



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

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

**Laboratorio de Neuroendocrinología**

**EFFECTOS DEL ALCOHOL A 6.25% EN EL LADO DERECHO DE POA-AHA  
SOBRE LA OVULACIÓN Y LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA GnRH Y DE LOS  
RECEPTORES A ESTRÓGENOS**

**TESIS**

**Para obtener el título de Biólogo**

**Presenta**

**Min Poblete Isid Enrique**

**Directora de tesis:**

**Dra. María Esther Cruz Beltrán**

Financiado por CONACyT (Convenio 81898) y DGAPA-PAPIIT (IN-214508)



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  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno **MIN POBLETE ISID ENRIQUE**, con número de cuenta **408100326**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **29** del mes de **mayo** de 2012 a las **12:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

VOCAL DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

SECRETARIO M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

SUPLENTE DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

SUPLENTE DRA. JUANA MONROY MORENO

El título de la tesis que presenta es: **EFFECTOS DEL ALCOHOL A 6.25% EN EL LADO DERECHO DE POA-AHA SOBRE LA OVULACIÓN Y LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA GnRH Y DE LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS.**

Opción de titulación: tesis.

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

México, D. F., a 26 de abril de 2012.

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ

DIRECTOR

ZARAGOZA  
DIRECCION

RECIBI  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

Gracias

VO. BO.  
Dr. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ  
JEFE DE CARRERA

A mis padres y hermana que me apoyaron todo el tiempo y sé que estarán ahí para hacerlo siempre.

A mi familia que sin importar las adversidades siempre habrá un lazo que nos une.

A mis amigos con los que he pasado buenos y malos momentos, hemos reído y llorado juntos pero siempre unidos.

A mis compañeros de laboratorio, siempre nos apoyamos académica y moralmente.... Ahora somos más que amigos, somos colegas.

No me gustaría decir nombres porque no quisiera omitir a nadie, ellos saben a quienes me refiero.

## Abreviaturas

POA-AHA.....	Área preóptica hipotalámica anterior
ARNm.....	Ácido ribonucleico mensajero
RE $\alpha$ .....	Receptor a estrógenos alfa
RE $\beta$ .....	Receptor a estrógenos beta
GnRH.....	Hormona liberadora de las gonadotropinas
SNC.....	Sistema Nervioso Central
LH.....	Hormona Luteinizante
FSH.....	Hormona estimulante del folículo
GAP.....	Polipéptido asociado de la GnRH
GnIH.....	Hormona inhibidora de las gonadotropinas
hCG.....	Gonadotropina coriónica humana
E <sub>2</sub> .....	Estradiol
AMPC.....	Adenosinmonofosfato cíclico
ATP.....	Adenosintrifosfato
17 $\beta$ -HSD.....	17 $\beta$ -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa
LHRH.....	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
EtOH-50%.....	Etanol cincuenta por ciento (v/v)
HMB.....	Hipotalamo Medio Basal
OVX.....	Hemi-ovariectomizadas
EtOH.....	Etanol al 6.25% (v/v)
RT.....	Retro transcripción
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
GAPDH.....	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
BE.....	Benzoato de estradiol
H <sub>2</sub> O.....	Agua
pb.....	Paras de bases
IMB.....	Intensidad media de la banda

# Contenido

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Marco teórico .....	3
<i>Hipotálamo</i> .....	3
<i>Control hipófisis-hipotálamo</i> .....	3
<i>GnRH</i> .....	3
<i>Hipófisis</i> .....	5
<i>LH</i> .....	6
<i>Ovarios</i> .....	6
<i>Hormonas esteroides</i> .....	8
<i>Receptores a estrógenos</i> .....	10
<i>Ciclo estral de la rata</i> .....	11
<i>Asimetrías Funcionales del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario</i> .....	13
<i>Efectos del alcohol en la reproducción</i> .....	15
Justificación.....	18
Hipótesis .....	19
Objetivos .....	20
<i>General</i> .....	20
<i>Particulares</i> .....	20
Materiales y métodos.....	21
<i>Experimento 1. Análisis de los efectos de la micro-inyección de agua o alcohol a 6.25% en el lado derecho de POA-AHA, realizada en la mañana del diestro 1.</i> .....	21
<i>Experimento 2. Estudio de la sustitución de la señal hipotalámica y ovárica en ratas con bloqueo de la ovulación por la micro-inyección de agua en el lado derecho de POA-AHA en la mañana del diestro 1.</i> .....	27

<i>Análisis estadístico</i> .....	27
Resultados.....	28
Análisis de resultados.....	41
Conclusiones .....	47
Bibliografía .....	48

## Resumen

El consumo de alcohol está relacionado con problemas en la reproducción. Sin embargo, el sitio de acción de esta droga aún es ambiguo. Pérez y col. (2011) realizaron una curva dosis-respuesta, para analizar los efectos de la micro-inyección de alcohol en el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) izquierda o derecha sobre la ovulación, usando agua como vehículo. Los resultados mostraron que 1.08  $\mu\text{M}$  de alcohol (que corresponde a 6.25%, v/v) tiene un efecto asimétrico. Por lo que se decidió en este estudio analizar los efectos que tiene el alcohol al 6.25% en el lado derecho sobre la ovulación y la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica para el receptor a estrógenos alfa ( $\text{RE}\alpha$ ), beta ( $\text{RE}\beta$ ) y la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), usando agua como vehículo. La micro-inyección de agua disminuyó el porcentaje de animales ovulantes, la masa ovárica, la concentración de  $17\text{-}\beta$  estradiol y la expresión del ARNm para ambos RE, tanto del lado izquierdo como del derecho de POA-AHA. Posiblemente el agua altere el ambiente osmolar de POA-AHA lo cual causa daños puntuales que alteran la expresión del ARNm para ambos receptores a estrógenos y posteriormente su expresión proteica. La falta de estos receptores tiene como consecuencia la disminución en el porcentaje de animales ovulantes, que en ausencia del receptor, la señal ovárica no será detectada y no habrá liberación de GnRH.

Por el contrario, la inducción de la ovulación por el alcohol en el lado derecho de POA-AHA es resultado del incremento en la expresión del ARNm de los dos tipos de receptores a estrógenos, así como de la secreción de estradiol.

## Introducción

El setenta por ciento de la población mundial consume alcohol y México está en el tercer lugar de consumidores de alcohol en el continente Americano (Degenhardt y col., 2008).

El abuso en el consumo de bebidas alcohólicas provoca alteraciones funcionales del tracto gastrointestinal, el hígado, el páncreas y afecta las funciones reproductivas (Fisher y col., 2008; Karinch y col., 2008; Yang y col., 2008; LaPlagia y col., 1997).

La exposición prenatal al alcohol afecta varias regiones del cerebro que se manifiestan en la adultez (VanDeMark y col., 2009). Experimentos llevados a cabo en la rata adulta han mostrado que la administración intraperitoneal de 3g/Kg peso de alcohol en la etapa del proestro inhibe la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de la hormona luteinizante, sin modificar el síntesis de estas hormonas (LaPlagia y col., 1997). En el macho disminuye la concentración de testosterona en el plasma y la morfología de los espermatozoides (Rivier, 1999).

La mayoría de los experimentos llevados a cabo para analizar los efectos del alcohol sobre la reproducción han implicado la administración de éste por vía intraperitoneal ó intragástrica, pero no se conocen sus efectos al ser inyectado directamente en el sistema nervioso central. Por lo que se decidió analizar los efectos de la micro-inyección del alcohol en el hipotálamo sobre la ovulación, la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH, y de los receptores a estrógenos; así como en las concentraciones séricas de estradiol y progesterona.

Dado que el hipotálamo del lado izquierdo al tercer ventrículo regula de manera diferente los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación al del lado derecho, se decido realizar este estudio en el lado derecho.

## **Marco teórico**

Los eventos reproductivos en los mamíferos están regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual en la hembra culmina con la ovulación

### *Hipotálamo*

El hipotálamo es un componente del sistema nervioso central (SNC), considerado filogenéticamente antiguo, ya que en el curso de la historia evolutiva de los mamíferos ha tenido pocos cambios en su organización y sus conexiones con otras áreas encefálicas. Es una zona compleja de materia gris que se extiende a lo largo de los dos hemisferios y se considera como un regulador importante en las funciones vegetativas, entre las cuales está la reproducción. Esta última función la lleva a cabo mediante la regulación de la secreción de dos hormonas hipofisarias, la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH), mediante la liberación de la GnRH. La GnRH tiene como células blanco los gonadotropos ubicados en la hipófisis anterior (Conn, 1998).

### *Control hipófisis-hipotálamo*

Las secreciones hormonales de la adenohipófisis están reguladas por señales hormonales o nerviosas provenientes del hipotálamo. Las hormonas o factores de liberación e inhibición hipotalámicas, llegan a la hipófisis por medio del sistema porta hipotalámico-hipofisario, un conjunto de minúsculos vasos sanguíneos que inicia en la eminencia media, porción más inferior del hipotálamo, pasan por el tallo hipofisario y llegan hasta la adenohipófisis (Guyton 2001).

### *GnRH*

La reproducción en los mamíferos es regulada por la liberación pulsátil de la GnRH (también llamada LHRH) secretada por el hipotálamo, se ha postulado que las neuronas GnRHérgicas tienen una sincronización y una sinapsis múltiple (Cambell y col., 2009). En vertebrados existen al menos trece variantes, llamadas isoformas, de la GnRH (Prieto y Velázquez, 2002). Las isoformas de GnRH han sido identificadas en todas las especies de vertebrados estudiados a lo largo de la escala filogenética, desde los tunicados hasta los humanos (Hiney y col., 2002). Al menos dos ó tres de estas isoformas están presentes en mamíferos (Herbison, 2006).

La distribución de las neuronas GnRHérgicas en el SNC es diferente entre las especies, sin embargo su principal sitio de proyección es la zona externa de la eminencia media (entre un 50 y 70% de las neuronas), el resto de las fibras están distribuidas de forma heterogénea incluyendo el complejo amigdaloides medial y cortical, la estría terminal, habénula, el hipocampo, núcleo interpeduncular, la neocorteza y la zona gris periacueductal, estas redes no tienen relación directa con la función reproductora. En cambio, se ha mostrado que en la rata las neuronas GnRH del área preóptica (POA) tienen una relación funcional con la secreción de la LH (Herbison, 2006).

En la rata, ratón y mono, las neuronas GnRHérgicas poseen una morfología predominantemente bipolar y son clasificadas como de contorno liso o espinoso. Estructuralmente las espinosas poseen múltiples puntas en las porciones citoplasmáticas, lo cual sugiere que este tipo de células recibe más señales de entrada que las neuronas lisas, sin embargo la diferencia funcional entre las morfologías es desconocida (Herbison, 2006).

Se ha mostrado que el retrocontrol (“feedback”) positivo inducido por la secreción basal de estrógenos incrementa aproximadamente un 40% la transcripción del gen para la GnRH, dos a cuatro horas antes del aumento de la secreción preovulatoria de la GnRH. Esta transcripción produce un transcrito primario poliadenilatado de alrededor de 4200 bases, que es procesado a una cadena de 560 bases, la traducción del ARNm maduro resulta en la producción de una pre-pro-hormona de 92 aminoácidos. Los primeros 23 aminoácidos del extremo N terminal comprenden una secuencia señal y el resto de los aminoácidos conforman la pro-hormona, en la cual la GnRH está localizado al final del extremo N terminal y separado por 3 aminoácidos del GAP (polipéptido asociado a la GnRH). El paso final en la formación del decapeptido biológicamente activo es la transformación del glutamato del extremo N terminal en piroglutamato (pGlu), y de la amidación de la glicina presente en el extremo C terminal en el aparato de golgi. Como resultado se obtiene la siguiente secuencia de aminoácidos pGlu-His-Trp-Ser-**His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly**, secuencia que puede variar en tres aminoácidos, para las diferentes isoformas con respecto a ésta que caracteriza a la GnRH-I (Herbison, 2006).

La GnRH también tiene un papel como neurotransmisor, con efectos estimulantes, inhibitorios o moduladores, en el hipotálamo, hipocampo, cerebelo y la amígdala, sin embargo no se conoce su función específica en estas estructuras (Herbison, 2006).

El papel opuesto al de la GnRH lo lleva a cabo la hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH), que inhibe la síntesis de la subunidad  $\alpha$  (común) y la subunidad  $\beta$  (específica) de las gonadotropinas en la hipófisis (Bentley y col., 2009). Las neuronas productoras de la GnIH hacen sinapsis con las neuronas GnRHérgicas y modulan su secreción (Kriegsfeld y col., 2006).

### *Hipófisis*

La hipófisis es un órgano que se ha dividido en tres regiones para su mejor estudio: el lóbulo anterior, el lóbulo intermedio y el lóbulo posterior. El lóbulo anterior y el lóbulo intermedio forman una glándula endocrina llamada adenohipófisis y el lóbulo posterior es una extensión del hipotálamo y es llamado neurohipófisis (Arimura, 2000). Las hormonas que libera la adenohipófisis a la circulación estimulan la secreción de otras hormonas en sus órganos blancos. Específicamente la FSH y la LH estimulan las funciones de los ovarios. Su secreción se ve influenciada por diferentes factores entre ellos la concentración de hormonas esteroides o los pulsos de secreción de GnRH (Arimura, 2000).

### *FSH*

La cantidad de FSH es sintetizada por los gonadotropos es baja comparada con otras hormonas hipofisarias. Uno de los efectos biológicos de la FSH es estimular la producción de progesterona y estradiol en el ovario. En la hembra las concentraciones máximas de esta hormona se dan inmediatamente antes del “pico” preovulatorio de LH. La FSH se une a su receptor ubicado en las membranas de las células de la granulosa del folículo (Reichert, 1998).

El peso molecular de esta hormona es mayor a 30,000 daltons y está compuesta por dos subunidades asociadas, pero con diferentes aminoácidos y carbohidratos que la conforman dependiendo de la especie. Una subunidad es designada como  $\alpha$ , la cual es semejante a la subunidad  $\alpha$  de la LH, a la de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y de la gonadotropina coriónica humana (hCG), por lo que es llamada

subunidad común. La otra subunidad es designada  $\beta$  y es la que le otorga especificidad a la hormona. Al asociarse con la subunidad  $\alpha$  se forma un heterodímero que le proporciona una alta afinidad con su receptor (Reichert, 1998).

### *LH*

Entre las funciones que desempeña la LH están el estímulo de la estereoidogénesis en la gónada masculina y femenina. En la hembra participa en la inducción de la ovulación y la luteinización del folículo. La LH juega un papel central en la regulación del sistema reproductivo. En la mayoría de las hembras el ciclo reproductivo está dividido por un “pico” preovulatorio ó valor máximo de la concentración sanguínea de la LH; una fase de desarrollo folicular que conduce a la ovulación y otra fase caracterizada por la presencia del cuerpo lúteo (Bousfield, 1998).

Dado que la hCG presenta un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos y en sus características estructurales con la molécula de la LH, se ha utilizado como la hormona que puede reemplazar las funciones de la LH a falta de la misma, ya que comparten el mismo receptor (Bousfield, 1998).

