la secreción de la GnRH. Esto es seguido por un incremento en la frecuencia y amplitud de los pulsos, así como de un aumento de los interpulsos entre dos y cuatro horas antes de la secreción preovulatoria de la GnRH. En la rata se ha mostrado un aumento en la irregularidad de los pulsos de secreción de la GnRH antes de la secreción preovulatoria<sup>(87, 88, 89,90)</sup>.

El repentino incremento en la secreción de GnRH durante el medio día del proestro es importante para propiciar la iniciación de la liberación preovulatoria de la LH <sup>(87)</sup>. En primates, ovejas y roedores la liberación de LH por la secreción preovulatoria de la GnRH es únicamente inducida por una señal de estrógenos lo suficientemente alta que dura algunas horas <sup>(91,92)</sup>.

En la rata, los estrógenos no necesariamente deben de estar presentes en el momento en que se inicia la liberación preovulatoria de GnRH, esto indica que la red GnRHérgica requiere de una prolongada exposición a los estrógenos en concentraciones altas, lo que se traduce en la señal apropiada para iniciar el “feedback” positivo. Además hay que considerar que los estrógenos actúan en el genoma, modificando la expresión de genes en la red neural de la GnRH <sup>(93)</sup>.

A la fecha se plantea que la secreción de la GnRH generada por los estrógenos es por medio de la expresión génica en neuronas que sintetizan el RE $\alpha$  localizadas en el núcleo para-ventricular antero-ventral (AVPV) en los roedores o en el hipotálamo medio basal en la oveja <sup>(94)</sup>.

#### **FEED BACK NEGATIVO DE LOS ESTROGENOS**

Los efectos supresivos de los estrógenos sobre la secreción de GnRH ocurre mucho mas rápido (de 1 a 2 hrs) que el “feedback” positivo e involucra principalmente un decremento en la amplitud de los pulsos de la GnRH, aunque también se observan cambios en la frecuencia <sup>(95,96)</sup>.

#### **ASIMETRIAS NEUROENDOCRINAS.**

La primera observación que mostró la existencia de funciones asimétricas del eje hipotálamo-hipófisis-gónada fue dada por Gerendai y col. <sup>(97)</sup>, al indicar que en la rata hembra, la concentración de la GnRH en la porción derecha del hipotálamo medio basal era el doble que la del lado izquierdo. Recientemente se mostro, que la síntesis del ARNm de la GnRH, también es asimétrica y varia durante en ciclo estral <sup>(98)</sup>, la mayor cantidad de ARNm se observa en la tarde del diestro-2, en la porción derecha de POA-AHA.



La falta de una gónada incrementa el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal del mismo lado que se extirpa la gónada, de manera que la hemiovariectomía derecha incrementa el contenido de GnRH del lado derecho del hipotálamo (haciendo más marcada la asimetría), mientras que la extirpación del ovario izquierdo aumenta el contenido del decapeptido en el lado izquierdo del hipotálamo (anulando la asimetría) <sup>(97)</sup>.

El análisis de los efectos de la denervación, de la inyección sistémica o local de neurotoxinas, o fármacos que afectan la transmisión neuronal, ha mostrado que la inervación proveniente del nervio ovárico superior regula la respuesta de los folículos ováricos a las gonadotropinas. El ovario envía información neuronal de estas actividades hacia el sistema nervioso central por medio del nervio vago. La respuesta de esta señal neuronal proveniente del ovario puede ser ipsilateral o contralateral. Más aún, la regulación de las funciones del ovario dependen no solo de las gonadotropinas, sino también de los efectos moduladores de la inervación ovárica en las acciones gonadotrópicas y el ovario en específico bajo estudio <sup>(99)</sup>.

Los receptores muscarínicos localizados en POA-AHA regulan en forma asimétrica la secreción de la GnRH y la ovulación. Dicha asimetría cambia durante el ciclo estral <sup>(21)</sup>. El implante de atropina del lado derecho de POA-AHA (colocado a las 13:00 horas del día del estro) bloquea la ovulación, mientras que el implante del lado izquierdo no lo hace. Cuando el implante se realiza en el diestro-1, ambos implantes bloquean la ovulación. En el día del proestro los implantes en uno u otro lado de POA-AHA no la alteran <sup>(100)</sup>.

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 <sup>(21)</sup>. Esta modificación en la secreción fásica de la GnRH parece ser el resultado de una alteración en el efecto de “feedback” estimulante de los estrógenos, ya que al restablecer la señal ovárica en el día del diestro-2, solo ovulan aquellos animales en los que el implante de atropina se colocó en el lado izquierdo de POA-AHA <sup>(21)</sup>.

### MPP (METIL-PIPERIDINO-PIRAZOL)

Los compuestos de la familia de los piperidino-pirazoles contienen como su nombre lo indica, un grupo pirazol, el cual tiene una mayor afinidad al RE $\alpha$  que para el RE $\beta$ . Por ello y a falta de antagonistas selectivos para el RE $\alpha$ , se desarrollaron compuestos que antagonizan con este receptor y no con el RE $\beta$ .

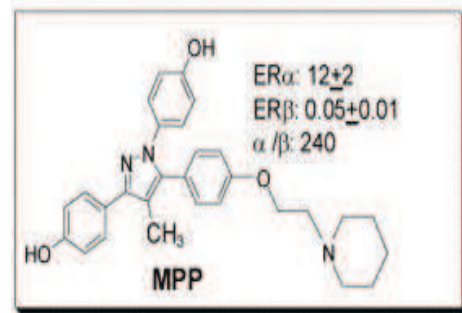


Figura 16. Estructura del Metil-Piperidino-Pirazol.

Entre estos pirazoles, el más selectivo para el RE $\alpha$  es el metil-piperidino-pirazol (MPP)<sup>(101)</sup>.

El MPP incrementa el porcentaje de células del endometrio de la mujer, cuando se compara con los efectos del estradiol. En ratones, el MPP aumenta el peso del útero y la proliferación del endometrio<sup>(102)</sup>. La inyección subcutánea de MPP por 6 días consecutivos provoca disminución de la concentración de LH en la hipófisis y en el suero<sup>(103)</sup>.

Por medio del uso de ratones “Knockout”, en los que el RE $\alpha$  o RE $\beta$  son desactivados, se ha sugerido que el RE $\alpha$  pero no el RE $\beta$  es necesario y suficiente para que se manifieste el efecto de “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica. Y en consecuencia estimular la secreción preovulatoria de LH<sup>(104)</sup>. Con base en estos resultados se ha sugerido que en la rata, la acción de los estrógenos sobre la secreción de LH es ejercida por el RE $\alpha$ .

En ratas adultas cíclicas, la inyección subcutánea de MPP en la mañana del diestro-1 provocó aumento del número de ovocitos liberados y disminución del peso de los ovarios, lo que se acompañó de un menor número de folículos pequeños sanos y de un aumento de los medianos, en los animales sacrificados a las 9:00 y 17:00 horas del proestro<sup>(36)</sup>.

El MPP a dosis de 25 a 150  $\mu\text{g}$  aumenta el peso húmedo del útero, pero no de la forma en que lo hace el  $17\beta$ -estradiol, ya que éste provoca un aumento en el peso húmedo del útero y diferenciación en el epitelio luminal y glandular, simulación de transcripción y translación de una variedad de productos genéticos que regulan la progresión del ciclo celular, hiperemia, edema del estroma e inhibición del agua, angiogénesis, incorporación de células inmunes y morfología endometrial <sup>(105)</sup>.

### **TWEEN 20®**

El Tween 20® (nombre comercial) es un surfactante no iónico que se utiliza principalmente en la fabricación de cosméticos, productos del cuidado de la piel, en alimentos y productos farmacéuticos. El Tween 20® se compone de un grupo central con cuatro cadenas de óxido de polioxietileno, cuando estas cadenas se esterifican con un ácido oleoso y con ácido láurico pueden obtenerse 1500 estructuras. Ya que si las cadenas de polioxietileno son más cortas se forman agregados muy grandes, lo que hace que sea una solución muy viscosa <sup>(106)</sup>.

