



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Laboratorio De Neuroendocrinología
UMIEZ

“Efectos del bloqueo del RE- α en el lado
derecho de POA-AHA sobre la ovulación y la
secreción preovulatoria de gonadotropinas y
hormonas esteroides.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :

JOSÉ LUIS GALINDO MARTÍNEZ



MEXICO D.F. A 30 DE MAYO DEL 2011

Financiamiento: CONACyT (81898) y DGAPA (PAPIIT: IN-214508)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES

José de Jesús Galindo Chavarría y Araceli Martínez Zavala por haber confiado siempre en mí, por sus consejos y apoyo incondicional en todo lo que me he propuesto, por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera, por aguantarme todo este tiempo que duro la tesis, pero sobre todo por el simple hecho de ser mis padres.

A MI HERMANO

José de Jesús Galindo Martínez por la lucha constante por demostrar quién sacaba las mejores calificaciones, los mejores proyectos y lo mejor de cada quien, eso fue un gran estímulo para alcanzar esta meta y lo seguirá siendo para alcanzar otras más adelante.

A MI DIRECTORA DE TESIS

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán por haber confiado en mí, por estar al pendiente y compartir su conocimiento para poder sacar adelante este proyecto.

A MIS SINODALES

Por sus valiosas criticas y contribución para la elaboración de este trabajo.

Dra. Teresa Corona Ortega
Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán
Dr. Marco Antonio Rodríguez Medina
M.C. Raúl Zavala Chavero
Dra. Isabel Soto Cruz

A los integrantes de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción

A mis amigos y compañeros que me apoyaron durante toda la carrera, por todas las convivencias juntos, a los que estuvieron en las buenas y en las malas, a aquellos con los que seguimos en contacto y a los que no, algunos deciden separarse por asuntos personales pero a todos se les estima y aprecia por haber compartido parte de su vida.

Cada día sabemos más y entendemos menos.

Albert Einstein (1879-1955) Científico alemán.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Marco Teórico | 3 |
| Ovario | 6 |
| Compartimento Luteal | 7 |
| Compartimento Intersticial | 7 |
| Compartimento Follicular | 7 |
| El ciclo estral de la rata | 10 |
| Los receptores a estrógenos | 13 |
| Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH) | 18 |
| Receptor a GnRH | 19 |
| Pulsos de secreción de la GnRH..... | 22 |
| Síntesis de la GnRH durante el ciclo estral | 28 |
| Funciones de la GnRH en la hipófisis | 28 |
| Funciones de la LH y la FSH en el ovario | 30 |
| Funciones de la LH y la FSH en el hipotálamo | 31 |
| Estructura y función de las hormonas esteroides | 33 |
| Progesterona | 34 |
| <i>Generalidades</i> | 34 |
| <i>Estructura química</i> | 34 |
| <i>Síntesis de la progesterona</i> | 35 |
| <i>Acciones generales de la progesterona</i> | 35 |
| Estrógenos | 37 |
| <i>Estructura química</i> | 38 |
| <i>Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario</i> | 38 |
| Metil Piperidino Pirazol (MPP) | 39 |
| Estructura | 40 |
| Tween 20..... | 41 |
| Actividad farmacológica | 41 |
| Asimetrías neuroendócrinas | 44 |
| Asimetría ovárica | 46 |
| Asimetrías del sistema neuroendócrino | 47 |
| Asimetrías hipotalámicas | 49 |
| Planteamiento del problema | 51 |
| Hipótesis | 52 |
| Objetivos | 53 |
| Materiales y método | 54 |
| Cuantificación de hormonas | 55 |
| Resultados | 57 |
| Discusión y análisis de resultados | 65 |
| Conclusiones | 70 |
| Bibliografía | 71 |

RESUMEN

El 17β -estradiol (E_2) es una hormona secretada por el ovario, cuyas funciones están relacionadas con la reproducción, los ciclos de sueño-vigilia, la regulación de la temperatura corporal y la osmolaridad plasmática, entre otras. Estas funciones se dan al unirse a dos tipos de receptores, los alfa ($RE\alpha$) y los beta ($RE\beta$). Su papel regulador en la reproducción se lleva a cabo al dirigir la actividad de las neuronas que secretan la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH), neuronas que en los roedores se ubican en el área pre-óptica hipotalámica (POA-AHA). La importancia funcional de la GnRH radica en su papel estimulante de la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo-estimulante (FSH), las cuales son responsables de las funciones del ovario, como son la secreción de hormonas esteroides, del crecimiento folicular y de la ovulación.

A pesar de la importancia funcional del E_2 como elemento regulador de la cascada de eventos neuroendocrinos que culminan con la ovulación, se desconoce su papel específico al unirse al $RE\alpha$ en POA-AHA, por lo que en este estudio se analizaron los efectos del bloqueo de los $RE\alpha$ en el lado derecho de POA-AHA, durante el ciclo estral, sobre la ovulación y el peso de los ovarios y del útero. Así mismo en las etapas de proestro y estro, se analizaron los efectos del bloqueo de estos receptores sobre las concentraciones séricas de LH, FSH, E_2 , y Progesterona en el día del proestro.

Para ello, se utilizaron ratas hembras adultas cíclicas, las cuales fueron microinyectadas con $25\mu\text{g}$ de MPP (*metil-piperidino-pirazol*; antagonista de los $RE\alpha$) disueltos en $1\mu\text{L}$ de una solución de Tween 20® al 1% ($100\mu\text{L}:10\text{mL H}_2\text{O}$) durante un minuto en el lado derecho de POA-AHA, entre las 8:30 y 9:30 horas del día del estro, diestro-1 diestro-2 o proestro. Como grupo control se utilizaron ratas microinyectadas únicamente con el Tween 20® al 1%. Todos los animales fueron sacrificados por decapitación, a las 10:00h del estro esperado del ciclo estudiado; se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados; los ovarios y el útero para pesarlos y el cerebro para verificar la zona donde se inyectó el fármaco o el vehículo.

Otros grupos de animales microinyectados con Tween 20® o con MPP entre las 8:30 y 9:30 horas del día del estro o del proestro, fueron sacrificados a las 11:00 ó 17:00 horas del proestro esperado. Estos animales fueron sacrificados por decapitación, se recogió la sangre del tronco, se dejó coagular a temperatura ambiente, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min para separar el suero, el cual se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta cuantificar por radio-inmuno-ensayo las concentraciones séricas de LH, FSH, Estradiol y Progesterona. Como grupo intacto se utilizaron animales cíclicos, sin tratamiento, sacrificados los mismos días y horas que los grupos experimentales.

La microinyección de Tween en POA-AHA del lado derecho afectó de manera diferente la ovulación durante el ciclo estral. En la fase de Estro y Diestro-1 el Tween disminuyó significativamente el porcentaje de animales ovulantes (%AO), mientras que en el Diestro -2 y Proestro no la afectó. En comparación con los efectos provocados por la inyección del Tween, el bloqueo de los $RE\alpha$ (por la inyección del MPP) en Estro y Diestro-1 no afectó el %AO. Sin embargo en los días del Diestro-2 y del Proestro, la inyección del MPP provocó disminución del %AO.

La desactivación de los $RE\alpha$ por MPP en Estro o Proestro provocó aumento en la concentración de E_2 y LH a las 11:00 y 17:00 h del día del proestro esperado (en los animales tratados en la etapa de estro, las hormonas son medidas a las 2 y 8 horas después de la microinyección del fármaco), pero no provocó cambios en las concentraciones de FSH con respecto a los animales tratados con el Tween.

Estos resultados nos permiten sugerir que el Tween en POA-AHA altera mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación espontánea, exclusivamente en las fases de Estro y Diestro-1, y dado que el tratamiento con el MPP no modificó los efectos provocados por el Tween sugerimos que algunas de estas alteraciones involucran al $RE\alpha$.

La desactivación de los $RE\alpha$ por la unión del MPP, en el lado derecho de POA-AHA regula de manera inhibitoria la ovulación de la rata en las fases de Diestro-2 y del Proestro, como resultado de la sobre estimulación de la secreción de E_2 y LH.

INTRODUCCIÓN

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

La secreción de la GnRH es modulada por diferentes sustancias entre las que podemos citar a neurotransmisores como la noradrenalina, la serotonina, la acetilcolina, el GABA, neuropéptidos, opioides y hormonas esteroides como la progesterona y el 17β -estradiol (Silverman, et al., 1998). A la fecha se afirma que los estrógenos secretados en la mañana del proestro estimulan la secreción de GnRH, la que horas más tarde estimulan la secreción de las gonadotropinas.

Existen dos tipos de receptores a estrógenos (RE), el α y el β . En POA-AHA se han identificado ambos receptores (Shughrue, et al., 1998), sin embargo, la mayoría de las neuronas GnRHérgicas poseen sólo el RE β (Hrabovszky, et al., 2000). A la fecha se desconoce el papel del estradiol al unirse a uno u otro receptor en la regulación de la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación.

Tanto POA como el hipotálamo regulan de manera asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación. La cantidad de GnRH en el hipotálamo medio basal del hemisferio derecho es el doble que en el izquierdo (Gerendai, et al, 1978). De la misma manera la cantidad ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH en POA-AHA es asimétrica, ya que en el día del diestro-2, la expresión de este mensajero es mayor en el lado derecho que en el izquierdo. Así mismo, la expresión del ARNm para el RE α también es asimétrica, ya que es mayor en POA-AHA del lado derecho que en el izquierdo (Arteaga-Lopez, et al., 2003).

Por lo que el propósito de este proyecto de investigación fue conocer el papel de los RE α del lado derecho sobre la ovulación y la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides.

MARCO TEÓRICO

La ovulación es la etapa final de una serie de eventos regulados por señales neuroendocrinas que involucran al sistema nervioso central, al hipotálamo, a la hipófisis y al ovario. Esta serie de eventos implican: la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), por parte del hipotálamo, la secreción de la hormona luteinizante (LH) así como de la hormona estimulante del folículo (FSH), por la hipófisis (Butler, et al., 1999) y la secreción de 17β -estradiol, progesterona, inhibina, activina y folicostatina, por el ovario.

La regulación de la liberación de las gonadotropinas (FSH y LH) sucede de manera secuencial y sincrónica durante toda la vida reproductiva del animal. En los mamíferos, la secreción de las gonadotropinas está influenciada por factores del ambiente como la temperatura, los ciclos de luz/obscuridad, la disponibilidad del alimento o por factores conductuales (Ronnekleiv, et al. 2005)

Los gonadotropos son un tipo específico de células productoras de hormonas encontradas en el lóbulo anterior de la hipófisis. Su principal función es la producción y la secreción de dos hormonas que regulan las funciones del ovario y los testículos. Una de ellas es la hormona luteinizante (LH), la cual estimula la ovulación en el ovario y la producción de testosterona en el testículo. La otra hormona es la hormona estimulante del folículo (FSH), la cual estimula el desarrollo del folículo y del óvulo en el ovario y el desarrollo del espermatozoide en los testículos. Estas hormonas son llamadas gonadotropinas las cuales son glicoproteínas. Cada gonadotropina tiene dos subunidades, llamadas subunidades α y β . Tanto la LH como la FSH contienen la misma subunidad α , sin embargo, la subunidad β es única para cada gonadotropina la cual les da especificidad biológica e inmunológica. (Childs, et al. 1997)

La GnRH es secretada por las neuronas GnRHérgicas que se localizan en el piso del diencefalo (Figura 1). Las neuronas GnRHérgicas no forman agregados neuronales compactos, sino redes laxas y difusas. La principal red, por su participación directa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, conocida como la red septo-preóptica-infundibular (Köves y Molnár, 1986), se

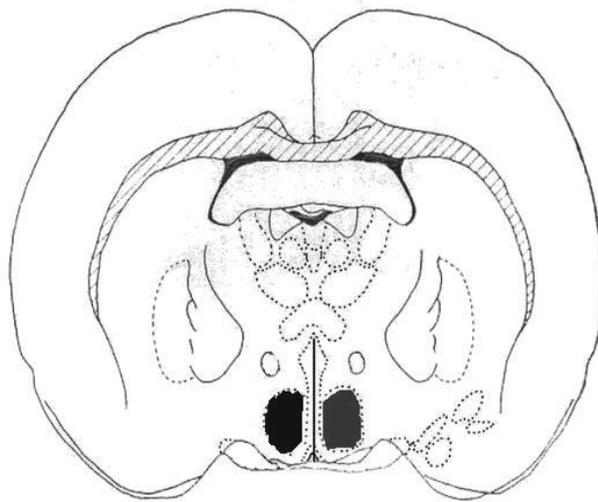


Figura 3 Figura que muestra un corte coronal del cerebro de la rata, donde se muestra el lado izquierdo y derecho de POA-AHA. Las coordenadas correspondientes al corte son: antero-posterior 0.4mm, lateral \pm 0.6mm y vertical 0.86mm con respecto al punto de Bregma (Köning y Klippel, 1963)

OVARIO

El ovario es el órgano principal del sistema reproductor, cuyas funciones principales son la producción de gametos fértiles y la secreción de hormonas esteroides y peptídicas (Espey y Basile, 1999); (Dominguez, et al., 1991); (Guyton y Hall, 2001).