La subunidad  $\beta$  de la LH consiste de unos 20 a 39 aminoácidos en la secuencia principal y de 105 a 149 residuos de aminoácidos en el péptido maduro, hay seis puentes disulfuro en la subunidad  $\beta$  madura, de los cuales se conoce la función de cinco. En la molécula tres puentes disulfuro crean el nudo de cisteína, que es el que dicta el pliegue básico de la proteína, el cuarto puente es esencial para determinar la estructura del bucle determinante, el cual juega un papel importante en la especificidad de la LH y la FSH, el quinto puente es determinante para la dimerización con la subunidad  $\alpha$ , y aparentemente el sexto puente posee la función de estabilizar a la molécula (Bousfield, 1998).

### *Ovarios*

La mayoría de los vertebrados desarrollan un par de ovarios. Estos órganos se localizan en la parte superior de la cavidad pélvica y se encuentran sujetos a ella. Los ovarios se mantienen en su lugar por un mesenterio (mesovario) que está conectado al ligamento suspensorio (Yao y Bahr, 1998).

Los ovarios son de los órganos más vascularizados. A pesar de que el tamaño de los ovarios varía entre las especies, su estructura es similar cuando se compara entre los vertebrados. Consisten de una médula interna, que contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos junto con tejido conectivo, y una corteza externa que está compuesta por numerosos folículos que están embebidos en el estroma. El estroma está compuesto por tres tipos celulares: células de tejido conectivo (fibroblastos) con la función de soporte, células de músculo liso que regulan la contracción de los vasos sanguíneos y células intersticiales que incluyen células de la teca indiferenciadas y células de folículos atrésicos (Yao y Bahr, 1998).

El ovario al igual que todos los órganos recibe fibras nerviosas. Estas fibras nerviosas provienen del nervio vago, el plexo ovárico y el nervio ovárico superior (Burden, 1978; Lawrence y Burden, 1980).

Los ovarios son los órganos productores de gametos y de hormonas esteroides, peptídicas, de neurotransmisores y de factores de crecimiento que regulan la función del propio ovario y del eje hipotálamo-hipófisis. En las hembras de los mamíferos la producción de folículos primarios es cíclica e implica la interacción de cambios foliculares y hormonales, funciones que son reguladas por la FSH y la LH (Curtis y Barnes, 2007).

En concentraciones elevadas, los estrógenos actúan por medio de un efecto “feedback” negativo, cuyo resultado es la inhibición de la producción de GnRH y en consecuencia de la FSH y LH. En concentraciones reducidas, los estrógenos actúan a través del mecanismo de retroalimentación positiva o “feedback” positivo, lo que resulta en el aumento de la secreción de la GnRH. Al mismo tiempo, aumenta la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH, lo que estimula la síntesis de LH y FSH (Curtis y Barnes, 2007).

La progesterona en concentraciones elevadas y en presencia de estrógenos, inhibe la secreción de GnRH, FSH y LH (Curtis y Barnes, 2007).

Al principio del ciclo ovárico los folículos y los ovocitos primarios (ovocitos I) comienzan a madurar por influencia de factores de crecimiento, a medida que el folículo crece, aumenta la concentración de estrógenos en sangre. El aumento repentino de los estrógenos estimula la secreción de LH, que resulta en el aumento de la concentración sanguínea

de esta hormona, este incremento, junto con la caída en los estrógenos provoca la liberación de los ovocitos I, fenómeno conocido como ovulación (Curtis y Barnes, 2007).

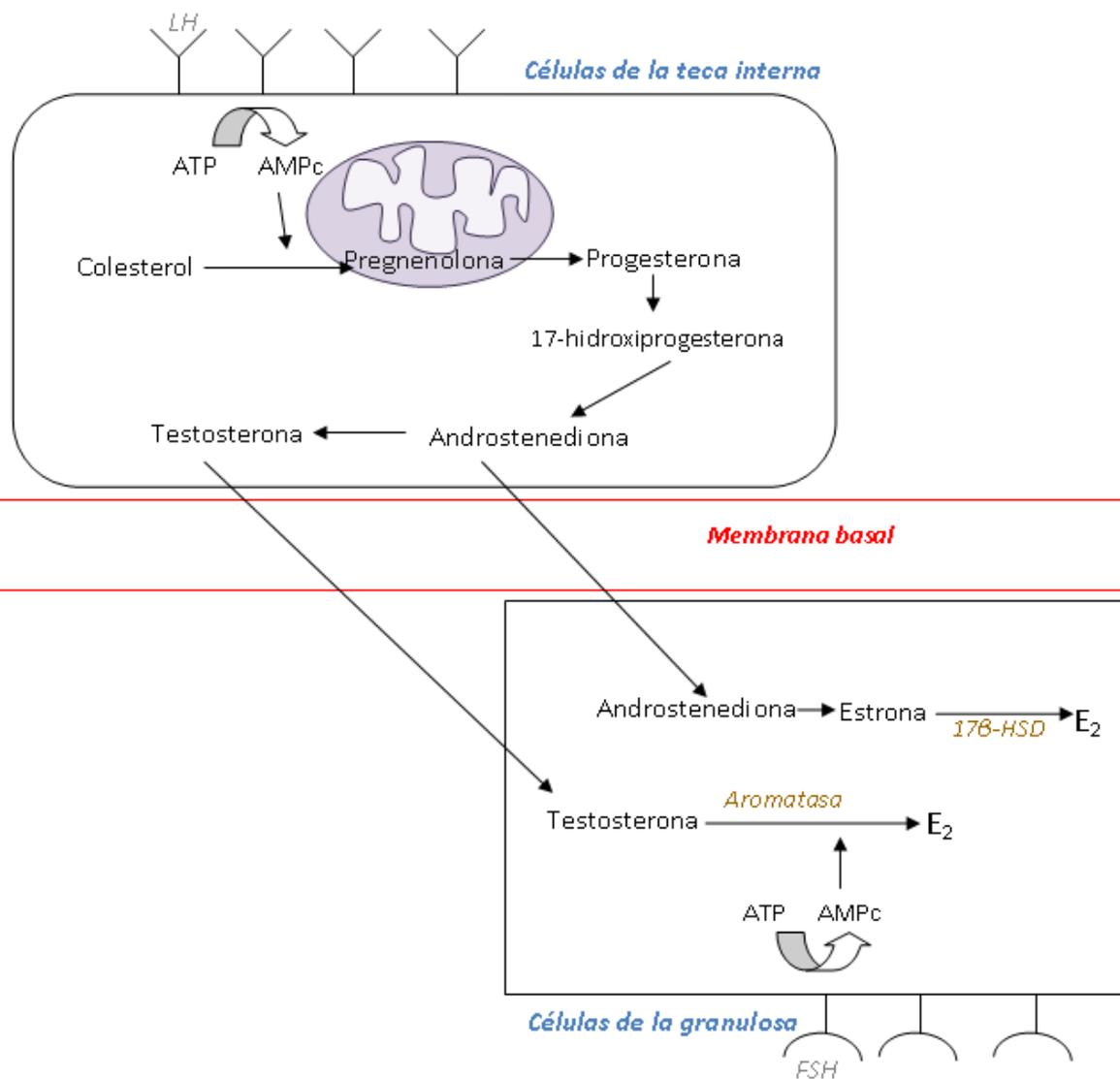
Después de la ovulación, bajo el estímulo continuo de la LH, las células de la granulosa y de la teca interna del folículo aumentan de tamaño y se transforman en células granuloso-luteínicas y teco-luteínicas del cuerpo lúteo. Cuando las células del cuerpo lúteo aumentan de tamaño comienzan a sintetizar cantidades significativas de progesterona (Curtis y Barnes, 2007).

### *Hormonas esteroides*

Hace medio siglo, la clasificación de hormonas sexuales era simple, los andrógenos eran secretados por las gónadas masculinas y los estrógenos por las femeninas. Años después, se ha considerado que tanto los machos como las hembras secretan ambas hormonas sexuales, pero en concentraciones diferentes. En los machos, los estrógenos regulan el comportamiento sexual, mantienen el sistema óseo, el cardiovascular y participan en la función normal de los testículos y la próstata. La importancia de los andrógenos en la hembra es que son los precursores de los estrógenos y substratos en los que actúa la aromatasas, enzima que sintetiza el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), así como su papel regulador en órganos como el útero, la glándula mamaria y el cerebro (Pettersson y Gustafsson, 2001).

Las células de la teca interna del folículo ovárico sintetizan andrógenos (androstenediona y testosterona) a partir de colesterol. Los folículos pueden obtener el colesterol de tres fuentes: 1) de lipoproteínas de baja densidad en la sangre; 2) del colesterol almacenado en las células foliculares o 3) de la síntesis de colesterol por las mismas células foliculares (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).

El primer paso en la síntesis de hormonas esteroides (Figura 1) es la formación de la pregnenolona, que es estimulada por la unión de la LH a los receptores que se encuentran en la membrana celular, lo cual induce la formación de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) a partir de adenosintrifosfato (ATP), el cual activa al complejo enzimático citocromo  $P_{450}$  que cataliza la formación de pregnenolona en la membrana interna de las mitocondrias de las células de la teca (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).



**Figura 1.** Esteroidogénesis. El proceso de esteroidogénesis ocurre por medio de la cooperación entre las células de la teca interna y las de la granulosa del folículo ovárico. Cuando la hormona luteinizante (LH) se une a su receptor, en las células de la teca interna, se activa la formación de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosintrifosfato (ATP) lo cual desencadena una vía de señalización y la internalización de la pregnenolona a la membrana interna de la mitocondria, donde se transforma en progesterona, posteriormente en 17-hidroxiprogesterona, luego en androstenediona y después en testosterona; estas dos últimas atraviesan la membrana basal a las células de la granulosa; donde la hormona estimulante del folículo (FSH) tiene su receptor que desencadena una vía de señalización por medio del AMPc que promueve la activación de la enzima aromatasa que transforma la testosterona en 17- $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). La androstenediona por otro lado se transforma a estrona y después en estradiol por medio de la enzima 17 $\beta$ -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) (diseñado por Min).

Una vez sintetizada la pregnenolona, sale de la mitocondria y se transforma en progesterona; es a partir de ésta que se forma la 17-hidroxiprogesterona; esta ultima por la acción de la C<sub>17,20</sub>-liasa se biotransforma a androstenediona, la que se convierte a testosterona por acción de la enzima 17β-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17β-HSD) (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).

La androstenediona y testosterona se difunden a través de la membrana basal y llegan a las células de la granulosa, donde son aromatizadas a estrógenos por el complejo enzimático P<sub>450</sub>-aromatasa, que se activa por el incremento de AMPc a partir de ATP inducido por la unión de la FSH a sus receptores. La testosterona se transformara en E<sub>2</sub> y la androstenidiona se transforma en estrona, que será transformada en E<sub>2</sub> por medio de la enzima 17β-HSD (Gore-Langton y col., 1994).

### *Receptores a estrógenos*

La existencia de una proteína a la cual se le une el E<sub>2</sub> en el útero fue reconocida hace más de 40 años. Sin embargo, en 1996 se identificó un segundo receptor a estrógenos (RE) en la próstata de la rata; este receptor fue llamado REβ para distinguirlo del anteriormente identificado como REα. Ambos receptores pertenecen a la familia de los receptores nucleares de factores de transcripción, son receptores similares en la región de unión al ligando. Sin embargo, el REβ posee una mayor afinidad al E<sub>2</sub>.

En el ovario, el REα se ha identificado en las células de la teca (pero no en las de la granulosa), en las células de la glándula intersticial y en el epitelio germinal, mientras que la expresión del REβ en los ovarios cambia durante del ciclo estral. Los valores más bajos de la expresión se observan en las células de la granulosa de folículos pequeños, en crecimiento y preovulatorios (Pettersson y Gustafsson, 2001).

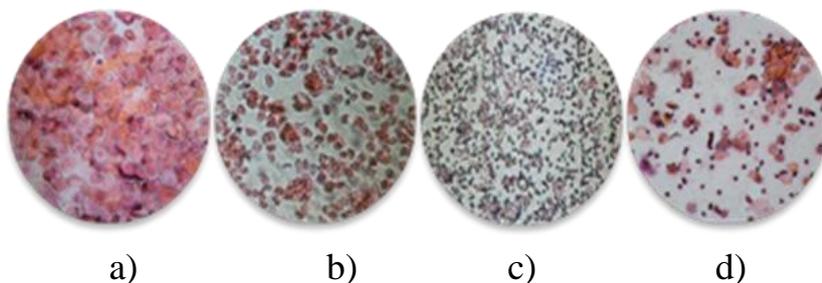
En el útero de la rata adulta, el REα es más abundante que el REβ, está presente en el estroma y en ambos tipos de células epiteliales (luminales y granulares). Mientras que el REβ sólo se encuentra en las células del epitelio granular (Pettersson y Gustafsson, 2001; Byers y col. 1997).



La palabra estro es una adaptación latina del griego *oistros* que significa frenesí, fue utilizada por primera vez por Heape (1900) para describir el periodo en el que la hembra está sexualmente receptiva al macho. También se utilizó el término *anestrus* para el periodo de no reproducción, cuando aparentemente los ovarios y los otros órganos reproductores están “quiescentes”. Heape (1900) utilizó los prefijos *di-*, *pro-* y *met-* con el sufijo *estro* para describir los estadios del ciclo (Freeman, 2006).

El *proestro* es la etapa en la que la hembra “entra en calor” y es receptiva al macho entre las horas subsiguientes al valor máximo (“pico”) en la concentración de gonadotropinas y las primeras de la siguiente fase. Durante las primeras horas del *estro*, ocurre la ovulación. En el caso de que no exista fecundación, las hembras entran en un periodo corto de recuperación llamado *metaestro* o *diestro-1*. El siguiente estadio en el ciclo es el *diestro* o *diestro-2*, cuya duración varía dependiendo de la especie, a partir de esta fase, el ciclo comienza de nuevo (Freeman, 2006).

La rata es un animal que tiene una ovulación espontánea, su ovulación ocurre cada 4 o 5 días. El ciclo estral puede ser identificado mediante la diferente citología del frotis vaginal tomados diariamente. El proestro está caracterizado por la presencia de células nucleadas epiteliales. Al día siguiente, en el estro, el tipo celular dominante son células epiteliales cornificadas, durante el diestro-1 el tipo celular dominante son los leucocitos, los cuales aparecen en un número mucho mayor que los otros tipos celulares. En el diestro-2 se presentan los tres tipos celulares (Figura 3) (Freeman, 2006).



**Figura 3.** Diferentes tipos celulares que se pueden observar en un frotis vaginal, a) células nucleadas y redondas típicas del proestro, b) el día estro se observan células cornificadas, c) y d) en el día del diestro el tipo celular dominante es el leucocito.

### *Asimetrías Funcionales del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.*

La existencia de una función asimétrica ha sido descrita en los distintos órganos endocrinos pares, incluyendo, la glándula tiroides, las glándulas suprarrenales y gónadas, incluso en el SNC (Gerendai, 1986).

El tracto reproductivo de las aves es conocido por su desarrollo asimétrico característico: sólo el ovario y oviducto izquierdos son funcionales y su extirpación reactiva la función del lado derecho, sin embargo, en la mayoría de los mamíferos no se ha mostrado aún predominancia en las funciones de una gónada respecto a la otra (Gerendai y Halász, 1997).

Al estudiar el efecto de la ovariectomía unilateral sobre el contenido de GnRH, se observó que la extirpación del ovario aumentó el contenido de GnRH en el mismo lado del HMB, un efecto semejante se observó cuando se extirpó la gónada izquierda. La ovariectomía bilateral resulta en una disminución del contenido de GnRH en ambos lados del hipotálamo (Gerendai y Halász, 1997).