Los detergentes no iónicos también se utilizan para la solubilización de membranas y como un medio solvente para proteínas de membrana. Generalmente el detergente óptimo para ciertas proteínas de membrana se tiene que encontrar empíricamente y puede depender del tipo de experimento que uno quiere hacer. Los detergentes no iónicos no tienen ningún grupo cargado <sup>(106)</sup>.

El carácter hidrófilo de estos detergentes se debe al grupo hidroxilo, disuelve los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína, mientras que las interacciones proteína-proteína no resultan afectadas. De este modo se conserva la estructura nativa de las proteínas. Además, el detergente sustituye a los lípidos, que normalmente están unidos a la parte hidrófoba de las proteínas, con lo que crean un entorno de tipo lípido y pueden estabilizar proteínas solubilizadas que los lípidos y proteínas de una membrana nativa actúan recíprocamente uno con el otro de una manera compleja que diferirá con todo detalle de membrana a membrana <sup>(106)</sup>.

El Tween 20® por ser un detergente no iónico es usado para estudiar la estructura de las subunidades de proteínas de membrana y las interacciones de proteínas de membrana con estructuras externas, ya que no desnaturalizan a las proteínas y no altera la carga de las proteínas a las que se une <sup>(106)</sup>.

Por las propiedades mencionadas, el Tween 20® se emplea para estabilizar la solución de proteínas purificadas usada en prueba de piel para la exposición de tuberculosis, como un agente para lavar pruebas de inmuno-ensayos como el de Western Blot y ELISA. Se puede disolver en tris –buffer Salino o buffer de Fosfato salino en diluciones de 0.05% a 0.05% de v/v <sup>(107, 108,109)</sup>.

### **PROPÓSITO DEL ESTUDIO**

En la rata, el 17β-estradiol es una de las señales que regulan la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Existen dos tipos de receptores a estrógenos: el REα y el REβ. En el área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) se han identificado ambos RE <sup>(110)</sup>; sin embargo solo el REβ ha sido identificado en las neuronas GnRHérgicas y se ha sugerido que tanto el REα como el REβ están involucrados en los efectos de “feedback” inhibitorios de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH y las gonadotropinas. Por medio del uso de ratones “Knockout”, en los que el REα o REβ son desactivados, se ha sugerido que el REα pero no el REβ es necesario y suficiente para que se manifieste el efecto de “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH. Y en consecuencia estimular la secreción preovulatoria de LH <sup>(100)</sup>.

Sin embargo los resultados obtenidos con este tipo de modelos experimentales no son concluyentes, ya que limitan el estudio de las interacciones fisiológicas entre el REα y el REβ en la regularización de la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación por derivarse de un modelos experimental en el que la desactivación genética de uno u otro receptor esta presente en todos los órganos blanco del 17β-estradiol; así que se trabaja con un modelo no fisiológico.

Por otra parte, se ha demostrado que el número máximo de células inmunorreactivas al RE $\alpha$  en POA-AHA se observa a las 9:00 y 17:00 horas de cada día del ciclo estral <sup>(111)</sup>.

En ratas cíclicas, el bloqueo de los RE $\alpha$  en uno de los días del ciclo estral provoca modificaciones en la ovulación espontánea, que dependen del lado de POA-AHA manipulado y del día del ciclo estral <sup>(112)</sup>, el día más sensible a la falta de la señal que genera el 17 $\beta$ -estradiol a través del RE $\alpha$  es el diestro 1.

Por lo tanto, con la finalidad de conocer cual o cuales de las señales neuroendocrinas son alteradas al bloquear los RE $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA en la fase del diestro-1, en este proyecto de tesis se analizaron los perfiles séricos de hormonas esteroides (estradiol y progesterona) y de la expresión del ARNm de la GnRH en las porciones izquierda y derecha de POA-AHA.

### **HIPÓTESIS**

Dado que el bloqueo de los RE $\alpha$  en la mañana del diestro-1 bloquea la ovulación, entonces la falta de la señal que genera el 17 $\beta$ -estradiol por medio de RE $\alpha$  modificará el perfil de expresión del ARNm de la GnRH, lo que a su vez generará modificaciones en la concentración de hormonas esteroides y por ende en la falta de ovulación.

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los efectos del bloqueo de los RE $\alpha$  en el lado izquierdo de POA-AHA sobre la expresión del ARNm de la GnRH, la concentración de progesterona, de estradiol, así como la ovulación.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar los efectos del bloqueo de los RE $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA en el día del diestro-1, sobre el perfil de expresión de ARNm de la GnRH en el lado izquierdo y derecho de POA-AHA.

2. Evaluar los efectos del bloqueo de los RE $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA en el día del diestro 1, sobre el perfil de las concentraciones de progesterona y estradiol en el suero, posteriores al tratamiento.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron ratas hembras adultas de 3-4 meses de edad de la cepa CIIZ-V, mantenidas en grupos de seis animales por jaula, en periodos controlados de luz-obscuridad (luces encendidas de 5:00-19:00 horas) y con libre acceso al agua y al alimento.

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

Entre las 8:30 y 9:30 horas del día del diestro-1, grupos de 9 animales fueron anestesiados con 25mg/kg peso de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal. Una vez anestesiados se colocaron en un aparato estereotáxico para ubicar la zona de estudio, con base a las coordenadas del Atlas del Cerebro de la Rata de Köning y Klippel <sup>(113)</sup>. Se rasó la zona dorsal de la cabeza (donde se localizan los huesos parietales) con una navaja de acero inoxidable, se realizó una incisión vertical en sentido antero-posterior en el cuero cabelludo, se esterilizó por medio de la aplicación de agua oxigenada y se eliminó el exceso de tejido con un hisopo de algodón. Una vez limpia el área, se ubicó el punto Bregma (punto donde coinciden la unión de los dos huesos parietales con el frontal), o punto cero del Atlas del cerebro de la rata <sup>(113)</sup>. Las coordenadas utilizadas para llegar a POA-AHA fueron: AP= -0.04 mm, LM=  $\pm$  0.06 mm y V= 8.6 mm a partir de la meninge.

Una vez en la zona de estudio, las ratas fueron microinyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con 25µg de methyl-piperidino-pyrazol ó MPP (antagonista selectivo para el REα) disuelto en 1µl de una solución 1:100 de Tween/agua (vehículo), durante un minuto. Como grupos control se utilizaron animales inyectados con vehículo (1µl durante un minuto).

Grupos de animales fueron sacrificados por decapitación a las 9:30 horas del día del estro esperado, se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados, y los ovarios y el útero para pesarlos. El cerebro de estos animales fueron colocados en una solución de formol al 4% durante al menos una semana, para ser cortados en sentido coronal, a 80 µm en un vibrátomo, con la finalidad de verificar la zona en donde se inyectó el fármaco o el vehículo. Otros grupos de animales micro-inyectados fueron sacrificados a las 11:00 horas del mismo día de la inyección (diestro-1), del diestro 2, del proestro y del estro esperado, que correspondieron en tiempo post-inyección a 2, 26, 50 y 98h.

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación; se colectó la sangre del tronco, la que se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero, el cual se almacenó a -4°C hasta la cuantificación de hormonas esteroides. Los grupos de referencia absoluta correspondieron a animales sin tratamiento sacrificados a las mismas horas que los grupos experimentales.

Se extrajo el cerebro y se colocaron en solución salina, se disecaron las porciones izquierda y derecha de POA-AHA mediante la técnica propuesta por Palkovits (1973) y se obtuvo el ARNm total, el cuál se almacenó a -70 °C hasta la medición de la expresión del ARNm de la GnRH por la técnica de retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR) <sup>(114)</sup>.