Se presentan como órganos pares contra la pared pélvica, en ambos lados de la cavidad pélvica superior. (Bahr et al., 1999)

El ovario está limitado por un epitelio cúbico simple derivado del peritoneo, debajo del cual se encuentra la túnica albugínea, una capa delineada formada de tejido conectivo denso, debajo del cual se encuentra la corteza (Sanchez-Criado, 2003)

El ovario está constituido por un tejido en constante transformación, que macroscópicamente se divide en:

Corteza. Es la capa externa, contiene los folículos en diferentes estadios de maduración, y el estroma, que es el tejido de sostén y las células intersticiales.

Médula. Es la capa interna que se compone por una rica red vascular y tejido conectivo. La corteza y la médula se continúan de forma imperceptible sin que exista línea clara de demarcación.

Hílio. Es el sitio donde se encuentra la salida y entrada de la arteria y vena ovárica (o arteria útero-ovárica), la rama de la aorta abdominal que llega al ovario a lo largo del mesovario, los vasos linfáticos, las terminales nerviosas y células intersticiales. (Bahr, et al., 1999);

El ovario está formado funcionalmente por tres compartimientos: el luteal, el intersticial y el folicular, en éste último se engloban a los folículos en crecimiento, que son la unidad anatómico-funcional de la gónada y a partir de los cuales se originan los otros dos (Ganong, 2004).

COMPARTIMENTO LUTEAL O CUERPO LÚTEO

Se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsan al ovocito. Secreta principalmente progesterona.

COMPARTIMENTO INTERSTICIAL O GLÁNDULA INTERSTICIAL

Incluye tanto a las células teco-intersticiales de los folículos en crecimiento y las células de la teca de los folículos atrésicos, y representa la unidad productora de andrógenos (Bahr, et al., 1999)

COMPARTIMENTO FOLICULAR

Está formado por folículos que se encuentran en la corteza del ovario, en diferentes etapas del desarrollo. Como son primordiales, en crecimiento (primario, secundario y terciario) y preovulatorios. (Ross, et al. 2005), (Domínguez, et al. 1999).

El folículo está formado por el ovocito I, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y las células de la teca; éstas últimas conforman la denominada teca interna. Además de las células de la granulosa y las tecales, el folículo está rodeado por un complejo sistema de fibras colágenas, células del tejido conectivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas, todo lo que recibe el nombre de teca externa (Domínguez, et al., 1999).

La mitosis de las células de la granulosa ocurre por acción de la FSH y de los estrógenos, que actúan de manera sinérgica. La FSH, a su vez, estimula la síntesis de sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que permite que su número se incremente conforme el folículo madura y también estimula la síntesis de los receptores de LH (Domínguez, et al., 1999).

Los folículos que forman tres o cuatro capas de células de la granulosa alrededor del ovocito se les denominan folículos secundarios y comienza la diferenciación de las células de la teca a partir de las células del estroma del ovario. En las células de la teca la LH estimula la síntesis de andrógenos, los cuales pasan

a las células de la granulosa donde son convertidos a estrógenos por acción del complejo enzimático Aromatasa (McGee, et al. 1997) (Van-Voorhis, et al. 1998).

En los folículos con seis a doce capas de células de la granulosa alrededor del ovocito comienza a acumularse líquido entre las células hasta formar una cavidad llamada antro folicular. En estos folículos (terciarios o antrales) el ovocito termina su crecimiento y se diferencian dos capas de células de la teca; la teca interna con capacidad esteroideogénica y la teca externa compuesta por colágeno, células de tejido conectivo, fibras musculares lisas, vasos sanguíneos y fibras nerviosas. Los vasos sanguíneos, al igual que los nervios, solo llegan a la teca interna, ya que no penetran a la granulosa, algunas de las fibras nerviosas terminan en el músculo liso presente en la teca externa, estos nervios regulan la contractibilidad de las mismas, lo que influiría en el mecanismo de la ovulación. Las células teco-intersticiales tienen receptores a LH, prolactina, ACTH (hormona adrenocorticotropa), noradrenalina, GnRH y estrógenos. En el licor folicular se encuentran proteínas, polipéptidos, FSH, LH, prolactina, progesterona, andrógenos [DHT (dihidrotestosterona), 5 α -androstano-3-17-diona, androsterona y epiandrosterona], estrógenos, gonadocrininas y noradrenalina, cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral de la rata (Dominguez, et al., 1991); (Terranova, et al. 1999); (Bahr, et al., 1999).

Conforme los folículos antrales siguen creciendo continúan acumulando líquido hasta llegar a la etapa preovulatoria en donde las células de la granulosa que rodean al ovocito primario, forman al *cumulus ooforus*. En el ovario de la rata, los folículos llegan a este estadio de desarrollo 17 a 19 días después de haber iniciado el crecimiento.

En los folículos preovulatorios, la ovulación ocurre en respuesta al incremento brusco de la concentración plasmática de las gonadotropinas. La LH y FSH estimulan la secreción de enzimas proteolíticas como el activador del plasminógeno (Tsafriri y Reich, 1999); (Timossi y Ulloa 2000). La LH también estimula otras enzimas proteolíticas como plasmina y metalproteinasas, las cuales contribuyen a la degradación de la matriz perifolicular y principalmente de las fibras de colágeno que

forman la pared folicular. Estos cambios se acompañan de incremento en el flujo sanguíneo, en la permeabilidad vascular y en el volumen folicular. Los cambios vasculares y en la actividad proteolítica son estimulados, además de LH, por mediadores locales como: factor de crecimiento endotelial vascular, interleucina 1, eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), factor activador de plaquetas y óxido nítrico (Tsafriri, 1995).

El ovocito expulsado es un ovocito secundario (ovocito II), ya que justo antes de salir culmina la primera etapa de la meiosis e inicia la segunda división meiótica que se detiene en metafase. La segunda meiosis se reinicia sólo si el ovocito es fecundado (Ross, et al. 1997); (Espey y Basile, 1994)

Las funciones de los ovarios son liberar ovocitos capaces de ser fecundados y producir hormonas esteroides sexuales (Progesterona, andrógenos y estrógenos) y péptidos (inhibina, activina, entre otros) que preparan a la hembra adulta para la reproducción y regulan el metabolismo general de la hembra (Espey y Basile 1999); (Domínguez, et al., 1997) (Yao y Bahr, 1999)

EL CICLO ESTRAL DE LA RATA

En la rata, la época reproductiva está caracterizada por cambios periódicos en la secreción de las hormonas secretadas por el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, el resultado final de estos cambios es el crecimiento, la maduración y la liberación de ovocitos fértiles, así como una conducta sexual que asegura la máxima receptividad de la hembra durante la etapa ovulatoria. Esta conducta rítmica que presentan las hembras se le llama ciclo del estro o ciclo estral (Mandl, et al., 1963)

Se han descrito distintas etapas en el ciclo de la rata, se ha utilizado el término *anestro* para describir el periodo en el cual la rata se encuentra fuera del periodo reproductivo. También se han usado los prefijos *pro-*, y *di-* con el sufijo *estro* para describir las etapas del ciclo entre el estro en el periodo sexual. La primera parte de este periodo es el *proestro*, el cual se caracteriza cuando el animal “entra en calor”. La siguiente etapa es el *estro*, el término “estro” proviene del latín *oestrus* y este a su vez del griego “*oistros*”, que significa frenesí. Este término se ha utilizado para describir el período de deseo sexual de la hembra y distinguirlo del celo del macho. Si durante ésta etapa no se dio la concepción, el estro se recupera en un periodo muy corto en lo que es llamado como *diestro-1*. El siguiente periodo es el *diestro-2*, el cual su duración puede variar en diferentes especies. Durante este tiempo, las secreciones ováricas preparan el tracto reproductivo para recibir el óvulo, nuevamente fertilizado poco después del apareamiento en el estro. Si la fertilización no se lleva a cabo, el animal regresa al proestro, iniciándose el ciclo una vez más (Freeman, 1994).

La rata es un mamífero policíclico, es decir, presenta varios ciclos estrales durante todo el año, cuya duración promedio es de cuatro a cinco días. La determinación de la duración de las diferentes etapas del ciclo estral están basadas en el monitoreo diario mediante frotis vaginal. El proestro tiene una duración de 12 a 14 horas, el estro de 25 a 27 horas, el diestro-1 de 6 a 8 horas y el diestro-2 de 55 a 57 horas.

Las células epiteliales en el proestro se caracterizan por la predominante presencia de núcleo. Estas células son claramente redondas, visiblemente nucleadas y aparecen en grupos. Ocasionalmente, algunas células epiteliales escamadas con forma de cono suelen estar presentes en el frotis en el proestro. En el siguiente día, el estro, las células epiteliales predominantes son las escamadas en forma de cono. En estas células no se aprecia la presencia del núcleo, contienen una gran cantidad de citoplasma granular y son de formas irregulares. Durante el diestro¹, las células predominantes son los leucocitos, los cuales aparecen a lo largo del frotis mostrando un significativo número de células epiteliales nucleadas. Los leucocitos son pequeños con citoplasma granular y usualmente contienen un núcleo vesicular. Una vez más, el proestro se caracteriza por la ausencia de leucocitos.

Existe un “periodo crítico” diario, durante este intervalo tiene lugar un evento neuronal, el cual conlleva a la liberación de LH y posteriormente a la ovulación. El tiempo de este periodo puede ser alterado al modificar los periodos de luz-obscuridad (pero no su duración). Así, los ciclos de luz-obscuridad intervienen en la regulación del ciclo estral al ajustarlo en función del ciclo luz-obscuridad en el que son mantenidos los animales. De hecho, con la exposición prolongada al periodo de obscuridad, la rata se volverá acíclica de manera gradual (Freeman, 1994).

