



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**TÍTULO DEL PROYECTO**

**“ESTUDIO DEL EFECTO ASIMÉTRICO DEL ALCOHOL EN LA SECRECIÓN DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO Y SU VINCULACIÓN CON EL RECEPTOR A ESTRÓGENOS ALFA. LA RATA COMO MODELO DE ESTUDIO”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

**ESTEBAN OLVERA JUÁREZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN.  
FES. ZARAGOZA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO.  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.  
DR. JUAN CUAUHTÉMOC DÍAZ ZAGOYA.  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**CIUDAD DE MÉXICO. FEBRERO, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de abril del 2014, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** del alumno, **OLVERA JUÁREZ ESTEBAN** con número de cuenta **95038522** con la tesis titulada "ESTUDIO DEL EFECTO ASIMÉTRICO DEL ALCOHOL EN LA SECRECIÓN DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO Y SU VINCULACIÓN CON EL RECEPTOR A ESTRÓGENOS ALFA. LA RATA COMO MODELO DE ESTUDIO", bajo la dirección de la Tutora Principal, **DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN**:

Presidente: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ  
Vocal: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
Secretario: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO  
Suplente: DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA  
Suplente: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de enero de 2017.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

# Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas y a la UNAM por las facilidades para la realización de esta tesis. La grandeza de esta institución no es la parte física, sino las personas que laboran en el posgrado por lo que mi agradecimiento es para todos ustedes.

Por el apoyo financiero a este proyecto a CONACYT, beca 370898; CONACyT, convenio: 81898 y DGAPA-PAPIIT: IN-214508-3.

A mi directora de tesis la Dra. María Esther Cruz Beltrán por su apoyo incondicional y guía no solo en este proyecto, si no en mi vida, por lo que estoy muy agradecido de ser su alumno.

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo por su valiosa contribución con material de laboratorio y sus observaciones, así como su conocimiento.

Al Dr. Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya por su objetividad y aportaciones para la realización de este proyecto.

<b>ÍNDICE.</b>	<b>Página.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>ANTECEDENTES</b> .....	7
Regulación de las funciones de los ovarios.....	7
Efecto del alcohol sobre la reproducción.....	7
Hormona liberadora de las gonadotropinas.....	8
Las gonadotropinas.....	10
Estructura de la FSH.....	11
El ciclo estral.....	12
Papel de las hormonas esteroides durante el desarrollo folicular.....	13
Los receptores a estrógenos.....	15
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>METODOLOGÍA</b> .....	21
Procedimiento de autopsia.....	22
Cuantificación de hormonas.....	23
Remplazo de la señal hipotalámica.....	23
Remplazo de la señal ovárica.....	23
Extracción del ARN total de las áreas izquierdas y derechas de POA-AHA.....	24
Extracción de la proteína de los receptores a estrógenos.....	26
Cuantificación de proteínas.....	27
Western blot.....	27
Análisis estadístico.....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	29
Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado, después de ser micro-inyectados con vehículo (H <sub>2</sub> O) en POA-AHA izquierda o derecha a las 09:00 horas del diestro-1.....	29
Efectos de la micro-inyección de diferentes concentraciones de alcohol en POA-AHA izquierda o derecha a las 9:00 horas del diestro-1 sobre la ovulación.....	30
Respuesta ovulatoria de animales inyectados con H <sub>2</sub> O en el lado derecho de POA-AHA, o con alcohol en POA-AHA izquierda o derecha a las 09:00 horas del diestro-1, a la inyección subcutánea de LHRH sintética o de benzoato de estradiol (BE), sacrificados en el día del estro esperado.....	31
Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda, a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la concentración sérica de progesterona, estradiol, LH y FSH a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.....	32
Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la expresión relativa del ARNm para RE $\alpha$ en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.....	33
Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la cantidad de la proteína del RE $\alpha$ en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.....	34

Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la expresión relativa del ARNm para RE $\beta$ en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.....	36
Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la cantidad de la proteína del RE $\beta$ en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.....	37
<b><i>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</i></b> .....	39
<b><i>CONCLUSIONES</i></b> .....	42
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b> .....	43

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la estructura y la secuencia de 92 aminoácidos de la pre-pro-GnRH (A). Procesamiento molecular del decapeptido de GnRH (B).....	9
<b>Figura 2.</b> Enlaces N- y O-glucosídico en glicoproteínas.....	10
<b>Figura 3.</b> Concentración de LH, FSH, P <sub>4</sub> y E <sub>2</sub> obtenido en plasma cada 2 horas en cada día del ciclo estral de la rata.....	14
<b>Figura 4.</b> Número y porcentaje de aminoácidos identificados en los receptores a estrógenos: ERβ humano (hERβ), ERβ rata (rERβ), ERβ ratón (mERβ) y REα humano (hERα).....	15
<b>Figura 5.</b> Esquema que muestra el área izquierda y derecha de POA-AHA en cortes coronales antero-posteriores sucesivos.....	22
<b>Figura 6.</b> Reactivos utilizados en el desarrollo en la técnica de retro-transcripción.....	25
<b>Figura 7.</b> Reactivos utilizados en el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.....	25
<b>Figura 8.</b> Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la retro-transcripción, así como las temperaturas y ciclos utilizados para la técnica de RT-PCR.....	26
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de animales que ovularon, después de ser micro-inyectados en POA-AHA izquierda o derecha con H <sub>2</sub> O.....	29
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de animales que ovularon, después de ser inyectados en POA-AHA izquierda o derecha con diferentes concentraciones de alcohol.....	30
<b>Tabla 1.</b> Respuesta ovulatoria a la inyección de LHRH (3.7 µg/kg peso) o de benzoato de estradiol (BE: 10 µg a las 14:00 h del diestrus-2) de ratas tratadas con vehículo (H <sub>2</sub> O) en POA-AHA derecha, o con alcohol en POA-AHA izquierda o derecha.....	31
<b>Figura 11.</b> Modificaciones en la concentración sérica de LH (A), FSH (B), estradiol (C) y progesterona (D) (media ± e.e.m.) de ratas intactas (INT) o micro-inyectadas con vehículo (H <sub>2</sub> O) o alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA, evaluadas a diferentes horas del día del tratamiento posteriores a la micro-inyección.....	32

<b>Figura 12.</b> Media $\pm$ e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para RE $\alpha$ en el lado izquierdo (A1) o derecho (B1) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con el vehículo (H2O) o con alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA durante el diestro-1. Imagen representativa de los productos de la RT-PCR ARNm para RE $\alpha$ en el lado izquierdo (A2) o derecho (B2) obtenidos del POA-AHA de ratas tratadas con las mismas condiciones.....	33
<b>Figura 13.</b> Media $\pm$ e.e.m. del contenido del RE- $\alpha$ en la porción izquierda (A) o derecha (B) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con vehículo (H2O) o con alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA en diferentes horas del ciclo estral. Imagen representativa de los productos de western blot para RE $\alpha$ en el lado izquierdo (A2) o derecho (B2) obtenidos del POA-AHA de ratas tratadas con las mismas condiciones.....	35
<b>Figura 14.</b> Media $\pm$ e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para RE $\beta$ en el lado izquierdo (A) o derecho (B) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con el vehículo (H2O) o con alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA durante el diestro-1. Imagen representativa de los productos de RT-PCR para RE $\beta$ en el lado izquierdo (A2) o derecho (B2) obtenidos del POA-AHA de ratas tratadas con las mismas condiciones.....	36
<b>Figura 15.</b> Media $\pm$ e.e.m. del contenido del RE- $\beta$ en la porción izquierda (A) o derecha (B) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con vehículo (H2O) o con alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA en diferentes horas del ciclo estral. Imagen representativa de los productos de western blot para RE $\beta$ en el lado izquierdo (A2) o derecho (B2) obtenidos del POA-AHA de ratas tratadas con las mismas condiciones.....	38
<b>Figura 16.</b> Metabolismo del alcohol y su participación simplificada en la modificación de la expresión de genes y la transcripción a proteínas.....	41

## RESUMEN.

El alcohol que se consume oralmente es rápidamente absorbido a través de las paredes del estómago, pasa a la sangre y en el cerebro, causa una gama amplia de cambios en sus funciones.

En los humanos, monos y pequeños roedores como la rata, el alcohol disminuye las funciones reproductivas. En la rata hembra modifica el ciclo estral, retrasa la pubertad, inhibe la liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH), pero no de la hormona estimulante del folículo (FSH). La inyección unilateral de etanol en el día del diestro-1, en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) bloquea la ovulación, disminuye la concentración basal y preovulatoria de estradiol, y bloquea la secreción preovulatoria de la LH. La secreción de FSH disminuye sólo cuando el alcohol es inyectado en la porción izquierda de POA-AHA. Veintiocho, 48, 56 y 72 horas después del tratamiento, los cambios endocrinos se acompañaron de la ausencia de expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del receptor a estrógenos alfa ( $RE\alpha$ ).

Con base en estos resultados, se sugirió que la falta de la expresión de los  $RE\alpha$  por la microinyección de alcohol en la porción izquierda de POA-AHA resulta en la inhibición de la secreción de FSH. Por ello, el propósito de esta tesis fue estudiar si la falta de expresión del ARNm del  $RE\alpha$  en POA-AHA inducida por la microinyección de alcohol, resulta en la falta de este receptor y si éste se correlaciona con el efecto inhibitorio en la secreción de la FSH. Para ello, grupos de ratas adultas (3 meses de edad) cíclicas de la cepa CIIZ-V, a las 9:00 horas del diestro-1 fueron anestesiadas con 25 mg/kg de pentobarbital sódico, se colocaron en un aparato estereotáxico y se les micro-inyectó un  $\mu$ L de agua estéril (vehículo) o de etanol al 50%, en un minuto, en el lado izquierdo de POA-AHA. Grupos de animales micro-inyectados con agua o etanol fueron sacrificados 2, 4, 8, 10, 12 o 24 horas después. En el suero de todos los animales se cuantificó por radio-inmuno-ensayo la concentración de progesterona ( $P_4$ ),  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), LH y FSH. En la porción izquierda y derecha de POA-AHA, se cuantificó la expresión del ARNm del  $RE\alpha$  y del  $RE\beta$  por la técnica de retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la cantidad de uno y otro receptor, por Western blot. Otros grupos de ratas micro-inyectadas con el vehículo o alcohol, se sacrificaron 28, 48, 56 o 72 horas después del tratamiento y se midió la cantidad de la proteína de los  $RE\alpha$  y  $\beta$  por Western blot. En los animales sacrificados a las 72 h (día del estro vaginal) se buscó la presencia ovocitos en las trompas uterinas. Como grupo testigo se utilizaron animales cíclicos, sin tratamiento, sacrificados en las mismas horas y días del ciclo que los grupos experimentales.

La micro-inyección de alcohol a las 9:00 horas del diestro-1, no afectó la secreción de LH, FSH,  $E_2$ ,  $P_4$ , en las 12 horas posteriores al tratamiento, pero disminuyó la expresión del ARNm del  $RE\alpha$  en POA-AHA. Sin embargo, la cantidad de proteína solo disminuye en la porción izquierda. La expresión del ARNm del  $RE\beta$  no fue modificada, pero disminuye la cantidad de la proteína. En el día del estro vaginal (72 h después) no se observaron ovocitos en las trompas uterinas.

Con base en los resultados sugerimos que en cada porción de POA-AHA los mecanismos de regulación de la síntesis de los RE $\alpha$  y RE $\beta$  son diferentes. La ausencia de ovulación es el resultado de la falta del efecto “feedback” estimulante del E<sub>2</sub> sobre la secreción preovulatoria de la GnRH, a consecuencia de las bajas concentraciones de E<sub>2</sub> en suero y de la cantidad de sus receptores en POA-AHA.

## ABSTRACT.

The alcohol consumed orally is rapidly absorbed through the stomach wall into the bloodstream once in the brain, causing a wide range of changes in his function.

In humans, monkeys and small rodents such as rats, alcohol decreases reproductive functions. In the female rat, blocking the estrous cycle, delayed puberty, inhibits pulsatile release of luteinizing hormone (LH), but not follicle stimulating hormone (FSH). The day of diestrus-1, ethanol injection in each portion of the preoptic anterior-hypothalamic area (POA-AHA) blocks ovulation, decreases the basal concentration of estradiol and the preovulatory estradiol secretion, block the preovulatory secretion of LH, and that of the FSH only if alcohol is injected into the left portion of POA-AHA, this endocrine events were accompanied by the absence of mRNA expression of estrogen receptor alpha ( $RE\alpha$ ), when tested at 28, 48, 56 and 72 hours after treatment.

Based on these results, it was suggested that the alcohol in the left portion of POA-AHA inhibitory manner regulates FSH secretion through  $RE\alpha$ . Hence the purpose of this thesis was to study whether the lack of mRNA expression in POA-AHA  $RE\alpha$ , alcohol resulting in lack of this receptor and whether this correlates with the inhibitory effect on the secretion of FSH. For which adult rats (3 months old), the cyclic strain CIIZ-V was used. At 9:00 hours of the diestrus-1 the rats were anesthetized with 25 mg / kg pentobarbital sodium, placed in a stereotaxic apparatus and injected with 1  $\mu$ L of sterile water (vehicle) or 50% ethanol during one minute on the left side of POA-AHA. The animals were sacrificed at day of vaginal estrus to search oocytes in the fallopian tubes, and at 2, 4, 8, 10 and 12 hours after microinjection. In the serum of these groups of rats were quantified by radio immunoassay the concentration of progesterone ( $P_4$ ), 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), LH and FSH. In the left and right portion of POA-AHA, mRNA expression of  $RE\alpha$  and  $RE\beta$  technique by retro transcription of Polymerase chain reaction (RT-PCR) and the amount of either receptor was quantified by Western blot. Other groups of micro-injected with the vehicle and alcohol, rats were sacrificed 28, 48, 56 and 72 hours to measure by Western blot the amount of  $RE\alpha$  and  $\beta$  protein. In animals sacrificed at 72 h (day of vaginal estrus) searched the presence of oocytes in the uterine tubes. Cyclic animals were used as a control group and were sacrificed at same hours and days of the experimental groups.