## **CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS**

La cuantificación de las concentraciones plasmáticas de estradiol ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ) se realizó por RIA mediante el uso de estuches comerciales marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA), que contienen tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada ( $^{125}\text{I}$ - Progesterona ó  $^{125}\text{I}$ - Estradiol) y calibradores para la realización de la curva patrón. A cada tubo del estuche se le adiciono 100 $\mu\text{l}$  de la hormona marcada ( $^{125}\text{I}$ - Progesterona ó  $^{125}\text{I}$ - Estradiol). Los tubos se agitaron durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas; posteriormente se decantaron y limpiaron, finalmente con la ayuda de un contador de centelleo Gama, se cuantificó la cantidad de la hormona problema. Los datos de la concentración de  $E_2$  se expresaron en pg/ml y los de  $P_4$  en ng/ml.

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

1. A la porción izquierda ó derecha de POA-AHA, contenidas en tubos eppendorf estériles se les agregó 300  $\mu\text{l}$  de trizol y se homogenizó con un Politron, modelo PT -MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza).
2. Al tejido homogenizado se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se agitó durante 30 segundos en un vortex, con la finalidad de extraer el ARNm.
3. Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 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.
4. 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.



5. Se centrifugaron las muestras por 25 minutos a 12,000 rpm a 4° C. El ARN se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta.
6. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80 %. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4° C.
7. 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 H<sub>2</sub>O inyectable (lo que consistió la muestra).
8. Se hicieron alícuotas de 0.4 µl de muestra en 100 µl H<sub>2</sub>O inyectable. Se leyó la absorbancia de estas muestras a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La concentración de ARN se determinó conociendo que: una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 mg de ARN ml<sup>-1</sup>. La pureza del ARN se determinó por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm (260/280 nm).
9. 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 retrotranscripción. 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 <sub>2</sub> O
Oligo dt	0.05 µl
H <sub>2</sub> O	Aforado a 10 µl

10. Por medio de la técnica de retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se amplificó un fragmento de los genes de la 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 <sub>2</sub>	2.5 µl
Taq polimerasa	0.8 µl
DNTP's	0.5 µl c/u
Oligo 1	2.0 µl c/u
H <sub>2</sub> O	25.7 µl

11. 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.

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

	Secuencia sense	Secuencia antisense	Temperatura	Ciclos
GnRH	CAA CCC ATA GGA CCA GTG CTG G	CAC TAT GGT CAC CAG CGG GG	53.0 ° C	32
GAPDH	GAT GGG TGT GAA CCA CGA GA	AGT GAT GGC ATG GAC TGT GG	55.1 ° C	32

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.

12. 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 Technologies, gibco brl, USA).

13. Se tomaron fotografías del gel con una cámara Kodak EDAS 216.

14. 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.

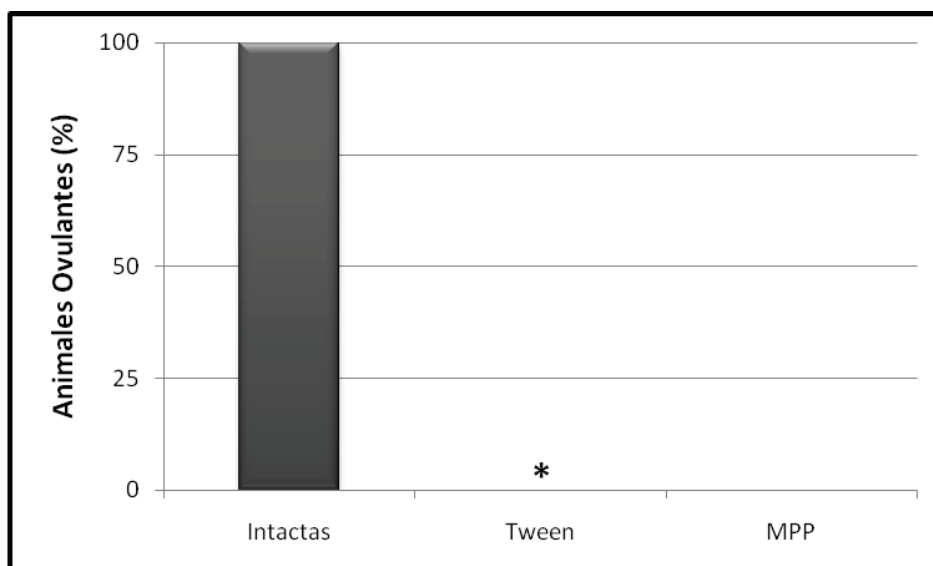
### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados del número de animales ovulantes se analizaron por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher, los del número de ovocitos liberados por la prueba de Kruzcall-Wallis seguida de la prueba de Dunn o la de “U” Mann-Whitney. Los datos de las concentraciones de las hormonas esteroides y del ARNm de la GnRH se analizaron mediante la prueba de análisis de varianza (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de “t” de Student. En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad sea igual o menor al 5%.

## RESULTADOS

### ANIMALES OVULANTES.

Con respecto a los animales intactos, la micro-inyección de Tween 20® en el lado izquierdo de POA-AHA, a las 09:00 h del día del diestro-1 bloqueó la ovulación de todos los animales tratados. La micro-inyección de MPP no modificó los efectos del Tween 20® sobre el porcentaje de animales ovulantes (Grafica 1).

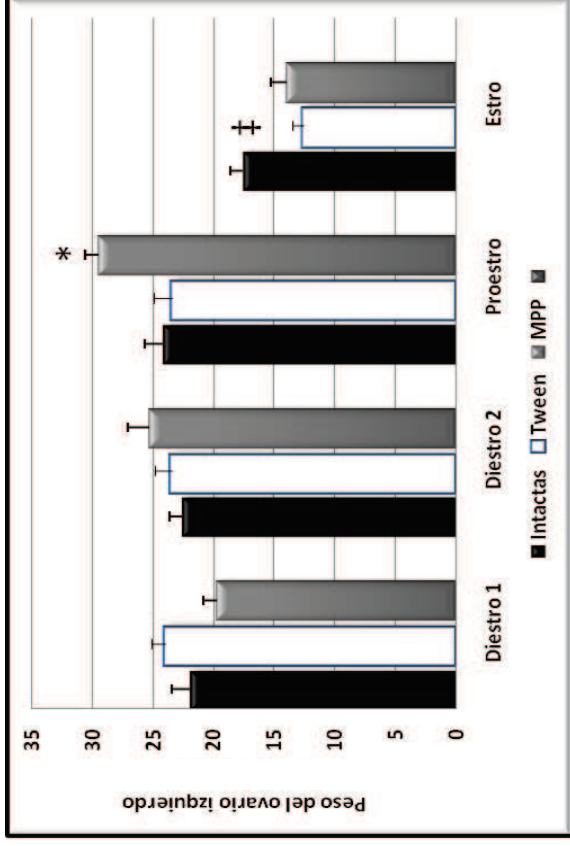


\*  $p < 0.05$  vs. Intactas (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher)

Grafica 1. Media  $\pm$  e.e.m. del porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado en ratas micro-inyectadas con Tween o MPP en el día del diestro-1 en el lado izquierdo de POA-AHA

## PESO DEL OVARIO IZQUIERDO

En la mañana del estro esperado, la micro-inyección de Tween 20® en la mañana del diestro-1 provocó disminución del peso del ovario izquierdo, mientras que la micro-inyección de MPP lo aumentó cuando se cuantificó en el día del proestro (Grafica 2).