El hipotálamo, específicamente en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA), se regula de manera asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación (Gerendai y col., 1978; Bakalkin y col., 1984; Inase y Machida, 1992; Nance y Moger, 1982; Fukuda y col., 1984; Nance y col., 1984; Morán y col., 1994; Cruz y col., 1989; Sánchez y col., 1994; Arteaga-López y col., 2003). Esta función asimétrica se debe a: la cantidad de GnRH, entre el lado derecho del hipotálamo medio basal y el izquierdo (Gerendai y col., 1978); la síntesis del ARNm de la GnRH en la tarde del estro en uno y otro lado de POA-AHA (Arteaga-López y col., 2003); la expresión del ARNm para el RE $\alpha$  y el RE $\beta$  en POA-AHA (Arteaga-López y col., 2003), el número de neuronas GnRH en el hipotálamo del ratón macho que es diferente entre ambos lados (Inase y Machida, 1992).

Estos resultados ponen de manifiesto que los mecanismos neuroendocrinos que se generan en las porciones izquierda y derecha de POA-AHA son diferentes. Los primeros datos que mostraron esta disimilitud funcional se observaron en la rata hemiovariectomizada (OVX), donde la lesión (por radiofrecuencia) del lado derecho del hipotálamo anterior inhibe la hipertrofia compensadora del ovario remanente (el ovario *in situ*), mientras que la lesión del lado izquierdo no la modificaba (Fukuda y col., 1984). La lesión del lado derecho del área

retroquiasmática con ácido kaínico, bloquea el desarrollo de hipertrofia compensadora cuando se extirpa el ovario del mismo lado en que se realiza la lesión (Nance y col., 1984). En el animal que cuenta con sus dos gónadas, la lesión del lado derecho de POA, en el día del estro, disminuye el número de animales que ovulan en la mañana del siguiente estro esperado (Cruz y col., 1990).

La primera observación bioquímica que mostró la existencia de la función asimétrica del hipotálamo fue dada por Gerendai y col. (1978), al indicar que en la rata hembra, la concentración de la GnRH en la porción derecha del HMB era el doble que la del lado izquierdo. Dicha asimetría también se ha mostrado en la rata macho, pero ésta sólo se observa en horas específicas del día (Bakalkin y col., 1984). En el ratón macho, el número de células inmunorreactivas a la GnRH es mayor en el lado derecho del cerebro que en el izquierdo (Inase y Machida, 1992).

Recientemente hemos mostrado que la síntesis del ARNm de la GnRH también es asimétrica y varía durante el ciclo estral (Arteaga y col., 2003): la mayor cantidad de ARNm se observa en la tarde del diestro-2, en la porción derecha de POA- AHA.

La actividad asimétrica de la neurona GnRH es regulada por las gónadas: la orquidectomía bilateral o la extirpación del testículo izquierdo disminuye el número de células GnRH, en tanto que la extirpación de la gónada derecha no lo hace (Inase y Machida, 1992).

La secreción asimétrica de GnRH del hipotálamo es regulada por señales extrahipotalámicas: en la rata macho, la deafferentación del lado derecho del hipotálamo y extirpación del testículo derecho, bloquea el incremento en la concentración plasmática de FSH que normalmente ocurre después de la hemiovariectomía (Nance y Moger, 1982).

Las hormonas sexuales establecen algunas asimetrías fisiológicas y conductuales que varían con el sexo. En la rata hembra de cuatro días de vida, el contenido de receptores a estrógenos en la corteza cerebral es asimétrico: en el macho hay más receptores del lado izquierdo, mientras que en la hembra sucede lo contrario (Sandhu, 1986).

La asimetría en la concentración de receptores y los efectos de las hormonas gonadales en la etapa perinatal, repercuten en el establecimiento de patrones fisiológicos y de conducta en la etapa adulta. Nordeen y Yahr (1982) mostraron que implantes de estrógenos en el hipotálamo de la rata hembra recién nacida, inducen cambios conductuales diferentes en la edad adulta; estos cambios dependen del lado y del núcleo hipotalámico en el que se coloque el implante. Así, el implante de benzoato de estradiol en el lado izquierdo del núcleo ventromedial disminuye el coeficiente de lordosis; mientras que el implante del lado derecho de POA incrementa la conducta sexual masculina (es decir, monta a otra hembra), la que se evidencia por la aparición de la conducta de monta.

En la rata adulta con ambas gónadas, la lesión electrolítica de la porción derecha de POA medial reduce significativamente el número de animales que ovulan, mientras que la lesión de la porción izquierda no afecta. En cambio en la rata hemiovariectomizada, los efectos de la lesión unilateral se invierten, ya que ahora, los animales que no ovulan son los que fueron lesionados en la porción izquierda de POA-AHA (Cruz y col., 1990).

En el ciclo estral ocurren eventos neuroendócrinos sincronizados que suceden de manera consecutiva y culminan con la ovulación. Por lo que es necesario que al momento de diseñar un experimento en este campo de la investigación, se esté consciente de la importancia de estos cambios, y de que cualquier manipulación, por mínima que se considere, generará modificaciones en la homeóstasis del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que finalizaran en el bloqueo de la ovulación. Entre la infinidad de factores que afectan la ovulación está el consumo de alcohol.

#### *Efectos del alcohol en la reproducción*

El alcohol inhibe la reproducción en humanos, monos y roedores pequeños al inhibir la secreción de LH y por tanto bloqueando la ovulación en la hembra (Rettori y McCann, 1997). En ratas en proestro, la inyección intra-peritoneal de alcohol disminuye el "pico" preovulatio de LH, la concentración de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), el estradiol y la progesterona en la tarde del proestro, sin embargo no afecta la expresión del ARNm que codifica para la LH ni el precursor de la LHRH (LaPaglia y col., 1997).

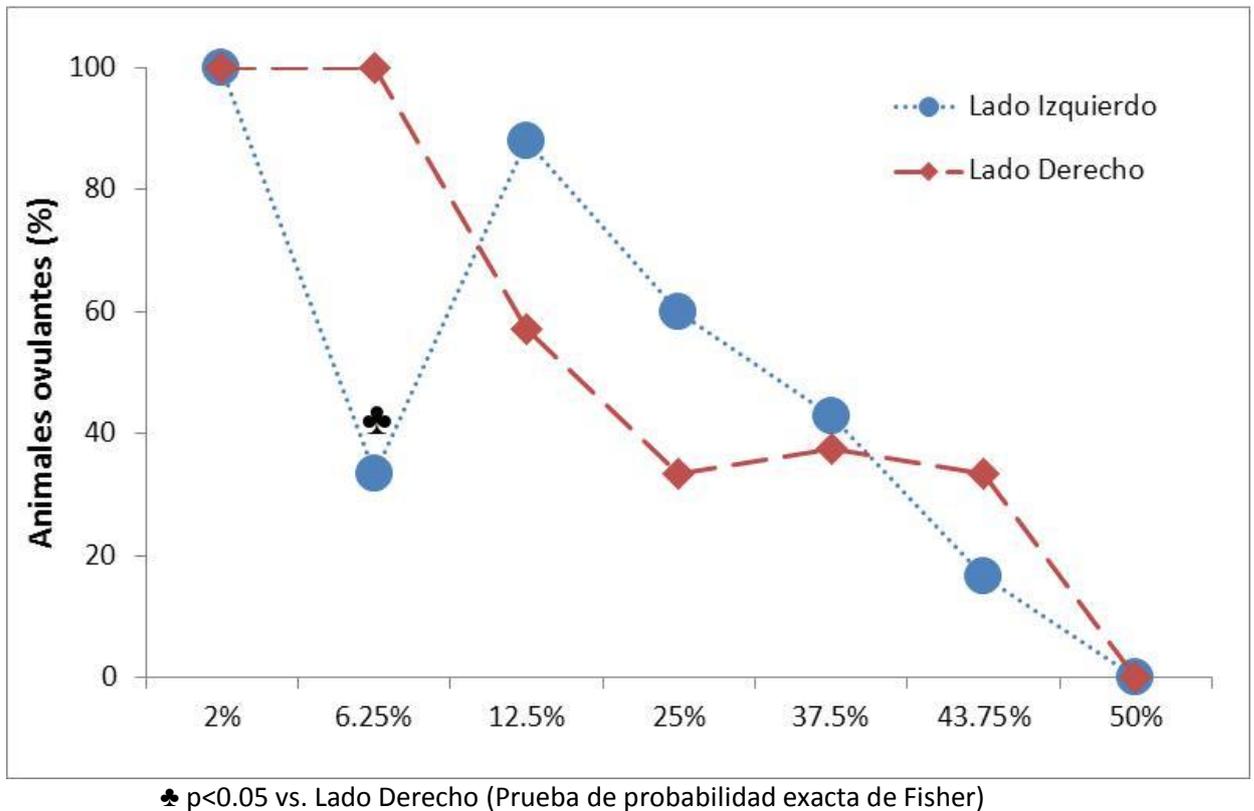
Olvera (2009) mostró que en la mañana del diestro-1, la micro-inyección de etanol al 50% (EtOH-50%) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA bloquea la ovulación espontánea, disminuye la concentración basal y preovulatoria de estradiol y bloquea la secreción preovulatoria de la LH. Las modificaciones provocadas por el EtOH-50% en el lado derecho de POA-AHA no involucran la secreción preovulatoria de la FSH; estos resultados llevó al autor a plantear que la secreción de la FSH estaría regulada por las neuronas GnRHérgicas del lado izquierdo de POA-AHA, ya que el EtOH-50% inhibió la secreción de FSH.

La micro-inyección de EtOH-50% en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA provoca efectos asimétricos sobre la expresión del ARNm del RE $\alpha$ : en el lado izquierdo, el EtOH bloquea la expresión de este mensajero en ambos lados de POA-AHA, mientras que en el lado derecho invierte el patrón de expresión, provocando un retraso de ocho horas en la expresión máxima del ARNm del RE $\beta$  en ambos lados de POA-AHA (Olvera, 2009).

Otro efecto asimétrico del EtOH-50% ocurre sobre la expresión del ARNm de la GnRH: cuando el alcohol se micro-inyecta en el lado izquierdo, se bloquea la expresión de este mensajero hasta la mañana del proestro, en el mismo lado en que se inyectó el etanol, sin cambios en el lado opuesto. Mientras que, la inyección de etanol en el lado derecho invierte el patrón de expresión del ARNm de la GnRH en el mismo lado del tratamiento, en el lado opuesto (el izquierdo) la estimuló (Olvera, 2009).

Con la finalidad de analizar los efectos del alcohol en la ovulación de la rata adulta, se realizó una curva dosis-respuesta, por lo que se micro-inyectó 1  $\mu$ L diferentes soluciones de alcohol (2, 6.5, 12.5, 25, 37.5, 43.75 o 50%) en el día del diestro-1, en el lado izquierdo o en el lado derecho de POA-AHA. El tiempo utilizado para micro-inyectar este volumen de alcohol fue de un minuto. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 4, como se puede observar, los efectos sobre la frecuencia de animales que ovulan en el día del estro esperado, dependen de la concentración de alcohol micro-inyectada. Así mismo, el alcohol a la dosis de 6.25% provoca un efecto asimétrico, ya que la micro-inyección en el lado derecho de POA-AHA disminuye el porcentaje de animales ovulantes, efecto que es opuesto en el lado izquierdo, ya que todos los animales ovulan (Pérez y col., 2011).

Es importante señalar que la micro-inyección de agua en la porción izquierda de POA-AHA no modificó la ovulación, pero en la porción izquierda provocó que sólo el 40% de las ratas micro-inyectadas ovulara en el día del estro esperado.



**Figura 4.** Gráfica de la dosis-respuesta de diferentes concentraciones (2, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 43.75 o 50%) de alcohol o agua sobre la ovulación espontánea de la rata adulta (Tomado de Pérez y col., 2011).

## **Justificación**

Con base en los resultados obtenidos en la curva dosis-respuesta del alcohol en POA-AHA derecha sobre la ovulación, que muestra que la micro-inyección de una solución de 6.25% de alcohol, a las 08:00 h del diestro-1 induce la ovulación en todos los animales tratados, que no habían ovulado por la inyección de agua, en este estudio se decidió analizar los mecanismos neuroendocrinos que generan el bloqueo de la ovulación por el agua inyectada, así como los efectos, mecanismos neuroendocrinos que inducen la ovulación por la micro-inyección del alcohol.

## **Hipótesis**

Dado que la micro-inyección de alcohol al 6.25% en el lado derecho estimula la ovulación cuando se compara con el efecto provocado por el agua, entonces, el ARNm que codifica para la GnRH, los RE alfa y beta y la concentración de hormonas esteroides, serán semejantes a los de un animal intacto, pero diferentes a los de un animal micro-inyectado con agua.

## Objetivos

### *General*

Analizar los efectos de la micro-inyección de agua y del etanol al 6.25% (EtOH) en el lado derecho de POA-AHA, administrados en el día del diestro-1, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y la ovulación.

### *Particulares*

- Analizar los efectos de la micro-inyección de agua y de EtOH en el lado derecho de POA-AHA sobre el número de ovocitos liberados y el peso de los ovarios y útero, a las 09:00 h del estro esperado.
- En la etapa del diestro-1 del ciclo estral de la rata, estudiar el efecto de la micro-inyección de agua o de EtOH en el lado derecho de POA-AHA sobre la concentración sérica de estradiol y progesterona, a las 13:00 h del diestro-2, a las 09:00 y 17:00 h del proestro y a las 09:00 h del estro.
- Cuantificar a las 13:00 h del diestro-2, a las 09:00 y 17:00 h del proestro, la expresión del ARNm de la GnRH y de los receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  en POA-AHA izquierda y derecha de ratas micro-inyectadas con agua o con EtOH en el lado derecho de POA-AHA.
- Analizar la respuesta del reemplazo de la señal hipotalámica (por medio de la inyección de LHRH sintética) en ratas micro-inyectadas con agua en el lado derecho de POA-AHA.
- Analizar la respuesta del reemplazo de la señal ovárica (por medio de la inyección de benzoato de estradiol) en ratas micro-inyectadas con agua en el lado derecho de POA-AHA.

## **Materiales y métodos**

### *Animales*

Se utilizaron ratas hembra adultas (tres meses de edad) de la cepa CIIZV, las cuales fueron mantenidas desde su nacimiento en un periodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad (luz de 05:00 a 19:00 horas), a una temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con libre acceso al agua y alimento. El ciclo estral fue monitoreado diariamente por medio de la toma de frotis vaginales, sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración y no mayores a cuatro meses de edad.

*Experimento 1. Análisis de los efectos de la micro-inyección de agua o alcohol a 6.25% en el lado derecho de POA-AHA, realizada en la mañana del diestro 1.*

### *Anestesia*

A las 7:00 h del día del diestro-1, las ratas se anestesiaron con 25 mg/kg de pentobarbital por vía intra-peritoneal.

### *Micro-inyección*

Una vez anestesiados, los animales se colocaron en el aparato esterotáxico (Modelo 900, David Kopf Instruments, USA), fueron afeitados utilizando jabón antiséptico para deslice de la navaja, se les realizó una incisión en el cuero cabelludo de aproximadamente un centímetro de largo, desde el hueso frontal a la parte media de los parietales. Se procedió a limpiar el área con agua oxigenada hasta visualizar el punto Bregma (punto donde se unen los dos huesos parietales con el frontal). Con base en el Atlas del cerebro de la rata (König y Klippel, 1963), para llegar a la zona de estudio, se utilizaron las coordenadas: AP= -0.4 cm, L= -0.6 cm y V= -0.86 cm. Una vez en el punto cero o Bregma, se procedió a restar el valor correspondiente con el del atlas para las coordenadas en las que la aguja de inyección fue introducida.