The micro-injection of alcohol at 9:00 h of the diestrus-1, on the left side of POA-AHA does not affect the secretion of LH, FSH,  $E_2$ ,  $P_4$ , 12 hours after treatment, but decrease the mRNA expression of the  $RE\alpha$  in POA-AHA. However, decrease the amount of protein in the left portion. The mRNA expression of the  $RE\beta$  was not modified. On the day of vaginal estrus (72 h later) no oocytes were observed in the uterine tubes.

Based on the results we suggest that each portion of POA-AHA mechanisms regulating the synthesis of RE $\alpha$  and RE $\beta$  are different. The absence of ovulation is likely the result of the lack of stimulating effect "feedback" of preovulatory E<sub>2</sub> on GnRH preovulatory secretion, owing to low levels of E<sub>2</sub> and the amount of the POA-AHA receptors.

## INTRODUCCIÓN.

En los humanos, monos y pequeños roedores como la rata, el alcohol disminuye las funciones reproductivas (Cicero, 1997). En la rata macho adulta, la administración intra-peritoneal (i.p.) de alcohol causa disminución en la secreción de testosterona (Rivier, 1999). En la rata hembra joven, la inyección crónica de alcohol bloquea el ciclo estral y retrasa la pubertad, eventos que están asociados con modificaciones en la secreción de las gonadotropinas. Dicho efecto parece ser consecuencia de una rápida inhibición de la liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH), pero no de la hormona folículo estimulante (FSH) (Rettori y McCann, 1997). En la mañana del proestro la administración de alcohol en el peritoneo, bloquea la secreción preovulatoria de LH, disminuye la secreción de estradiol e incrementa la secreción de progesterona, causa luteinización en los folículos y reduce la activación de las neuronas GnRHérgicas en la tarde del proestro (LaPaglia y col., 1997).

La conducta eufórica que expresan las personas una vez que han consumido alcohol es consecuencia del aumento del flujo sanguíneo en la zona frontal del hemisferio cerebral derecho (Tiihonen y col., 1994). Previamente mostramos (Olvera, 2009), que este efecto funcional asimétrico del alcohol también ocurre sobre el hipotálamo, específicamente sobre POA-AHA, ya que la micro-inyección de una solución de alcohol al 50% en la porción izquierda de POA-AHA bloquea la secreción preovulatoria de FSH y LH, así como la expresión del ARNm del receptor a estrógenos alfa ( $RE\alpha$ ). En cambio, la inyección de alcohol en el lado derecho bloquea la secreción preovulatoria de la LH, pero no la de FSH y se invierte el patrón de expresión del ARNm para el  $RE\alpha$ . Además, la máxima expresión del ARNm del  $RE\beta$  y del ARNm de la GnRH es retrasada hasta la tarde del proestro en los animales inyectados en uno u otro lado de POA-AHA.

Dado que la micro-inyección de alcohol a las 9:00 horas del diestro-1 tiene un efecto asimétrico sobre la secreción de FSH y que no se expresa el ARNm del  $RE\alpha$ , se estudiaron los efectos de la micro-inyección de alcohol a las 9:00 horas del diestro-1, en el lado izquierdo de POA-AHA, sobre la secreción de la FSH, LH,  $P_4$  y  $E_2$ . Así como la expresión del ARNm de los en POA-AHA 2, 4, 8, 10 o 12 h posteriores a la micro-inyección. La concentración de proteína de los  $RE\alpha$  y  $RE\beta$  2, 4, 8, 10, 12, 28, 48, 56 o 72 horas posteriores a la micro-inyección. Dado que algunos grupos de animales no ovularon

en la mañana del estro predicho, animales con el mismo tratamiento fueron inyectados con GnRH en la tarde del proestro o con benzoato de estradiol (BE) a las 14 h del diestro-2. La inyección de GnRH indujo la ovulación. Mientras que la inyección de BE indujo la ovulación en 3/7 de los animales tratados. En aquellos animales que ovularon, el número de ovocitos fue menor con respecto a los inyectados con GnRH. Estos resultados nos sugiere que la liberación de GnRH y en consecuencia la secreción preovulatoria de LH, depende de la activación del  $RE\alpha$ , ya que había  $E_2$  circulante, pero el menor número de receptores (menor la cantidad de la proteína del  $RE\alpha$ ) no fue suficiente para generar el efecto estimulante sobre la secreción de GnRH y LH.

## *ANTECEDENTES.*

### *REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DE LOS OVARIOS.*

Las funciones de los ovarios son la liberación de ovocitos capaces de ser fecundados (ovulación) y la secreción de hormonas esteroideas y polipeptídicas que regulan las funciones reproductivas y generales. La ovulación y la secreción hormonal son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis, por señales endocrinas originadas en los propios ovarios, las adrenales y la tiroides, y por señales nerviosas que llegan a los ovarios por medio del nervio ovárico superior (NOS), nervio del plexo ovárico (NPO) y nervio vago (Cruz y col., 2016).

### *EFECTOS DEL ALCOHOL SOBRE LA REPRODUCCIÓN.*

En la rata hembra, la inyección crónica de alcohol modifica la secreción de las gonadotropinas (inhibición de la liberación pulsátil de LH y de la secreción preovulatoria), lo que resulta en el bloqueo del ciclo estral y retraso de la pubertad (Rettori y McCann, 1997). La inyección de alcohol en el peritoneo en la mañana del proestro disminuye la secreción de  $E_2$  y  $P_4$ , causa luteinización en los folículos, disminuye la secreción preovulatoria de LH y reduce la activación de las neuronas GnRHérgicas en la tarde del proestro (LaPaglia y col., 1997). En estos animales la inyección de la GnRH restablece la secreción preovulatoria de LH y la ovulación (Kathleen y Rivier, 1997).

En ratas ovariectomizadas o adrenalectomizadas, la inyección intra-peritoneal (i.p.) de alcohol a las 8 y 12 horas del día inhibe la secreción de LH (Kathleen y Rivier, 1997).

Previamente mostramos (Olvera, 2009; Cruz y col., 2014) que la inyección de alcohol al 50 % (8.6  $\mu$ M) a las 9:00 horas del diestro-1 de la rata, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA resultó en el bloqueo de la secreción preovulatoria de LH a las 17:00 h del proestro y de la ovulación en la mañana del proestro esperado. La micro-inyección en el lado izquierdo de POA-AHA, disminuyó la secreción preovulatoria de FSH, la concentración sérica de  $E_2$  y la expresión del ARNm del  $RE\alpha$  y  $RE\beta$  28 y 48 h posteriores a la micro-inyección. La micro-inyección en el lado derecho no modificó la secreción preovulatoria de FSH, ni la expresión del ARNm del  $RE\beta$  e indujo una inversión del patrón de expresión del ARNm para el  $RE\alpha$  evaluadas a las mismas horas.

## *HORMONA LIBERADORA DE LAS GONADOTROPINAS.*

La GnRH es un decapeptido del cual se conocen al menos 15 secuencias diferentes. En los mamíferos la secuencia de aminoácidos es **pyroGlu<sup>1</sup>-His<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Trp<sup>5</sup>-\*Gly<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Gly\*-NH<sub>2</sub>** (Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000).

En la rata, las neuronas GnRHérgicas, se originan de la placoda olfatoria, migran principalmente a la banda diagonal de Broca, áreas septales, el lecho del núcleo de la estría terminal, áreas diencefálicas (área periventricular, área preóptica (POA) medial y lateral, área hipotalámica anterior (AHA), zona retroquiasmática) e hipotálamo medio basal (MBH) (Lipostis y col., 1984; Funabashi y col., 2002). En el adulto, estas neuronas se localizan como redes extensas y difusas distribuidas a lo largo de la ruta septo-preóptica–infundibular (Silverman, 1994).

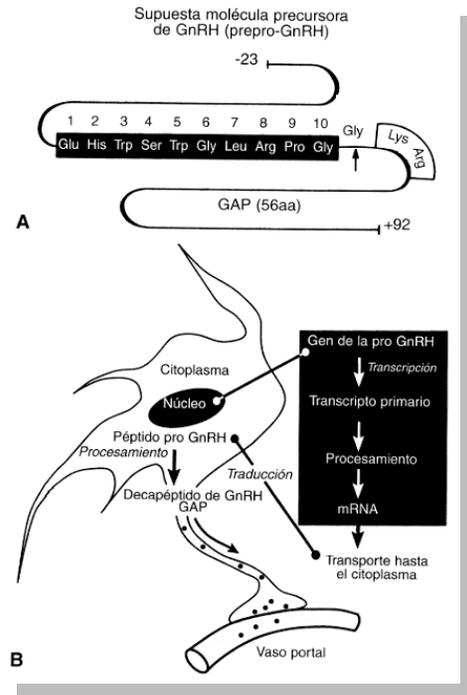
Las neuronas GnRHérgicas secretan el decapeptido de una manera sincronizada y pulsátil. Los axones de estas neuronas son proyectados a varias regiones del cerebro, donde el decapeptido actúa como neuromodulador de las funciones reproductivas (Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000). Existen al menos 15 formas distintas de la GnRH que han sido aisladas en diferentes vertebrados. Una sola especie posee de dos a tres formas de GnRH que podrían tener distintas funciones, además de estimular la secreción de las gonadotropinas (Parhar, 2002). En la rata se han *detectado* tres de ellas, la GnRH-I y GnRH-II y GnRH III (Chen y col., 1998; Kovacs y col., 2002).

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

El procesamiento molecular de GnRH en el interior de las neuronas ocurre fundamentalmente en el núcleo. Después de la transcripción y el procesamiento del transcrito primario de la Pro-GnRH, el ARNm maduro es transportado hasta el citoplasma, donde tiene lugar la traducción, con la generación de la

GnRH (Figura 1). Luego la GnRH es transportada en vesículas hasta las terminaciones nerviosas y secretados a la circulación. (Yen, 2001).

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



En el hipotálamo la expresión del ARNm de la GnRH cambia durante el ciclo estral. Según Gore y Roberts (1997) existen dos máximos en la expresión: uno entre las 11:00 Y 18:00 horas del diestro-2 y otro a las 15:00 horas del proestro. Arteaga y colaboradores (2003) también observaron un valor máximo en la expresión del ARNm de la GnRH entre las 09:00 y 13:00 h del diestro-2 Y mostraron que la expresión del ARNm para la GnRH es mayor en la porción derecha de POA-AHA que en la izquierda.

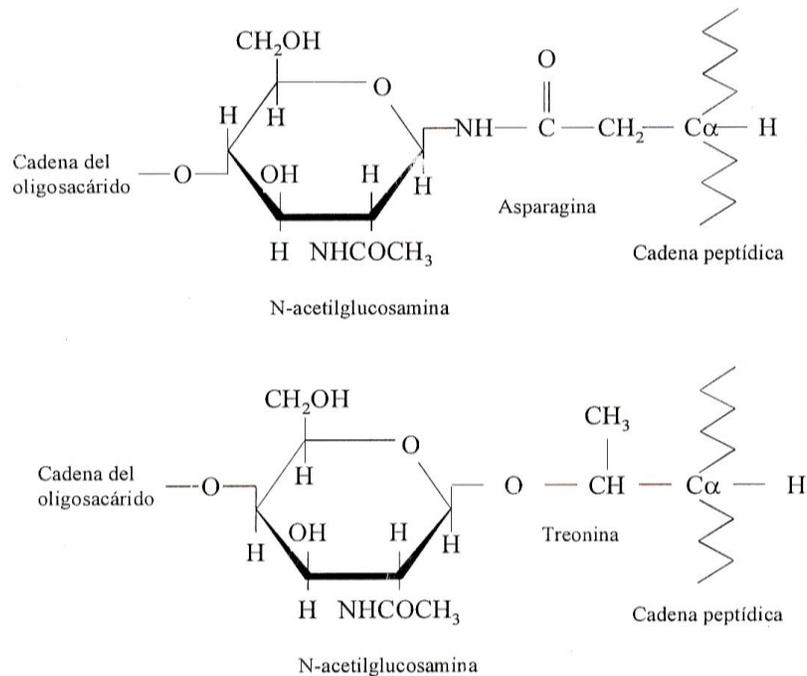
En la rata macho y hembra la cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es significativamente mayor que en el izquierdo (Gerendai y col., 1979; Bakalkin y col., 1984). Es posible que esta asimetría esté definida por el momento y el tipo de participación de los diversos sistemas de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

La secreción de la GnRH es regulada por neurotransmisores (acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina), ácido gama amino butírico (GABA), ácido glutámico, aspartato, glicina, neuropéptidos como la kisspeptina, opioides y hormonas esteroides (Norris, 1996; Herbison, 2016). Los

axones de la neurona GnRHérgica se proyectan a varias regiones del cerebro y hacia la eminencia media, donde la GnRH es liberada, al sistema porta-hipofisario y se une a sus receptores membranales de los gonadotropos donde estimula la síntesis y liberación (secreción) de las gonadotropinas.

### *LAS GONADOTROPINAS.*

Las gonadotropinas forman parte de una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, compuesta por la FSH, la LH, la hormona estimulante de tiroides o tirotrópina (TSH) y la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). Las glicoproteínas son secuencias peptídicas con cadenas laterales de oligosacáridos unidos a asparagina (N), en el caso de la FSH y la LH con treonina (T) o serina (S) en el caso de la hCG. Estas uniones se han descrito como enlaces tipo N- (cuando se encuentra unido al átomo de nitrógeno de la amida del residuo de la asparagina) o enlace O-glicosídico (cuando se une al átomo de oxígeno de la serina o treonina) (Ulloa-Aguirre y col., 2000). (Figura 2).



**Figura 2.** Enlaces N- y O-glicosídico en glicoproteínas. En la parte superior se muestra el enlace tipo N (unido al residuo de asparagina) que se da entre el residuo del oligosacárido y la cadena peptídica de las glicoproteínas. En la parte inferior se muestra el enlace glicosídico (unido al residuo de serina o treonina). Tomado de Ulloa-Aguirre y col., 2000.