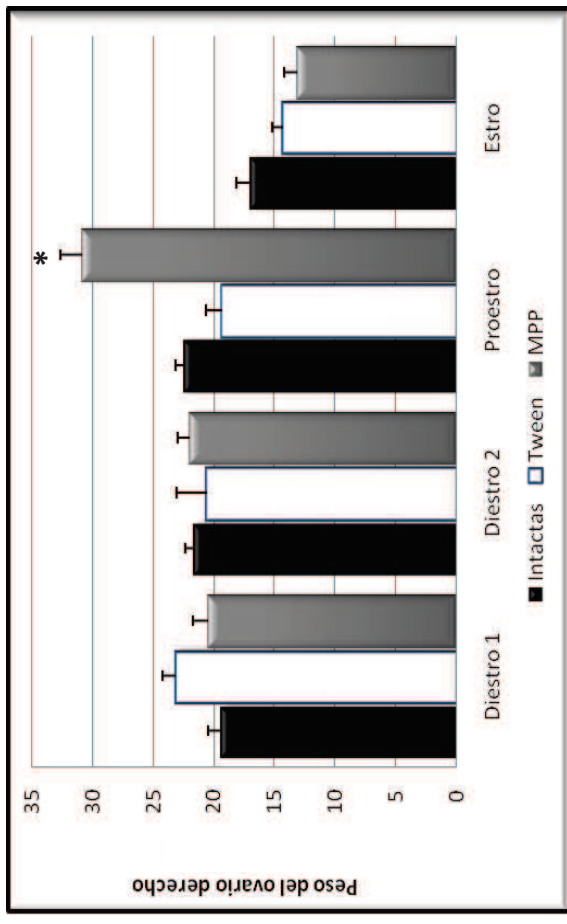


† p<0.05 vs. Intactas; \* p<0.05 vs. Tween (ANDEVA seguida de la Prueba te Tuckey)

Grafica 2. Media ± e.e.m. del peso del ovario izquierdo (mg/100g peso corporal) en ratas micro-inyectadas con Tween o MPP a las 9:00 h del diestro-1 en el lado izquierdo de POA-AHA.

## PESO DEL OVARIO DERECHO

La micro-inyección de MPP del lado izquierdo de POA-AHA en el día del diestro-1 provocó que el peso del ovario derecho aumentara en la mañana del proestro (Grafica 3).

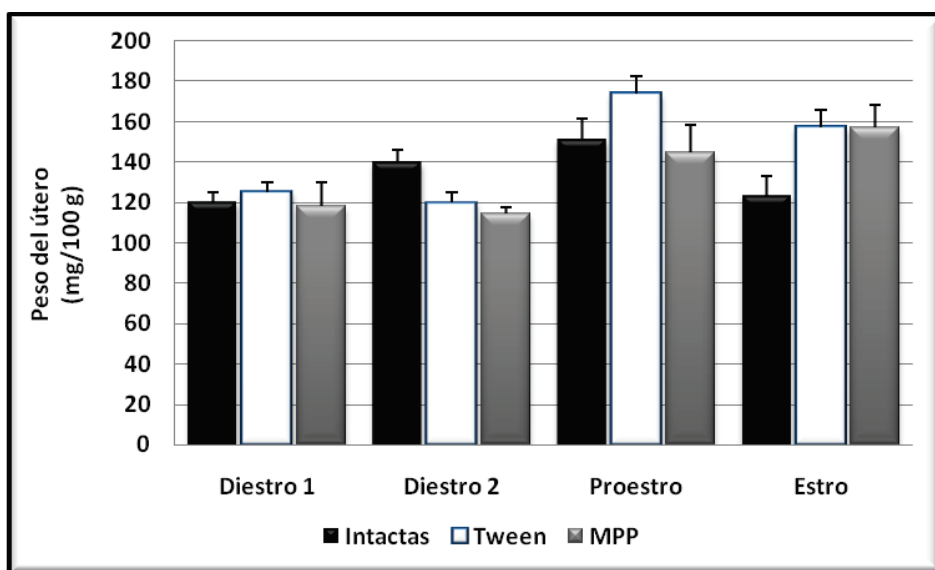


\* p<0.05 vs. Tween (ANDEVA seguida de la Prueba te Tuckey)

Grafica 3. Media ± e.e.m. del peso del ovario derecho (mg/100g peso corporal) en ratas micro-inyectadas con Tween o MPP a las 9:00 h del diestro-1 en el lado izquierdo de POA-AHA.

## PESO DEL ÚTERO

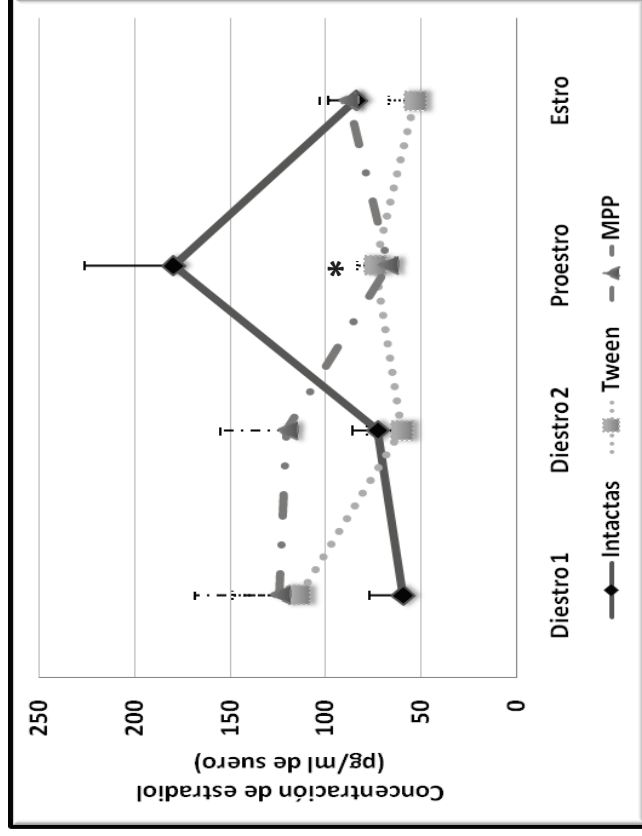
La micro-inyección de Tween 20® o MPP en el lado izquierdo de POA-AHA no modifico el peso del útero (Grafica 4).



Grafica 4. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del útero (mg/100g peso corporal) en ratas micro-inyectadas con Tween o MPP a las 9:00 h del diestro-1 en el lado izquierdo de POA-AHA

### CONCENTRACIÓN SÉRICA DE ESTRADIOL

La micro-inyección de Tween 20® en el lado izquierdo de POA-AHA en la mañana del diestro-1 disminuyó significativamente la concentración de estradiol en la mañana del proestro. La micro-inyección de MPP no modificó los efectos del Tween 20® (Grafica 5).



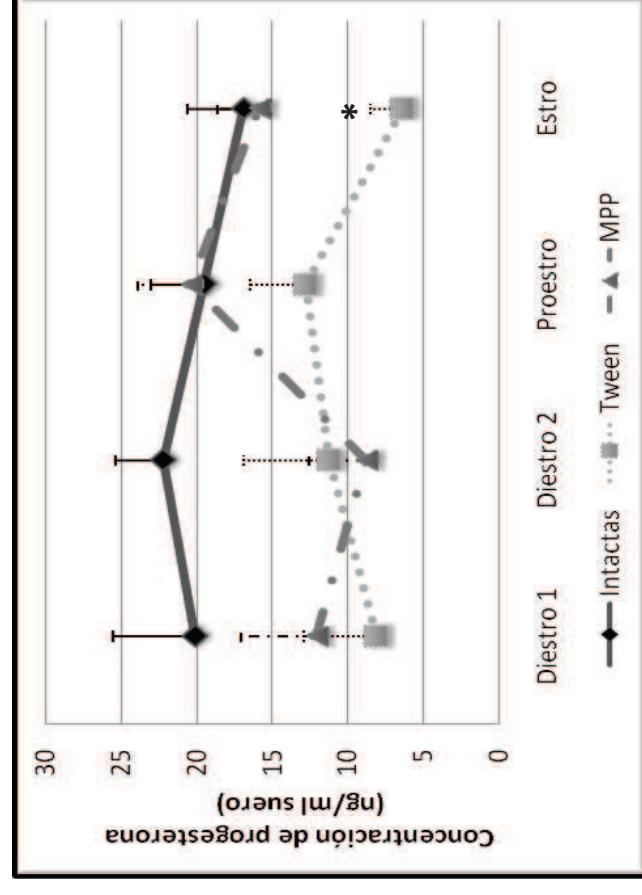
\* p<0.05 vs. Intactas (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Grafica 5. Media + e.e.m. de la concentración de estradiol en el suero de ratas intactas o micro-inyectadas con Tween o MPP en la porción izquierda de POA-AHA, en la mañana del diestro-1.