Por medio del uso de una fresa acoplada a un roto-motor odontológico (marca DREMEL, modelo 300, Hecho en México), se perforo el cráneo sin dañar las meninges, se bajo la aguja a la coordenada ventral resultante. Una vez introducida la aguja del No. 25, la cual se conectó a una jeringa Hamilton de 50 $\mu\text{L}$ , acoplada a una bomba de micro-inyección automática (CMA400, ByochemicalSystem, USA), se administró, 1 $\mu\text{L}$  de agua estéril o alcohol al 6.25% (1.08 $\mu\text{mol}$ ) durante un minuto. Finalmente

se retiró la aguja, se suturó la herida y se aplicó alcohol yodado sobre la sutura.

#### *Sacrificio y autopsia*

Todos animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación. Se colectó la sangre del tronco, la cual fue centrifugada a 3000 r.p.m. durante 15 minutos; el suero fue separado y almacenado a -20°C hasta la determinación de hormonas.

Los ovarios, los oviductos y el útero fueron extraídos. Con la ayuda de un estereoscopio se revisaron los oviductos en busca de la presencia de ovocitos, los cuales fueron contados. Los ovarios y el útero se pesaron en una balanza de precisión.

#### *Cuantificación de hormonas*

La cuantificación de las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> y progesterona, se realizó por Radio Inmuno Análisis (RIA) mediante el uso de estuches comerciales marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA), que contienen tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (<sup>125</sup>I-Progesterona ó <sup>125</sup>I-Estradiol) y calibradores para la realización de una curva patrón (P<sub>4</sub>: 0, 0.02, 0.1, 0.5, 2, 5, 10, 20 y 40 ng/ml; E<sub>2</sub>: 0, 10, 20, 50, 150, 250, 500 y 900 ng/ml). A cada tubo del estuche se le adicionó 100µL del plasma problema más 1000µL de la hormona marcada. Cada tubo fue agitado por un minuto e incubado a temperatura ambiente por tres horas; finalmente las hormonas fueron cuantificadas con la ayuda de un contador de centello gama, la concentración de la hormona problema fue cuantificada. Los datos de la concentración problema de E<sub>2</sub> y progesterona se expresaron en pg/ml y en ng/ml respectivamente.

#### *Extracción y homogenización de POA-AHA*

Recién decapitado el animal se le extrajo el cerebro removiendo el cráneo con un alicate. Y se colocó boca arriba sobre media caja Petri con papel filtro humedecido en alcohol, con cuidado y con precaución de no dañar los tejidos se removió el quiasma óptico lo cual expuso a POA-AHA e inmediatamente se procedió a extraer POA-AHA tanto del lado izquierdo como del lado derecho, esto fue realizado con 3 cerebros para formar un pool, cada grupo experimental constó de 3 pools que formo un punto.

Se prepararon siete tubos eppendorf con 500  $\mu$ L de trizol (refrigerado a 4°C) y otro con agua estéril, en dos de los tubos fueron colocados todos los lados izquierdos de POA-AHA de un pool con el mismo tratamiento experimental, y en otro tubo se colocaron los lados derechos de ese mismo pool, cada uno de estos tubos representó uno de tres puntos a cuantificar, al final del experimento se trabajó con 3 muestras por cada grupo experimental para cada lado de POA-AHA.

Todos los tubos con muestra de tejido nervioso se homogenizaron en un politrón (Polytron, modelo PT3100, USA), teniendo extremo cuidado de no mover el tubo ya que esta acción produce burbujas y de no superar los 3 segundos, ya que esto podría causar la desnaturalización del ARN, entre cada tubo que se homogenizó, el politrón fue lavado primero con trizol y después con el agua estéril e inmediatamente secado con una gasa.

Después se procedió a separar las fases adicionando 250 $\mu$ L de cloroformo al tubo recién homogeneizado; se agitó e inmediatamente centrifugó a una temperatura de -4°C a 1200 rpm durante 25 minutos, teniendo cuidado de colocar los tubos con la cola hacia el centro de la criocentrífuga (Sigma 3K15). Al finalizar la centrifugación se extrajo aproximadamente 250 $\mu$ L de la fase acuosa resultante (teniendo mucho cuidado de no extraer la fase blanca o rosa) en tubos estériles y correctamente etiquetados. Después de adicionó el mismo volumen de isopropanol (1:1) refrigerado a 4°C; después de realizar este paso, las muestras reposaron de 24 a 72 horas en un refrigerador a 4°C.

#### *Obtención de la pastilla*

Todos los tubos fueron centrifugados a -4°C a 1200 rpm durante 25 minutos, la fase acuosa se decanto en otros tubos y sólo quedo la pastilla. Posteriormente, se colocaron 100  $\mu$ L de alcohol al 80% (20  $\mu$ L de agua estéril + 80 $\mu$ L de alcohol puro) en cada tubo, los cuales fueron centrifugados a -4°C durante 15 minutos a 1200 rpm, colocando los tubos con las colas apuntando al centro del aparato. Los residuos se decantaron en otros tubos y la pastilla fue expuesta. Sobre una gasa estéril se colocaron los tubos abiertos boca abajo y sobre de estos una lámpara que ayudó a la volatilización del alcohol, evitando un secado total. A cada tubo se le colocó 30  $\mu$ L de agua inyectable y fue refrigerado a -70°C.

### Lectura del ADN

Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (BOECO, modelo S-30) a una longitud de onda 260nm; 280nm. Se tomó una alícuota de 2μL de cada muestra diluida con 98μL de agua inyectable. Con las lecturas de absorbancia se procedió a calcular la cantidad de ADN por medio de la siguiente fórmula:

$$\left[ \frac{(\text{Abs a } 260\text{nm})(40\mu\text{g}/\mu\text{L})(A)}{\frac{1000 \mu\text{L}}{B}} \right] 10$$

A=Cantidad en la que se diluyó  
B=Cantidad de la muestra que se diluyó

El resultado de la fórmula fue la cantidad de ADN que se tomó de cada muestra para poder realizar la retro-transcripción (RT) y posteriormente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### RT-PCR

Para la realización del RT, se colocaron 2μg del ARN total, un “mix” para RT y agua estéril en un tubo eppendorff (cuadro 1) cada muestra se colocó en un termociclador de gradientes (marca EppendorfScientificInc, Alemania). Después de la RT a las muestras obtenidas de les agregó un mix de PCR (Cuadro 2), fueron colocadas en un termociclador para la amplificación los genes para la GAPDH<sup>1</sup>, GnRH, REα y REβ a las temperaturas y ciclos que se muestran en el cuadro 3 (Arteaga-López y col., 2005).

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 (Arteaga-López y col., 2005).

<sup>1</sup>La enzima glicolítica, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), es considerada como una enzima involucrada en varios procesos celulares además de la glicolisis. Los cuales incluyen: reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la exportación del ARNm, dinamismo del citoesqueleto, muerte celular, fusión y transporte de membrana. Esta enzima se encuentra en varios compartimentos celulares como en el citoplasma, vesículas, mitocondria y núcleo. Dependiendo del tipo de señales que sean procesadas esta enzima mantiene la homeostasis o puede promover la muerte celular (Tristan y col. 2011).

Reactivo	Concentración	Para c/ muestra
ARN total	2 µg	2 µg
Buffer RT	5x	2 µL
DTT	0.2 mM	1 µL
dATP	10 mM	0.5 µL c/u
dCTP	10 mM	0.5 µL c/u
dGTP	10 mM	0.5 µL c/u
RT M-MLV	100 U	0.5 µL + 0.5 µL H <sub>2</sub> O
Oligo (dT)	0.025 µg	0.5 µL
H <sub>2</sub> O		Aforado a 10 µL

**Cuadro 1.** Reactivos utilizados en la técnica de RT

Reactivo	Concentración	Para c/muestra
Producto de RT		10 µL
Buffer PCR	10x	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2.5	2.5 µL
Taq polimerasa	0.5 µL	0.5 µL
dNTP's	10 mM	0.5 µL c/u
Oligo 1		2.0 µL c/u
Oligo 2		2.0 µL c/u
H <sub>2</sub> O		26 µL

**Cuadro 2.** Reactivos utilizados en la técnica de PCR

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Temperatura (°C)	Ciclos
GnRH	CAA CCC ATA GGA CCA GTG CTG G	CAC TAT GGT CAC CAG CGG GG	53.0	32
RE $\alpha$	TTC ACA CCA AAG CCT CGG G	TGC AGC AGC ATC AGC GGA C	64.2	32
RE $\beta$	TCC CGG CAG CAC CAG TAA C	CCC AGA TGC ATA ATC GCT GC	55	32
GAPDH	GAT TTG GGC GCC TGG TCA CC	CGC TCC TGG AAG ATG CTG ATG	55.1 °C	32

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

Una vez obtenidos los productos de PCR, se corrieron en un gel de agarosa al 2%, preparado con TBE al 1% y teñido con bromuro de etidio, preparado de la siguiente manera: En un matraz erlenmeyer se agregó 1 gr de agarosa, adicionando 50 ml de una solución Buffer TBE 1x que se calentó en el microondas hasta su completa disolución. Cuando la solución de agarosa alcanzó una temperatura de  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ , se agregaron 2.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio. Agitando el recipiente en forma circular, se mezclaron los diferentes componentes, evitando la formación de burbujas en la solución. El gel se vertió lentamente en la cámara de electroforesis por uno de sus extremos y con una punta de micro-pipeta limpia se retiraron las burbujas. Se dejó polimerizar la agarosa.

Para la corrida de las muestras, se llenó el tanque de la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X hasta cubrir el gel. Se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, se graduó el voltaje a 100V y se dejaron correr las muestras.

Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal, modelo Horizon 11-14 (Life Technologies, gibcobl, USA). Las fotografías del gel fueron tomadas con una cámara Kodak EDAS 216. Las bandas de se analizaron por medio del Sistema de Análisis Logic GEL 112.

En todas las amplificaciones se detectaron bandas únicas de 202, 250, 301 y 337 pares de bases (pb) correspondientes a los fragmentos de GAPDH, GnRH, RE $\beta$  y RE $\alpha$  respectivamente.

*Experimento 2. Estudio de la sustitución de la señal hipotalámica y ovárica en ratas con bloqueo de la ovulación por la micro-inyección de agua en el lado derecho de POA-AHA en la mañana del diestro 1.*

A otros dos grupos de animales micro-inyectados con agua del lado derecho de POA-AHA se les sustituyó la señal hipotalámica por medio de la inyección subcutánea de 3.7  $\mu$ g de LHRH sintética (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis Mo.), a las 14:00 h del día del proestro; así como la señal ovárica por la inyección subcutánea de 10  $\mu$ g de benzoato de estradiol (BE) a las 14:00 h del día del diestro-2.

Todos los animales fueron sacrificados el día del estro esperado a las 9:00 h por una sobredosis con éter e inmediatamente se extrajeron los ovarios y se disecaron los oviductos con la finalidad de contar el número de ovocitos liberados, con ayuda de un microscopio estereoscópico.

#### *Análisis estadístico*

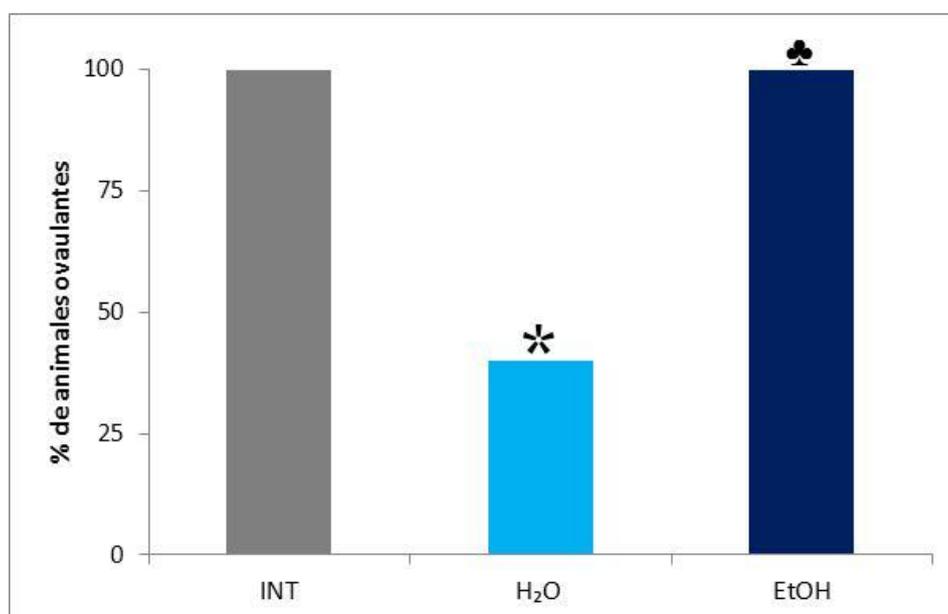
Los resultados del porcentaje de animales ovulantes se analizaron por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher o la de  $J_i^2$ ; el número de ovocitos por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los datos de las concentraciones de las hormonas y de la expresión relativa del ARNm para RE $\alpha$ , RE $\beta$  y GnRH fueron analizadas por ANDEVA (prueba de análisis de las varianzas) seguida por una prueba de Tukey. En el caso de que dos grupos de animales sean comparados se les realizará una prueba "t" de Student o por una prueba de "U" Mann-Whitney. En todos los casos, se consideraron significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue menor o igual a 5%.

## Resultados

*Experimento 1. Análisis de los efectos de la micro-inyección de agua o alcohol 6.25% en el lado derecho de POA-AHA, realizada en la mañana del diestro 1.*

### *Porcentaje de animales ovulantes*

La micro-inyección de agua durante un minuto en el lado derecho de POA-AHA, indujo disminución en el porcentaje de animales ovulantes con respecto a los animales intactos, mientras que la micro-inyección de EtOH no modificó que todos los animales ovularan (Gráfica 1).



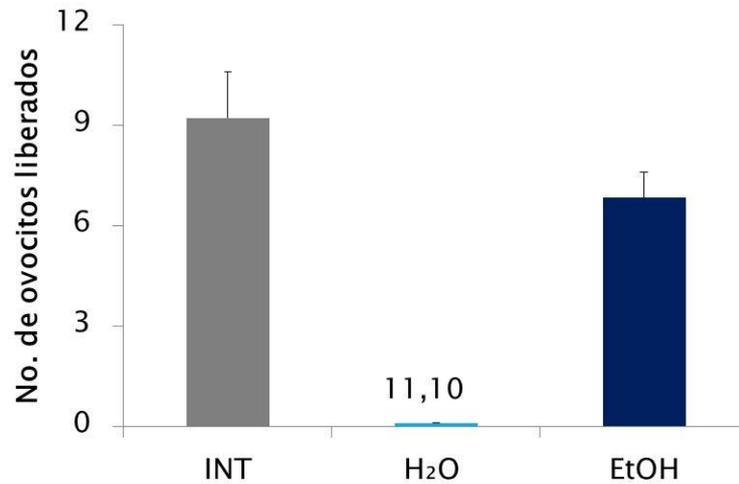
\*  $p < 0.05$  vs. INT, ♣  $p < 0.05$  vs. H<sub>2</sub>O (Prueba de probabilidad exacta de Fisher)

**Gráfica 1.** Porcentaje de animales ovulantes de las ratas intactas (INT), micro-inyectadas con agua (H<sub>2</sub>O) o con alcohol al 6.25% (EtOH) en el lado derecho de POA-AHA.