Estas glicoproteínas están formadas por dos cadenas polipeptídicas, comparten la estructura de la subunidad- $\alpha$  que consta de 92 a 96 residuos. Las subunidades- $\beta$  presentan de 111 a 112 residuos de aminoácidos (Smith y col., 1992).

### *ESTRUCTURA DE LA FSH.*

La FSH es el principal factor que estimula el crecimiento y desarrollo del folículo. En las células de la granulosa, la FSH estimula el proceso de aromatización de los andrógenos a estrógenos (Dorrington y col., 1975), y la síntesis de receptores a FSH y a LH (Richards y Midgley, 1976), la división celular de las células de la granulosa y la síntesis de acetilcolina por las células de la granulosa (Yong y col., 1992). También estimula la producción de inhibina, activina y del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1), factores involucrados en la regulación del crecimiento folicular (Bley y col., 1992).

La presencia de diferentes isoformas pudiera estar correlacionada con el papel multifuncional de la FSH (Ulloa-Aguirre y col., 2001). Las variaciones en la estructura y distribución de los oligosacáridos sializados, y en menor grado de los sulfatados constituyen la base química más importante de las diferencias entre sus isoformas (Zambrano y col., 1995; Baenziger, 1996).

Las isoformas ácidas con mayor contenido de ácido siálico, tienen una mayor vida media circulante, una menor unión al receptor y actividad biológica *in vitro*, son producidas y secretadas preferencialmente durante el inicio del desarrollo folicular. Por el contrario, la vida media de las isoformas menos ácidas es menor y presentan una mayor actividad biológica *in vitro*, así como una mayor unión al receptor. Su síntesis y secreción aumenta antes de la ovulación (Padmanabhan y col., 1988; Ulloa-Aguirre y col., 1990; Wide y Bakos, 1993).

En las células de la granulosa en el ovario y las células de Sertoli del tubo seminífero, la diversas isoformas de la FSH estimula su crecimiento y proliferación, la síntesis de estradiol y de diversas proteínas, lo cual depende del sexo, la edad, el estado del desarrollo sexual y la fase del ciclo estral (Ulloa-Aguirre y col., 1988).

## *EL CICLO ESTRAL.*

Se denomina ciclo estral a la secuencia de cambios en las concentraciones hormonales y conductuales, sincronizados y repetitivos, que incluyen una etapa en la que la hembra es receptiva al macho, denominada etapa de celo (Kilen y Schwartz 1998; Schwartz, 2000).

En nuestro modelo de estudio, la rata de laboratorio, el ciclo estral es de 4 ó 5 días, lo que depende de la cepa que se utilice y del periodo de luz/oscuridad en que sean mantenidos los animales. Para su estudio se le divide en: proestro, estro, diestro-1 y diestro-2 (Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000). En la figura 3 se muestra el perfil de secreción de progesterona ( $P_4$ ), estradiol ( $E_2$ ), y gonadotropinas durante el ciclo estral de la rata de la cepa CIIZ-V.

En el día del proestro, el frotis vaginal se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas. Entre las 13:00 y 17.00 h, la concentración plasmática de  $E_2$  alcanza los valores máximos, evento llamado “pico” o secreción preovulatoria de estrógenos. La disminución brusca de la concentración de  $E_2$ , induce la secreción preovulatoria de FSH y LH, por lo que la concentración de ambas hormonas aumenta hacia la tarde, alcanza su máximo valor a las 17:00 h para la LH y a las 19:00 h para la FSH. La secreción preovulatoria de LH estimula la secreción de  $P_4$ , que alcanza un primer “pico” en la noche de este día (19:00 h) (Figura 3) (Freeman, 1994; Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000).

En la madrugada del día del estro ocurre la ovulación y el frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas sin núcleo, (Kilen y Schwartz, 1998). La concentración de  $E_2$ ,  $P_4$  y LH son basales, pero la de FSH vuelve a aumentar en la mañana de este día. Se considera que la función de este segundo pico es reclutar los folículos que empezarán a crecer y ovularán en ciclos posteriores (Figura 3) (Freeman, 1994; Schwartz, 2000).

En la etapa de diestro-1, la citología vaginal se caracteriza por presentar una gran cantidad de leucocitos. Las concentraciones de LH y FSH son basales durante todo el día. El cuerpo lúteo secreta  $P_4$  por varias horas, lo que provoca que la concentración de esta hormona aumente paulatinamente durante el transcurso del día (Figura 3). En algunas cepas de ratas la secreción de  $P_4$  se prolonga, lo que resulta en ciclos de 5 días (Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000). Por muchos este día es considerado como la fase de reinicio del ciclo estral.

En el diestro-2, el frotis vaginal presenta leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas. La concentración de P<sub>4</sub> presenta un aumento a las 6:00 h, a partir de las 9:00 h y durante el resto del día tiene concentraciones basales. La concentración de E<sub>2</sub> empieza a aumentar paulatinamente desde la tarde de este día. (Figura 3) (Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000). Los cambios en la citología vaginal son inducidos principalmente por el estradiol.

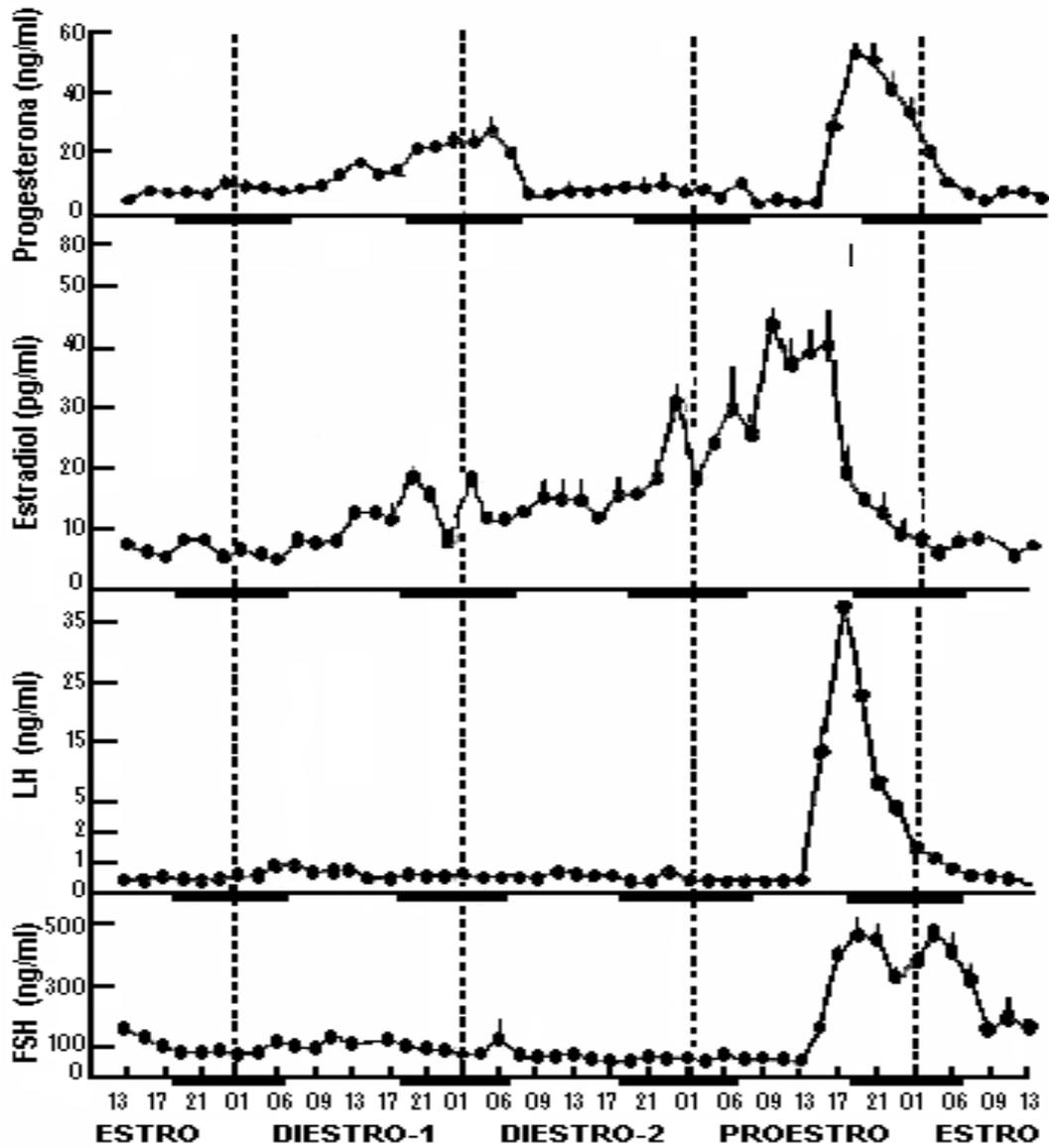
### ***PAPEL DE LAS HORMONAS ESTEROIDES DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR.***

Las células de la granulosa sintetizan E<sub>2</sub> durante todo el ciclo estral y P<sub>4</sub> en la tarde del día del proestro. En la biosíntesis de estrógenos participan las células de la teca interna que secreta andrógenos y de la granulosa donde son aromatizados (teoría de dos células-dos gonadotropinas) (Yen, 2001).

En las células de la granulosa los estrógenos y la FSH estimulan la división celular (efecto anti-atrético) (Rosenfeld y col., 2001). Los estrógenos estimulan la formación de uniones intercelulares tipo Gap, la formación del antro folicular y la síntesis de receptores a estrógenos. Los estrógenos sinergizan la acción de las gonadotropinas, incluyendo la promoción del crecimiento ovárico, aumentan a su vez la actividad de la aromatasa y la síntesis de receptores para FSH y LH (Rosenfeld y col., 2001). Los estrógenos incrementan la actividad de la enzima responsable de su propia formación, se suma al incremento exponencial preovulatorio en las concentraciones séricas de estradiol. Esta forma de auto-amplificación pudiera ser importante en el proceso de selección folicular. Por otra parte, los estrógenos inhiben la producción de andrógenos ováricos, bloqueando la conversión de progestinas (C<sub>21</sub>) a andrógenos (C<sub>19</sub>). En resumen los estrógenos promueven la foliculogénesis, incrementan la expresión de receptores para gonadotropinas, incrementan las uniones tipo gap en las células de la granulosa, estimulan la esteroidogénesis (testosterona y progesterona en la células de la teca y en las células lúteas respectivamente) e inhiben la apoptosis celular de las células de la granulosa (Rosenfeld y col., 2001).

Los andrógenos aumentan la actividad de la enzima aromatasa estimulada por la FSH, actuando como sustrato y también ejerciendo un efecto autócrino directo, el cual resulta en una regulación positiva de las enzimas esteroidogénicas. Por otra parte, las altas concentraciones de andrógenos 5- $\alpha$  reducidos,

tales como la 5 $\alpha$  dihidro-testosterona, actúan como inhibidores de la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa (Yen, 2001).

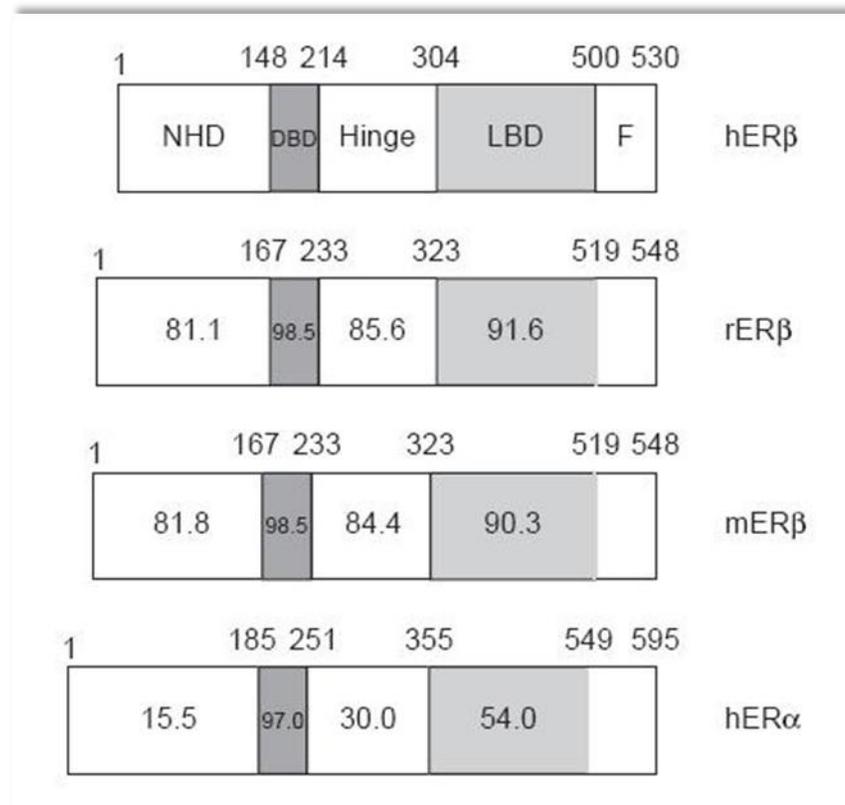


**Figura 3.** Concentración de LH, FSH, P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> obtenido en plasma cada 2 horas en cada día del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de hormona de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan intervalos de oscuridad en el cuarto del animal (Tomada de Freeman, 1994).

## *LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS.*

Los receptores a estrógeno son miembros de la súper familia de receptores nucleares de transcripción los cuales comparten una estructura química común. El receptor a estrógenos consta de seis dominios funcionales: A/B, C, D, E y F (Rollerova y Urbancikova, 2000). El dominio A/B, localizado en el extremo amino terminal (*terminal-N*) es altamente variable en su secuencia y longitud, contiene una región que regula la actividad transcripcional, conocida como AF-1 (*Activation Function 1*) (Rollerova y Urbancikova, 2000).

Existen dos tipos de receptores a estrógenos, el alfa ( $RE\alpha$ ) y el beta ( $RE\beta$ ). Cada subtipo es codificado por un gen diferente; tienen el mismo número de exones y los cDNAs (ADN complementario) clonados de humanos, ratas y ratones comparten secuencias homólogas, especialmente en los dominios de ligando y de unión al ADN (figura 4) (Kuiper y col., 1996).