A continuación se muestran las variaciones en la concentración plasmática de progesterona (P_4), prolactina, 17β -estradiol o estradiol (E_2), LH y FSH durante el ciclo estral (Figura 4). En los días de estro, diestro-1, diestro-2 y la mañana del proestro, las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas (LH y FSH) se mantienen en concentraciones basales, principalmente por el efecto “feedback negativo” o efecto inhibitorio que ejercen los estrógenos y hormonas proteicas, tales como la inhibina. Las cantidades de LH y FSH circulantes, si bien son bajas, son suficientes para estimular el crecimiento de los folículos. Conforme los folículos crecen y maduran, la concentración plasmática de 17β -estradiol también aumenta hasta alcanzar su concentración máxima en la mañana del proestro, evento también llamado secreción preovulatoria de estrógenos o “pico de estrógenos” (Smith et al., 1975)

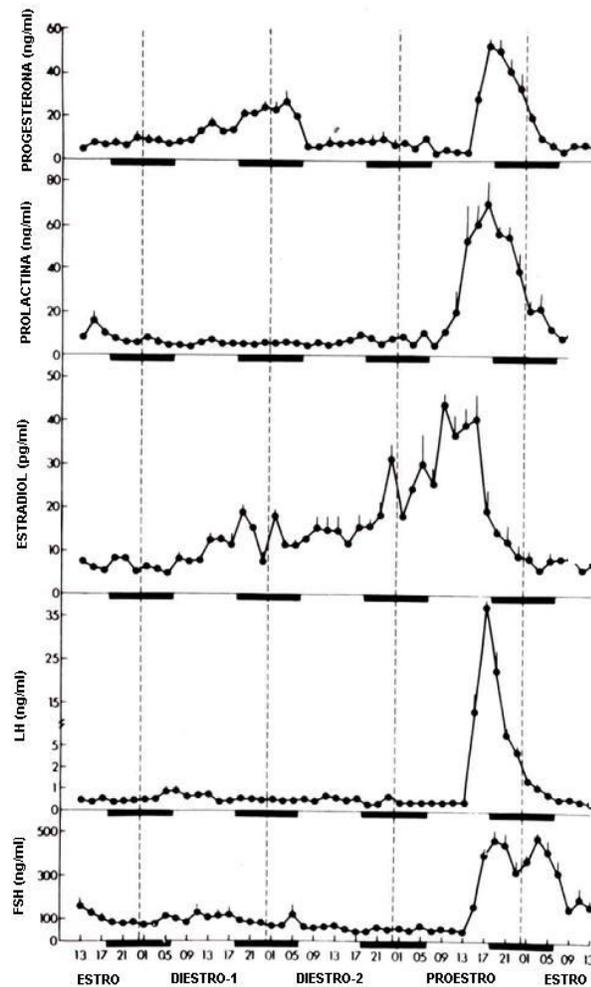


Figura 4. Variaciones en la concentración de LH, FSH, progesterona, prolactina y estradiol durante el ciclo estral de la rata, cuantificadas cada 2 horas de muestras de plasma periférico. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de la concentración de hormonas de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad en el que se mantuvieron a los animales (Smith, et al., 1975)

La secreción preovulatoria de E_2 en el proestro estimula la secreción fásica de ambas gonadotropinas, que horas después (en la mañana del estro) induce a la ovulación. Esta secreción masiva de ambas gonadotropinas se conoce como “pico” o secreción preovulatoria de gonadotropinas.

En la mañana del estro se presenta en la sangre un segundo aumento en la concentración de FSH, que al parecer participa en el reclutamiento de los folículos ováricos que ovularán en el siguiente ciclo.

Una vez que se produce la ovulación, el folículo se transforma en el cuerpo lúteo. La función principal del cuerpo lúteo es la secreción de P_4 , como resultado del efecto estimulante de la LH (Smith et al., 1975)

LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS

Los estrógenos cumplen una función vital en la fisiología reproductiva tanto femenina como masculina estimulando el crecimiento y la diferenciación celular del tejido de mama, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo y próstata (Korach, 1994)

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína perteneciente a la “súper familia de receptores nucleares”, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroideas (Evans, 1988). El receptor de estrógeno fue identificado hace aproximadamente 50 años, por Jensen y col., ellos describieron la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de ratas (Jensen y Jacobson, 1962). Cuatro años más tarde, Toft y Gorski aislaron por primera vez los receptores de estrógeno del útero de ratas (Toft y Gorski, 1996). Ambos grupos desarrollaron distintos modelos para explicar como el estradiol lleva a cabo su acción en el núcleo al unirse a un receptor específico, el receptor de estrógeno.

Funcionalmente, el RE α , al igual que el resto de los receptores esteroides, está organizado en 6 dominios denominados por letras de la “A” a la “F” (Figura 5). La región A/B está localizada en el lado amino terminal de la proteína y es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción genética (Activation Function 1 o AF-1) y varios sitios de fosforilación, que son importantes en el proceso de activación de la proteína especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona.

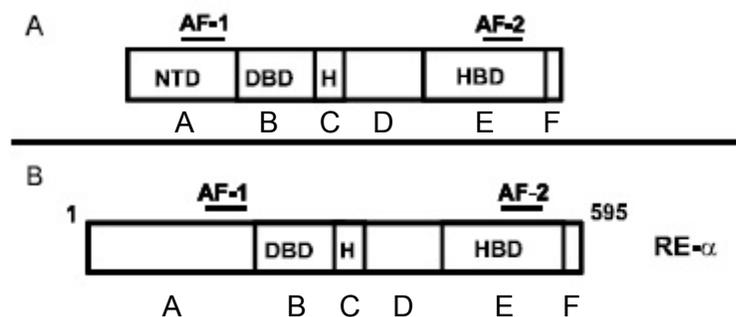


Figura 5. Estructura general de los receptores de hormonas esteroides. **A.** Esquema de la estructura compartida por todos los receptores de hormonas esteroides: HBD dominio carboxi-terminal de unión al ligando, DBD dominio de unión al ADN, región bisagra (H) y un dominio aminoterminal NTD, de secuencia muy variable. Presentan además 2 funciones activadoras (AF) AF-1 y AF-2. **B.** Estructura del receptor de estrógenos RE α de 595 aminoácidos. (Bottino y Lanari, 2010)

Adyacente se encuentra la región de unión al ADN o dominio C, la más conservada entre los diferentes receptores nucleares compuesta por nueve residuos de cisteínas que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroides, de los cuales, ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar dos dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de zinc, conocida como la caja P (P-box) (Freedman, 1992). Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F, se encuentra la región D o región de bisagra, la cual no ha sido bien caracterizada y que participa en la unión a la proteína chaperona de golpe de calor hsp90 (heat shock protein 90), la cual permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo. Finalmente, en el extremo carboxilo terminal se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando (LBD), donde se une la hormona estradiol (E_2). Esta región a pesar de que es conservada entre los diferentes receptores esteroides es altamente específica para su hormona (AF-2), es decir que el receptor de estrógeno une estrógenos con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroides.

Se han descrito diversas isoformas del receptor de estrógeno obtenidas mediante *splicing alternativo*, concretamente hasta 3 formas del $RE\alpha$ y 5 formas del $RE\beta$. Las isoformas del $RE\beta$ pueden transactivar la transcripción únicamente cuando se forma un heterodímero con el receptor funcional $RE\beta_1$ de 59 kDa. El $RE\beta_3$ ha sido detectado en los testículos a elevadas concentraciones. Las otras dos isoformas del $RE\alpha$ pesan 36 y 46 kDa (Nilsson et al., 2001) (Leung, et al. 2006).

En la rata, los efectos del 17β -estradiol en los órganos blanco están regulados por los receptores a estrógeno (REs), los cuales son proteínas de transcripción de enlace activo que regulan la expresión de los genes blanco. Como miembros de la super-familia de los receptores de esteroides, estos receptores juegan un papel importante en múltiples procesos de la función reproductiva.

El primer miembro de esta familia fue aislado del útero de la rata, el cual fue denominado como receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$). En el año 1996, Kuiper y col (Kuiper, et al. 1996), clonaron un ácido desoxirribonucleico complementario (DNAC) del receptor a estrógenos de la próstata de rata, al cual denominaron receptor-beta ($RE\beta$), para distinguirlo del que previamente se había clonado.

Los estrógenos juegan un papel crítico al establecer la forma de secreción de las neuronas GnRHérgica durante su diferenciación sexual, lo que determina el patrón de secreción de la hormona durante la edad adulta (Loza et al., 1995). A pesar de su importancia, la función precisa de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica no es aún del todo clara.

Mediante la detección del ARNm (por hibridación *in situ*) y la cuantificación de los receptores a estrógenos (por la técnica de unión con estrógeno tritiado) en neuronas GnRHérgicas (identificadas por inmunohistoquímica) (Shughrue, et al. 1998), se mostró que las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el $RE\beta$ y no el $RE\alpha$. Estos resultados no concuerdan con los observados por Hrabovszky y colaboradores (2000), quienes mostraron que en las áreas rostrales del cerebro anterior (estría terminal, núcleo medial de la amígdala y el núcleo preóptico peri-ventricular e incluso el área preóptica), hay neuronas que co-expresan el ARNm para ambos tipos de receptores pero también se han identificado neuronas que expresan sólo el ARNm para el $RE\alpha$ o para el $RE\beta$ (Hrabovszky, et al. 2000).

Mediante el uso de técnicas inmuno-histoquímicas se ha mostrado que el número de células inmuno-reativas (ir) al $RE\alpha$ en POA-AHA es mayor a las 09:00 y 17:00 horas y menor a las 13:00 horas del día, independientemente de la etapa del ciclo que se considere. En cambio, el número de células ir- $RE\beta$ es mayor a las 13:00 horas del proestro y del estro (Mendoza, et al. 2007). Por lo que en este proyecto de tesis se pretende estudiar la participación del $RE\alpha$ del lado derecho de POA-AHA en los días del proestro y estro sobre la secreción de gonadotropinas, estradiol, progesterona y la ovulación de la rata adulta.

La mayoría de las neuronas GnRHérgicas del área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) expresan el RE β (99%) y muy pocas el RE α , por lo que se ha sugerido que la activación del RE α o del RE β están involucrados en los efectos “feedback” estimulante e inhibitorios de los estrógenos, por medio de su acción en la neurona GnRH ó en neuronas que modulan la actividad de la neurona en cuestión. Se ha propuesto que los estrógenos estarían ejerciendo sus efectos sobre la neurona GnRH por medio de mecanismos transinápticos indirectos, dependientes de las células de la glía, en los cuales estarían involucrados los RE α . (Herbison, 1998) Por medio del uso de ratones “knockout”, en los que el RE α ó β han sido desactivados, se ha demostrado que el RE α es necesario para que se dé el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH, pero no así con el RE β . En este mismo modelo experimental, el uso de un ligando selectivo para el RE α demostró que este receptor no sólo es necesario, sino que es suficiente para estimular la secreción pre-ovulatoria de LH (Rissman, et al., 1997). Aún cuando los resultados de Wintermantel y col parecen contundentes, no debemos olvidar que en su modelo experimental la desactivación génica de uno u otro receptor está presente en todos los órganos blanco del 17 β -estradiol (Wintermantel, et al. 2006).

En neuronas no específicas a GnRH del área pre-óptica (POA), el 54% de las neuronas en diestro-2 expresan el RE α , el 22% en proestro y el 25% en estro; para el caso del RE β , los porcentajes respectivos son 12%, 0% y 17%; hay que aclarar que ninguna de estas neuronas de POA medial expresan el ARNm para GnRH En POA de ratón hembra adulto, el 45% de las neuronas identificadas como GnRHérgicas expresan el ARNm para el RE α y el 11% expresa el del RE β ; algunas otras co-expresan el ARNm para ambos receptores. Esta proporción de neuronas que expresan uno u otro receptor cambia durante el ciclo estral: el RE α se expresa en el 46% de las neuronas GnRHérgicas en el día del diestro-2, en el proestro el 18% y el 75% en el estro; para el RE β , los porcentajes respectivos son 6%, 0% y 19% (Skinner, et al. 1999).

En POA y área hipotalámica anterior (AHA) de la rata, recientemente se ha mostrado que la expresión del ARNm para $RE\alpha$ tiene un máximo en la tarde del estro (17:00 horas), seguido de un aumento de menor magnitud a las 13:00 horas del diestro-2; mientras que para el $RE\beta$, la máxima expresión del gen se observa al medio día del diestro-2. Estas variaciones durante el ciclo estral se acompañan de disimilitudes en la porción derecha de POA-AHA, ya que el lado derecho expresa más el $RE\alpha$ que el lado izquierdo, mientras que el $RE\beta$ se expresa en ambas porciones en la mañana y medio día del diestro-2 (Conn y Jennes, 1994)

Como se indicó en párrafos anteriores, la función del estradiol al unirse al $RE\beta$ sobre la neurona GnRHérgica está involucrado en los efectos de “feedback” inhibitorios.

El ARNm del $RE\beta$ presenta valores máximos en ambos lados de POA-AHA en el diestro-2; en el lado derecho de las 9:00 horas a las 13:00 horas, mientras que en el lado izquierdo se presenta a las 13:00 horas. No se mostró ningún otro pico en algún otro día y hora del ciclo estral, lo que indica que este receptor se sintetiza en tiempos precisos.

En el lado derecho de POA-AHA la expresión del ARNm para el $RE\alpha$ presenta un pico máximo a las 17:00 horas del día del estro. Otros dos picos más pequeños se observaron a las 9:00 horas del día del diestro-2 y a las 13:00 horas del proestro. Sin embargo, solo el pico de las 17:00 horas del día del estro, fue estadísticamente significativo cuando se compara con la expresión del mensajero del lado izquierdo, momento en el que el ARNm del $RE\alpha$ se expresa muy poco.