### *Número de ovocitos liberados*

Con respecto al número de ovocitos liberados, sólo dos animales de los cinco que fueron micro-inyectados con agua ovularon (media= 10.5).

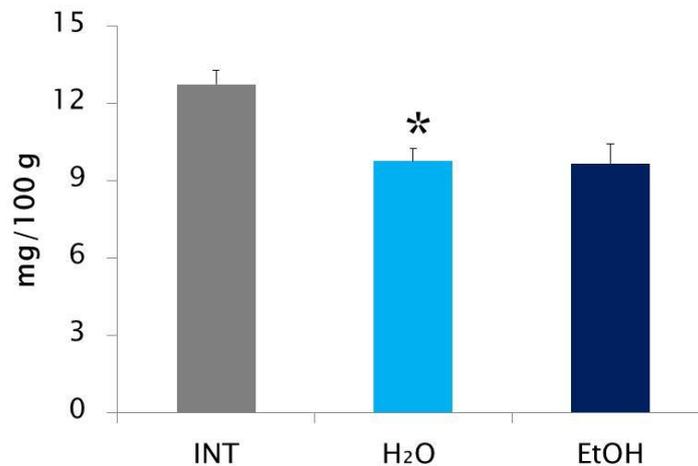
La micro-inyección del EtOH provocó que los animales que ovularon liberaran un número de ovocitos semejante al grupo de grupo de animales intactos (Gráfica 2).



**Gráfica 2.** Media ± e.e.m. del número de ovocitos liberados por los animales intactos (INT) o micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O) o con alcohol a 6.25% (EtOH) en el lado derecho de POA-AHA. Los valores sobre la barra indica el número de ovocitos liberados por los dos animales que ovularon en el día del estro esperado.

## Peso de órganos

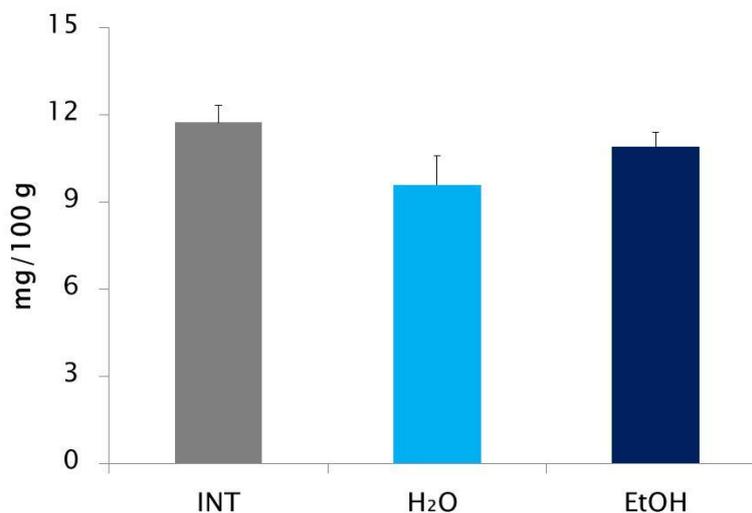
El peso del ovario izquierdo (Gráfica 3) en el día del estro esperado de los animales micro-inyectados del lado derecho de POA-AHA con agua o con EtOH disminuyó en comparación con los animales intactos.



\*  $p < 0.05$  vs. INT (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple)

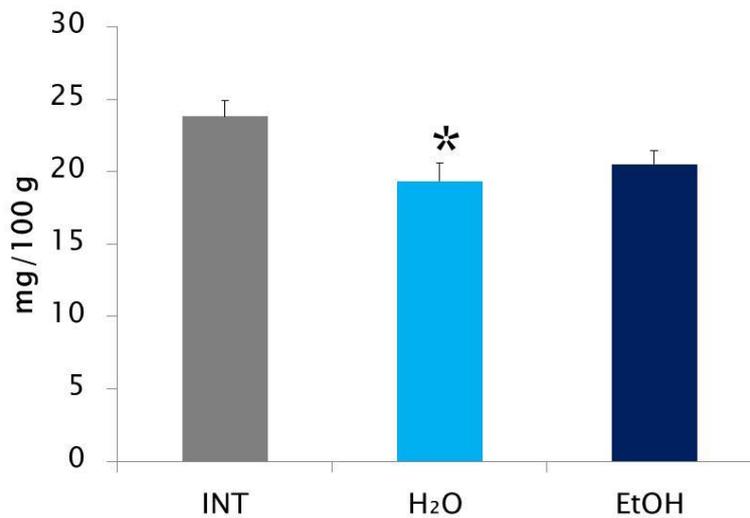
**Gráfica 3.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del ovario izquierdo de las ratas sin tratamiento (INT) o micro-inyectadas con agua (H<sub>2</sub>O) o con alcohol al 6.25% (EtOH) en el lado derecho de POA-AHA.

En comparación con los animales intactos, tanto la micro-inyección de agua como de EtOH no alteró el peso del ovario derecho (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del ovario derecho de los animales intactos (INT) o micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O) o con EtOH al 6.25% (EtOH) en el lado derecho de POA-AHA.

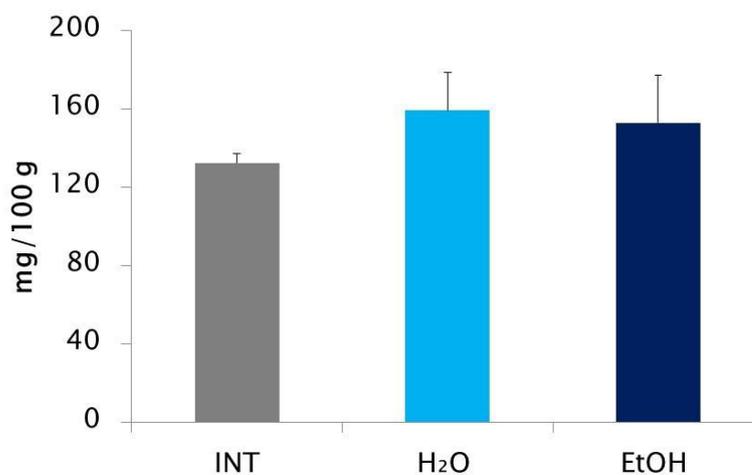
La micro-inyección de H<sub>2</sub>O en el lado derecho de POA-AHA indujo disminución en la masa ovárica (Gráfica 5) en comparación con los animales intactos, mientras que la micro-inyección de EtOH no modificó los efectos provocados por el agua.



\*  $p < 0.05$  vs. INT (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple)

**Gráfica 5.** Media  $\pm$  e.e.m. de la masa ovárica de las ratas sin tratamiento (INT) o micro-inyectadas con agua (H<sub>2</sub>O) o con alcohol al 6.25% (EtOH) en el lado derecho de POA-AHA.

Ninguno de los tratamientos realizados el día del diestro-1 modificó el peso del útero (Gráfica 6).

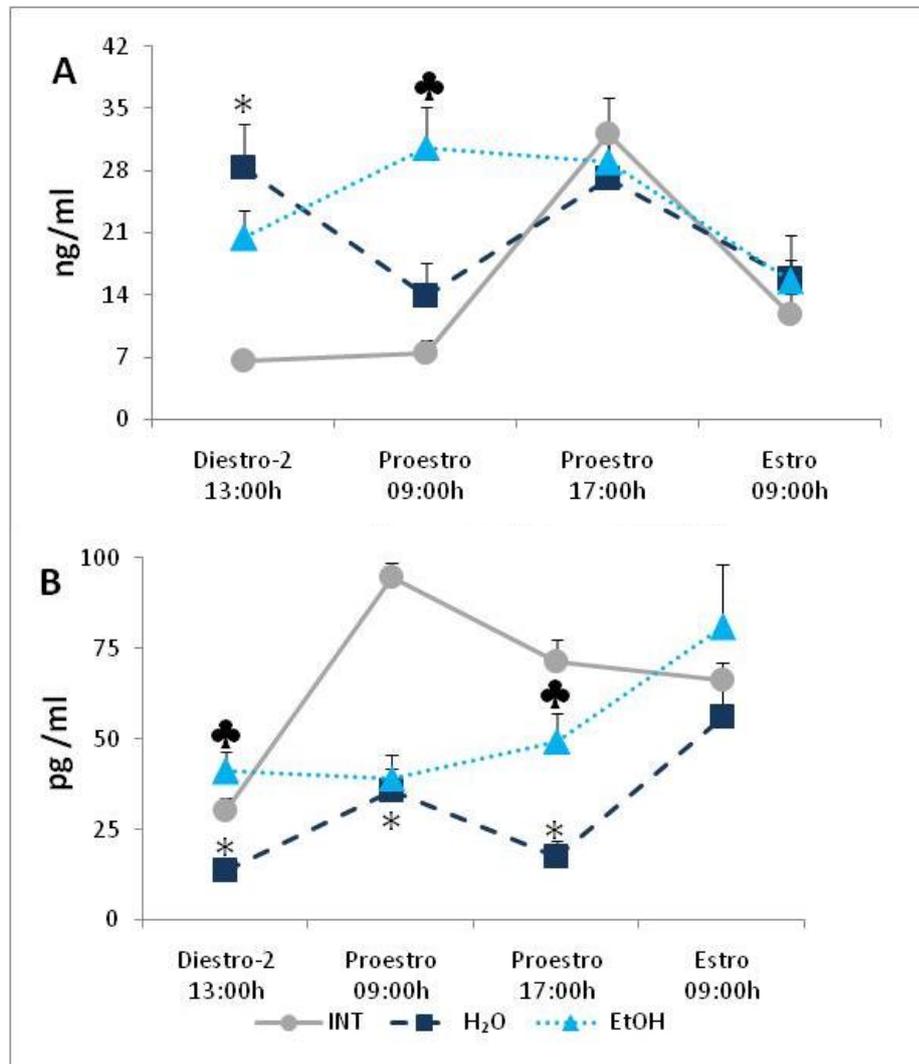


**Gráfica 6.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del útero de los animales intactos (INT) o micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O) o con EtOH al 6.25% (OH6.25%) en POA-AHA en el lado derecho.

### *Concentración de hormonas esteroideas*

Tanto la micro-inyección del agua como la de alcohol aumentan la concentración de progesterona 28 h después (en diestro 2 a las 13:00 h) de la micro-inyección en diestro 1. En los animales a los cuales se les inyectó el alcohol, la concentración de progesterona aumentó desde la mañana del proestro a valores semejantes a los observados en la tarde de este día (Gráfica 7 A).

Después de la micro-inyección del agua en la mañana del diestro-1, la concentración de estradiol (Gráfica 7 B) disminuyó a las 28 (diestro-2 a las 13:00 h), 49 (proestro a las 09:00 h) y 57 (proestro a las 17:00 h) horas, excepto el día del estro esperado a las 9:00 h (73 horas después del tratamiento), momento en que la concentración fue semejante al intacto. Cuando se comparan los efectos de la micro-inyección de alcohol al 6.25% en el lado derecho de POA-AHA con los efectos del vehículo, se observó un aumento en la concentración de esta hormona a las 13:00 h del diestro 2 y a las 17:00 h del proestro, pero no hubo cambios a las 09:00 h del proestro.



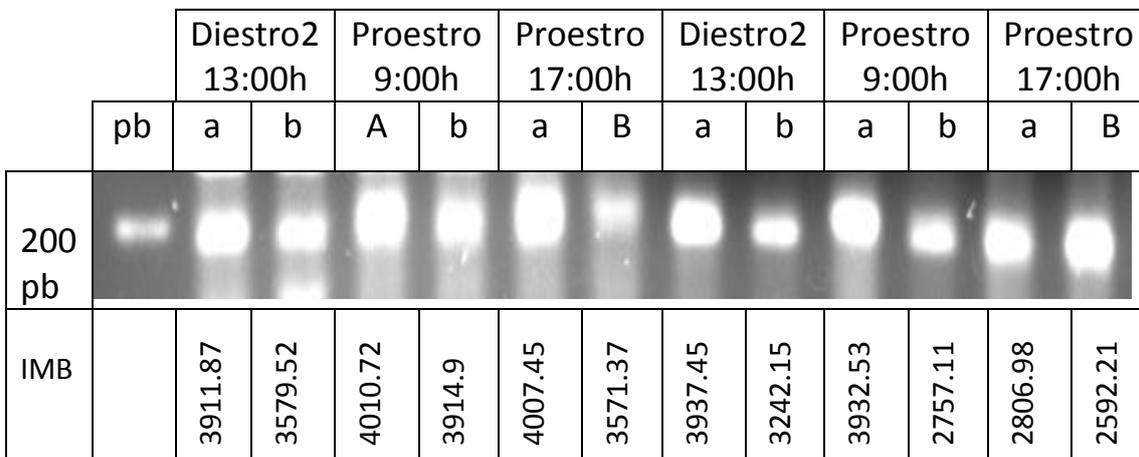
\*p<0.05 vs. INT, ♣p<0.05 vs. H<sub>2</sub>O (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple)

**Gráfica 7.** Concentración de progesterona (A) y de estradiol (B) en diferentes momentos del ciclo estral, de animales intactos (INT) o micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O) o con alcohol al 6.25% (OH6.25%) en el lado derecho de POA-AHA.

## Expresión del ARNm

### GAPDH

La expresión del ARNm para la GAPDH no se ve alterada entre los animales intactos y los animales tratados en el lado derecho de POA-AHA con agua (Figura 5).

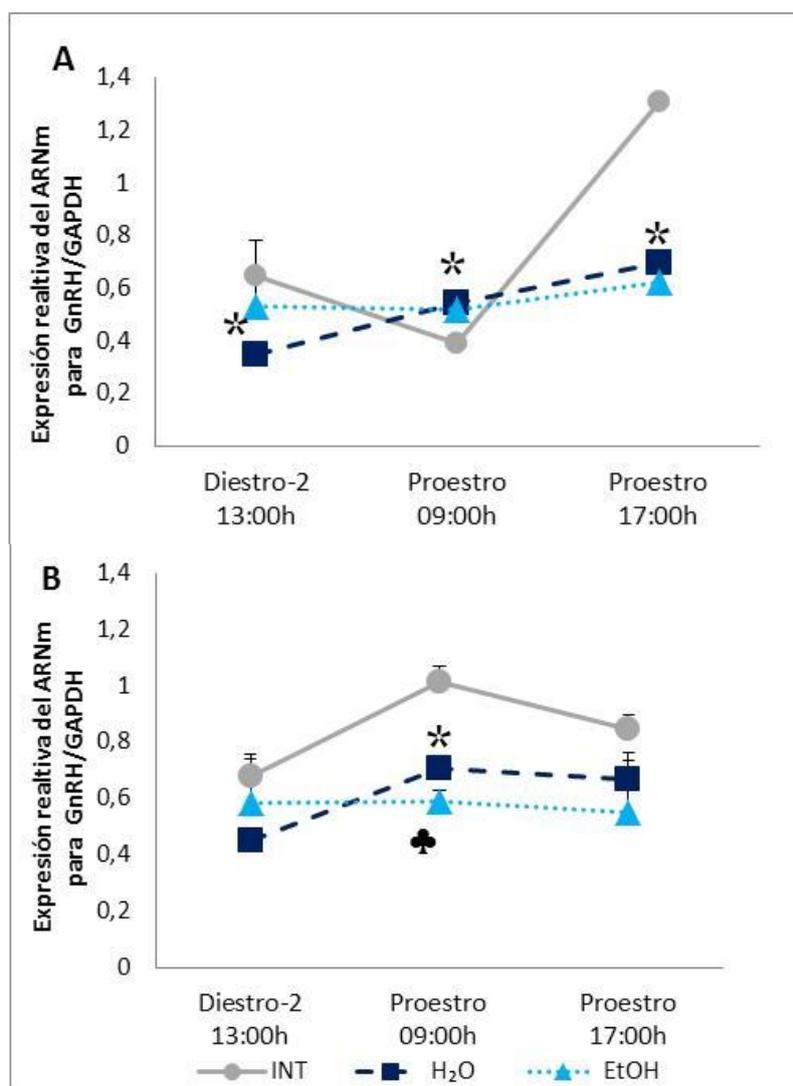


**Figura 5.** Marcador de peso molecular (MPM), intensidad media de la banda (IMB) y expresión del ARNm de la GAPDH en la porción izquierda (a) o derecha (b) de POA-AHA de animales sin tratamiento (lado izquierdo de la tabla) o micro-inyectados con agua (lado derecho de la tabla). Los sacrificios fueron realizados en Diestro-2 a las 13:00h, Proestro a las 9:00h o a las 17:00h para todos los grupos experimentales.