**Figura 4.** Número y porcentaje de aminoácidos identificados en los receptores a estrógenos: ERβ humano (hERβ), ERβ rata (rERβ), ERβ ratón (mERβ) y REα humano (hERα). Los números por encima de las cajas representan el número de aminoácidos, mientras que los números dentro de ellas se refieren el porcentaje de homología entre los receptores. Tomado de Enmark y Gustafsoon 1999.

Hrabovszky y col., 2000 mediante la detección del ARNm (por hibridación *in situ*) y su cuantificación, mostró que la mayoría de las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE $\beta$ , pero no el ARNm para el RE $\alpha$ . Otros investigadores (Butler y col., 1999) mostraron que en las áreas rostrales del cerebro anterior (estría terminal, núcleo medial de la amígdala y el núcleo preóptico periventricular e incluso el área preóptica), hay neuronas GnRHérgicas que co-expresan los ARNm de ambos tipos de receptores, mientras que otras expresan sólo el ARNm del RE $\alpha$  y otras sólo el del RE $\beta$  (Shughrue y col., 1998).

Los efectos de los estrógenos sobre la actividad de la neurona GnRH son genómicos y no genómicos. El resultado de la estimulación de los efectos genómicos por los estrógenos es lento y depende del tamaño de la proteína que se sintetice. A partir de estos hechos Beato y col., (1996) y Evans (1998) propusieron que el receptor a estrógenos estaría localizado en el núcleo de la célula.

Los efectos no genómicos son rápidos y no requieren de los mecanismos de transcripción y de síntesis de nuevas proteínas. Los estrógenos se unen a receptores de membrana ionotrópicos, lo que da como resultado el flujo de iones que resulta en potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas cinasas (Falkenstein y col., 2000; Nemere y col., 1998; Pietras y col., 2001; Levin, 1999).

Se desconoce cuál es resultado de la estimulación de cada tipo de receptor a estrógenos presente en la neurona GnRHérgica. La unión del estradiol al RE $\alpha$  o RE $\beta$  participa en la regulación de los efectos “feedback” inhibitorios de los estrógenos (Herbison, 2008; Abraham y col., 2003). Herbison (2008) propuso que los estrógenos ejercen sus efectos sobre la neurona GnRH por medio de mecanismos transinápticos indirectos, dependientes de las células gliales, o de otras neuronas en las cuales estarían involucrados los RE $\alpha$ .

En POA de ratón hembra adulto, el 45% de las neuronas identificadas como GnRHérgicas expresan el ARNm para el RE $\alpha$  y el 11% expresa el del RE $\beta$ ; algunas otras co-expresan el ARNm para ambos receptores. Esta proporción de neuronas que expresan uno u otro receptor cambia durante el ciclo

estral: el  $RE\alpha$  se expresa en el 46% de las neuronas GnRHérgicas en el día del diestro-2, en el proestro son el 18% y el 75% en el estro. Para el  $RE\beta$ , los porcentajes respectivos son 6%, 0% y 19% (Skynner y col., 1999). En POA, el 54% de las neuronas de ratones en diestro-2 expresan  $RE\alpha$ , el 22% en proestro y el 25% en estro, mientras para el caso del  $RE\beta$ , los porcentajes respectivos son 12%, 0% y 17%. Según Skynner y col., (1999) ninguna de estas neuronas de POA medial expresan el ARNm para GnRH.

## *JUSTIFICACIÓN.*

En la rata, la inyección crónica de alcohol provoca la rápida inhibición de la liberación pulsátil de LH, pero no ejerce ningún efecto de sobre la FSH (Rottori y McCan, 1997). Sin embargo, la micro-inyección de alcohol diluido al 50% en la porción izquierda de POA-AHA, a las 9:00 h del día del diestro-1, provoca disminución de la secreción de FSH en un 92%. En cambio, cuando se inyecta el alcohol en la porción derecha no se altera la secreción preovulatoria de FSH (Olvera 2009).

Estos resultados se acompañan por la ausencia en la expresión del  $RE\alpha$  44 h antes del momento en que ocurre la secreción preovulatoria de la FSH hasta 16 h después. Por lo que el propósito de este proyecto fue estudiar si la falta de expresión del ARNm del  $RE\alpha$  en POA-AHA, provocada por la micro-inyección con alcohol resulta en la falta de este receptor y si este se correlaciona con el efecto inhibitorio en la secreción de la FSH.

Para analizar si la falta de ovulación no se debe a alteraciones en la secreción de estradiol, sino a la síntesis del  $RE\alpha$ , se procedió a reemplazar la señal ovárica, mediante la inyección de benzoato de estradiol en animales micro-inyectados con alcohol.

## *HIPÓTESIS.*

Dado que la inyección de alcohol en el lado izquierdo de POA-AHA resulta en la ausencia de la expresión del ARNm del RE $\alpha$  y en el bloqueo de la secreción preovulatoria de FSH, entonces estos efectos se reflejarán en una menor cantidad de proteína para el RE $\alpha$  en ambas porciones de POA-AHA, pero sin modificaciones en la cantidad de proteína del RE $\beta$ . Además, si el alcohol inhibe la síntesis del RE $\alpha$ , entonces el remplazo de la señal ovárica por la inyección de estradiol no restaurará la ovulación.

## *OBJETIVOS.*

- Realizar una curva dosis-respuesta para estudiar si la micro-inyección de alcohol al 50% es la dosis máxima que provoca el bloqueo de la ovulación.
- Estudiar los efectos de la micro-inyección de alcohol en el lado izquierdo de POA-AHA (realizada a las 09:00 h del diestro-1), sobre la expresión del ARNm del RE $\alpha$  y del RE $\beta$  en una y otra porción de POA-AHA, durante 12 h posteriores al tratamiento.
- Estudiar los efectos de la micro-inyección de alcohol sobre la cantidad de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en POA-AHA, desde las 12 h posteriores a la inyección del alcohol hasta la mañana del estro esperado.
- Correlacionar los resultados mostrados por Olvera (2009) y Cruz y col., (2014) de la expresión del ARNm de los receptores a estrógenos con la cantidad de receptores a estrógenos
- Analizar los efectos de la micro-inyección de alcohol sobre la concentración sérica de FSH, LH, P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> durante las 12 h posteriores a la inyección del alcohol y hasta la mañana del estro esperado.
- Cuantificar la respuesta ovulatoria al remplazo de la señal hipotalámica u ovárica en animales que no ovularon por la micro-inyección de alcohol en el lado izquierdo de POA-AHA.

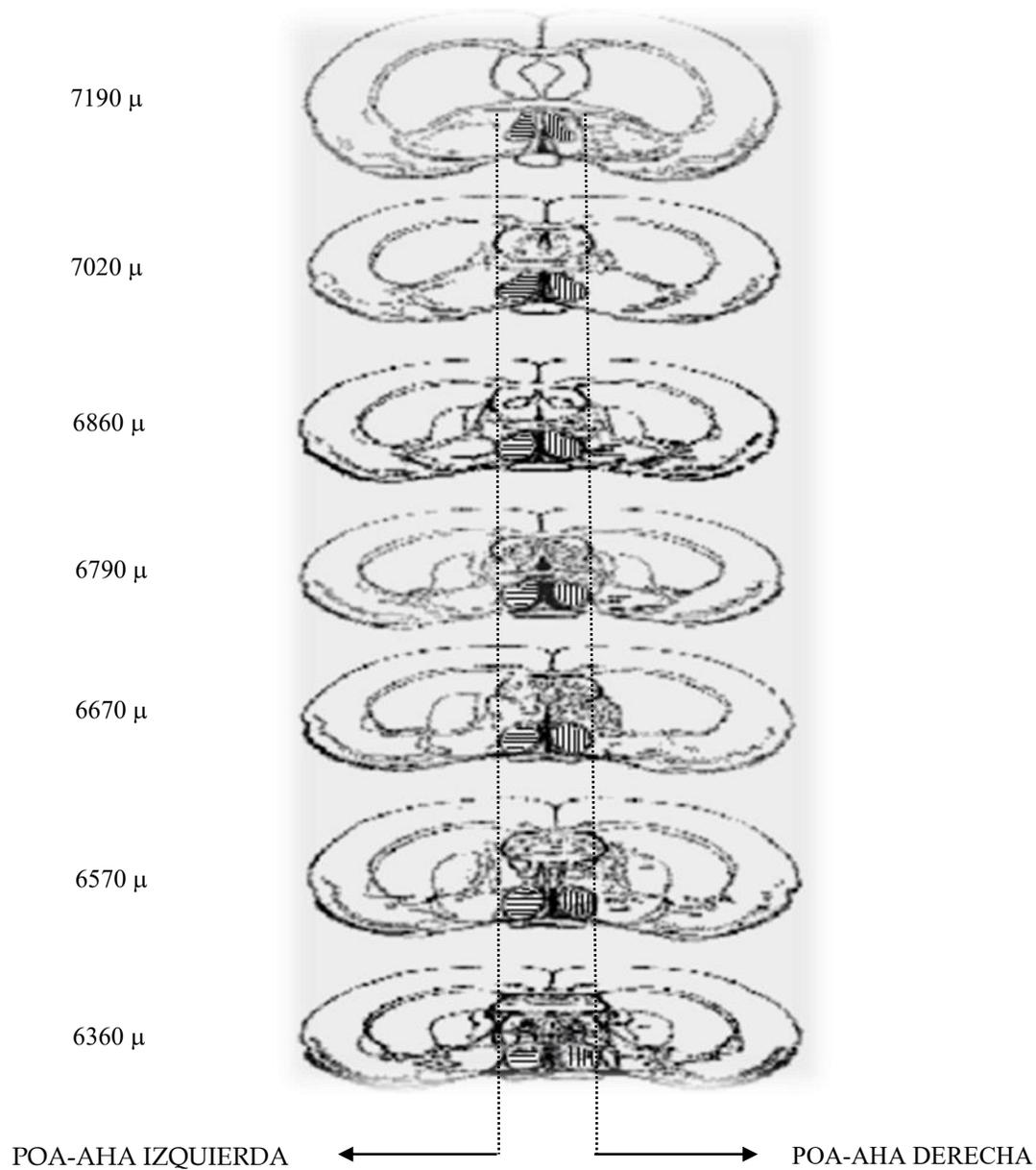
## *METODOLOGÍA.*

Debido a que en los experimentos realizados por Olvera (2009) no se evaluaron los efectos del vehículo sobre la ovulación, la cuantificación sérica de hormonas ( $P_4$ ,  $E_2$ , FSH y LH), así como la expresión del ARNm para los  $RE\alpha$  y  $RE\beta$  y el contenido de la proteína de estos receptores, se procedió a cuantificar dichas variables, en durante las primeras 12 h posteriores a la inyección del alcohol en grupos de animales inyectados en POA-AHA izquierda.

Se utilizaron ratas hembras adultas (190-230 g) cíclicas de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso al alimento (Purina S.A., México) y agua. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Anestosal, Smith Kline Norden de México) (25 mg/kg p.c.) por vía intra-peritoneal, a las 09:00 horas del diestro-1. Se colocaron en un aparato estereotáxico y a cada animal se le micro-inyectó 1  $\mu$ l de una solución de alcohol (alcohol etílico absoluto anhidro, J. T. Baker) al 50% (8.6  $\mu$ M) o agua inyectable, durante un minuto, en el lado izquierdo de POA-AHA, con la misma metodología utilizada previamente (Olvera, 2009 y Cruz y col., 2014) siguiendo las coordenadas del atlas del cerebro de la rata de König y Klippel (1963) (Figura 5).

Grupos de animales fueron sacrificados a las 11:00, 13:00, 17:00 o 21:00 horas del diestro-1, a las 13:00 h del diestro-2, a las 09:00 o 17:00 horas del proestro o a las 09:00 horas del estro, con la finalidad de cuantificar la cantidad de la proteína del  $RE\alpha$  y del  $RE\beta$ .

Como grupo testigo absoluto se utilizaron animales intactos sacrificados a las mismas horas que los tratados con el vehículo o alcohol. Con la finalidad de estudiar el tiempo que se retrasa la ovulación por el tratamiento con alcohol, otros grupos de animales fueron sacrificados hasta que presentaron un estro vaginal.



**Figura 5.** Esquema que muestra el área izquierda y derecha de POA-AHA en cortes coronales antero-posteriores sucesivos König y Klippel (1963).

### *PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA.*

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación. Se recogió la sangre del tronco, la que se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero se almacenó a  $-4^{\circ}\text{C}$ , hasta la cuantificación de  $\text{E}_2$ ,  $\text{P}_4$ , LH y FSH por radio-inmuno-análisis (RIA). El cerebro se extrajo del cráneo y se disecaron las porciones izquierda y derecha de POA-AHA, según la técnica propuesta por Palkovits (1973). Se obtuvo el ARNm total por la técnica del trizol, se le almacenó a

-70 °C hasta la medición de la expresión del ARNm del RE $\alpha$  o RE $\beta$  por la técnica de retro-trascricpción de la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR). A los animales sacrificados en la mañana del estro se les extrajeron las trompas uterinas para verificar la presencia de ovocitos.

### *CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS.*

La cuantificación de las concentraciones plasmáticas se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) mediante el uso de estuches comerciales marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los datos de la concentración de E<sub>2</sub> se expresaron en pg/ml y los de P<sub>4</sub> en ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 5.3% y 9.87 para P<sub>4</sub>, 6.9% y 10.8% para E<sub>2</sub>. El límite de detección para P<sub>4</sub> fue 0.03091 ng/ml y para E<sub>2</sub> fue de 2.12 pg/ml.

Los datos de la concentración LH y FSH se expresaron en ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.91% y 5.74% para LH y 9.3% y 6.82% para FSH. El límite de detección de LH y FSH fue de 0.05 y 0.01 ng/ml, respectivamente.

### *REEMPLAZO DE LA SEÑAL HIPOTALÁMICA.*

Ratas micro-inyectadas en el día del diestro-1 a las 9:00 horas con 1 $\mu$ l de agua o de alcohol al 50% en el lado izquierdo de POA-AHA a las 14:00 horas del día del proestro fueron inyectadas con 3.7  $\mu$ g/Kg de peso de GnRH sintética por vía subcutánea. Los animales fueron sacrificados a las 9:00 horas del día del estro.