Al igual que el $RE\beta$, la expresión del ARNm de la GnRH mostró un valor máximo a las 13:00 en el diestro-2 para ambos lados de POA-AHA. Sin embargo, el “pico” mayor se presentó del lado derecho. Un segundo aumento en la expresión del ARNm de la GnRH pero de menor magnitud al previo se observó a las 9:00 del proestro en ambos lados de POA-AHA. Una vez más, la ausencia de actividad en los demás días sugiere tiempos específicos para la expresión de la GnRH. (Arteaga et al., 2003)

HORMONA LIBERADORA DE LAS GONADOTROPINAS (GnRH)

Las neuronas secretoras de la GnRH o neuronas GnRHérgicas representan, según algunos autores (Timossi y Ulloa, 2000), el punto final de los procesos que regulan la reproducción en los mamíferos. Las neuronas GnRH están reguladas por muchas neuronas aferentes distintas, que secretan varios transmisores [norepinefrina, dopamina, α -serotonina, acetilcolina, ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato, aspartato], péptidos [Factor liberador de la corticotropina o CRF, Factor liberador de la tirotropina o TRH, sustancia P, VIP o péptido intestinal vasoactivo, neuropéptido Y, encefalinas, opioides, kisspeptina, histamina, colecistoquinina o CCK], factores de crecimiento y hormonas esteroides, lo que indica que estos neurotransmisores actúan directamente sobre la neurona GnRH. La forma en que cada una de estas sustancias regula la actividad de las neuronas GnRH depende del ambiente neuroendócrino que las circunda. (Kordon, et al. 1994)

El glutamato estimula la secreción de la GnRH y la LH, la administración de glutamato incrementa la expresión genética de la GnRH en un 30% entre los 15 a 60 minutos después de su administración, e incrementa la secreción de LH (Merchenthaler, et al. 1989)

Otro factor estimulante es la noradrenalina. La estimulación de los receptores α -adrenérgicos estimula la secreción de la GnRH en ratas y conejos intactos. La distribución de neuronas inmunopositivas a GnRH y de tirosina hidroxilasa (enzima que estimula la conversión de la tirosina en dopamina, precursor de la noradrenalina), sugiere un posible sitio directo de acción noradrenérgica en la neurosecreción de la GnRH, sin embargo no se ha identificado ningún contacto sináptico como los que se conocen a la fecha (Negro-Vilar, et al., 1979).

Los efectos del GABA en la secreción de la GnRH y de la expresión genética están mediados por sinapsis directa entre neuronas GABA-érgicas y GnRH. GABA tiene un efecto inhibitorio en las concentraciones del ARNm para la GnRH, los cuales son mediados por el receptor GABA_A. (Gore y Roberts, 1997)

La Acetilcolina (ACh) estimula la secreción de gonadotropinas y la ovulación. La capacidad de la ACh en regular dicha función cambia durante el ciclo estral y presenta un ritmo circádico (Domínguez, et al. 1982). Mediante el uso de implantes de cristales de atropina (antagonista de los receptores muscarínicos) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, se mostró la existencia de una función asimétrica de estos receptores muscarínicos en la ovulación de la rata, la cual cambia durante el ciclo estral (Cruz, et al., 1989). En ratas que ovulan espontáneamente, se observó que implantes de atropina en el hipotálamo lateral anterior altera el ciclo ovulatorio y prolonga la fase del diestro-2 (Benedetti, et al. 1969). En cultivos de células del hipotálamo o de células GT1 (células GnRH inmortalizada), se mostró que la activación de receptores muscarínicos reducen la liberación basal de la GnRH e inhiben el aumento de la proteína G acoplada a AMPc intracelular; mientras que la activación selectiva de los receptores muscarínicos M1 facilita la hidrólisis de la fosfoinositida, lo que resulta en el rápido aumento de la secreción de la GnRH (Krsmanovic, et al. 1998). Estos efectos estimulantes de la ACh sobre la secreción de la GnRH se producen mediante contactos sinápticos (Turi, et al. 2007).

Los axones de las neuronas GnRH finalizan en la eminencia media, lugar donde es liberada, la que al pasar a la sangre del sistema porta de la hipófisis es llevada hasta los gonadotropos de la adenohipófisis, los cuales expresan el receptor de la GnRH (GnRHR).

RECEPTOR A GNRH (GNRHR)

El GnRHR es un receptor con siete dominios transmembranales acoplados a proteína-G, que contiene residuos de cisteína en el primer y segundo pliegue. La formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína estabiliza su forma tridimensional. La unión de la GnRH a su receptor estimula la isoforma β de la fosfolipasa C (PLC- β), lo que resulta en la rápida fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-di-fosfato, (PIP₂), lo que produce un segundo mensajero, el inositol 1, 4, 5-tri-fosfato (IP₃) y diacilglicerol. Mientras el IP₃ activa el flujo de calcio intracelular, el DAG aumenta la concentración de proteína de fosforilación por la activación de la quinasa (PKC) (Anderson, 1996). Esta cascada de señalización resulta en la síntesis y secreción de las gonadotropinas LH y FSH.

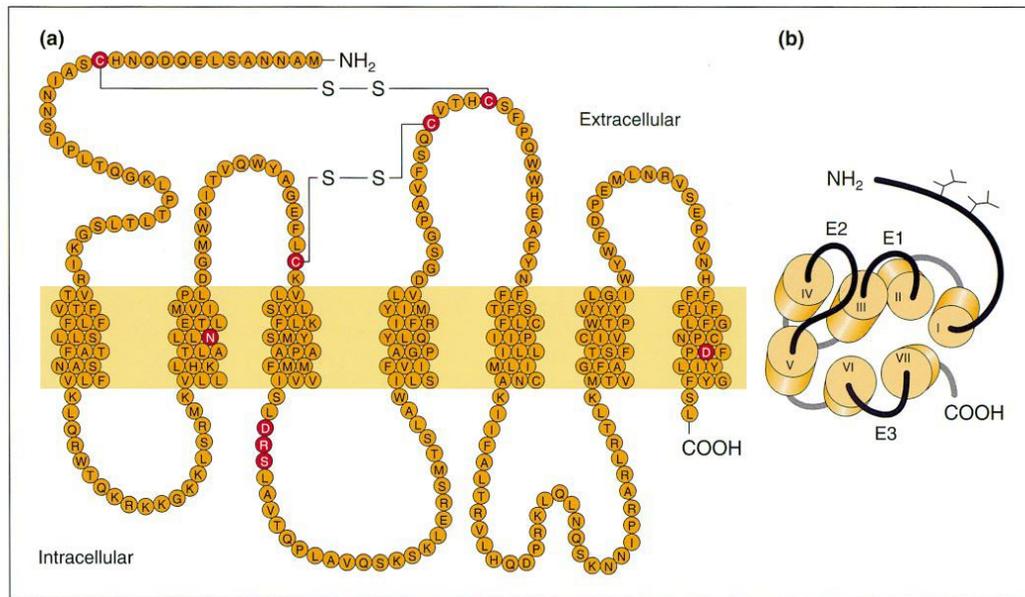


Figura 6. (a) Estructura del receptor de la GnRH que muestra el extremo amino terminal (NH₂), los siete dominios transmembranales glicosilados, tres bucles extracelulares, tres bucles intracelulares, y el extremo carboxilo terminal (COOH). (b) Diagrama tridimensional del GnRHR. (K.A. Eidne et al., 1996)

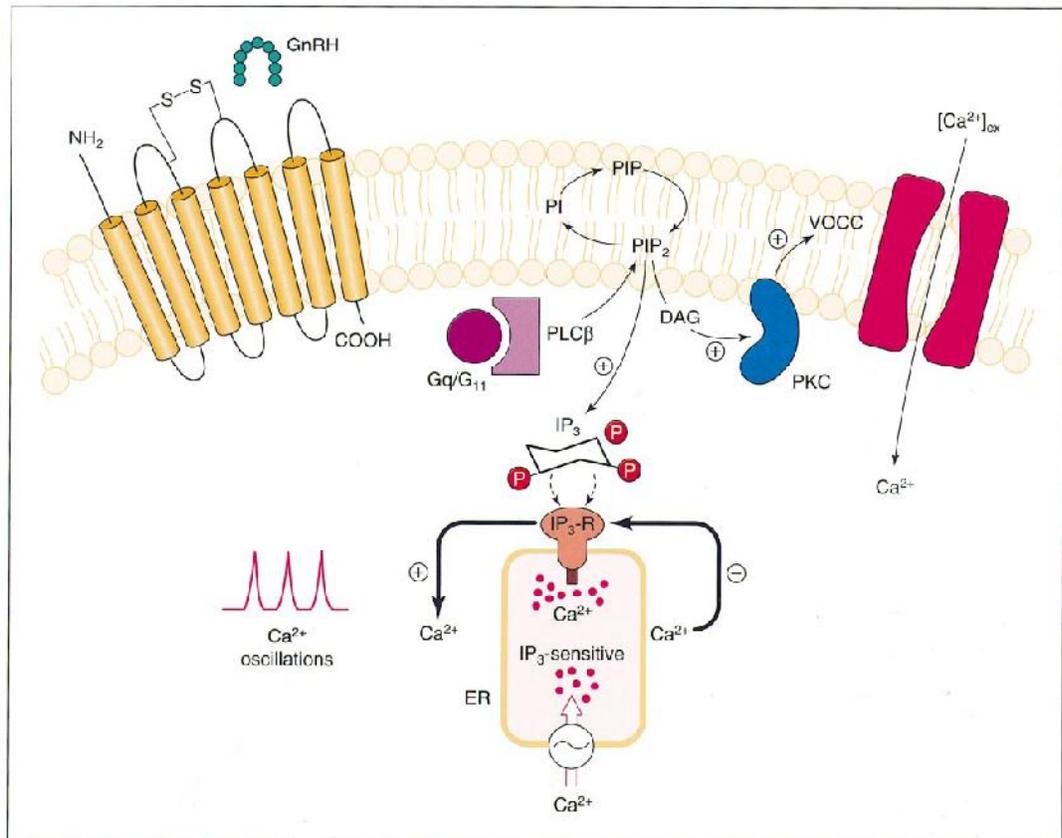


Figura 7. Mecanismo intracelular propuesto por la unión de la GnRH a su receptor en los gonadotropos de la hipófisis. La activación del receptor de la GnRH inicialmente promueve una movilización de inositol-1,4,5-trifosfato dependiente del calcio a partir de inositol-1,4,5-trifosfato sensible a calcio, así como el flujo interno de calcio extracelular por medio de canales de calcio tipo L dependientes de voltaje (K.A. Eidne et al 1996)

La GnRH es degradada por proteólisis en pocos minutos. El gen GnRH1, precursor de la GnRH, se encuentra en el cromosoma 8. Se presume que éste es una entidad muy singular, aun cuando se reportó que esta molécula se ha conservado desde los peces hasta el hombre; diversos estudios muestran que en vertebrados existen al menos cinco variantes, una de ellas se aisló y se identificó a partir de 300,000 cerebros de pollo. La existencia de estas variantes, dio la pauta para conocer la relación estructura-función y permitió que hasta la fecha se hayan sintetizado más de 3,500 análogos de GnRH. En los mamíferos, el decapeptido se sintetiza a partir de una pre-hormona de 92 aminoácidos (Russell y White, 1999).

La estructura química de la GnRH fue descubierta por Guillemin y Schally en 1977 (Mornex, 1978; Susuki, et al. 1995):

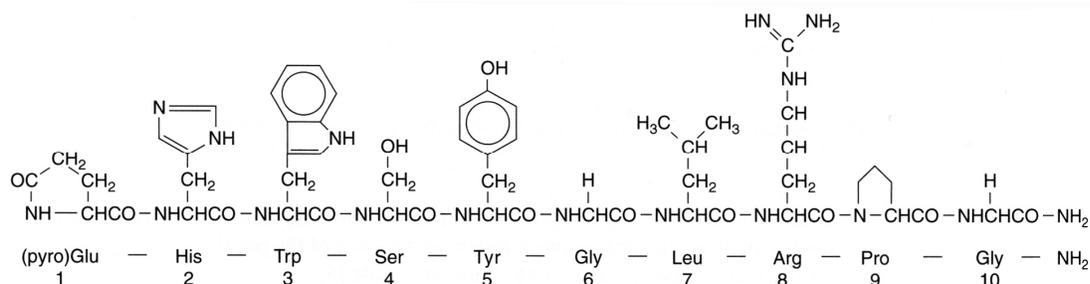


Figura 8. Estructura y composición de la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH), la cual comprende 10 aminoácidos (Ácido Glutámico, Histidina, Triptofano, Serotonina, Tirosina, Glicina, Leucina, Arginina, Prolina y Glicina) junto con su extremo amino (modificado de Prieto, 2002.)