## GnRH

El producto de la amplificación del PCR de la GnRH del lado izquierdo de POA-AHA (Gráfica 8 A), disminuyó a las 29 (D2 13:00 h) y 57 (proestro a las 17:00 h) horas después de la micro-inyección de H<sub>2</sub>O, sin embargo con este mismo tratamiento aumentó a las 49 horas (proestro 9:00 h) después del procedimiento en POA-AHA derecha.

En POA-AHA derecha (Gráfica 8 B) la expresión del ARNm que codifica a la GnRH disminuyó por la micro-inyección tanto de vehículo como de alcohol a las 49 horas (proestro a las 9:00 h) después del tratamiento.



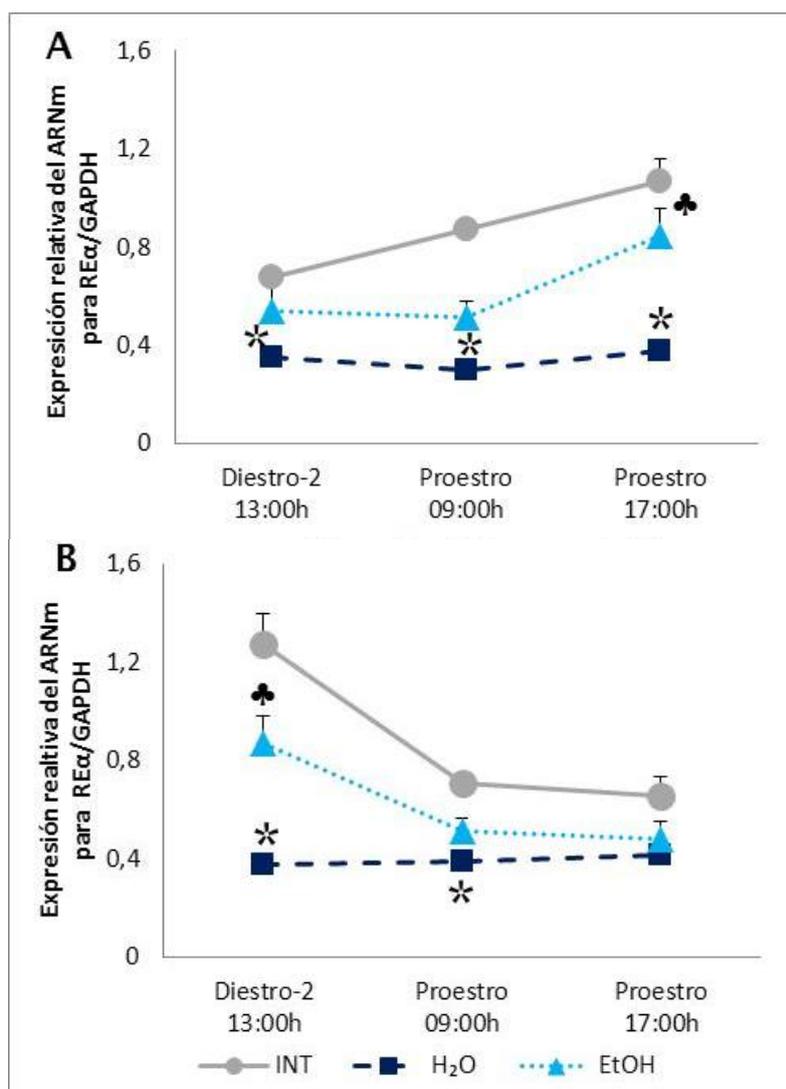
\* p < 0,05 vs. INT, ♣ p < 0,05 vs. H<sub>2</sub>O (Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer)

**Gráfica 8.** Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm de la GnRH en el lado izquierdo (A) o derecho (B) de POA-AHA en diferentes momentos del ciclo estral, de animales intactos (INT) o micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O) o con alcohol al 6.25% (EtOH) en el lado derecho de POA-AHA.

## RE $\alpha$

En POA-AHA izquierda(Gráfica 9 A) durante todas las horas probadas, en comparación con el grupo intacto la micro-inyección de H<sub>2</sub>O disminuyó la expresión relativa del ARNm del RE $\alpha$ ; en comparación con el vehículo, el alcohol incrementó la expresión del ARNm hasta las 57 horas después (proestro 17:00 h) de la micro-inyección.

En POA-AHA derecha (Gráfica 9 B), la expresión disminuyó hasta 49 horas (proestro 9:00 h) después de la micro-inyección de agua, comparado contra intactos, mientras que la expresión aumentó 28 h después de la infusión de EtOH, comparado con los micro-inyectados con agua.



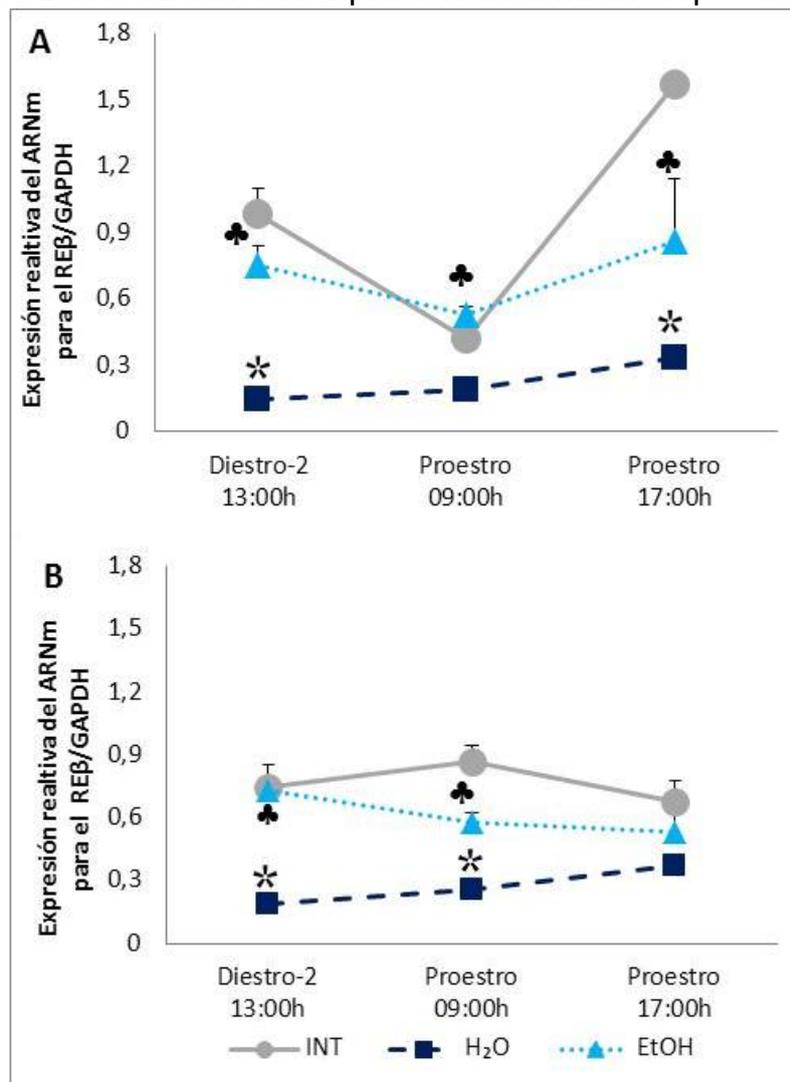
\*  $p < 0.05$  vs. INT, ♣  $p < 0.05$  vs. H<sub>2</sub>O (Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer)

**Gráfica 9.** Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm del RE $\alpha$  en la porción izquierda (A) o derecha (B) de POA-AHA, en diferentes momentos del ciclo estral, de animales intactos (INT), micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O) o alcohol a 6.25% (EtOH) del lado derecho de POA-AHA.

## RE $\beta$

En POA-AHA izquierda (Gráfica 10 A) la expresión del ARNm del RE $\beta$ , disminuyó a las 13:00h del diestro-2 y a las 17:00h del proestro, después del micro-inyección de agua en comparación de los animales intactos; y aumentó en todas las horas después de la infusión de EtOH en comparación con los animales tratados con agua.

En POA-AHA derecha (Gráfica 10 B) con respecto al grupo de animales intactos, después de la micro-inyección de agua la expresión del ARNm del RE $\beta$  disminuyó desde la administración de agua hasta las 9:00 h del proestro, mientras que, en comparación con el vehículo la micro-inyección de EtOH aumentó la expresión en el mismo lapso de tiempo.

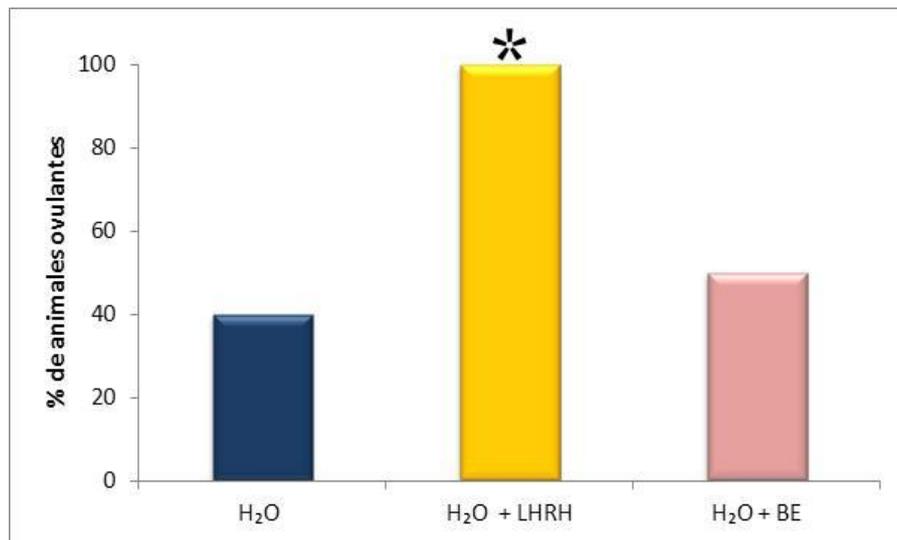


\* p < 0,05 vs. INT, ♣ p < 0,05 vs. H<sub>2</sub>O (Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer)

**Gráfica 10.** Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm del RE $\beta$ , en la porción izquierda (A) o derecha (B) de POA-AHA, en diferentes momentos del ciclo estral, de animales sin tratamiento (INT), micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O) o con alcohol a 6.25% (EtOH) del lado derecho de POA-AHA.

**Experimento 2. Estudio de la sustitución de la señal hipotalámica y ovárica en ratas con bloqueo de la ovulación por la micro-inyección de agua en el lado derecho de POA-AHA en la mañana del diestro 1.**

La sustitución de la señal hipotalámica, mediante la inyección de LHRH, indujo la ovulación en todos los animales micro-inyectados con agua. En cambio, la sustitución de la señal ovárica, por la inyección de BE, no modificó los efectos del agua, es decir, el porcentaje de animales que ovularon fue semejante al grupo sin remplazo hormonal (Gráfica 11).

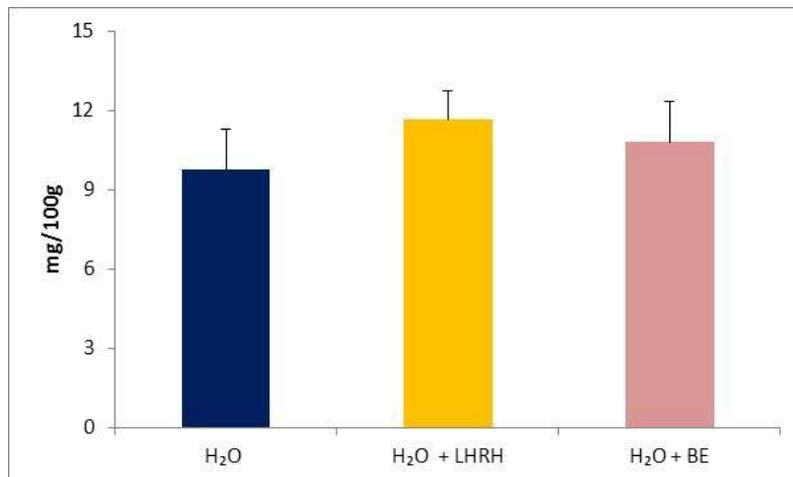


\*  $p < 0.05$  vs. H<sub>2</sub>O (Prueba de probabilidad exacta de Fisher).

**Gráfica 11.** Porcentaje de animales micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O) del lado derecho de POA-AHA, que ovularon como resultado de la administración de LHRH (H<sub>2</sub>O + LHRH) o BE (H<sub>2</sub>O + BE).

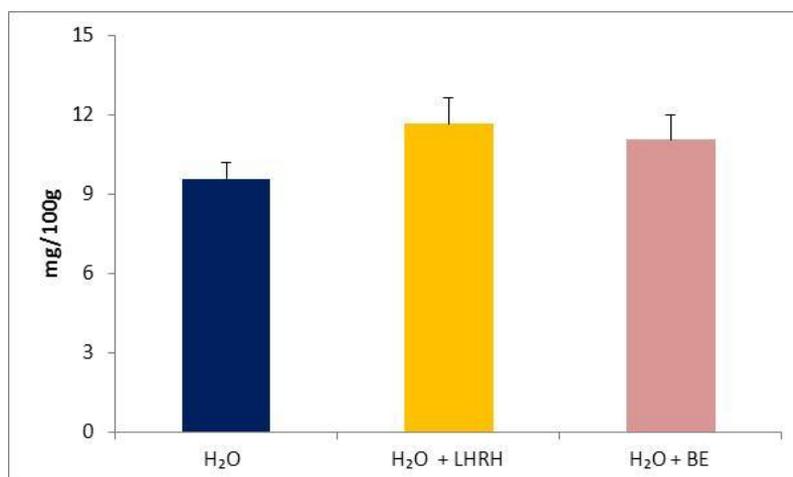
## Peso de órganos

La administración de LHRH o de BE no modificó el peso del ovario izquierdo (Gráfica 12) en comparación con los animales con micro-inyección de agua en POA-AHA sin reemplazo hormonal.