### *REEMPLAZO DE LA SEÑAL OVÁRICA.*

Ratas micro-inyectadas en el día del diestro-1 a las 9:00 horas con 1 $\mu$ l de agua o de alcohol al 50% durante un minuto, en el lado izquierdo de POA-AHA a las 14:00 horas del día del diestro-2 fueron inyectadas con 10  $\mu$ g de benzoato de estradiol por vía subcutánea. Los animales fueron sacrificados a las 9:00 horas del día del estro.

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

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

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

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

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

Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm, por 25 minutos, a 4° C. El ARN se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con alcohol al 80 %. La pastilla de ARN se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después de una segunda separación del sobrenadante, los tubos se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril y la pastilla se secó a temperatura ambiente para evitar la insolubilidad de la misma. La pastilla de ARN se disolvió en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O inyectable (lo que consistió la muestra experimental).

Se hicieron alícuotas de 0.4  $\mu$ l de la muestra en 100  $\mu$ l de 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 por la siguiente relación: 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).

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 la figura 6.

Reactivo	Para c/muestra
Producto de RT	10 $\mu$ l
Buffer PCR	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2.5 $\mu$ l
Taq polimerasa	0.8 $\mu$ l
DNTP's	0.5 $\mu$ l c/u
Oligo 1	2.0 $\mu$ l c/u
H <sub>2</sub> O	25.7 $\mu$ l

**Figura 6. Reactivos utilizados en el desarrollo en la técnica de retro-transcripción.**

Por medio de la técnica RT-PCR, se amplificó un fragmento de los genes de los RE- $\alpha$ , RE- $\beta$ . Se utilizó GAPDH como gen control interno. En la figura 7 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la técnica.

Reactivo	Para c/ muestra
ARN total	2 $\mu$ g
Buffer RT 1x	2 $\mu$ l
DTT	1 $\mu$ l
DNTP's	0.5 $\mu$ l c/u
RT M-MLV	0.5 $\mu$ l + 0.5 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
Oligo dt	0.05 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Aforado a 10 $\mu$ l

**Figura 7. Reactivos utilizados en el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.**

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termo-ciclador de gradientes (marca Eppendorf Scientific Inc, Alemania), a las temperaturas y ciclos que se muestran en la figura 8. 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.

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Temperatura (°C)	Ciclos
RE $\alpha$	TTCACACCAAAGCCTCGGG	TGCAGCAGCATCAGCGGA	64.2	32
RE $\beta$	TCCCGGCAGCACCAGTAAC	CCCAGATGCATAATCGCTGC	55	32
GAPDH	GATGGGTGTGAACCACGAGA	AGTGATGGCATGGACTGTGG	55.1	32

**Figura 8. 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 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<sup>sm</sup>, Gibco-brl, USA). Se tomaron fotografías del gel con una cámara Kodak EDAS 216.

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

### ***EXTRACCIÓN DE LA PROTEINA DE LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS.***

Se extrajo el POA-AHA y se separaron las porciones izquierda y derecha. Se colocaron tres porciones del mismo lado (una porción por rata) en un tubo estéril, al cual se le agregó una solución amortiguadora de lisis RIPA (20mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 200mM PMFS, 1mM EDTA, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 1  $\mu$ g/ml Atropina, 1  $\mu$ g/ml Pepstatina) en una relación de 100mg de tejido por 200  $\mu$ l de solución. El tejido se homogenizó con un Politrón a 4 °C. El homogenizado se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 30 min a 4 °C, el sobrenadante se separó en alícuotas de 50  $\mu$ l.

## *CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.*

La concentración de proteínas se cuantifico por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm con la ayuda de un nanodrop (marca Thermo scientific 2000). La cantidad de muestra utilizada fue de 1 $\mu$ l.

## *WESTERN BLOT.*

De cada muestra se agregó el volumen necesario para cargar 100  $\mu$ g de proteína total mezclándola con el amortiguador de carga (tris base 50mM SDS 2%,  $\beta$ -mercapto-alcohol 5% azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) en una relación 1:1 y se hirvieron en baño maría durante 5 min.

Se depositó esta mezcla en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 75%, las proteínas fueron separadas por electroforesis a 80 volts durante 90 minuto, al terminar se transfiere a una membrana de nitrocelulosa a 60 mA durante 60 min. Posteriormente la membrana se bloqueó con una solución bloqueadora al 5% en tris 1X (NaCl, tris-Base, pH 7.4) con Tween 20 al 0.1% durante toda la noche en refrigeración.

En la mañana siguiente se incubo la membrana con el anticuerpo primario para el receptor a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  en una proporción de 1:250 (v:v) en TBS1X con Tween 20 al 1% por 24 horas a 4°C. Posteriormente se incubo con el anticuerpo secundario en una dilución de 1 en 1:7500 durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS + Tween 20 al 0.1% y las membranas se colocaron con TBS para continuar con la detección de la proteína la cual se por quimioluminiscencia de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Con este sistema el peróxido de luminol y un activador (al ser sustratos de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario) reaccionan y generan una señal de luminiscencia que es detectada en placas radiográficas.

## *ANÁLISIS ESTADÍSTICO.*

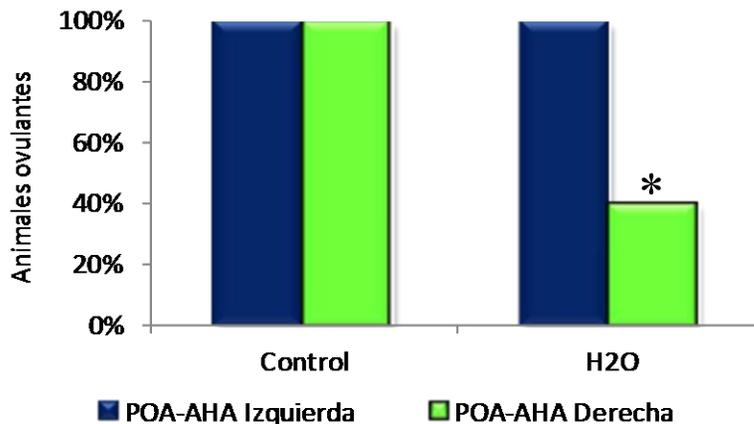
Los resultados del número de animales que ovularon (expresado en porcentajes), se analizó por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher y los del número de ovocitos por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" Mann-Withney. Los datos de las concentraciones séricas de las hormonas y de la expresión relativa del ARNm y de la proteína para RE $\alpha$  y RE $\beta$  fueron analizados mediante la prueba de análisis de las varianzas (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de "t" de Student. En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue  $\leq 0.05$ .

## RESULTADOS.

### 1.- Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado, después de ser micro-inyectados con vehículo (H<sub>2</sub>O) en POA-AHA izquierda o derecha a las 09:00 horas del diestro-1.

La micro-inyección del vehículo en POA-AHA derecha disminuyó la tasa de animales que ovulan (Figura 9).

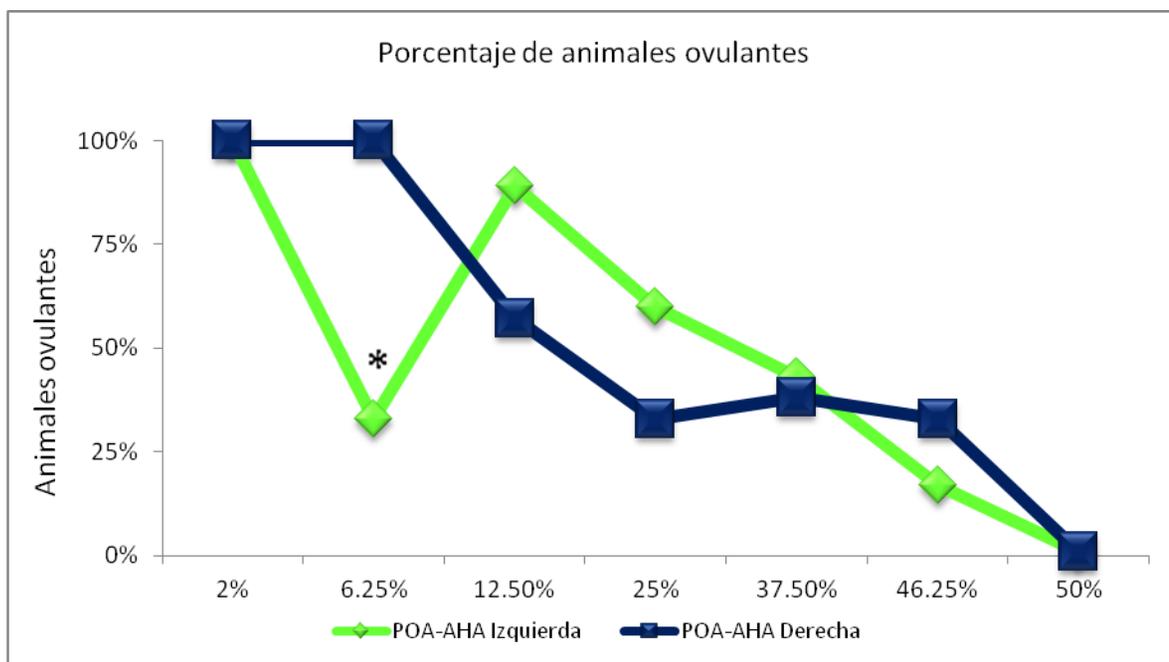
La micro-inyección del alcohol al 50% en una u otra región de POA-AHA retrasó el estro vaginal y la ovulación en  $9 \pm 2$  días, El número de ovocitos liberados por animal que ovula fue similar al promedio de los grupos tratados con el vehículo y los testigos absolutos. Durante los nueve días, el frotis vaginal correspondió a la fase del diestro.



**Figura 9.** Porcentaje de animales que ovularon, después de ser micro-inyectados en POA-AHA izquierda o derecha con H<sub>2</sub>O. \*  $p < 0.05$  vs. POA-AHA control (Prueba de Fisher).

**2.- Efectos de la micro-inyección de diferentes concentraciones de alcohol en POA-AHA izquierda o derecha a las 9:00 horas del diestro-1 sobre la ovulación.**

Los efectos de micro-inyección de alcohol sobre la ovulación espontánea, dependieron de la concentración inyectada. Cuando se micro-inyectó alcohol al 6.25% en el lado derecho no se modificó la ovulación, mientras que en el lado izquierdo sólo ovuló el 30% de los animales (Figura 10).



**Figura 10.** Porcentaje de animales que ovularon, después de ser inyectados en POA-AHA izquierda o derecha con diferentes concentraciones de alcohol. \*  $p < 0.05$  vs. POA-AHA derecha (Prueba de Fisher).

**3. Respuesta ovulatoria de animales inyectados con H<sub>2</sub>O en el lado derecho de POA-AHA, o con alcohol en POA-AHA izquierda o derecha a las 09:00 horas del diestro-1, a la inyección subcutánea de LHRH sintética o de benzoato de estradiol (BE), sacrificados en el día del estro esperado.**

El 60% de los animales con micro-inyección del vehículo en POA-AHA derecha, no ovularon en el día del estro predicho. En un grupo de animales con el mismo tratamiento, la inyección subcutánea de BE no indujo la ovulación; en cambio, la inyección de GnRH indujo la ovulación en todos los animales (Tabla 1).

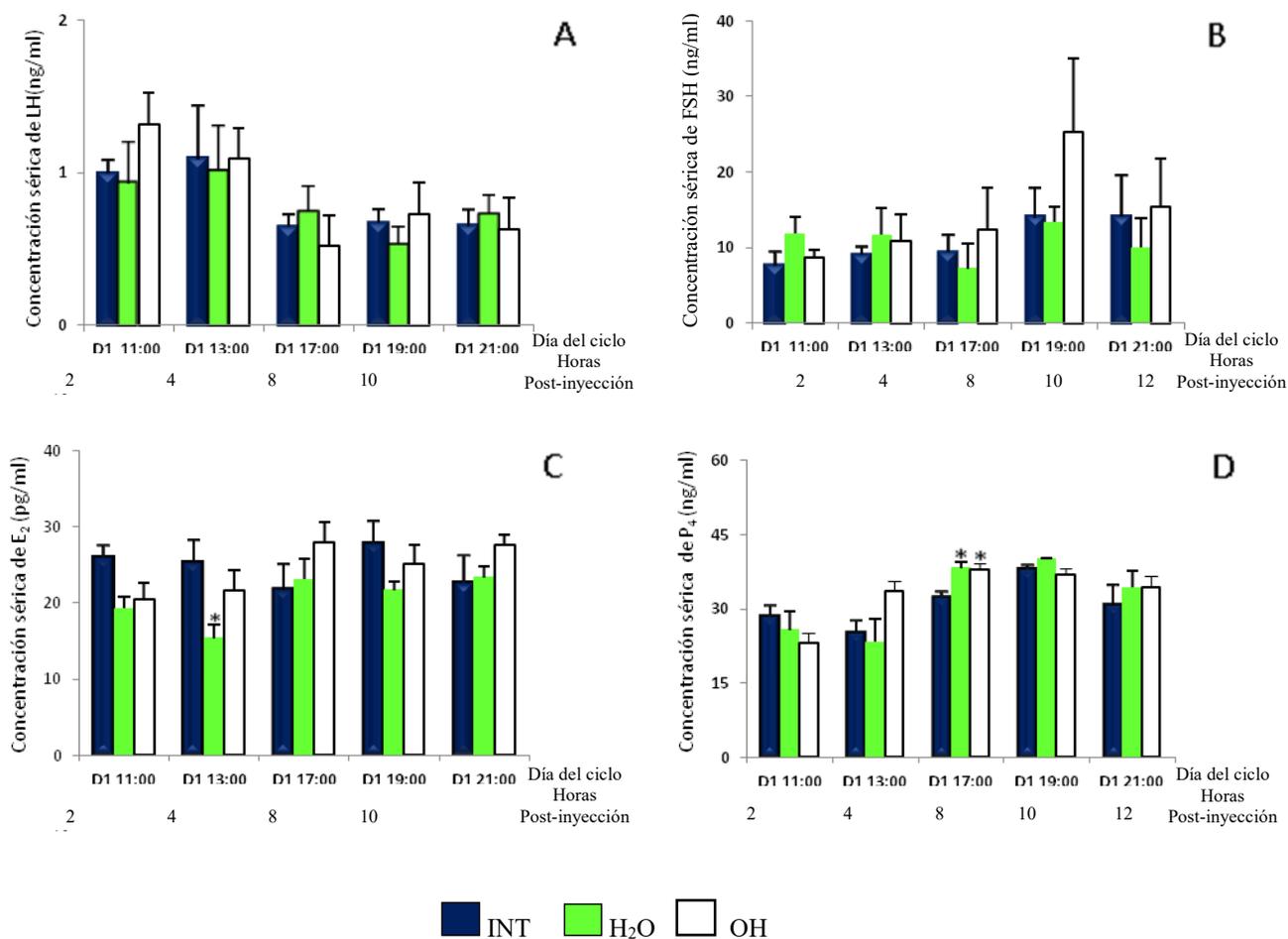
La inyección subcutánea de GnRH en los animales micro-inyectados con alcohol al 50% en POA-AHA izquierda o derecha indujo la ovulación, mientras que en los inyectados en POA-AHA izquierda, la inyección de BE no restableció la ovulación, lo que si ocurrió en los animales tratados en POA-AHA derecha (Tabla 1).