A su vez, los estrógenos y la progesterona estimulan o inhiben la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas en función del día del ciclo que se considere.

PULSOS DE SECRECIÓN DE GnRH

La GnRH es secretada de manera pulsátil (25ng/pulso). En el hipotálamo, existen dos “centros” de regulación pulsátil de la secreción de la GnRH: el “centro tónico”, que incluye al núcleo arcuato, ventro-medial y dorso-medial, y el “centro fásico” localizado en el área preóptica.

El patrón de administración pulsátil de la GnRH a hipófisis de rata en cámaras de perfusión es determinante en la liberación de las gonadotropinas. Por ejemplo, la infusión de GnRH en pulsos de 60 minutos produce pulsos de liberación de LH de magnitud constante, lo que muestra que la secreción pulsátil de GnRH es esencial para que los gonadotropos respondan de manera adecuada a este decapeptido (Figura 9). Por el contrario, la exposición constante de la hipófisis a la GnRH provoca que la hipófisis no responda a subsecuentes administraciones de GnRH, por lo que se altera la liberación de LH. (Belchetz, et al. 1978)

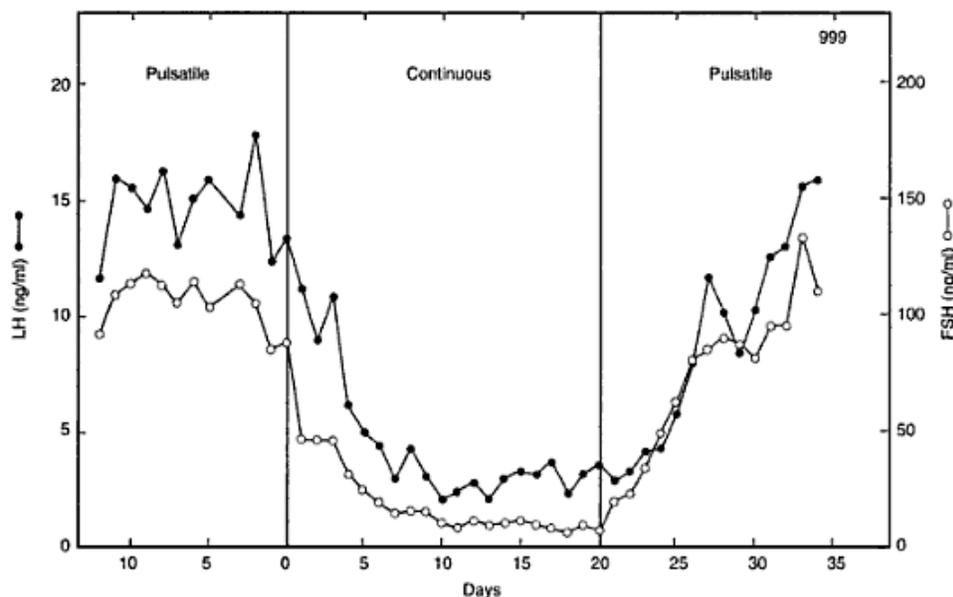


Figura 9. Supresión de la concentración plasmática de la hormona luteinizante (LH) y foliculo-estimulante (FSH) después del inicio (día cero) de una infusión continua de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (1 μ L/min) en *Mono rhesus* ovarioctemizado con una lesión por radiofrecuencia en el hipotálamo. La secreción de las gonadotropinas se reestabiliza por la administración intermitente del decapeptido (1 μ L/min por 6 minutos cada hora). La inhibición de la liberación de las gonadotropinas fue revertida después de la administración de modo intermitente de la GnRH (Belchetz *et. al.*, 1978)

Los efectos de la frecuencia de los pulsos de GnRH sobre la expresión de los genes de la subunidad- α o β de la LH (LH β) o de la FSH (FSH β), así como en la secreción de las mismas han sido bien caracterizados. En la rata, la cantidad de ARNm para LH β y FSH β depende de los pulsos de GnRH que activen a la hipófisis. Los pulsos de GnRH a frecuencias altas (cada 30 minutos) estimulan la biosíntesis y liberación de LH. Mientras que pulsos a frecuencias bajas (2 horas) estimulan la biosíntesis y liberación de FSH (Figura 10). (Katt, et al. 1985)

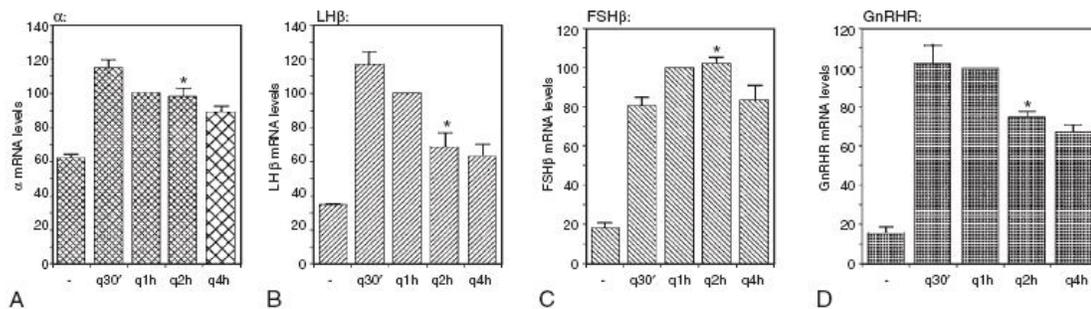


Figura 10. Efectos de la frecuencia pulsátil de la GnRH en la hipófisis de la rata. Sub-unidad α de la glicoproteína (A), sub-unidad β de la hormona luteinizante (B), sub-unidad β de la hormona foliculo-estimulante (C), receptor de la GnRH (D), las concentraciones del ARNm se muestran para cada frecuencia de GnRH. (Kaiser, U. B., et al. 1997)

La frecuencia en los pulsos de GnRH varía entre especies, sexo, edad y circunstancias fisiológicas. La frecuencia de los pulsos de GnRH varía también en rango, tan rápidos como 1 pulso cada 15 minutos en roedores ovariectomizados, o lentos como 1 pulso cada 6 horas. (Levine, et al. 1991)

La secreción pulsátil de GnRH también estimula la expresión del ARNm para el GnRHR, lo que se traduce en aumento de la cantidad del GnRHR en la superficie de las células. *In vitro*, células hipofisarias de la rata fueron tratadas cada hora con pulsos de GnRH, lo que resultó en el incremento de la cantidad de ARNm del GnRHR. En la rata cíclica de 4 días, la secreción fásica o preovulatoria de gonadotropinas hipofisarias se da en la tarde del día del proestro (Butcher, et al. 1974). La liberación fásica de LH dura entre 6 y 8 horas, y principalmente esta bajo el control de la GnRH (Bauer-Dantoin, et al. 1993). La liberación fásica de FSH también comienza en la mañana del proestro, pero ésta continúa durante el estro, es decir, a la mañana siguiente. El patrón bifásico de la secreción preovulatoria de la FSH, podría estar regulado por la GnRH y después por la secreción de inhibina (Bauer-Dantoin, et al. 1993), (Rivier, et al. 1989), (Woodruff, et al. 1989).

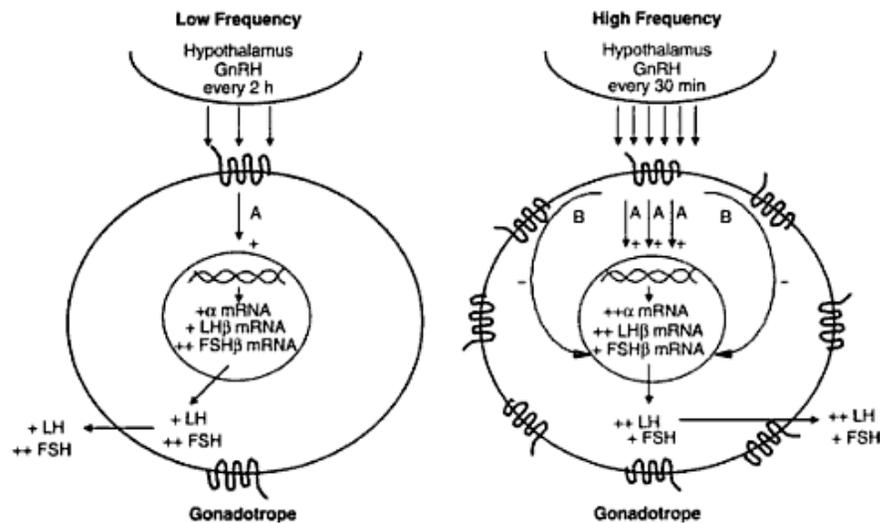


Figura 11. Mecanismo de la regulación diferencial de las subunidades α y β de las gonadotropinas por la GnRH a bajas y altas frecuencias. Cuando la frecuencia de los pulsos de liberación de la GnRH es baja, la concentración de receptores de GnRH es baja. Cuando la frecuencia de los pulsos es alta, la superficie de la célula presenta una alta concentración de receptores a GnRH (Jeong, 2006)

Durante el proestro, tanto el ARNm de LH β como de la FSH β aumentan durante la secreción preovulatoria y aunque el incremento en la cantidad de ambos mensajeros es paralelo, hay diferencias en el momento de su inicio y su duración. El incremento de la subunidad LH β comienza a las 14:00 (2 horas antes de la liberación de LH), alcanzan sus concentraciones máximas a las 17:00 (aumento 2.5 veces), para después regresar a su estado basal a las 22:00 horas. Por el contrario, el incremento del ARNm FSH β no se da, sino hasta las 20:00 horas del proestro, 2 horas después del incremento inicial en la FSH circulante. El incremento máximo (4 veces en magnitud) en el ARNm para la FSH β ocurre en la mañana del estro (02:00 horas), el cual retorna a valores basales, 6 horas después (08:00 horas) del valor "pico". Un incremento selectivo en la concentración de ARNm para la FSH puede ser observado en la mañana del diestro-1 cuando no se observan incrementos medibles en la concentración de FSH. En la mañana del diestro-2 aumenta la concentración de LH, la cual no está asociada con el aumento medible en la secreción de LH (Zmeili, et al. 1986).