### CONCENTRACIÓN SÉRICA DE PROGESTERONA

La micro-inyección de Tween 20® provocó disminución de la concentración sérica de progesterona en todas las horas evaluadas, sin embargo sólo fue significativa en la mañana del estro.

La micro-inyección del MPP provocó un efecto semejante al Tween 20® en el patrón de secreción de esta hormona, excepto que en la mañana del proestro, el bloqueo de los RE $\alpha$  aumentó, aunque no significativamente, pero es semejante al grupo de animales intactos (Grafica 6).

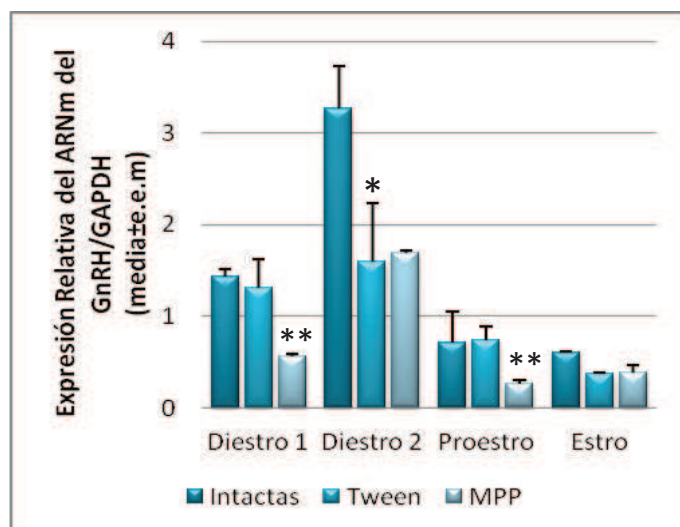


\* p<0.05 vs. Intactas (ANDEVA seguida de la Prueba de Tukey)

Grafica 6. Media + e.e.m. de la concentración de progesterona en el suero de ratas intactas o micro-inyectadas con Tween o MPP en la porción izquierda de POA-AHA, en la mañana del diestro-1.

## EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LA GnRH EN POA-AHA IZQUIERDA

En la Gráfica 7 se muestran los efectos de la microinyección de Tween 20® y del MPP sobre la expresión del ARNm de la GnRH en el lado izquierdo de POA-AHA realizado a las 11:00 h de cada fase del ciclo estral, después del tratamiento en la mañana del diestro-1. El Tween 20® provocó disminución del ARNm de la GnRH en la mañana del diestro-2 cuando se compara con los animales intactos. Mientras que la micro-inyección del MPP disminuyó la expresión del ARNm de la GnRH en la mañana del diestro-1 y del proestro con respecto a los animales tratados con Tween 20®.



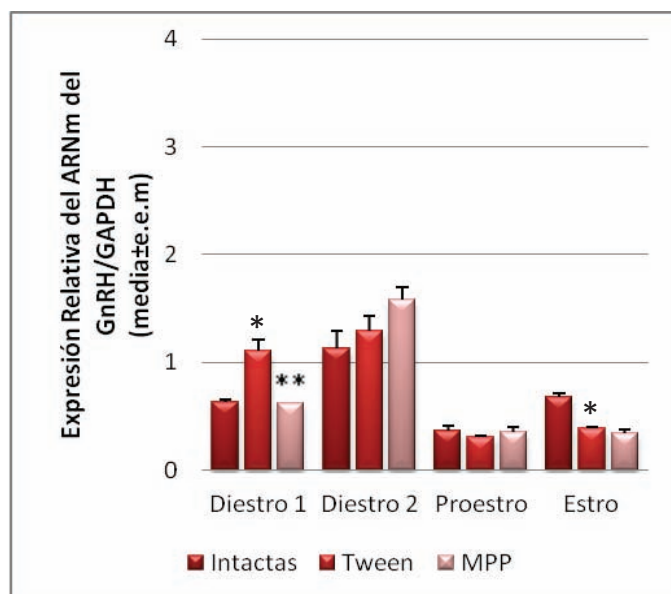
\*p<0.05 vs. Intactas; \*\*p<0.05 vs. Tween (Prueba "t" de Student)

Grafica 7. Media + e.e.m. de la expresión relativa del ARNm de la GnRH micro-inyectadas son Tween o MPP en la porción izquierda de POA-AHA, en la mañana del diestro-1.

## EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LA GnRH EN POA-AHA DERECHA

En la Gráfica 8 se muestran los efectos de la microinyección de Tween 20® y del MPP sobre la expresión del ARNm de la GnRH en el lado derecho de POA-AHA a las 11:00 h de cada fase del ciclo estral después del tratamiento en la mañana del diestro-1. Como se puede observar, a las dos horas de micro-inyectar el Tween 20®, la expresión del mensajero aumentó la expresión del mensajero; efecto que fue disminuido por la micro-inyección del MPP.

En cambio en la mañana del estro esperado la micro-inyección del Tween 20® provocó disminución de la expresión del ARNm de la GnRH, efecto que no fue modificado al administrar el MPP.



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

Grafica 8. Media + e.e.m. de la expresión relativa del ARNm de la GnRH micro-inyectadas son Tween o MPP en la porción derecha de POA-AHA, en la mañana del diestro-1.



## **ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en la mañana del diestro-1, el bloqueo de los RE $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA (por la micro-inyección del MPP) disminuye la expresión del ARNm de la GnRH en el lado inyectado e inhibe la secreción preovulatoria de estradiol e incrementa el peso de ambos ovarios en la mañana del proestro.

La desestabilidad de las membranas de las neuronas de POA-AHA, por la micro-inyección de Tween 20® en el lado izquierdo de esta área hipotalámica, resulta en el bloqueo de la ovulación. Este efecto es consecuencia de la disminución en la expresión del ARNm de la GnRH en el lado inyectado, así como por la inhibición de la secreción preovulatoria de estradiol.

En experimentos anteriores se ha demostrado que el día del diestro-1 es el más susceptible a los cambios neuroendocrinos generados por distintas manipulaciones experimentales <sup>(100,115)</sup> que rompen la cascada de señalización que culminan con la ovulación en las primeras horas del estro.

La ausencia de ovulación en los animales micro-inyectados con el Tween 20® puede ser explicada si consideramos que al ser un surfactante (detergente no iónico) que solubiliza las membranas celulares, al disolver los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína <sup>(109)</sup>, podría modificar la disposición de las proteínas de contacto celular que existen entre las neuronas de POA-AHA, lo que alteraría las estructuras proteicas de los receptores de neuromoduladores estimulantes o inhibitorios que regulan la actividad de las neuronas, entre ellas, las que secretan la GnRH.

Esta hipótesis estaría apoyada, en parte, por la disminución en la expresión del ARNm para la GnRH observada a las 11:00 h del diestro-2 en los animales micro-inyectados con el Tween 20®.

Con base en los resultados obtenidos por Gore y Roberts (1997) y Arteaga-López y colaboradores (2005), en este día del ciclo ocurre un máximo en la expresión del mensajero para este decapeptido, el cual estaría relacionado con la secreción preovulatoria de la GnRH que inducirá horas más tarde la secreción de gonadotropinas y la ovulación <sup>(98,116)</sup>.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Pérez (2011), muestran que la inyección de agua a las 9:00 hrs del diestro-1 en el lado izquierdo de POA-AHA resulta en la disminución de la expresión del ARNm para la GnRH, pero los animales si ovulan en el día del estro esperado. Esta disminución del mensajero, nos lleva a pensar que aumenta quizá la transcripción, lo que asegura la síntesis y liberación de la GnRH.