**Table 1.- Respuesta ovulatoria a la inyección de LHRH (3.7 µg/kg peso) o de benzoato de estradiol (BE: 10 µg a las 14:00 h deldiestrus-2) de ratas tratadas con vehículo (H<sub>2</sub>O) en POA-AHA derecha, o con alcohol en POA-AHA izquierda o derecha, en el diestro-1. a: p<0.001 vs. el mismo tratamiento sin remplazo hormonal..**

Tratamiento	Lado de POA-AHA	Frecuencia de animales ovulantes	Número de ovocitos liberados (media ± e.e.m.)
Alcohol	Izquierdo	0/9	0
Alcohol+GnRH	Izquierdo	6/6 <sup>a</sup>	11.8±1.9
Alcohol+BE	Izquierdo	3/7	4.6±2.3
H <sub>2</sub> O	Derecho	2/5	11,10
H <sub>2</sub> O +GnRH	Derecho	7/7 <sup>a</sup>	11.6±1.6
H <sub>2</sub> O +BE	Derecho	3/7	11.3±2.1
Alcohol	Derecho	0/9	0
Alcohol+GnRH	Derecho	5/5 <sup>a</sup>	8.6±2.5
Alcohol+BE	Derecho	6/7 <sup>a</sup>	8.1±1.7

**4. Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda, a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la concentración sérica de progesterona, estradiol, LH y FSH a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.**

La micro-inyección del vehículo o del alcohol no modificó la concentración sérica de, LH y FSH (Figura 11 A y B). La micro-inyección del vehículo o del alcohol aumento la concentración sérica de progesterona 8 h después del tratamiento (Figura 11 C). La micro-inyección del vehículo disminuyo la concentración de estradiol 2 h posteriores al tratamiento (Figura 11 D).



**Figura 11.** Modificaciones en la concentración sérica de LH (A), FSH (B), estradiol (C) y progesterona (D) de ratas intactas (INT) o micro-inyectadas con vehículo (H<sub>2</sub>O) o alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA, evaluadas en horas posteriores a la micro-inyección. Los resultados son expresados como media  $\pm$  e.e.m.

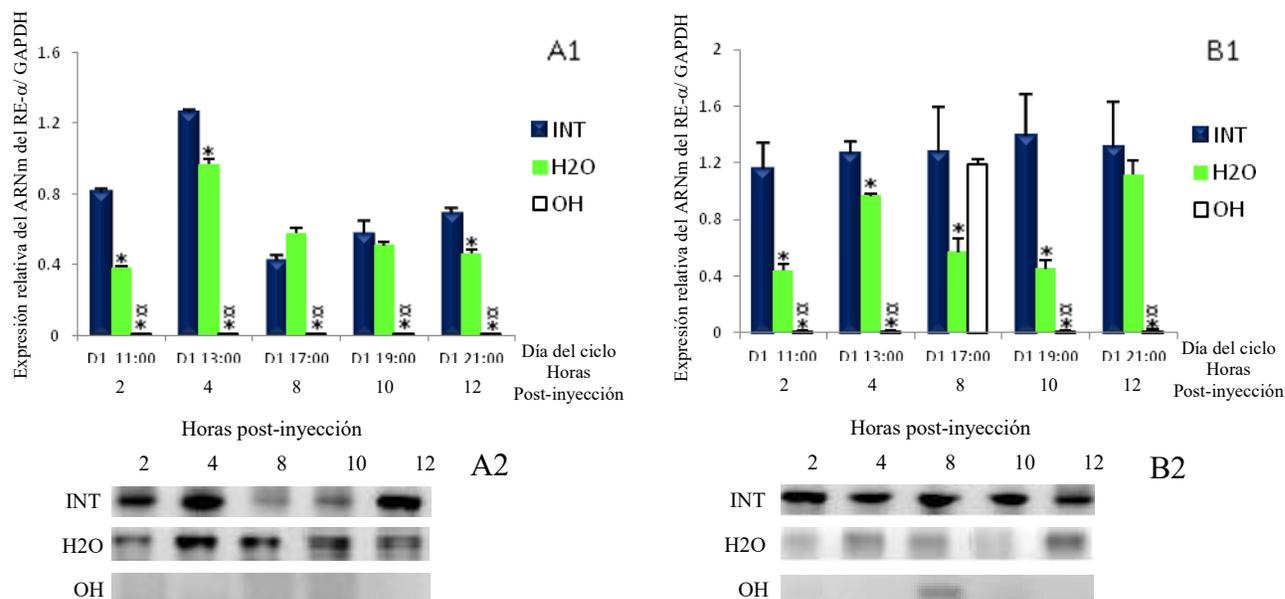
\* $p < 0.05$  vs. Intacto;  $\square$   $p < 0.05$  vs. H<sub>2</sub>O (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

**5. Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la expresión relativa del ARNm para RE $\alpha$  en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.**

En el lado izquierdo de POA-AHA del grupo control, la expresión relativa del ARNm del RE $\alpha$  alcanzó su máximo a las 13:00 horas (Figura 12A), mientras que en el lado derecho se mantuvo constante (Figura 12B).

Dos, cuatro y doce horas después de la micro-inyección del vehículo en la porción izquierda de POA-AHA, la expresión del ARNm del RE $\alpha$  en POA-AHA fue menor que en el grupo control (Figura 12A). Dos horas después de la inyección del vehículo en la porción izquierda de POA-AHA, la expresión del gen fue menor que en el control (Figura 12B).

La micro-inyección de alcohol en POA-AHA izquierda resultó en la falta de la expresión del ARNm para el RE $\alpha$  en el lado tratado (Figura 12A) y en el lado derecho a las dos, cuatro, diez o doce horas después de la micro inyección (Figura 12B).



**Figura 12.** Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para RE $\alpha$  en el lado izquierdo (A1) o derecho (B1) de POA-AHA de ratas intactas o micro-inyectadas con el vehículo (H2O) o con alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA a las 09:00 h del diestro-1. Imagen representativa de los productos de la RT-PCR ARNm para RE $\alpha$  en el lado izquierdo (A2) o derecho (B2) obtenidos del POA-AHA de ratas tratadas en las mismas condiciones.

\* $p < 0.05$  vs. Intacto; \*\* $p < 0.05$  vs. H2O (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

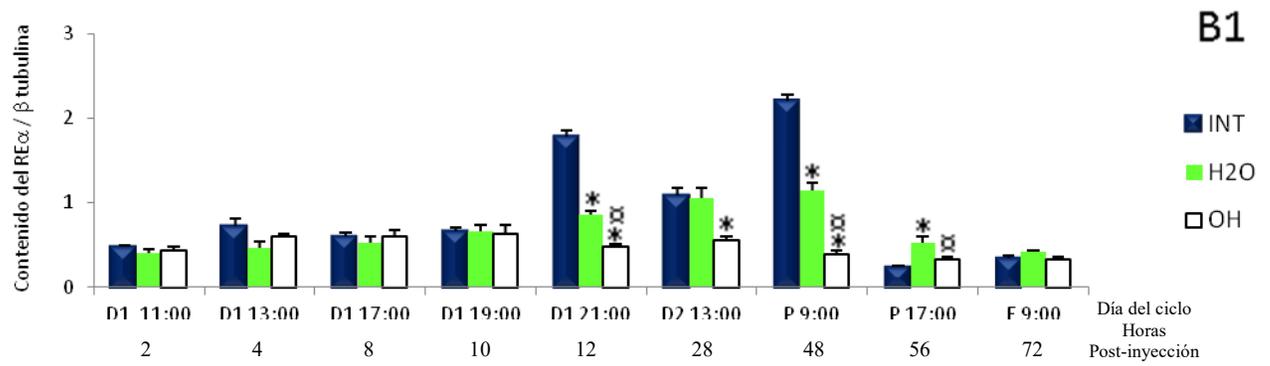
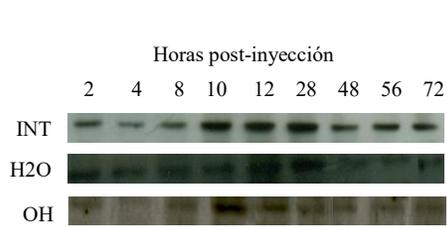
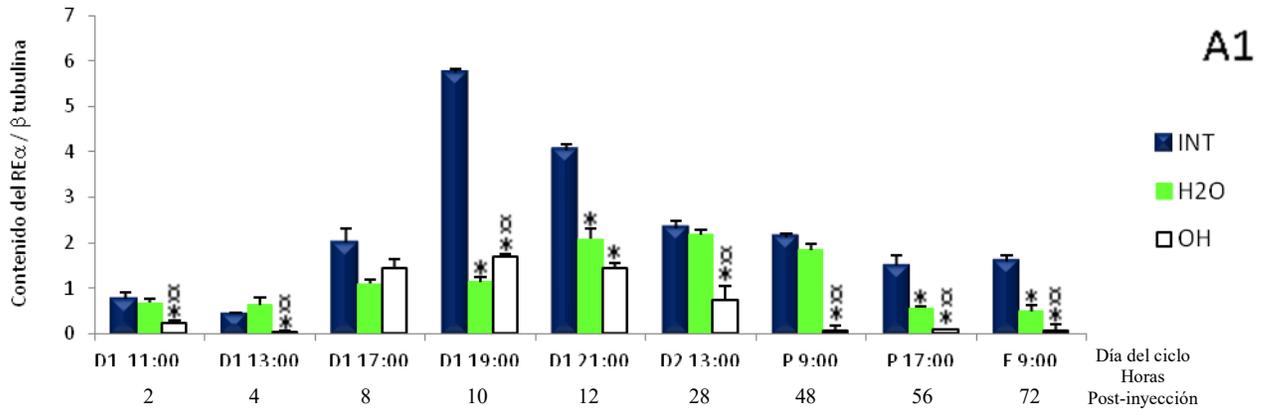
***6. Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la cantidad de la proteína del RE $\alpha$  en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.***

---

En el grupo control, el contenido del RE $\alpha$  en la porción izquierda de POA-AHA aumenta a las 19:00 h del diestro-1 (Figura 13A). En cambio, en la porción derecha la cantidad aumenta a las 19:00 h del diestro-1 y a las 09:00 del proestro (Figura 13B).

Diez y doce horas posteriores a la micro-inyección del vehículo el contenido del RE $\alpha$  en la porción izquierda de POA-AHA fue menor que en el control (Figura 13A). En la porción derecha, el contenido del RE $\alpha$  fue menor que el control en los animales sacrificados a las 21:00 h del diestro-1 o a las 09:00 h del proestro (Figura 13B).

El contenido del RE $\alpha$  en la porción izquierda de POA-AHA de los animales con micro-inyección de alcohol al 50% fue menor que el control en todas las horas estudiadas (Figura 13A), y en la porción derecha en los animales sacrificados a las 21.00 del diestro 1, a las 13.00 h del diestro 2 o a las 09.00 del proestro (Figura 13B).



**Figura 13.** Media  $\pm$  e.e.m. del contenido del RE- $\alpha$  en la porción izquierda (A1) o derecha (B1) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con vehículo (H2O) o con alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA a las 09:00 h del diestro-1. Imagen representativa de los productos de western blot para RE $\alpha$  en el lado izquierdo (A2) o derecho (B2) obtenidos del POA-AHA de ratas tratadas en las mismas condiciones.

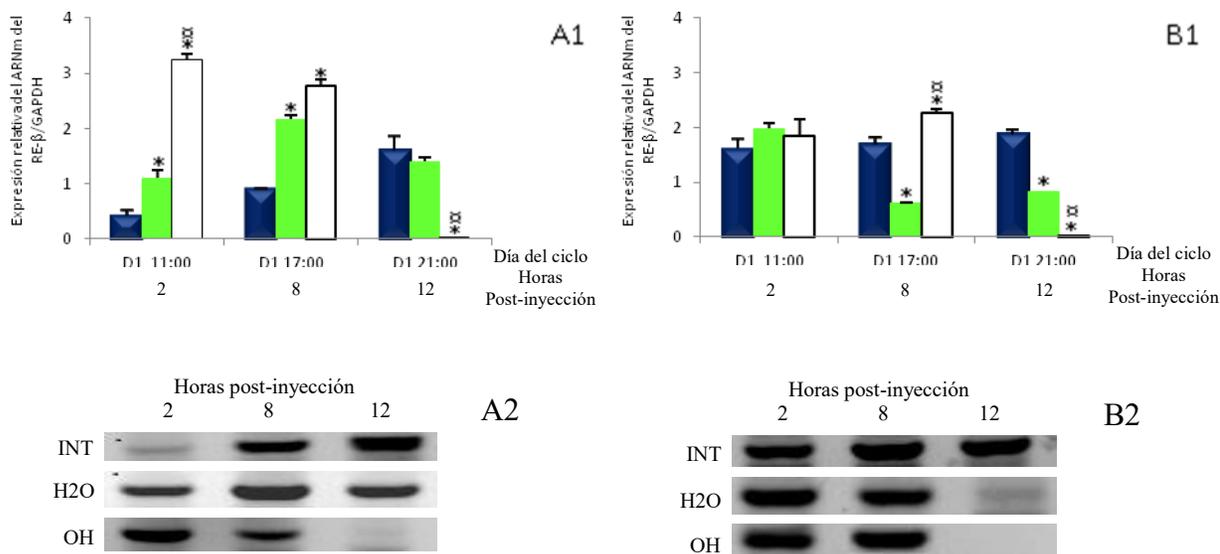
\* $p < 0.05$  vs. Intacto;  $\pi p < 0.05$  vs. H2O (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

**7. Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la expresión relativa del ARNm para RE  $\beta$  en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.**

En los animales intactos, la expresión relativa del ARNm para el RE $\beta$  en el lado izquierdo de POA-AHA aumentó desde las 11.00 hasta las 21 horas del diestro-1 (Figura 14A), mientras que en el lado derecho se mantiene constante (Figura 14B).