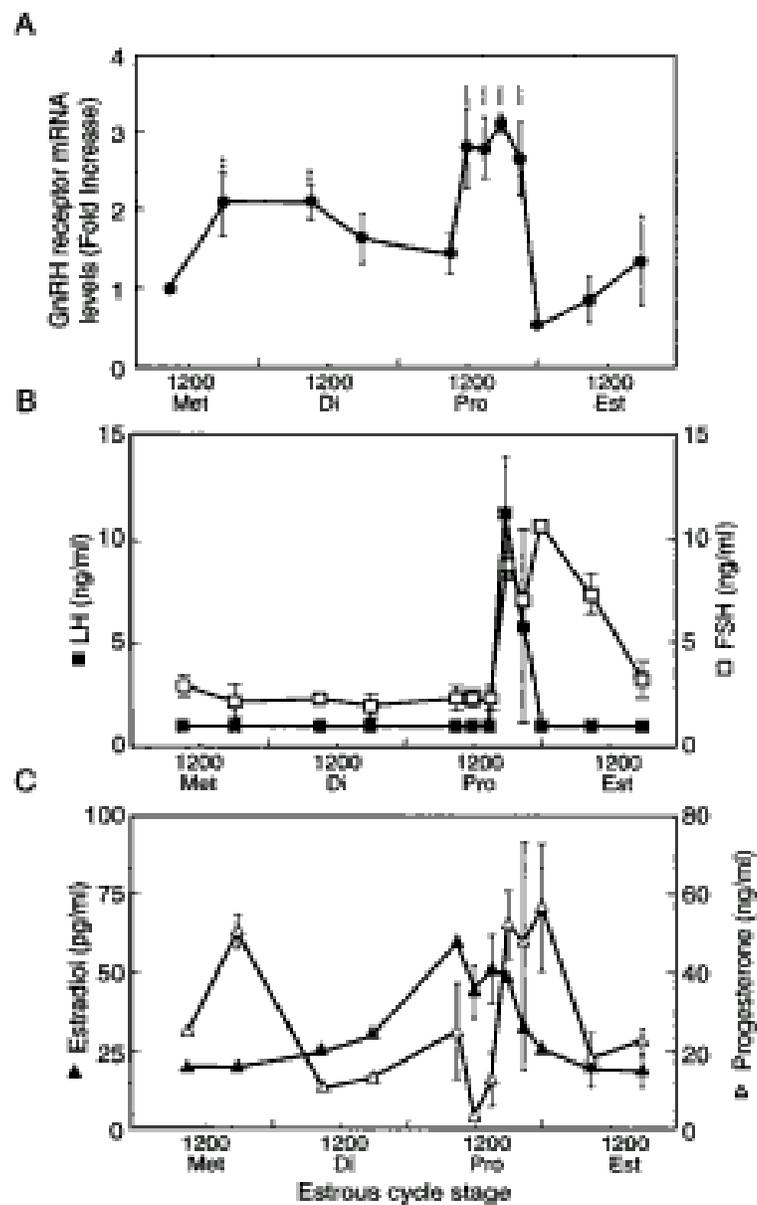


Figura 12. Cambios en la expresión del ARNm del receptor a GnRH, gonadotropinas y esteroides durante el ciclo estral. Concentraciones de GnRH (A), LH y FSH (B), estradiol y progesterona (C). Met, metaestro (diestro-1); Di, diestro-2; Pro, proestro; Est, estro. (Bauer, et al. 1993)

El estradiol estimula de manera selectiva la transcripción del gen de la LH β , la síntesis y la acumulación de LH en la hipófisis. Los esteroides en los gonadotropos estimulan el acoplamiento del GnRHR a segundos mensajeros. Tanto la progesterona como el estradiol actúan inhibiendo la secreción de GnRH.

Altas concentraciones de progesterona inhiben la transcripción genética de FSH β en células de la hipófisis en ovinos. La progesterona actúa de manera selectiva al estimular la expresión del ARNm de la FSH β .

El papel de la testosterona sobre la expresión del gen de la FSH β es complejo. La testosterona inhibe la expresión de la FSH β al actuar directamente en la hipófisis (Kumar y Low, 1995). En la rata, dosis bajas de testosterona inhiben la expresión de ARNm para FSH β , al bloquear la liberación de la GnRH. Por el contrario, dosis altas estimulan la expresión del ARNm para la FSH β , al actuar directamente en la hipófisis. La testosterona puede incrementar las concentraciones de ARNm para la FSH β tanto en ratas machos como en hembras, lo que ha llevado a sugerir que la regulación post-transcripcional del ARNm de la subunidad β de esta gonadotropina puede ocurrir en ambos sexos (Dalkin, et al. 1992).

La activina actúa de manera independiente a la GnRH y puede incrementar la secreción de FSH en células de la hipófisis (Schwall, et al. 1988). La activina también regula la expresión genética de la FSH β mediante un mecanismo no transcripcional, al estabilizar el ARNm de la FSH β y al aumentar la respuesta del gonadotropo a la GnRH (Carrol, et al. 1991), (Attardi y Winters, 1993). La activina A incrementa la expresión genética del GnRHR y su síntesis en la hipófisis de la rata.

El estradiol, la progesterona, los andrógenos y los glucocorticoides también regulan la expresión genética del GnRHR. (Knobil, 2005)

Además de los neurotransmisores antes mencionados, hormonas como la inhibina y la activina (factores no esteroideos de las gónadas) regulan la liberación de LH y FSH. La inhibina previene la “up regulation” de los receptores al bloquear la estimulación de la síntesis de receptor GnRH producida por la misma hormona, mientras que la activina estimula la síntesis del receptor a GnRH. (Prieto-Gomez y Velazquez-Paniagua, 2002)

La forma pulsátil de secreción de la GnRH, es decir de estimular a bajas dosis o de suprimirlas a altas dosis, ha sido utilizada para distintos propósitos, incluyendo la inducción de la ovulación y la espermatogénesis, el tratamiento de la pubertad precoz, la endometriosis, diferentes tipos de cáncer (principalmente próstata y mama), así como para una gran variedad en uso veterinario capacidad de la GnRH para las funciones reproductoras (Conn, 1986), (Jennes y Conn, 1986) (Janovick y Conn, 1993)

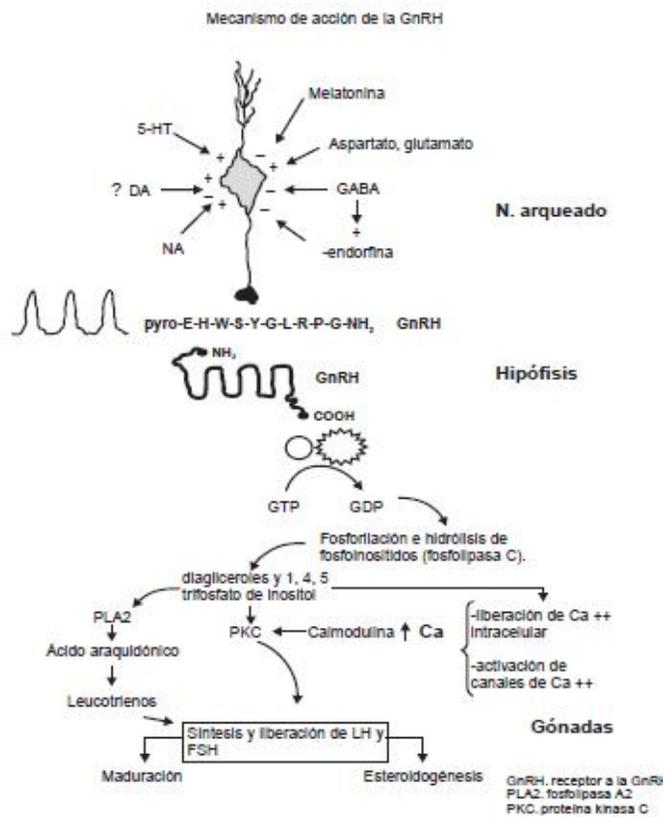


Figura 13. Mecanismo de acción de la GnRH (Prieto, 2002)

SÍNTESIS DE LA GNRH DURANTE EL CICLO ESTRAL

En ratas hembras y otras especies animales, la GnRH liberada mediante pulsos cambia durante el ciclo ovulatorio. Por ejemplo, durante la fase folicular de la oveja, la GnRH se libera por medio de un patrón de alta frecuencia y baja amplitud. En contraste, la frecuencia de los pulsos se reduce y la amplitud aumenta durante la fase lútea del ciclo.

El estradiol y la progesterona ejercen un efecto llamado “feedback negativo” mediante rutas divergentes, y así, la magnitud de este efecto durante la fase lútea o folicular en el ciclo, determina el patrón característico de los pulsos de GnRH.

El mayor cambio durante la liberación de la GnRH sucede entre el diestro-1 y el diestro-2, durante el inicio de la oleada preovulatoria de gonadotropinas. Gran cantidad de GnRH es liberada debido al incremento en la cantidad de estrógeno secretado por los folículos maduros, lo que estimula la secreción preovulatoria de LH y FSH, los principales activadores de la ovulación (Levine, 2000).

FUNCIONES DE LA GNRH SOBRE LA HIPÓFISIS

Los primeros estudios que intentaron elucidar el mecanismo a través del cual se realiza la liberación de LH estimulada por GnRH, sugirieron la participación de los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP como los segundos mensajeros en la transducción de esta señal. Sin embargo, ahora es claro que el cAMP no es el segundo mensajero en la liberación de LH estimulada por GnRH, pero este nucleótido sí parece tener un papel importante en la síntesis de esta hormona. Diversas evidencias, han mostrado que el calcio (Ca^{2+}) intracelular es el segundo mensajero en la liberación de esta hormona, ya que éste estimula la liberación continua de LH y FSH en respuesta a GnRH. Además, el tratamiento con bloqueadores de canales de Ca^{2+} como el verapamil y el metoxinerapamil bloquean su liberación. (Prieto-Gomez y Vazquez Paniagua, 2002)

El GnRHR conserva residuos de cisteína en el primer y segundo bucle extracelular, para estabilizar la configuración tridimensional del receptor hay una formación de puentes disulfuro entre estos residuos. Se sabe que si estos residuos llegan a mutar, la unión del receptor a la GnRH se pierde (Cook y Eidne, 1997).

La secuencia de los aminoácidos Asp-Arg-Tyr normalmente se encuentra en la región proximal de la membrana del segundo bucle intracelular de una cantidad de receptores acoplados a proteína G. La mutación de estos residuos normales a Tyr no alteran el acoplamiento a proteína G, pero incrementa la afinidad del receptor

FUNCIONES DE LA LH Y LA FSH EN EL OVARIO

La FSH y la LH son gonadotropinas producidas y liberadas por la hipófisis anterior, de donde se vierten al torrente sanguíneo, y de esta forma llegan al ovario. Ambas hormonas, favorecen la maduración gonadal y la esteroidogénesis, capacitando al organismo para que se pueda reproducir.

En la hembra, la FSH estimula el crecimiento de los folículos y la actividad de la enzima aromatasa, que convierte los andrógenos en estrógenos. La LH estimula la síntesis de andrógenos en las células de la teca y la ruptura del folículo, lo que permite la liberación del ovocito, fenómeno conocido como ovulación. Las células del folículo que ovuló, por efecto de la LH, se transforman en células luteínicas, que secretan progesterona y se transforman en el cuerpo lúteo (Figura 14). (Prieto-Gomez y Vazquez-Paniagua, 2002)

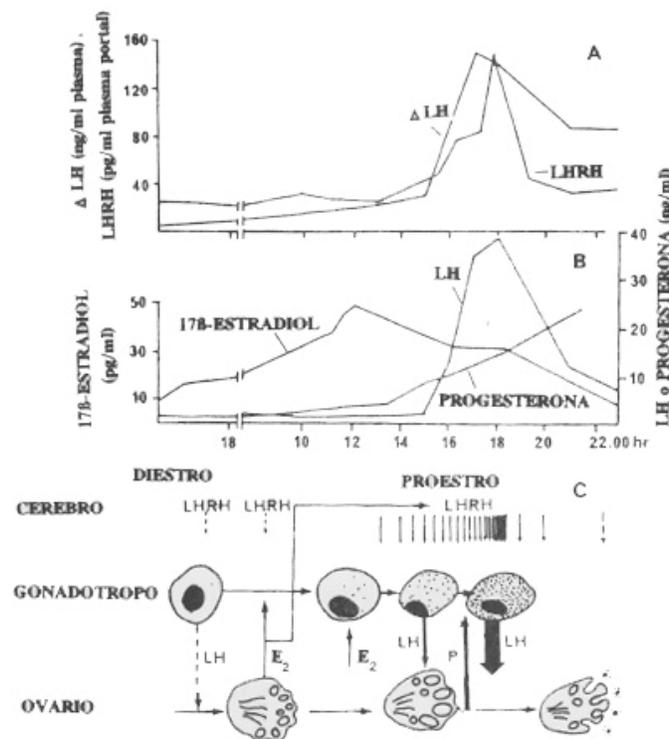


Figura 14. Representación de la "cascada" de eventos neuroendócrinos del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, durante los días del diestro-2 y proestro del ciclo estral de la ratona (Fink, 1988)

FUNCIONES DE LA LH Y LA FSH EN EL HIPOTÁLAMO

En ratas cíclicas, las concentraciones plasmáticas de estradiol son basales durante el estro. En el diestro-1, la concentración plasmática comienza a aumentar hasta que en la mañana del proestro alcanza un “pico” máximo de concentración. La concentración plasmática de testosterona y androsterona es similar a la del estradiol. El modelo similar de secreción de andrógenos y estrógenos sugiere que ambas clases de hormonas se originan del mismo órgano, el ovario, de tal forma que su síntesis, secreción y mecanismos de regulación están interrelacionados. (Dupon y Kim, 1973), (Gay y Tomacari, 1974).