En cambio, para el caso del Tween, la inhibición de la ovulación fue resultado de un efecto inhibitorio de la expresión del ARNm de la GnRH en la mañana del diestro-2, el cual aparentemente tampoco fue transcrito y por lo tanto no hubo una secreción adecuada de GnRH que asegurara la ovulación; aún cuando la expresión de este mensajero del lado derecho no se modificó. Lo que implica que este surfactante actúa de manera asimétrica en la síntesis del ARNm de la GnRH, lo que apoya la idea de que los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de la GnRH son asimétricos.

Otra posible explicación al bloqueo de la ovulación por la micro-inyección de Tween 20® está relacionada con la disminución en la concentración de estradiol en la mañana del proestro esperado, es decir, la ausencia de la secreción preovulatoria de estradiol que induce el “feedback” estimulante de la secreción de la LH y por tanto, de la ovulación <sup>(1)</sup>.

Una tercera explicación a la falta de ovulación en los animales micro-inyectados con Tween 20® en la mañana del diestro-1 es la sección de vías nerviosas que transcurren por la parte dorsal de POA-AHA que regulan de manera transitoria y estimulante la ovulación.

En el día del diestro-1, la introducción de una aguja de acero inoxidable del número 29G a POA-AHA del lado izquierdo retrasa la ovulación 24 h <sup>(117)</sup>.

La disminución de la concentración sérica de progesterona en todas las tiempos evaluados después de la micro-inyección del Tween 20® podría ser explicada por un efecto inhibitorio del surfactante sobre las neuronas que secretan el CRF. Meléndez (2005) mostró que la concentración sérica de progesterona en los días del diestro-1, diestro-2 y proestro proviene de las glándulas adrenales. Sin embargo no podemos descartar el hecho de que la síntesis de esta hormona por los ovarios también haya sido alterada, ya que junto con ella también disminuyó el estradiol <sup>(118)</sup>.

Dado que la esteroidogénesis en el ovario depende de FSH y LH <sup>(17, 3, 11, 12)</sup>, sugerimos que la secreción tónica de estas hormonas glucoprotéicas está alterada en los animales micro-inyectados con el Tween 20®.

En general, el bloqueo de los RE $\alpha$  del lado izquierdo de POA-AHA no modifica los efectos provocados por el Tween 20® sobre la ovulación. Sin embargo, reduce significativamente la expresión del ARNm de la GnRH a las dos horas de que se inyecta, lo que nos lleva a sugerir que la unión del estradiol al RE $\alpha$  juega un papel estimulante en la expresión del gen de la GnRH. Dado que según Gore y Roberts (1997) se requiere de 18 a 24 horas para que el ARNm de la GnRH se traduzca a la proteína, se puede sugerir que la secreción tónica de este factor hipotalámico está modificada, lo que pondría en riesgo las funciones (esteroidogénesis, crecimiento folicular y ovulación) de los ovarios <sup>(116)</sup>.

Con base en los resultados del RT-PCR, la mayor expresión del ARNm de la GnRH ocurre en el diestro-2, resultados semejantes a los observados por Gore y Roberts (1997) y Arteaga-López y colaboradores (2005); sin embargo ésta no es alterada por el MPP, lo que implicaría que el RE $\alpha$  no estaría regulando la secreción preovulatoria de la GnRH. No debemos olvidar que la neurona GnRH no expresa el RE $\alpha$  sino el RE $\beta$  <sup>(24)</sup>, por lo que sugerimos que el MPP estaría actuando en neuronas que sintetizan el RE $\alpha$  y no sobre la neurona GnRH. Luego entonces, el Tween 20® estaría alterando la expresión de la GnRH por medio del otro receptor a estrógenos <sup>(98)</sup>.

Otro de los efectos de la micro-inyección del MPP fue el aumento del peso de los ovarios en la mañana del proestro, efecto que podría estar relacionado con la presencia de un mayor número de folículos preovulatorios, de un aumento en el área de la glándula intersticial ó por la presencia de los cuerpos lúteos formados en el ciclo anterior.

El hecho de que el peso de los ovarios de los animales micro-inyectados con MPP sea normal en la mañana del estro esperado, nos lleva a plantear que la ovulación pudo haber ocurrido entre las 24 hrs. transcurridas entre el Proestro y el Estro. Por lo que sería necesario realizar otros grupos experimentales para sacrificarlos de las 11:00 h en adelante.

## **CONCLUSIONES**

- ❖ El bloqueo de los RE $\alpha$  en la mañana del diestro-1, regula a la baja, la expresión del ARNm de la GnRH, lo que indica que la unión del estradiol a este receptor estimula la síntesis del ARNm para esta proteína.
  
- ❖ El Tween 20<sup>®</sup> no es un vehículo adecuado para micro-inyectar fármacos de naturaleza lipídica a la hora, día del ciclo y lado de POA-AHA en los que se realizó éste estudio, ya que interfiere con mecanismos centrales y periféricos que culminan con la ovulación.

## **PERSPECTIVAS**

- Realizar una curva dosis-respuesta para determinar la dilución a la cual el Tween 20® no interfiera con la ovulación, pero a la vez que asegure la dilución del fármaco.
  
- Utilizar otro diluyente del fármaco que no provoque modificaciones en las variables analizadas.
  
- Una vez obtenido el vehículo adecuado, analizar el papel del RE $\alpha$  sobre la ovulación, la expresión del ARNm de la GnRH, la concentración de estradiol y progesterona.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Freeman ME (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. Edición, vol.2, cap.46, Raven Press, New York pp 613 – 658.
2. Heape W (1900). The “sexual season” of mammals and the relation of the “pro-oestrus” to menstruation. *Quart. J. Micr. Sci.* 44, 1-70.
3. Domínguez R, Chávez R, Cruz ME (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Editor: Domínguez R. Porrúa-UNAM. Cap VII, pp. 163 – 188.
4. Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM (2006). Follicular development: mouse, sheep and human models. Tomado de: Knobil and Neill’s *Physiology of reproduction*, Third Edition. 10, 383-423
5. Brown TR (1999). Steroid hormones, Overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U. S. A. Vol 4, 634 – 644.
6. Burris TP (1999). Progestins. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic press. U. S. A. Vol 4, 23 – 30.
7. Malley BW, Strott ChA (2001). Hormonas esteroides: Metabolismo y mecanismo de acción. En: *Endocrinología de la Reproducción: Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico*. Ed: Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri Ri. Médica Panamericana. Argentina, p.p. 118 – 143.
8. Smith CL (1999). Estrogens, Overview. En *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neil D (eds.) Academic Press U. S. A. 2: 119 – 126.
9. Pedernera E (1993). Cooperación Celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: *Comunicación Neuroendocrina, Bases Celulares y Moleculares*. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México. pp. 33 – 46.
10. Domínguez R (1997). Endocrinología de las Gónadas. En: *Curso de Actualización en Fisiología*. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM, México, p.p. 271 – 279.