La micro-inyección del vehículo resultó en una mayor expresión del ARNm para el RE $\beta$  en la porción izquierda de POA-AHA, 2 y 8 horas posteriores al tratamiento (Figura 14A), mientras que en la porción derecha la expresión del mensajero fue menor en los animales sacrificados 8 o 12 horas posteriores al tratamiento (Figura 14B).

La micro-inyección con alcohol resultó en una mayor la expresión del ARNm para el RE $\beta$  del lado izquierdo medida a las 11:00 o 17:00 horas del diestro-1, pero fue menor a las 21:00 horas del mismo día (Figura 14A), mientras que en la porción derecha la expresión del ARNm para este receptor fue mayor a las 8:00 horas y menor a la 12:00 h posteriores al tratamiento (Figura 14B).



**Figura 14.** Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para RE $\beta$  en el lado izquierdo (A1) o derecho (B1) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con el vehículo (H2O) o con alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA a las 09:00 h del diestro-1. Imagen representativa de los productos de RT-PCR para RE $\beta$  en el lado izquierdo (A2) o derecho (B2) obtenidos del POA-AHA de ratas tratadas en las mismas condiciones.

\* $p < 0.05$  vs. Intacto; \*\* $p < 0.05$  vs. H2O (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

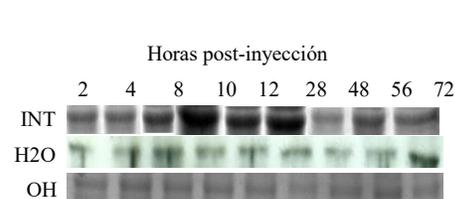
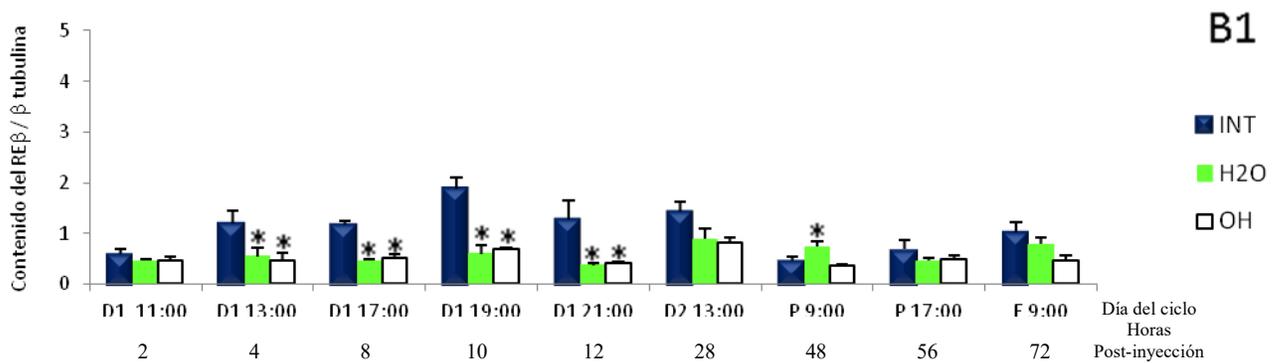
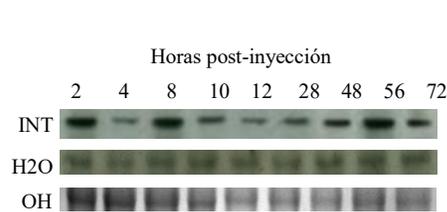
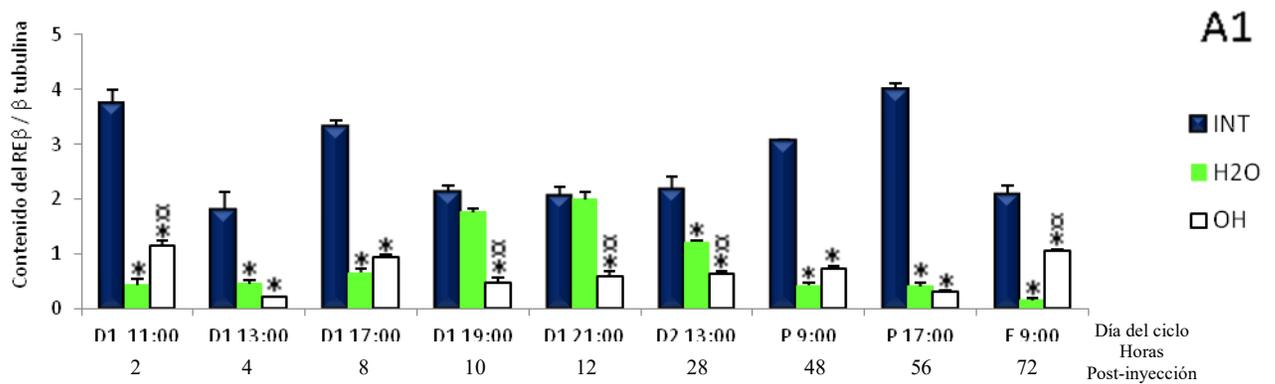
***8. Efecto de la micro-inyección de alcohol al 50% en POA-AHA izquierda a las 09:00 horas del diestro-1, sobre la cantidad de la proteína del RE $\beta$  en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a diferentes horas posteriores a la micro-inyección.***

---

En el grupo control, el contenido del RE $\beta$  en POA-AHA izquierda fue mayor a las 11:00 del diestro-1 y a las 17:00 h del proestro que en las otras horas estudiadas (Figura 15A), mientras que en la porción derecha fue mayor a las 19:00 horas del diestro-1 (Figura 15B).

La micro-inyección del vehículo en la porción izquierda de POA-AHA resultó en un menor contenido del RE $\beta$  POA-AHA izquierda, excepto a las 19:00 y 21:00 h del diestro-1 (Figura 15A), mientras que en la porción derecha el contenido del receptor fue menor a partir de las 13:00 h del diestro-1 hasta las 13:00 h del diestro-2, y mayor a las 09:00 h del proestro (Figura 15B).

El contenido del RE $\beta$  en la porción izquierda de POA-AHA de los animales con micro-inyección de alcohol fue menor que en el grupo control (Figura 15A), mientras que en la porción derecha fue menor en los animales sacrificados desde las 13:00 horas hasta las 19:00 horas del diestro-1 (Figura 15B).



**Figura 15.** Media  $\pm$  e.e.m. del contenido del RE- $\beta$  en la porción izquierda (A1) o derecha (B1) de POA-AHA de ratas hembras adultas intactas o micro-inyectadas con vehículo (H2O) o con alcohol (OH) en la porción izquierda de POA-AHA a las 09:00 h horas del diestro-1. Imagen representativa de los productos de western blot para RE $\beta$  en el lado izquierdo (A2) o derecho (B2) obtenidos del POA-AHA de ratas tratadas con las mismas condiciones.

\*  $p < 0.05$  vs. Intacto;  $\# p < 0.05$  vs. H2O (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

## *DISCUSIÓN DE RESULTADOS.*

Los resultados del presente estudio muestran que la microinyección de alcohol en el lado izquierdo de POA-AHA modifica de manera asimétrica la expresión del ARNm de los RE $\alpha$  y RE $\beta$ , así como de la proteína, en las horas subsecuentes al tratamiento.

A partir de los resultados obtenidos sugerimos que POA-AHA es una de las regiones en las que el alcohol afecta la liberación de GnRH, como resultado de un efecto inhibitorio sobre la síntesis del RE $\alpha$ , pero no del RE $\beta$ . Como consecuencia del menor número de RE $\alpha$  en POA-AHA, la secreción de FSH y LH no ocurre durante el día del proestro.

La disminución de la concentración de E $_2$  a las cuatro horas de micro-inyectar el vehículo a las 09:00 h del diestro-1, podría ser resultado de la estimulación de la secreción del factor liberador de la corticotropina generado por la cirugía, ya que el estrés agudo o crónico ejerce un efecto inhibitorio sobre el sistema reproductor (Kalantaridou y col., 2004). El CRF inhibe la secreción de GnRH (Chen y col., 1992; Kalantaridou y col., 2004), y el cortisol la de GnRH y LH (Breen y Karsch 2004), así como la de E $_2$  y P $_4$  por el ovario (Sakakura y col., 1975; Rabin y col., 1990; Kalantaridou y col., 2004).

La mayor concentración de P $_4$ , observada a las 17:00 horas del diestro-1 en los animales inyectados con el vehículo sería una respuesta al estrés y quizá a la secreción de prolactina, ya que el estrés inducido por éter estimula la secreción de prolactina (Jahn y Dies 1986; Freeman y col. 2000).

La respuesta de la expresión del RE $\alpha$  y RE $\beta$  y la cantidad de proteína frente al estrés producido por la cirugía y micro-inyección del vehículo son diferentes. La cantidad de la proteína del RE $\beta$  en ambos lados de POA-AHA disminuyó a las dos horas de la microinyección del vehículo, mientras que la expresión del RE $\alpha$  aumentó a partir de las 12 h. A partir de estos resultados sugerimos que cada receptor es regulado de manera diferente por los mecanismos neuroendocrinos que se desencadenan por el estrés.

A pesar de estos cambios, los animales micro-inyectados con el vehículo ovularon, aun cuando la concentración de LH en suero fue menor que la del control. (Olvera, 2009; Cruz y col., 2014). Según Everett (1972) y Gosden y col. (1976) la cantidad de LH liberada en el proestro es mayor a la cantidad mínima requerida para la ovulación.

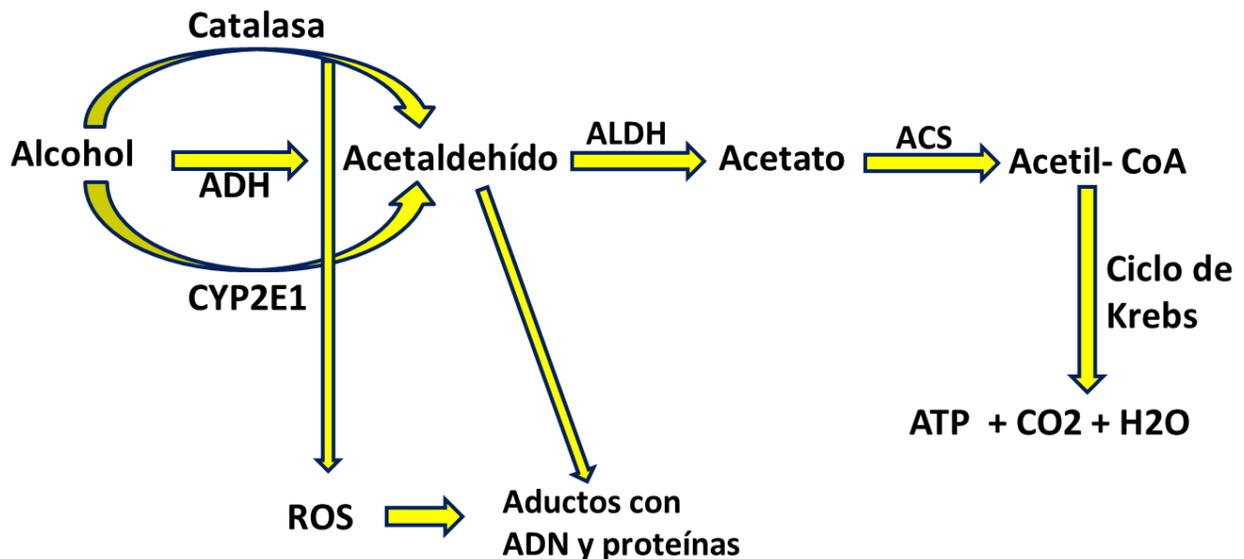
Dado que la micro-inyección del alcohol disminuye la expresión del ARNm y el contenido de la proteína del  $RE\alpha$ , en el lado izquierdo de POA-AHA, sugerimos que el alcohol estimuló proteínas correpositoras para el  $RE\alpha$  como la Icor (Fernandez y col. 2003), Rip140 (Parker y col. 2003), Safb1/2 (Townson y col 2003), y Fkhr (Zhao y col 2001), que son abundantes principalmente en cerebro y en órganos reproductivos (Noriega y Langley, 2008).

La disminución en la cantidad de la proteína del  $RE\alpha$  sería el efecto que explica el bloqueo de la secreción preovulatoria de la FSH y LH (Olvera, 2009; Cruz y col., 2014), lo cual está asociado a la baja concentración de  $E_2$  circulante observada a las 13:00 horas del diestro-2 y a las 09:00 horas del proestro (Olvera, 2009; Cruz y col., 2014).

La ovulación en estos animales después de la inyección de GnRH en la tarde del proestro, apoya esta hipótesis. Wintermantel y col. (2006) siguieron que la liberación de GnRH y de LH dependen de la activación del  $RE\alpha$ , cuyo efecto modulador no ocurre directamente sobre la neurona GnRHérgica, ya que ésta no expresa el  $RE\alpha$  (Shughrue y col., 1998), sino sobre neuronas o astrocitos que expresan el  $RE\alpha$  y que actúan directamente sobre ella (Herbison 2008).