El periodo pre-ovulatorio del ciclo estral se caracteriza por el crecimiento de los folículos que están destinados a ovular en ese ciclo y por el aumento preovulatorio de la secreción de estrógenos, FSH, LH y progesterona.

Durante gran parte del ciclo estral, el estrógeno inhibe la secreción de las gonadotropinas, sin embargo, a la mitad del ciclo, cambia al ejercer un efecto estimulante potente llamado también “feedback positivo”, que provoca la secreción preovulatoria de ambas gonadotropinas, y por ende la ovulación (Shupnik, 1996).

Dado que la neurona GnRHérgica expresa el RE β , pero no el RE α , es posible que el estrógeno actúe de manera directa al ejercer efecto sobre los RE β y de esta forma estimular la síntesis de grandes cantidades de GnRH (Herbison, 2006) y (Pape, et al. 2001); (Petersen, et al. 2003). Sin embargo, varias líneas de investigación han demostrado que los efectos del estrógeno pueden ser transmitidos a las neuronas GnRH-érgicas de manera indirecta utilizando neuronas que expresan a los RE α o RE β , células de la glía o endoteliales (Rage, et al. 1997); (Smith y Jennes, 2001); (Prevot, 2002).

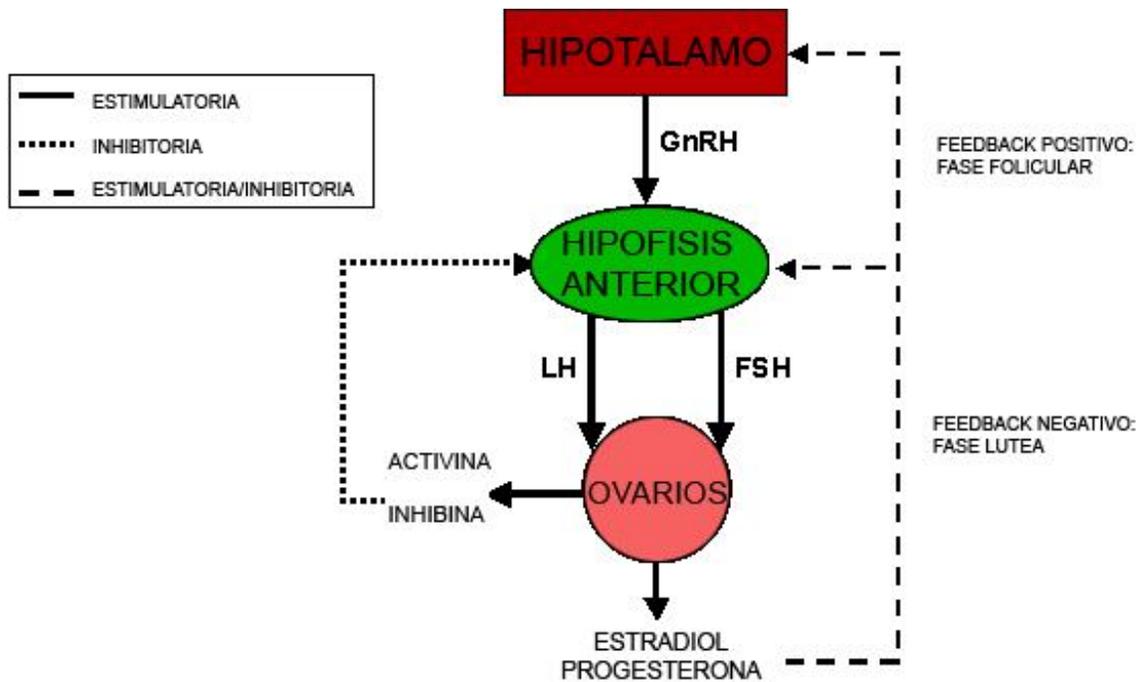


Figura 15. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario en el cual se describe la ruta estimulante e inhibitoria por la cual la GnRH es liberada, la que al estimular a la hipófisis anterior estimula la liberación de LH y FSH. A su vez, éstas actúan sobre el ovario al regular la secreción de estradiol, progesterona, activina e inhibina, estas dos últimas hormonas se encargan de activar o estimular en la hipófisis anterior la secreción de FSH, en función de las concentraciones de estrógenos (modificado de Comparato, M. R. 2000)

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroideas pertenecen al grupo de hormonas derivadas del colesterol. El colesterol posee un núcleo químico básico, el ciclopentanoperhidrofenantreno o “núcleo esteroide”, el cual está constituido por 17 átomos de carbono básico, dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono (ciclobencénicos) denominados A, B, C y un anillo de cinco carbonos (ciclopentano) denominado D, una cadena de ocho átomos de carbono en el carbono 17, dos metilos en posición 10 y 13, un doble enlace Δ^5 y un grupo hidroxilo en el carbono 3 (Figura 16) (O'Malley y Strott, 2001).

El colesterol es una molécula hidrófoba, al presentar una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción no polar, formada por el anillo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos (O'Malley y Strott, 2001).

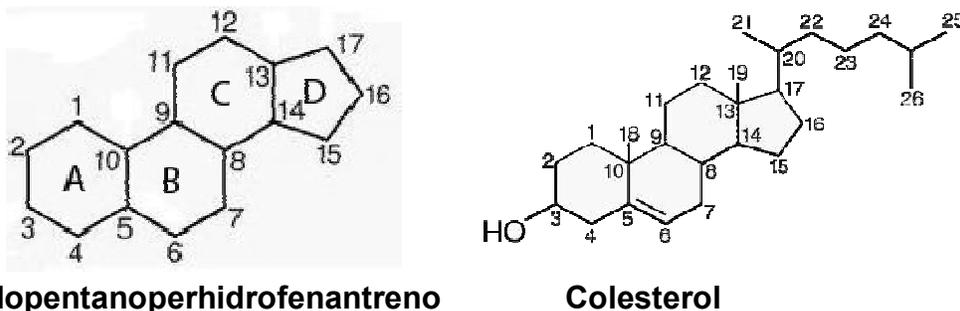


Figura 16. Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno o núcleo esteroide y del colesterol (modificado de Sánchez-Criado, 2003)

Las células obtienen colesterol por medio de tres fuentes: 1) del plasma donde el colesterol es transportado unido a lipoproteínas de alta y baja densidad, 2) del sintetizado por la célula a partir de acetato producto del ciclo de Krebs y 3) de ésteres de colesterol acumulados en el citoplasma de esa célula (O'Malley y Strott, 2001).

Las hormonas esteroideas se clasifican según su estructura química y su actividad biológica en: andrógenos y estrógenos, los cuales tienen un núcleo esteroide compuesto de 21 átomos de carbono, agrupados en cuatro anillos aromáticos, tres ciclohexanos y un ciclopentano (Brown, 1999).

El andrógeno con más actividad biológica es la testosterona, la cual tiene un núcleo esteroide androstano, que es un compuesto orgánico con 19 átomos de carbono, con un átomo de oxígeno con doble enlace en la posición C3 y un grupo hidroxilo en la posición C17 (Brown, 1999), (Burris, 1999)

Los estrógenos comprenden la estrona y estradiol; éste último es el de mayor actividad biológica. El estradiol tiene un núcleo de estrano que es un compuesto que tiene 18 átomos de carbono, tiene un grupo hidroxilo en la posición C3 como en C17 (Smith, 1999)

PROGESTERONA

Generalidades de la progesterona

La progesterona (P_4) (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides, su nombre se deriva del latín: *pro*: a favor y *gestare*: llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción.

Estructura química

La estructura química de la P_4 y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es el hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21) (Figura 17). Al igual que otros esteroides, la progesterona se compone de cuatro hidrocarburos cíclicos interconectados, contiene cetona y grupos funcionales oxigenados, así como dos metilos.

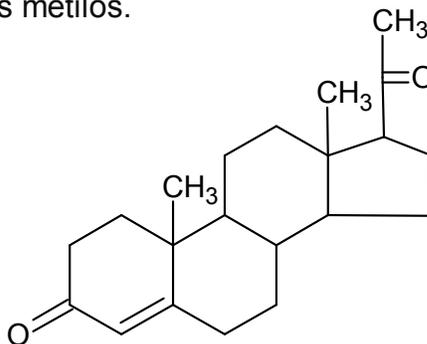


Figura 17. Estructura química de la progesterona (Gore-Langton, 1988)

Síntesis de la progesterona

La P_4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplasmático liso del cuerpo lúteo, durante el ciclo menstrual (Hsueh, et al 1984), (Hutchison, et al. 1986), otros órganos donde también se ha demostrado su síntesis son la corteza adrenal, la placenta, el testículo y el cerebro (Zwain, et al. 1999) (Ukena y Kohchi, 1999)

La síntesis de la P_4 se inicia con la pregnenolona, un derivado del colesterol. Esta conversión se lleva a cabo en dos fases. El grupo 3-hidroxilo se convierte en un grupo ceto y el doble enlace se traslada al C-4 de C-5 (Figura 18)

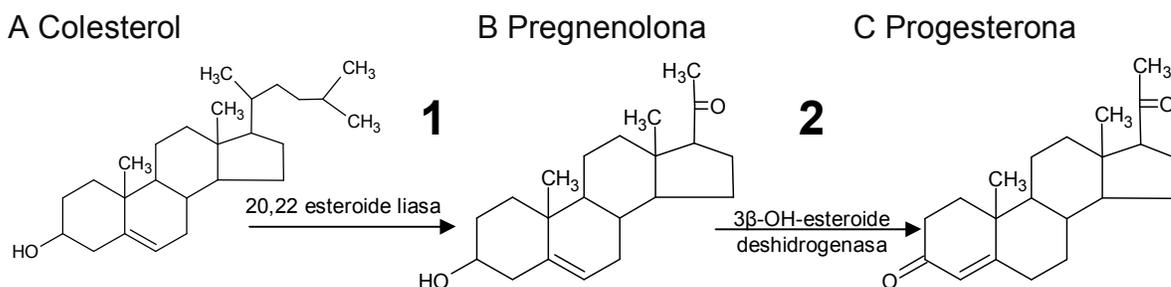


Figura 18. Biosíntesis de la P_4 . La biotransformación del colesterol a P_4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 por medio de la enzima 20,22 esteroide liasa (1), b) la oxidación del grupo alcohol, en el C-3 por medio de la enzima 3β-OH-esteroide deshidrogenasa (2) y c) la migración del doble enlace del anillo B al anillo A. (Gore-Langton, 1988)

Acciones generales de la progesterona

La P_4 participa en muchas de las actividades biológicas de diferentes tejidos (tabla 1). Sus efectos pueden ser estimulantes, como en el caso de la liberación de la GnRH, de la dopamina, en la inducción de la lordosis que es una conducta de receptividad sexual durante la cual la hembra flexiona su espina dorsal en forma de arco al ser montada por el macho para darle acceso a la cavidad vaginal; en la síntesis de uteroglobina, en la reacción acrosomal y en el fluido de Ca^{2+} en el espermatozoide. Los efectos de la P_4 también pueden ser inhibitorios, como en la contracción uterina.