11. Yao HH, Bahr JM (1999). Ovary, overview. En: Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U. S. A. 3, 590 – 595.
12. Brown TR. Steroid hormones, Overview. En: encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neil D (eds). Academic Press. U.S.A. 4. 1999. p. 634-644.
13. Sánchez Criado JE. Fisiología del ovario. En: Fisiología humana. 2ª Ed. México: McGraw-Hill Interamerican; 2003.p. 1036-1048.
14. O' Malley BW, Strott AC (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. Endocrinología de la Reproducción. 4ta edición. México: Médica Panamericana; 2001.p. 119-143.
15. Gore-Lantog RE , Armstrong OT. Follicular steroidogenesis and its control. En: The Physiology of reproduction. 2º ed. New York: Raven Press; 1994; Vol I. p.571-627.
16. Litwack G, Schmidt TJ (2000). Bioquímica de las hormonas II: Las hormonas esteroides. En: Bioquímica. Editor: Devlin MT. 3ª Edición, Ed. Reverte S.A. España, pp. 893-917.
17. Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cell. Endocr. Rev; 5: 76 – 127.
18. Shaikh AA (1971). Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. Biol. Reprod. 5:297-307.
19. Yoshinaga K, Hawkins RA, Stocker JF (1969). Estrogen secretion by the rat ovary *in vivo* during the estrous cycle and pregnancy. Endocrinology 85:103-112.
20. Barraclough CA, Collu R, Massa R, Martini L (1971). Temporal interrelationships between plasma LH. Ovarian secretion rates and peripheral plasma progesterin concentrations in the rat: Effects of Nembutal and exogenous gonadotropins. Endocrinology 96:37-44.



21. Cruz ME, Castro J, Dominguez R (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanism regulating ovulation, affected by unilateral implant of atropine in the preoptic–anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Endocrinology* pp 133:205-10.
22. Velasco MA, Alvarez GFJ (1988). *Compendio de Psiconeurofarmacología*, Ed. Diaz de Santos. Madrid. pp 135.
23. Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974) Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94:1704-1708.
24. Herbison AE (2006). Physiology of the gonadotropin–releasing hormone neuronal network. En: Knobil and Naill's *Physiology of Reproduction*, 3<sup>a</sup> ed. Cap. 28, 1415 – 1456.
25. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, Nayudu P (2003). Impact of Carbohydrate Heterogeneity in Fuction in Follicle-Stimulating Hormone: Studies Derived from in Vitro and In Vivo Models. *Biology of Reproduction* 69, 369-379.
26. Wärnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* 17 (10): pp. 1901–9.
27. Linja MJ, Porkka KP, Kang Z, Savinainen KJ, Janne OA, Tammela TL, Vessella RL, Palvimo JJ, Visakorpi T (February 2004). Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 10 (3): pp. 1032–40.
28. Glass CK, Rosenfeld MG (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14 (2): pp. 121–41.
29. Aranda A, Pascual A (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression (abstract). *Physiol. Rev.* 81 (3): pp. 1269–304.

30. Samuel S.C.Yen, MD, D Sci. (2001). *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Editorial medica panamericana.4 ed: 119-143
31. Berg JM (1989). Binding specificity of steroid receptors. *Cell*.57: 1065.
32. Baulieu EE (1987). *Steroid hormone antagonists at the receptor level: a role for the heat shock protein MW 90,000 (hsp 90)*. *J Cell Biochem* 35:161.
33. Jensen EV, Jacobson HI, Flesher JW, Suzuki T, Numata M, Smith s, DeSombre R (1966). Estrogen receptors in target tissues. In Pincus G. Nacao T. Thait JF (eds). *Steroid dynamics*. NY. Academic press. Pp 133-156. (1)
34. Tsai MJ, O´ Malley BW (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 673: 451.
35. Gariglio P (1986). *Control de la transcripción en organismos eucariontes, oncogenes y cáncer humano*. En: López-Revilla R, Tsutsumi V, Frixione E (eds.). *Temas selectos de biología Celular. SEP/COSNET/CINVESTA V. México pp 320-350*.
36. Cabrera E (2009). Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  sobre la ovulación, crecimiento folicular, el peso del útero y los ovarios, durante el ciclo estral de la rata. En tesis, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
37. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Öhman L, Greene GL, Gustafsson J-Å, Carlquist M (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389 (6652): pp. 753–8.
38. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95 (7): pp. 927–37.

39. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature reviews. Drug discovery* 3 (11): pp. 950–64.
40. Evans R. M (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854), 889-95
41. Jensen A, & Jacobson H (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent. Prog. Horm. Res.* 18, 387-414
42. Toft D & Gorski J (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55(6), 1574-81.
43. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996). “Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12), 5925-30.
- 44 . Bryant H, Dere W (1998). Selective estrogen receptor modulator: an alternative to hormone replacement therapy. *Soc Exp Biol Med*; 217:45-52.
45. Ferrer J, Cabrero A. Paciente cardiópata postmenopáusica. Sustitución hormonal. Nuevas moléculas. En: Cabrero A. Editor. Postmenopausia y enfermedad cardiovascular. Barcelona: Springer; 1998:285-300.
46. Comino R. Terapia hormonal sustitutiva (1999). Tibolona. SERMs y cáncer de mama. Medicina basada en la evidencia. En: Palacios S, Editor. Cerebro y mujer. Avances en Ginecología Endocrinológica. Madrid: Health Research Consulting; 139-146.
47. Wester S, Rosenfeld ME, Glass CK (2000). Nuclear receptor coactivators. *Adv Pharmacol*; 47:89-112.

48. Palacios S. Concepto de receptores esteroideos y su repercusión clínica. En: González O, Arteaga E, Contreras P, Editores. Menopausia y patologías asociadas. Santiago de Chile: Adiciones Sociedad chilena de Climaterio; 1998:109-17.

49. Hargreaves DF, Potten CS, Harding C, Shaw LE, Morton MS, Roberts SA, Howell A, Bundred NJ (1999). Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab*; 84(11):4017-24.

50. Adlercreutz H, Mazur W (1997). Phyto-estrogens and Western diseases. *Ann Med*; 29(2):95-120.

51. Brandi ML (1997). Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. *Calcif Tissue Int*; 61(Suppl 1):S5-S8.

52. Dixon Shanies D, Shaikh N (1999). Growth inhibition of human breast cancer cells by herbs and phytoestrogens. *Oncol Rep*; 6(6):1383-7.

53. Brzezinski A, Debi A (1999). Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 85(1):47-51.

54. Scheiber MD, Rebar RW (1999). Isoflavones and postmenopausal bone health: a viable alternative to estrogen therapy? *Menopause*; 6(3):233-41.

55. Clarkson TB, Anthony MS, Willians JK, Honore Ek, Cline JM (1998). The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med*; 217(3):365-8.

56. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C (1997). Effects of Raloxifene on bone mineral density serum cholesterol concentrations and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med*; 337:1641-7.

57. Navarro Ma C, Beltrán E (2000). Farmacología mecanismo de acción de fitoestrógenos. En: Libro ponencia y comunicaciones. VI Congreso Nacional de la AEEM. Barcelona: MAINSA (Ed):59-60.

58. Messina M, Barnes SM, Zetchell K (1997). Phytoestrogens and breast cancer. *Lancet*; 350:971-2.

59. Couse JF, Korach KS (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they led us. *Endocr Rev*; 20:358-417.

60. Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe RB (1999). Estrogen receptor alpha (ERa) and beta (ERb) m-RNAs in normal ovary, ovarian serous aystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines. Down-regulation of ERb in neoplastic tissue. *J Clin Endocrinol Metab*; 83:1025-8.

61. McCann SM (1962). A hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor. *Am J Physiol*. 202: 395-400.

62. Harris GW (1961). The pituitary stalk and ovulation. En: *Control of Ovulation*. Villet CA. Ed. London: Pergamon Press, p.p. 56-74.

63. Schally AV, Arimura A, Baba Y (1971). Isolation and properties of the FSH and LH- releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 393-39.

64. Silverman J, Livne I, Witkin JW (1994). The gonadotropin–releasing hormone (GnRH), neuronal systems: inmunocytochemistry and *in situ* hibridation. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. Edición, vol.1, cap.28, Raven Press, New York: 1683 – 1692.

65. Wheaton JE, Krulich L, Mc Cann SM (1975). Localization of luteinizing hormone releasing hormone in the Preoptic Area and Hypothalamus of the rat using radioimmunoassay. *Endocrinology* 97: 30-38.