Con base en los resultados, sugerimos que las modificaciones provocadas por el alcohol sobre el  $RE\alpha$ , no solo afecta la secreción de LH, sino también la de FSH. En la hipófisis, los pulsos de la GnRH a frecuencias altas estimulan la liberación de LH, mientras que los pulsos de frecuencias bajas estimulan la liberación de FSH (Herbison, 2008). Aparentemente este mecanismo de regulación no fue afectado por la micro-inyección con alcohol en las 24 horas subsiguientes, ya que las concentraciones de ambas gonadotropinas fueron similares a las del control. Es decir, los mecanismos de regulación que ejercen los distintos neurotransmisores sobre la neurona GnRHérgica (Ciechanowska y col., 2010; Clarke 2011), no

se modificaron en forma trascendente. Dado que los efectos del alcohol se observan a partir de las 13:00 horas del diestro-2 (28 horas después de la microinyección), suponemos que la ausencia del RE $\alpha$  en las neuronas y glías que se comunican con la neurona GnRHérgica resultó en la alteración de algunos mecanismos transcripcionales. Cervantes y col. (2005) mostraron que las especies reactivas de oxígeno como el O<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generadas durante el metabolismo del alcohol impiden el entrecruzamiento de proteínas-ADN, el intercambio de cromátidas hermanas, daño a la estructura de la desoxirribosa-fosfato, oxidación o liberación de las bases nitrogenadas, todo lo que puede provocar el rompimiento de las cadenas del ADN. Moonat y col. (2009) y Miranda (2014) mostraron la oxidación del alcohol a acetaldehído incrementa la acetilación de histonas, y forma aductos con el ADN, y que la suma de estos efectos modifica la expresión de genes y la transcripción a proteínas (Figura 16).



**Figura 16.** Metabolismo del alcohol y su participación simplificada en la modificación de la expresión de genes y la transcripción a proteínas. Abreviaturas (ADH alcohol deshidrogenasa, ALDH aldehído deshidrogenasa, ACS Acetil-CoA sintetasa, CYP2E1 citocromo P450 2E1, ROS especies reactivas de oxígeno).

La ausencia de cambios permanentes en la síntesis del RE $\alpha$  en la porción derecha de POA-AHA (la contralateral a la inyección), es una prueba de que el alcohol micro-inyectado no difundió al lado opuesto o que los mecanismos de regulación de este receptor son diferentes entre un lado y otro de POA-AHA.

## *CONCLUSIONES.*

- POA-AHA es una de las áreas donde el alcohol participa en los mecanismos que regulan la ovulación. La micro-inyección de alcohol a las 9:00 horas del diestro-1, en el lado izquierdo de POA-AHA, no afecta la secreción de LH, FSH, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, ni la cantidad de la proteína del RE $\beta$  en las 12 horas posteriores al tratamiento. Pero si interfiere con la síntesis del RE $\alpha$  en la porción izquierda de POA-AHA.
- La ausencia de la secreción de FSH y LH en el día del proestro provocada por la microinyección de alcohol es el resultado de las bajas cantidades del RE $\alpha$  en ambos lados de POA-AHA.
- En cada porción de POA-AHA los mecanismos de regulación de la síntesis del RE $\alpha$  parecen ser diferentes: En la porción izquierda, el alcohol inhibe la expresión del ARNm del RE $\alpha$ , así como la transcripción de esta proteína. En cambio, en la porción derecha el alcohol estimula la expresión del ARNm del RE $\alpha$ , pero inhibe la transcripción a la proteína.
- En éste día del ciclo y a ésta hora, el alcohol no altera la síntesis del RE $\beta$ .
- La ausencia de ovulación parece ser el resultado de la falta del efecto “feedback” estimulante del E<sub>2</sub> sobre la secreción preovulatoria de la GnRH, a consecuencia de bajas concentraciones de E<sub>2</sub> y de la cantidad de sus receptores en POA-AHA.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

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

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

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

**Baenziger JU.** (1996). Glycosylation: to what end for the glycoprotein hormones?. *Endocrinology.* May; 137(5):1520-2.

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

**Beato M, Chavez S, Truss M.** (1996). Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids.* 1996 Apr; 61(4):240-51.

**Bley MA, Simon JC, Estavez AG, Jimenez de Asua L, Barrarao JI.** (1992) Effects of follicle-stimulating hormone on insulin growth factor-1 stimulated ret granulose cell desoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology.* 131; 1223-1229.

**Breen KM, Karsch FJ.** (2014) Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level, *Endocrinology.* 145 (2004) 692–698.

**Butler JA, Sjoberg M, Coen CW.** (1999). Evidence for estrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J. Neuroendocrinol* 11: 331-335.

**Cervantes-Cervantes MP, Calderón-Salinas JV, Albores A, Muñoz-Sánchez JL.** (2015). Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. *Biol Trace Elem Res.* Mar; 103(3):229-48.

**Chen A, Yahalom D, Ben-Aroya N, Kaganovsky E, Okon E, Koch Y.** (1998). A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS. Letters* 453 199-203.

**Chen MD, O'Byrne KT., Chiappini SE, Hotchkiss J, Knobil E.** (1992). Hypoglycemic "stress" and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: role of the ovary. *Neuroendocrinology* 56, 666–673.

**Cicero TJ, Badger TM, Wilcox CE, Roy D, Meyer ER.** (1997). Morphine decreases luteinizing hormone by an action on the hypothalamic-pituitary axis. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. Vol. 203, No. 3. pp 548-555.

**Ciechanowska M, Lapot M, Mateusiak K, Przekop F.** (2010). Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states Received: 31 July 2009; accepted: 17 June 2010.

**Clarke IJ.** (2011). Control of GnRH secretion: One step back. *Frontiers in Neuroendocrinology* 32 (2011) 367–375.

**Cruz G, Fernandois D, Paredes A.** (2016). Ovarian function and reproductive senescence in the rat: Role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction*. Oct 31. pii: REP-16-0117.

**Cruz ME, Olvera E, Pérez MJ, Min EI, Flores A, Cárdenas M, Chavira R, Domínguez R.** (2014). Effects of unilaterally microinjecting ethanol in the preoptic-anterior hypothalamic areas of rats on ovulation. *Alcohol Clin Exp Res*. Jun; 38(6):1611-21.doi: 10.1111/acer.12399. Epub 2014 May 12.

**Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT.** (1975). Estradiol 17 $\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 97; 1328-1331.

**Enmark E, Gustafsson JA.** (1999) Oestrogen receptor – an overview. *Journal of Internal Medicine* 246 133-138.

**Evans RM.** (1998). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854), 889-95.

**Everett JW.** (1972). The Third Annual Carl G. Hartman Lecture. Brain, pituitary gland, and the ovarian cycle. *Biol Reprod* 6:3–12.

**Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M.**(2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52(4), 513-56.

**Fernandez I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, Lee HS, Eng F, Bertos NR, Pelletier N.** (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Molecular Cell* 2003; 11 139–150.

**Freeman ME.** (1994). The Neuroendocrine control of the ovarian cycle of rat. *The Physiology of Reproduction, Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. Vol 1: 613-654.

**Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G.** (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews* Published 10 January 2000 Vol. 80 no. 4, 1523-1631.

**Funabashi T, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K, Kimura F.** (2002). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. En: *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors*. Parhar I. 141: 165-173.

**Gerendai I, Rotsztejn W, Marchetti B, Scapagnini V.** (1979). LH-RH content changes in the medio-basal hypothalamus after unilateral ovariectomy. *Neuroendocrinology: Biological and Clinical Aspects. Proceedings of Sorono Symposia, Vol 19*, editors A. Polleri y R. MacLeod. New York. Academic Press. 97-102.

**Gore AC, Roberts JL.** (1997). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro. *Frontiers in neuroendocrinology* 18: 209-245.

**Gosden RG, Everett JW, Tyrey L.** (1976). Luteinizing hormone requirements for ovulation in the pentobarbital-treated proestrous rat. *Endocrinology* 99:1046–1053.

**Herbison AE.** (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular areas of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev.* 2008 Mar; 57(2):277-87. Epub 2007 Jun 2.

**Herbison AE.** (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol.* Aug; 12(8):452-66. doi: 10.1038/nrendo.2016.70.

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

**Jahn GA, Dies RP.** (1986). Stress-induced prolactin release in female, male and androgenized rats: influence of progesterone treatment. *J Endocrinol* 110:423–428.

**Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP.** (2004). Stress and the female reproductive system *Journal of Reproductive Immunology* 62 (2004) 61–68.

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

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

**Kovacs M, Seprodi J, Koppan M, Horvath J E, Vincze B, Teplan I, and Flerko B.** (2002). Lamprey gonadotropin hormone-releasing hormone-III has no selective follicle-stimulating hormone-releasing effect in rats. *J. Neuroendocrinol.*14, 647–655.

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

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

**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. *Clinical and Experimental Research*, Vol.21, No. 9 pp. 1567-1572.

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

**Lipostis Z, Setalo G, Flerko B.** (1984). Application of the silver-gold intensified 3,3'-diaminobenzidine chromogen to the light and electron microscopic detection of the luteinizing hormone-releasing hormone system of the rat brain. *Neuroscience.* 13: 513-525.

**Miranda R.C.** (2014). MicroRNAs and Ethanol Toxicity *International Review of Neurobiology*, Volume 115 Elsevier Inc. ISSN 0074-7742

**Moonat S, Starkman G.B, Sakharkar A, Pandey S.E.** (2009). Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms *Cell. Mol. Life Sci.* (2010) 67:73–88.

**Nemere I, Farach-Carson MC.** (1998). Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 248(3), 443-9.

**Noriega y Langley.** (2008). Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología* 2008 3: 29-40.

**Norris OD.** (1996). An Overview of Chemical Regulation en: *Vertebrete Endocrinology*. Academic Press. 146-150.

**Olvera E.** (2009). Efectos de la microinyeccion del alcohol en POA-AHA, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata adulta. Tesis de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.UNAM.

**Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ.** (1988). Modulation of serum follicle-stimulating hormona bioactivity and isoform distribution by estrogenic esterooids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J, Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 465-473.

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

**Parhar IS.** (2002). Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes. *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors.* Parhar I. 141: 3-17.

**Parker M, Leonardsson G, White R, Steel J, Milligan S.** (2003). Identification of RIP140 as a nuclear receptor cofactor with a role in female reproduction. *FEBS Letters* 2003; 546 149–153.

**Pietras RJ, Nemere I, Szego, CM.** (2001). Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine* 14(3), 417-27.

**Rabin DS, Johnson EO, Brandon DD, Liapi C, Chrousos GP.** (1990). Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biol. Reprod.* 42, 74–80.

**Rettori V, McCann SM.** (1997). The mechanism of action of alcohol to suppress gonadotropin secretion. *Molecular Psychiatry* 2. pp.350-354.

**Richards JS, Midgley AR Jr.** (1976). Protein hormone action: a key to understanding follicular and luteal cell development. *Endocrinology.* 97; 1174-1184.

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

**Rollerova E, Urvancikava M.** (2000). Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (review). *Endocrine regulation.* 34 203-218.

**Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts MR, Lubahn DB.** (2001). Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction.* 122; 215-226.

**Sakakura N, Takebe K, Nakagawa S.** (1975). Inhibition of luteinizing hormone secretion induced by synthetic LRH by long-term treatment with glucocorticoids in human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40, 774–779.

**Schwartz NB.** (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. En: *Neuroendocrinology in Physiology and medicine.* Eds PM Conn & Mefreema. EEUU. Raven Press. 135-145.

**Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I.** (1998). Evidence for the colocalization of estrogen receptor- $\beta$  mRNA and estrogen receptor- $\alpha$  immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinol* 139: 5267- 5270.

**Silverman AJ.** (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill D. Raven Press. 1: 1638-1709.

**Skyner MJ, Sim JA, Herbison AE.** (1999). Detection of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinol* 140: 5195-5201.

**Smith GM, Bishop LA, DeKroon R, Wright G, Cerpa-PoljakA, Schofield PR.** (1992). Purification and Characterization of recombinant human FSH. En Hunzicker-Dunn M, (Eds) *Folicle stimulating hormone. Regulation of secretion and molecular mechanisms of action*. Serono Symposia USA, Proccesing. Springer-Verlag, New York, 335-338.

**Tiihonen J, Kuikka J, Hakola P, Paanila J, Airaksinen J, Eronen M, Hallikainen T.** (1994). Acute ethanol induced changes in cerebral blood flow. *Am J Psychiatr*; 151(10):1505-8.

**Townson SM, Dobrzycka KM, Lee AV, Air M, Deng W, Kang K, Jiang S, Kioka N, Michaelis K, Oesterreich S.** (2003). SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:20059–20068.

**Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Espinoza R, Domínguez R, Morales L, Flores A.** (1990). Effects of neonatal androgenization on the cromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J. Endocrinol.* 126; 323-332.

**Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P, Chappel SC.** (1988). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. *Human Reprod.* 3:491-501.

**Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, Timossi C.** (2001). Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Archives of Medical research* 32: 520-532.

**Ulloa-Aguirre A, Timossi C.** (2000). Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive Bio Medicine Online.* 1: 48-62.

**Wide L, Bakos O.** (1993). More basic forms of both human Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76; 885-889.

**Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Gröne HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, P\_erez CA, 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.

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

**Yong EL, Baird DT, Yates R, Reichert LE Jr, Hillier SG.** (1992). Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. J. Endocrinol. Metab. 74; 842-849.

**Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Díaz-Cueto L, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A.** (1995). Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. May; 80 (5):1647-56.

**Zhao HH, Herrera RE, Coronado-Heinsohn E, Yang MC, Ludes-Meyers JH, Seybold-Tilson KJ, Nawaz Z, Yee D, Barr FG, Diab SG.** (2001). Forkhead homologue in rhabdomyosarcoma functions as a bifunctional nuclear receptor-interacting protein with both coactivator and corepressor functions. Journal of Biological Chemistry 2001; 276:27907-27912.