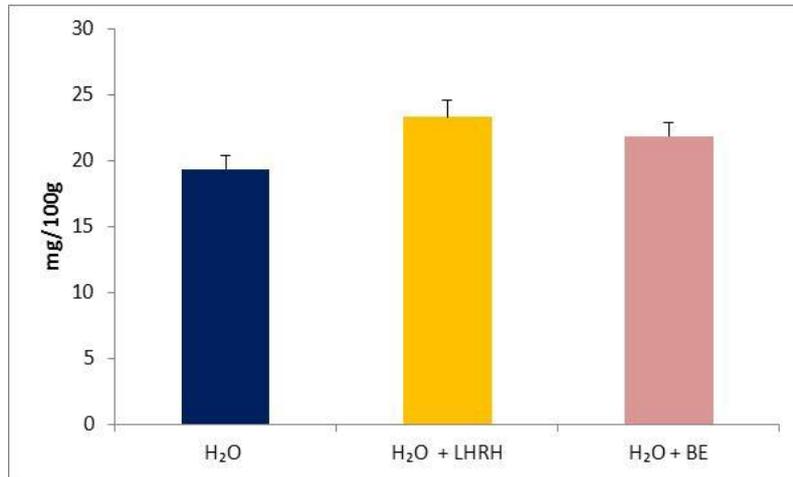


**Gráfica 12.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del ovario izquierdo de animales micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O), micro-inyectadas con agua en lado derecho de POA-AHA más LHRH (H<sub>2</sub>O + LHRH) o BE (H<sub>2</sub>O + BE).

Tampoco se alteró el peso del ovario derecho (Gráfica 13) y en consecuencia la masa ovárica (Gráfica 14).

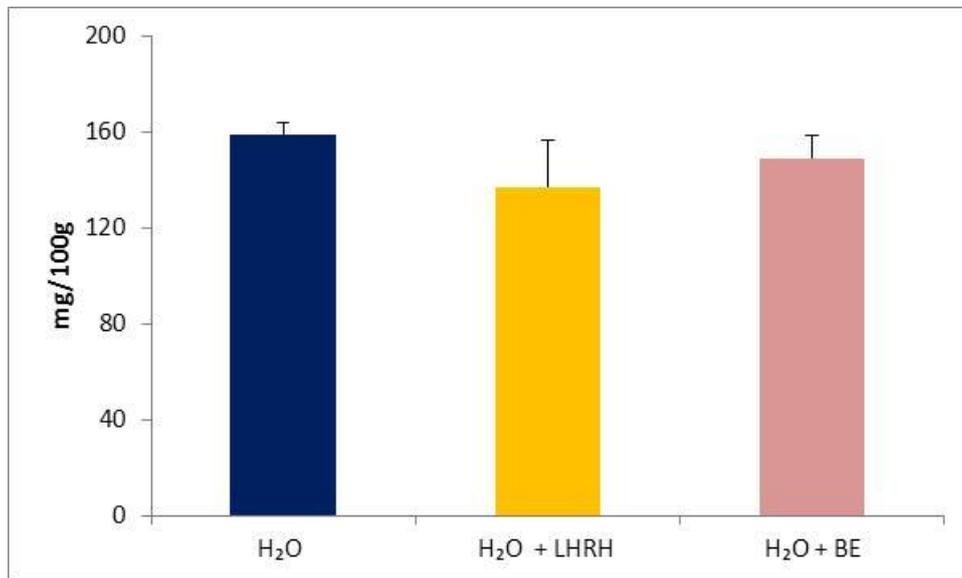


**Gráfica 13.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del ovario derecho de animales micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O), micro-inyectadas con H<sub>2</sub>O en lado derecho de POA-AHA más LHRH (H<sub>2</sub>O + LHRH) o BE (H<sub>2</sub>O + BE).



**Gráfica 14.** Media  $\pm$  e.e.m. de la masa ovárica de animales micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O), micro-inyectadas con H<sub>2</sub>O en lado derecho de POA-AHA más LHRH (H<sub>2</sub>O + LHRH) o BE (H<sub>2</sub>O + BE).

El peso del útero (Gráfica 15) no se vio alterado por ninguno de los tratamientos realizados.



**Gráfica 15.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del útero de animales micro-inyectados con agua (H<sub>2</sub>O), micro-inyectadas con H<sub>2</sub>O en lado derecho de POA-AHA mas LHRH (H<sub>2</sub>O + LHRH) o BE (H<sub>2</sub>O + BE).

## Análisis de resultados

### *Análisis de los efectos del agua sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario*

La micro-inyección de agua en el lado derecho de POA-AHA altera una o varias señales que a esta hora del día, y en esta fase del ciclo son imprescindibles para que el animal ovule en el día del estro.

La micro-inyección de H<sub>2</sub>O del lado derecho de POA-AHA disminuye la concentración de E<sub>2</sub> hasta la tarde del proestro, esta disminución podría ser una de las razones que provocaron la falta de ovulación.

Sin embargo, cuando se sustituyó la señal ovárica, por la inyección subcutánea de BE, no se restableció la ovulación. Además, la expresión del ARNm de ambos receptores a estrógenos disminuyó en las dos porciones de POA-AHA, lo que nos lleva a sugerir que la traducción del ARNm de los dos tipos de RE no está llevándose a cabo, por lo que no habrían receptores en los que el BE pueda unirse e inducir el efecto “feedback” estimulante que culmina con la ovulación.

Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la sustitución de la señal hipotalámica restablece la ovulación en todos los animales. De tal manera que la falta de ovulación por la micro-inyección de agua en el lado derecho de POA-AHA resulta del bloqueo de la secreción preovulatoria de LHRH resultado de la ausencia del “feedback” estimulante del estradiol al unirse a sus receptores.

Los cambios en la expresión del ARNm de la GnRH de los animales micro-inyectados con agua no son drásticos, por lo que sugerimos que la síntesis del decapeptido no está comprometida, sino su liberación, ya que cuando se administró LHRH-sintética, todos los animales micro-inyectados con agua ovularon.

El líquido cefalorraquídeo que rodea a las neuronas está separado del plasma que corre por los vasos por la barrera hemato-encefálica, su osmolaridad es mayor que la del plasma por lo que las concentraciones de Cl<sup>-</sup> y Mg<sup>++</sup> son mayores, mientras que las de K<sup>+</sup>, bicarbonato, fosfato, glucosa y proteínas son menores (Robertson, 2010). La homeostasis del agua en el líquido cefalorraquídeo puede ser alterada por una acumulación anormal de fluido, lo que resulta en el aumento del

volumen del líquido intra-cerebral, esta alteración es conocida como edema cerebral (Kimberleg, 2004). Entonces, el agua del lado derecho posiblemente cambia el ambiente osmolar, induce un edema cerebral, lo que se refleja en un cambio en la respuesta de la neurona GnRHérgica a las diferentes señales que recibe en ese momento.

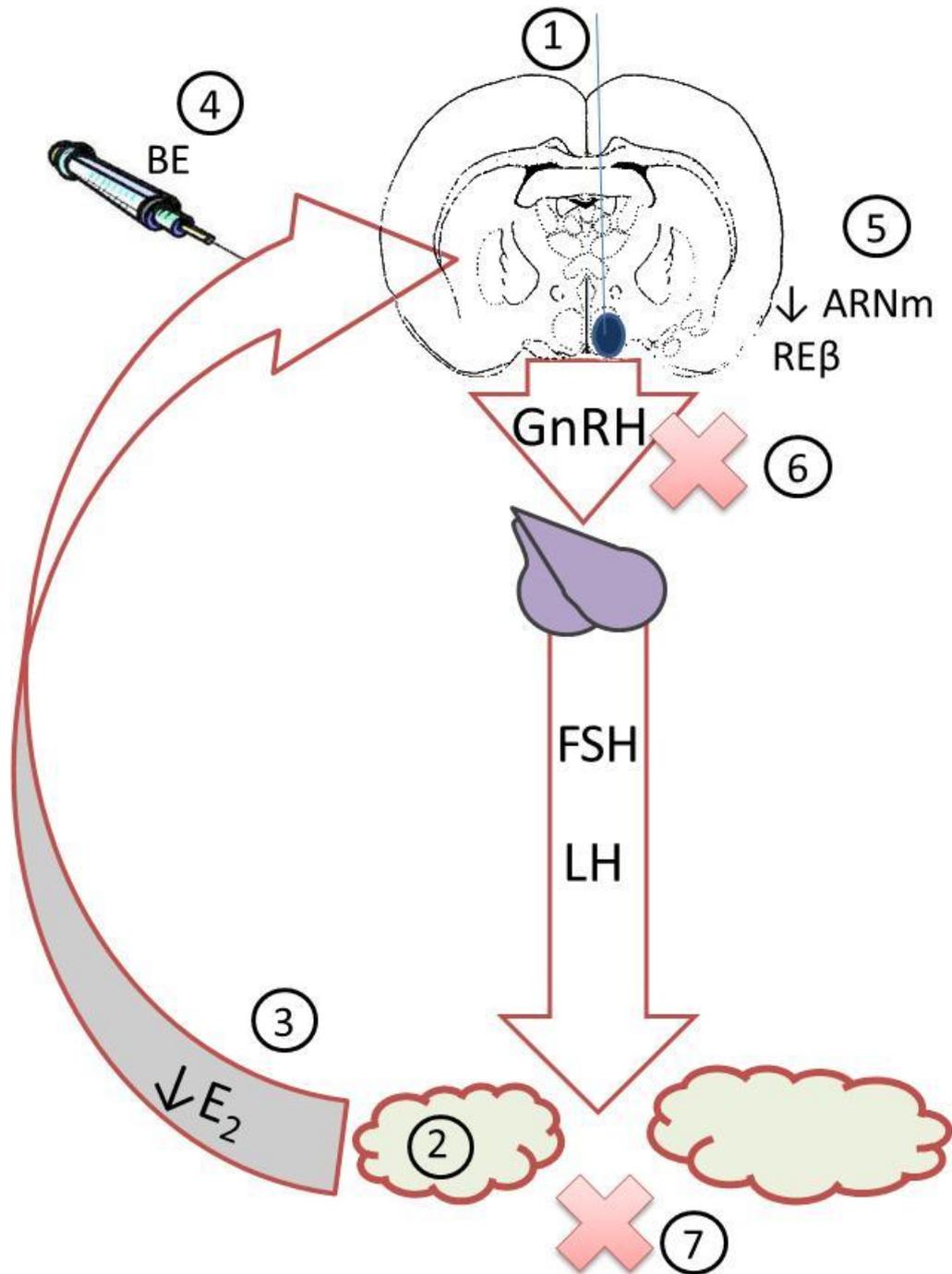
Sánchez y col. (1996), mostraron por medio de la actividad electroencefalo-gráfica en cada lado de POA-AHA, que en la cepa de ratas CIIZ-V el 57% son diestras y el 43% restante son zurdas. Si consideramos el porcentaje de animales que ovulan después de la micro-inyección con agua del lado derecho de POA-AHA, los animales que no ovularon (60%) serían diestros, mientras que el 40% restante serían cerebralmente zurdos, de tal forma que en los animales que ovularon, los mecanismos que culminan con la liberación de preovulatoria de la GnRH no fueron afectados porque se localizarían en el lado izquierdo de POA-AHA.

El aumento en la concentración de progesterona 28 h después de la micro-inyección de agua, puede estar asociada al estrés causado por la cirugía, por el aumento del volumen en el líquido cefalorraquídeo, cambio en la osmolaridad de éste ó un efecto sinérgico de todos los factores.

Everett (1948) demostró por medio de la inyección de progesterona en ratas de cuatro o cinco días de ciclo, que el momento de la ovulación se puede desplazar en función del día y la hora en se administre 1 mg de progesterona. Si la administración de la hormona se realiza en el diestro-1 o en el diestro-2, la ovulación se retrasa 24h. Por lo que el aumento en la concentración de progesterona resultado de la micro-inyección de agua, sería otro de los mecanismos que provocan el descenso del porcentaje de animales ovulantes.

El efecto inhibitorio de la micro-inyección de agua sobre el peso del ovario izquierdo (efecto contralateral) y la disminución de  $E_2$  hasta la mañana del estro posiblemente se deba a que los folículos sean atrésicos o que menos folículos hayan crecido. Se ha mostrado que una alteración en la relación andrógenos/estrógenos promueve la atresia folicular, es decir a mayor concentración de andrógenos en el licor folicular, mayor índice de atresia (Freeman, 2006; Oliver y col., 2006; Van Voorhis, 2006).

Los efectos del agua sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario son resumidos en la figura 6.



**Figura 6.** Después de la micro-inyección de agua en POA-AHA derecha (1), ocurre la reducción de la masa del ovario izquierdo (2), esta reducción disminuye la concentración de estradiol circulante (3), el remplazo con benzoato de estradiol (4) no estimula la ovulación, ya que la expresión del ARNm del RE $\beta$  disminuyó (5), por lo que no hay liberación preovulatoria de GnRH (6), lo que inhibe la ovulación.

### *Análisis de los efectos del EtOH sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario*

A pesar que el EtOH (administración intra-cerebro-ventricular) estimula al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Lee y col., 2004), se ha demostrado que la progesterona de origen adrenal, estimulada por alcohol, no es responsable del bloqueo de la secreción preovulatoria de LHRH (Ogilvie y Rivier, 1997); por lo que deducimos que, el aumento en la concentración de progesterona de origen adrenal hasta 49h después de la micro-inyección de EtOH no está involucrada en los mecanismos que culminan con la ovulación.