66. Kink JC, Tobet SA, Snavely FL, Arimura AA (1982). LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *J. Comp. Neurol.* 209, 287-300.
67. Tobet SA, Bless EP, Schwarting GA (2001). Developmental aspect of the gonadotropin-releasing hormone system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 185: 173-84.
68. Millar RP, Pawson AJ, Morgan K, Rissman EF, Zhi-Liang L (2008). Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol* pp. 24.
69. Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H (1984). Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropins secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3874- 3878.
70. Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Mausley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E, Kats A (2001) A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc. Natl. Accad. Sci. U.S.A.* 98, 9636 – 9641.
71. Lehman MN, Robinson JE, Karsch FJ and Silverman AJ (1986). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J. Comp. Neurol.* 244, 19-35.
72. Grove-Strawser D , Sower D, Ronsheim SA, Connolly JB, Bourn CG, Rubin BS (2002). Guinea pig GnRH: Localization and Physiological activity reveal that it, not mammalian GnRH, is the major neuroendocrine form in guinea pigs. *Endocrinology.* 143, 1602-1612.
73. Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *J. Comp. Neurol.* 232, 534-547.
74. Witkin JW, Demasio K (1990). Ultrastructural differences between smooth and thorny gonadotropin-releasing hormone neurons. *Neuroscience* 34: 777-783.
75. Herbison A.E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr. Rev.* 19, 302-330.

76. Petersen SL, Ottem EN, Carpenter CD (2003). Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol. Reprod.* 69, 1771-1778.
77. Skynner MJ, Sim JS, Herbison AE (1999). Detection of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 140, 5195-5201.
78. Sharifi N, Reuss AE, Wray S (2002). Prenatal LHRH neurons in nasal explant cultures express estrogen receptor  $\beta$  transcript. *Endocrinology* 143, 2503-2507.
79. Herbison A E, Pape JR (2001). New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front. Neuroendocrinol.* 13, 741-748.
80. Legan SJ, Tsai HW (2003). Oestrogen receptor- $\alpha$  and- $\beta$  immunoreactivity in luteinizing hormone releasing hormone neurones after ovariectomy and chronic exposure to oestradiol. *J. Neuroendocrinol.* 15, 1164-1170.
81. Langub MC, Watson RE (1992). Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependymal in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* 130, 364-372.
82. Chaban VV, Lakhter AJ, Micevych, P (2004). A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology* 145, 3788-3795.
83. Prevot V, (2002). Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J. Neuroendocrinol.* 14 247-255.
84. King JC, Letourneau RJ (1994). Luteinizing hormone-releasing hormone terminalis in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology* 134 1340-1351.
85. Prevot V, Croix D, Bouret S, Dutoit S, Tramu G, Stefano GB, Beauvillain JC (1999). Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* 94, 809-819.

86. Zwain IH, Arroyo A, Amato P, Yen SS (2002). A role for hypothalamic astrocytes in dehydroepiandrosterone and estradiol regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by GnRH neurons. *Neuroendocrinology* 75 375-383.
87. Simonian SX, Spratt DP, Herbison AE (1999). Identification and characterization of estrogen receptor  $\alpha$ -containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J. Compar. Neurol.* 411, 346-358.
88. Evans NP, Dahi GE, Mauger D, Karsh FJ (1995). Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe. *Endocrinology* 136, 1603-1609.
89. Evans NP, Dahl GE, Mauger DT, Padmanabhan V, Thrun LA, Karsch FJ (1995). Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system. *Endocrinology* 136, 5511-559.
90. Levine JE (1997). New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in the rats. *Biol. Reprod.* 56, 293-302.
91. Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M (1992). A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 131, 2812-2820.
92. Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ (1990). The estradiol-induced surge the gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127, 1375-1384.
93. Evans NP, Dahl GE, Padmanabhan V, Thrun LA, Karsch FJ (1997). Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* 138, 5408-5414.
94. Gu GB, Simerly RB (1997). Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J. Compar. Neurol.* 384, 142-164.



95. Goodman RL, Parfitt DB, Evans NP, Dahl GE, Karsch FJ (1995). Endogenous opioid peptides control the amplitude and shape of gonadotropin-releasing hormone pulses in the ewe. *Endocrinology* 136, 2412-2420.

96. Chongthammakun S, Terasawa E (1993). Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys. *Endocrinology* 132, 735-743.

97. Gerendai I & Halász B (1997). Neuroendocrine Assymetry. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 18, 354-381.

98. Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Arrieta I, Mendoza CA, & Cruz ME (2005). Effects of cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the preoptic and hypothalamic area of cyclic female rats. *Endocrine*, 21, 251-260.

99. Dominguez R, Riboni L, Zipitría D & Revilla R (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *J Endocrinol*, 85 (2), 175-80.

100. Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the interior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of endocrinology*, 24: 739-742.

101. Duax WL, Griffin JF, Weeks CM, Wawrzack Z (1988). The mechanism or action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *Journal of Steroid Biochemistry*.31(4B): 481-492

102. Davis AM, Eilersieck MR, Grimm KM, Rosenfeld CS (2006). The effects of the selective estrogen receptor modulators, Methyl-Piperidino-Pyrazole (MPP), and ramoxifene in normal and Cancerous Endometrial Cell lines and the murine uterus. *Molecular Reproduction and development*. 73:1034-1044.

103. 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-hipotalamo-hipofisis-ovario de la rata. Tesis de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

104. Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MJ, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schutz G, Herbison AE (2006). Definition of Estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52: 271-280.

105. Dickson RB, Stancel GM (2000). Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J. Natl Cancer Monogr*, 27, 135-1044.

106. Wengera MD, Bowman AM, Thorsteinsson MV, Little KK, Wang L, Zhong J, Lee AL, DePhillips P (2005). An automated homogeneous method for quantifying polysorbate using fluorescence polarization. Department of Biologics Development and Engineering, Merck Research Laboratories, Merck&Co., Inc., WP42A-20, West point, PA 19486, USA. bVaccine Biometric Research, Merck&Co., Inc., West Point, PA 19486, USA. 337(1): 48-54.

107. Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tanford C (1979). Properties of detergents. *Methods Enzymol*, 56: 734-49.

108. Joint F, (1974). Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. (W.H. Organization, Ed), WHO *Food Additives* Series No.5.

109. Woolley CS, Rudick CN, Gibbs RB (2003). Role for the basal forebrain Cholinergic System in estrogen-induced disinhibition of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, 23(11): 4479-90.

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

111. Mendoza-Garcés L, Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbon MA, Arrieta-Cruz I, Flores A, Cruz ME (2007). Changes in the number of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells on POA-AHA during the estrous cycle of the rat. 40 th Annual Meeting of Society Study of Reproduction, San Antonio Texas. 21-25 julio, Abst 128, pp 106.

112. Rodríguez D, Cruz ME, Olvera E, Cruz P, Galindo JL, Vázquez M, Domínguez R (2008). Asymmetric effects of unilateral blockade of ERalpha or ERbeta of POA-AHA on spontaneous ovulation during the estrous cycle of the adult rat. 38 th. Meeting of

society for neuroscience. Washington, D.C. 15-19 november. Program No. 81.18/CC11.

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

114. Palkovits M (1973). Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat, Brain Res. 59: 449.

115. Domínguez-González AD. Un estudio sobre la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de gonadotropinas y hormonas ováricas y su interacción con los sistemas monoaminérgicos de POA-AHA. La rata como modelo. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias en biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, 1999.

116. Gore AC and Roberts JL. (1997). Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Expression in vivo and in vitro. Frontiers in neuroendocrinology 18: 209-245. New York, New York.

117. Gutierrez HH. (2009). Efectos de la sección de las vías dorsales al area preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) del lado izquierdo o derecho, realizada en la fase de proestro, sobre la ovulación, el peso de los ovarios y del útero de la rata. Servicio Social, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

118. Meléndez de la Rosa G. Papel de las glándulas suprarrenales y los ovarios en la secreción de progesterona durante el ciclo estral de la rata. Tesis para obtener el título en biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, 2005.