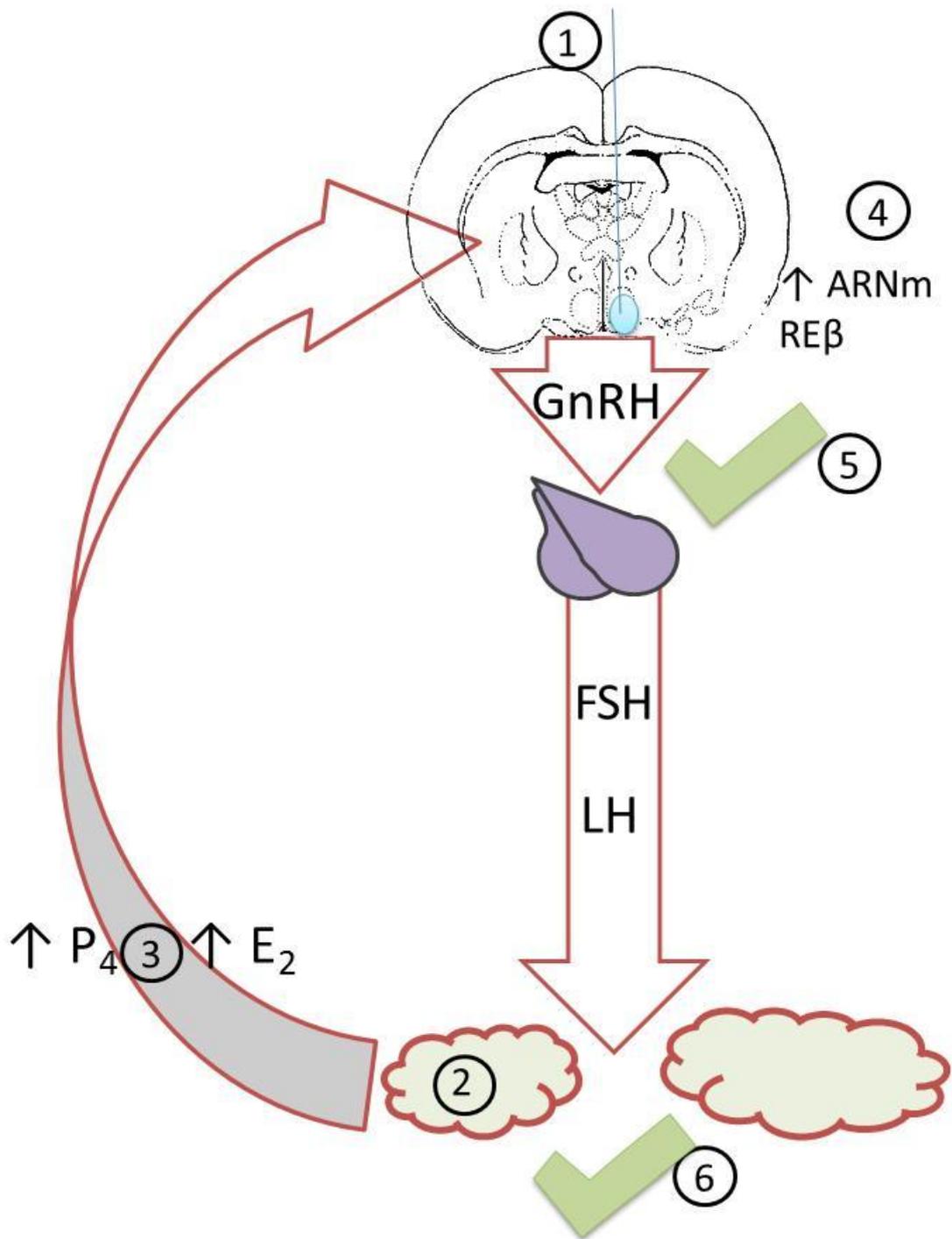
El efecto inhibitorio del alcohol en la secreción preovulatoria de  $E_2$ , asociado al aumento en la concentración sérica de progesterona, implica una alteración en la esteroidogénesis ovárica (Freeman, 2006).

La expresión del ARNm para la GnRH entre los animales tratados con la micro-inyección de alcohol y los animales tratados con la micro-inyección de agua es semejante por lo que podemos deducir que la traducción se lleva a cabo en ambos grupos pero con la diferencia que en el grupo micro-inyectado con alcohol la GnRH es liberada, esto lo podemos deducir porque la expresión el ARNm para ambos RE se ve estimulada en los animales micro-inyectados con EtOH. Artega y col. (2003) observaron que en diestro 2 a las 13:00 h existe una expresión máxima del ARNm para el RE $\beta$ , este "pico" no se ve alterado por nuestro tratamiento con alcohol pero es inhibido por la micro-inyección de agua, lo cual nos lleva a pensar que este pico es el que está involucrado en la expresión de la proteína, que al unirse con el estradiol circulante, ejerce un "feedback" positivo, el cual estimula la liberación preovulatoria de la GnRH, ya que este receptor se expresa en la neurona GnRH (Herbison, 2006).

Los efectos provocados por la micro-inyección de alcohol, sería el resultado de sus efectos sobre las membranas celulares de las neuronas, ya sea alterando la fluidez de las membranas que afectarían directamente el funcionamiento de las proteínas como enzimas o canales; produciendo una deshidratación de las membranas o interactuando directamente con las proteínas de la membrana (Elvir, 1993). Esta o estas interacciones determinarían la forma de secreción de la GnRH y en consecuencia la ovulación.

Se ha mostrado que la oxidación del etanol también se lleva a cabo en el cerebro (Zimatkin y Bubin, 2007) formando principalmente acetaldehído, metabolito altamente reactivo y es responsable de algunos efectos perjudiciales en la neurotransmisión de las neuronas dopaminérgicas, colinérgicas, serotoninérgicas y GABAérgicas (Kuriyama y col., 1987; Han y Dryhurst, 1996; Foddai y col., 2004), por lo que no se descarta que los efectos observados sean causados por el acetaldehído.

Los efectos del alcohol al 6.25% sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario son resumidos en la figura 7.



**Figura 7.** Después de la micro-inyección con 6.25% de alcohol en el lado derecho de POA-AHA (1), se observa una reducción en masa del ovario izquierdo (2), junto con un aumento en la concentración sérica de estradiol (3) y de progesterona (4), producto del estrés, el estradiol circulante se une al REβ en POA-AHA, ya que la expresión del ARNm de este receptor es estimulado por el alcohol (5), la unión del estradiol a su receptor induce la liberación de GnRH (6) y por lo tanto la ovulación (7).

## Conclusiones

- ✓ En diestro-1 la micro-inyección de alcohol induce la ovulación al incrementar la expresión del ARNm de los receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  y la secreción de estradiol eventos que son inhibidos por la micro-inyección de agua.
- ✓ El reemplazo de la señal ovárica (con benzoato de estradiol) no restableció la ovulación en los animales micro-inyectados con agua.
- ✓ La falta de la ovulación por la micro-inyección de agua es el resultado de ausencia de la secreción preovulatoria de GnRH ya que el reemplazo de la señal hipotalámica (por medio de LHRH) induce la ovulación de los animales tratados con agua.

## Bibliografía

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

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

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

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

Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, Calisi R, Perfito N, Kriegsfeld LJ, Wingfields, Tutsui K. (2009). Gonadotrophin-Inhibitory Hormone: A Multifunctional Neuropeptide. *Journal of Neuroendocrinology* 21: 276-281.

Bousfield GR. (1998). LH (Luteinizing Hormone). En: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 2. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. 1034-1054.

Burden HW. (1978). Ovarian Innervation. En: The vertebrate ovary comparative biology. Jones (Eds.). Plenum Press. NY. 615-628.

Byers M, Kuiper GG, Gustafson JA, Park-Sarge OK. (1997). Estrogen receptor  $\beta$  ARNm Expression in the Rat Ovary: Down-Regulation by Gonadotropins. *Molecular Endocrinology*. 11: 172-182.

Cambell RE, Gaidamaka G, Han S, Herbison AE. (2009). Dendro-dendritic binding and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *PNAS*. Vol. 106. No. 26: 10835-10840.

Conn M, Jennes L, Janovic JA. (1998) GnRH. En: Encyclopedia of Reproduction Vol. 2, SCS Knobil E, Neil JD. Eds. Academia press. USA. 464-466.

Cruz ME, Morán JL, Jaramillo LA, Domínguez R. (1990). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. Brain Research Bulletin. 24(6): 739-742.

Cruz ME. Jaramillo LP, Domínguez R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. J. Endocrinol. 123: 437-439.

Cruz, ME, Morán, JL, Jaramillo LP, Domínguez, R. (1990). Differential effects of unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rat. Journal of Endocrinology. 124: 37- 41.

Curtis H, Barnes N. (2007) Biología. 6ta Ed. Panamericana. México. 1323, 1327-1328.

DegenhardtL, ChiuW, SampsonN, KesslerRC, AnthonyJC, AngermeyerM, BruffaertsR, GirolamoG, GurejeO, HuangY, KaramA, KostyuchenkoS, LepineJP, Medina MoraME, NeumarkY, OrmelJH, Pinto-MezaA, Posada-VillaJ, SteinDJ, TakeshimaT, WellsJE. (2008). Toward a Global View of Alcohol, Tobacco, Cannabis, and Cocaine Use: FindingsfromtheWHO World Mental HealthSurveys. PLoS Medicine.Vol. 5.No. 7: 1053-1067.

Elvir JR. (1993). Efecto del Etanol sobre las Membranas Biológicas. Revista Medica Hondureña. Vol. 61.20-24.

Everett JW. (1948). Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. Control of the estrous cycle. Vol. 43. 389-405.

Fisher SJ, Lee J, Swaan PW, Eddington ND. (2008). Evaluation of the effect of ethanol's toxic metabolite acetaldehyde on the gastrointestinal oligopeptide transporter, PEPT1: In vitro and in vivo studies. Alcohol Clin. Exp. Res. 162-170.

Foddai M, Dosia G, Spiga S, Diana M. (2004). Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology* 29: 530-536.

Freeman M. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In Knobil and Neill's *Physiology of reproduction*, 3<sup>rd</sup> Ed. Edited by Jimmy D. Neill Elsevier. 2327-2330.

Fukuda M, Yamanochi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy. *NeurosciLett*. 51. 367-370.

Gerendai I, HalászB. (1997). Neuroendocrine Asymmetry. *Frontiers in neuroendocrinology*. Vol. 18, Article No. FN970154. 354-381.

Gerendai I, Rotsztejn W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *NeurosciLett* 9: 333-336.

Gerendai I. (1986). Laterality in the Neuroendocrine Systems. En: *Duality and unity of the brain. Unified functioning and specialization of the hemispheres*. Ottoson, D. (Ed.), *Proceedings of an International Symposium held at The Wenner Green Center, Stockholm*.

Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction*. 3<sup>th</sup> Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Raven Press USA. 571-627.

Guyton A, Hall J. (2001) *Tratado de fisiología médica* 10<sup>ma</sup> Ed. McGraw Hill Interamericana. México. 1018-1019.

Han QP, Dryhurst G. (1996). Influence of glutathione on oxidation of 1-methyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline: chemistry of potential relevance to addictive and neurodegenerative consequences of ethanol use. *J. Med. Chem.* 39: 1494-1508.

Herbison AE. (2006). Physiology of Gonadotropin-Releasing-Hormone Neural Network. En: *The physiology of reproduction*. 3<sup>th</sup> Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Raven Press USA. 1415-1482.

Hiney JK, Sower SA, Yu WH, McCann SM, Dees WL. (2002). Gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic-hypothalamic region of the rat contain lamprey gonadotropin-releasing hormone III, mammalian luteinizing hormone-releasing hormone, or both peptides. PNAS Vol. 99. No.4: 2386-2391.

Hinshelwood M. (1999). Steroidogenesis, overview. En: Encyclopedia of reproduction. 3<sup>th</sup> Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. 644-653.

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

Karinch AM, Martin JH, Vary TC. (2008). Acute and chronic ethanol consumption differentially impact pathways limiting hepatic protein synthesis. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 295-305.

Kimberleg HK. (2004). Water homeostasis in the brain: basic concepts. Neuroscience 129. 851-860.

König JFR, Klippel RA. (1963). The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. 162.

Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukeba K, Tsutsumi K, Silver R. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. PNAS. Vol. 103. No. 7: 2410-2415.

Kuriyama K, Ohkuma S, Taguchi J, Hashimoto T. (1987). Alcohol, acetaldehyde and salsolinol-induced alterations in function and metabolism of cerebral GABAergic and cholinergic neurons: possible involvements in alcohol dependence and withdrawal. Prog Clin Biol Res. 241: 271-282.

LaPaglia N, Steiner J, Kirsteins L, Emanuele MA, Emanuele N. (1997) The impact of acute ethanol on reproductive hormone synthesis, processing, and secretion in female rats at proestrous. *Alcoholism: clinical and experimental research*. Vol. 2. No. 9: 1567-1572.

Lawrence Jr. IE, Burden HW. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The anatomical record*. 196: 51-59.

Lee S, Selvage D, Hansen K, Rivier C. (2004). Site of action of acute alcohol administration in Stimulating the rat Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: comparison between the effect of systemic and intracerebroventricular injection of this drug on Pituitary and Hypothalamic Responses. *Endocrinology*. 145 (10): 4470-4479.

Morán JL, Cruz ME, Domínguez R. (1994). Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic and anterior hypothalamic area performed on each day of the oestrus cycle of adult rat. *Bain Res Bull*. 33: 663-668.

Nance DM, Bhargava M, Myatt GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Bain Res. Bull.*13: 651-655.

Nance DM, Morger WH. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemi-castration. *Bain Res. Bull*. 8: 299-302.

Norden EJ, Yahr P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science* 218: 391-393.

Ogilvie KM, Rivier C. (1997). Effect of Alcohol on the Proestrous surge of Luteinizing Hormone (LH) and the Activation of LH-Releasing Hormone (LHRH) Neurons in the Female Rat. *The Journal of Neuroscience*. 17 (7): 2595-2604.

Oliver RH, Chen GD, Yeh J. (2006). Follicular Atresia. En: *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 3. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. 373-375.

Olvera E. (2009). Efecto de la microinyección del alcohol en POA-AHA, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata adulta. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.

Pérez M, Min-Poblete I, Olvera E, Cruz ME, Domínguez R. (2011). Efecto de la micro-inyección de diferentes concentraciones de alcohol en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre la ovulación de la rata adulta. LIV Congreso de Nacional de Ciencias Fisiológicas, 10 al 14 de septiembre. León, Guanajuato.

Pettersson K, Gustafsson J. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annual Reviews Physiology* 63: 165-192.

Prieto B, Velázquez M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. Revisión Facultad de Medicina UNAM Vol.45. No.6: 252-257.

Reichert LE. (1998). FSH (Follicle-Stimulating-Hormone). En: *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 2. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. 418-422.

Rettori V, McCann SM. (1997). The mechanism of action of alcohol to 53preóptic gonadotropin. *Molecular Psychiatry*. 2: 350-354.

Rivier C. (1999). Alcohol rapidly lowers plasma testosterone levels in the rat: Evidence that a neural brain-gonadal pathway may be important for decreased testicular responsiveness to gonadotropin. *Alcoholism: Clinical and experimental research*. Vol. 23. No.1: 38-45.

Robertson DS. (2010). The Physical Chemistry of Brain and Neural Cell Membranes: An Overview. *Neurochemistry Res*. 35: 681-687.

Sánchez MA, López-García JC, Cruz ME, Tapia R, Domínguez R. (1994). Asymmetrical changes on the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrus cycle of the rat. *Neuroreport*. 5: 433-434.

Sánchez MA, Manjarrez ME, Cruz ME, Alvarado R, Domínguez R. (1996). EEG asymmetry in the preoptic-anterior area related with the body postural position in rats. *Med. Sci. Res*. 24: 655-656.

Sandhu S, Cooke P, Diamond MC. (1986). Rat cerebral cortical estrogen receptors: male-female, right-left. *Exp Neurol.* 92: 186-196.

Schwartz NB. (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. En: *Neuroendocrinology in Physiology and medicine*. PM Conn y Mefreema (Eds.). RavenPress. USA. 135-145.

Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. (2010). The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. *Cellular Signalling* 23. 317-323.

Van Voorhis BJ. (2006). Follicular Development. En: *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 3. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. 376-375.

VanDeMark KL, Guizzetti M, Giordano G, Costa LG. (2009). Ethanol inhibits muscarinic receptor-induced axonal growth in the rat hippocampal neurons. *Alcoholism: Clinical and experimental research*. Vol. 33. No.11: 1945-1955.

Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, GröneHermann-Josef, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez K, Schütz 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.

Yang AL, Vadhavkar S, Singh G, Omary M. (2008). Epidemiology of alcohol-related liver and pancreatic disease in the United States. *Arch. Intern.* 649-656.

Yao HH, Bahr MB. (1998). Ovary, Overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 3. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. 590-597.

Zimatkin SM, Bubin AL. (2007). Ethanol oxidation in the living brain. *Alcohol & Alcoholism*. Vol. 42. No. 6: 529-532.