Tabla 1. Acciones fisiológicas de la progesterona

| Tejido | Función |
|--------------|--|
| Útero/Ovario | Liberación del ovocito Facilitación de la implantación Mantenimiento del embarazo Estimulación de la regeneración del estroma |
| Cerebro | Regulación de la sexualidad Regulación de la excitabilidad neuronal y aumento del sueño Neuroprotección |

En ratas adultas, la progestina predominante que es secretada dentro del ovario durante el ciclo estral es la 20 α -hidroxipregn-4en-3-ona (Eto, et al 1962), (Uchida, et al. 1969), también conocida como 20 α -hidroxiprogesterona (20 α -OH-P). Esta progestina (Figura No. 19), es un metabolito de la progesterona, y su síntesis es catalizada por la enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Wiest, et al. 1963). Hay dos “picos” máximos de concentración en la secreción tanto de la 20 α -OH-P como de la progesterona durante el ciclo estral. El primer “pico” se da durante la tarde del diestro-1, y ambos esteroides son secretados por los cuerpos lúteos, este incremento resulta del efecto producido por la LH en los folículos preovulatorios que ovularon y se transformaron en cuerpos lúteos. El segundo “pico” se presenta durante la tarde ó noche del proestro. (Eto, et al. 1962), (Hashimoto, et al. 1968) (Freeman, 1994)

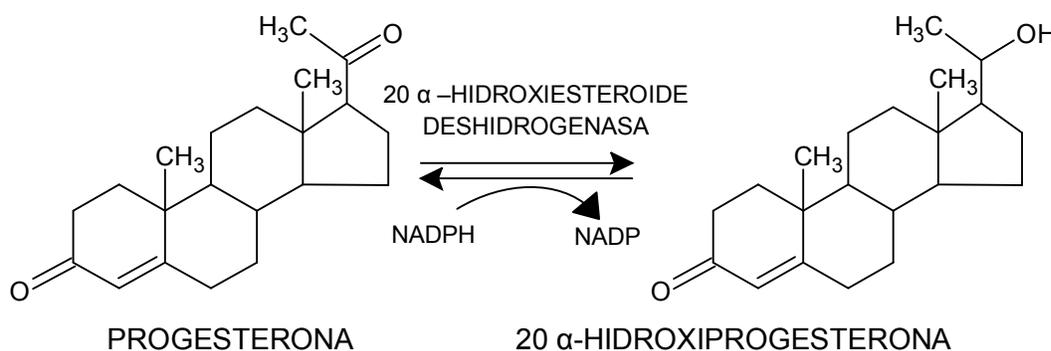


Figura 19 Destino de la progesterona sintetizada a partir de un nuevo cuerpo lúteo de la rata. Durante el ciclo estral el cuerpo lúteo nuevo contiene altas concentraciones de 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esta enzima convierte la progesterona a 20 α -hidroxiprogesterona.

ESTRÓGENOS

Los estrógenos son hormonas ampliamente distribuidas en el reino animal, que están presentes en hembras y machos. Los estrógenos estimulan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de las células que los reconocen (Guyton y Hall, 2001) (O'Malley y Strott, 2001).

En la hembra, la principal fuente de estrógenos son los ovarios, sin embargo, la piel, el hígado, la médula ósea, los tejidos adiposo, nervioso, óseo y muscular y las glándulas adrenales pueden aromatizar andrógenos en estrógenos; también la placenta secreta esta hormona.

Los ovarios secretan 17β -estradiol y pequeñas cantidades de estrona. La mayor proporción de estrona se sintetiza en otros tejidos a partir de andrógenos: androstendiona y testosterona, secretados por las adrenales y las células de la teca ovárica. El estriol es el producto oxidativo del estradiol y de la estrona, cuya conversión se realiza en el hígado y la placenta (Figura 20) (Brown, 1999).

En comparación con el 17β -estradiol y la estrona, el estriol es un estrógeno débil. La potencia estrogénica evaluada por el aumento de peso de una rata castrada, del 17β -estradiol es 12 veces mayor que la de la estrona y 80 veces que la del estriol. Considerando estas potencias relativas, el efecto estrogénico del 17β -estradiol es mayor que el de los otros estrógenos juntos. Por esta razón se considera que el 17β -estradiol es el principal estrógeno (Guyton y Hall, 2001) (Smith, 1999).



Figura 20. Estructura química de los estrógenos (modificado de Guyton, 2002)

Estructura química

El 17β -estradiol conserva el núcleo esteroide de 18 carbonos, por lo que se forma un anillo fenólico A (anillo aromático) con un grupo hidroxilo en la posición C3 y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición C17 del anillo D (Figura 16). El anillo fenólico A es la principal característica estructural de la cual depende la unión selectiva y la alta afinidad a receptores de estrógenos (Sanchez-Criado, 2003) (Smith, 1999).

Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario

En la síntesis de estradiol participan dos células, una que a partir del colesterol sintetiza testosterona o androstendiona y otra con la capacidad de transformar esta hormona en un estrógeno. La conversión de colesterol se logra por modificaciones estructurales que incluyen hidroxilaciones, pérdida de las cadenas laterales y la transformación del anillo A (con un doble enlace característico de los andrógenos) en el anillo aromático (fenólico) de los estrógenos (O'Malley y Strott, 2001).

En las especies animales que se han estudiado, el folículo ovárico es el sustrato anatómico más importante para la síntesis del 17β -estradiol. La biosíntesis de estrógenos en esta glándula por la teoría de “las dos células” o “doble célula”, en la cual se plantea la participación combinada de las células de la teca interna y las células de la granulosa (Figura 21) (Brown, 1999) (Sanchez-Criado, 2003).

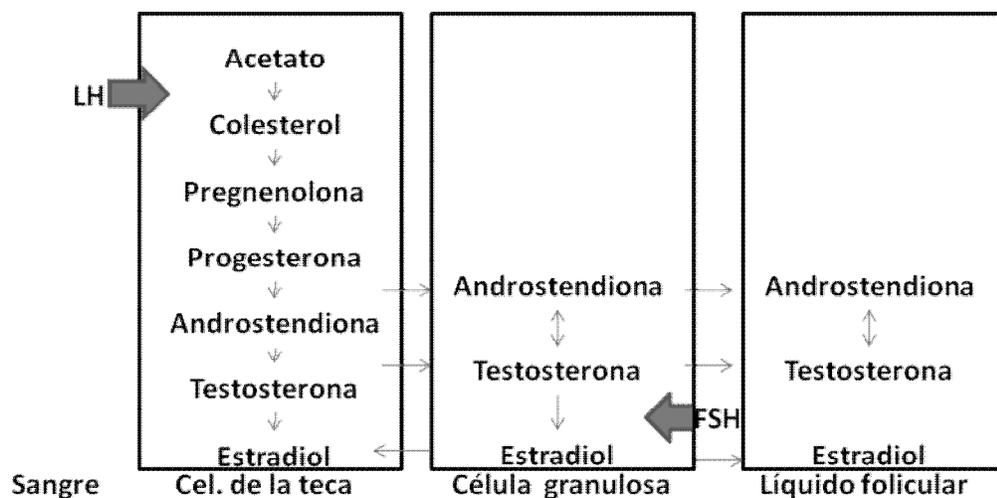


Figura 21: Biosíntesis de esteroides en los compartimentos del ovario

METIL-PIPERIDINO-PIRAZOL (MPP)

Los fármacos selectivos a estrógeno han sido creados para especificar y descifrar las funciones de los estrógenos en los órganos “blanco”. Estos fármacos moduladores tienen actividad agonista o antagonista específica al RE α o β (Duax, et al., 1985)

Los pirazoles, tienen alta afinidad para los RE, aunque se unen con mayor afinidad al RE α que al RE β (Stauffer, et al. 2000); (Sun, et al. 1999). Por ello, y a falta de antagonistas selectivos para el RE α , Sun y colaboradores (2002) desarrollaron compuestos que antagonizan con este receptor y no con el RE β , al adicionar una cadena lateral a ligandos pirazólicos [agonistas selectivos para el RE α (BSC- pirazoles)], que substituye a la típica encontrada en agentes antiestrógenos como el tamoxifen y el raloxifen. Entre estos BSC-pirazoles, el más selectivo para el RE α es el metil-piperidino-pirazol (MPP).

La información acerca de los efectos del bloqueo de los RE α sobre la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es escasa al utilizar el MPP. Sin embargo, se sabe que el MPP incrementa el porcentaje de apoptosis en células del endometrio humano mantenidas en cultivo y en la línea celular del endometrio de ovino (oLE), cuando se compara con los efectos del estradiol. En ratones ovariectomizados, la administración de MPP aumenta el peso del útero y la proliferación del endometrio (Davis, et al. 2006). En ratas ovariectomizadas a los 15 días de la castración, la inyección de MPP por 6 días consecutivos provoca disminución de la concentración de LH en la hipófisis y en el suero (Garrido-García, et al. 2007). Los autores sugieren que la acción de los estrógenos sobre la secreción de LH en la rata es ejercida por el RE α . En ratas adultas cíclicas, la inyección subcutánea de MPP en la mañana del diestro-1 provocó aumento del número de ovocitos liberados y disminución del peso de los ovarios, lo que se acompañó de un menor número de folículos, reflejo de la disminución del número de folículos pequeños sanos y aumento de los medianos en los animales sacrificados a las 9:00 y 17:00 horas del proestro (Cabrera, 2009).

El MPP a dosis de 25 a 150 μ g aumenta el peso húmedo del útero, pero no de la forma en que lo hace el 17 β -estradiol, ya que éste provoca efectos pleiotrópicos dentro del útero, estos efectos incluyen un aumento en el peso húmedo del útero, y diferenciación en el epitelio luminal y glandular, simulación de transcripción y translación de una variedad de productos genéticos que regulan la progresión del ciclo celular, hiperemia, edema del estroma e inhibición del agua, angiogénesis, incorporación de células inmunes y morfología endometrial (Dickson y Stancel, 2000)

ESTRUCTURA

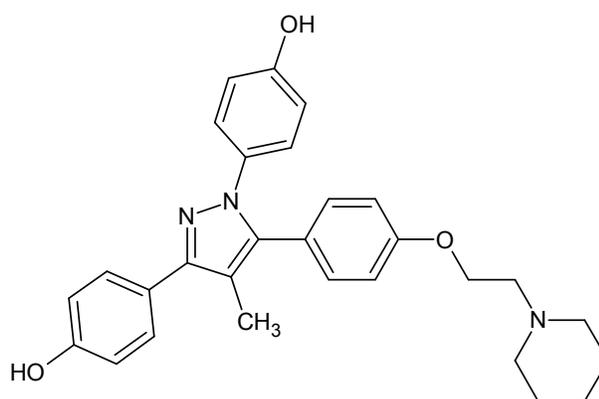


Figura 22. Metil-piperidino-pirazol (MPP) (Zhou, et al., 2009)

RE α =12 \pm 2% Valor de afinidad relativa de enlace (estradiol=100%)

Peso molecular de 469.574 g/mol

Densidad de 1.22 g/mL.

TWEEN 20

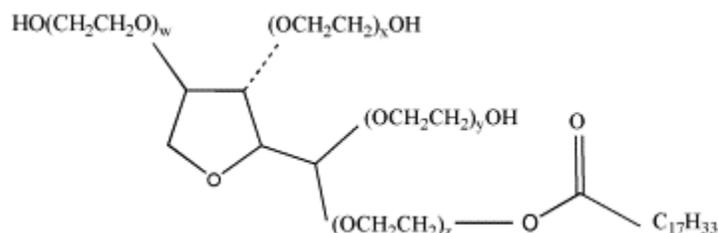


Figura 23. Estructura del Tween 20® en donde $w + x + y + z = 20$. (Wenger, et al., 2005)

Nombre común: Tween 20®

Otros nombres: Polisorbato 20, PEG (20) sorbitan monolaurato

Formula condensada: C₅₈H₁₁₄O₂₆

Masa Molecular: 1227.54 g/mol

Densidad: 1.1g/mL

Punto de ebullición: >100°C

ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

El polisorbato 20 (comercialmente conocido como Tween 20®) es un surfactante no iónico que se utiliza principalmente en la fabricación de cosméticos, productos del cuidado de piel, en alimentos y productos farmacéuticos. El polisorbato se compone de un grupo central sorbitán con cuatro cadenas de óxido de polioxietileno de lado (Figura 23), cuando estas cadenas se esterifican con un ácido oleoso y con ácido láurico dependiendo de la longitud variable de las cadenas, pueden obtener 1500 estructuras posibles. Ya que si las cadenas de polioxietileno son más cortas se forman agregados muy grandes y por tanto la solución es muy viscosa.

En el desarrollo biofarmacéutico, el Tween 20® se puede usar durante la purificación y la formulación para aminorar la adsorción de superficie, en las formulaciones líquidas el Tween20® se agrega para aminorar la absorción de la proteína a superficies y mantiene la concentración a una distancia definida durante un proceso de purificación, tal como un paso de ultrafiltración o cromatografía.

La dosis oral reportada de Tween 20® para ratas adultas es de > 30ml/Kg y la intravenosa de 0.7ml/Kg, por su baja toxicidad el Tween 20® se ha considerado bastante seguro para la preparación de alimentos y productos farmacéuticos. (Bartsch, et al., 1976)

Sin embargo los detergentes no iónicos también se utilizan para la solubilización de membranas y como un medio solvente para proteínas de membrana (Figura 24), generalmente la cantidad de detergente óptima para cierta proteína de membrana o membrana se tiene que encontrar empíricamente y puede depender del tipo del experimento que uno quiera hacer.

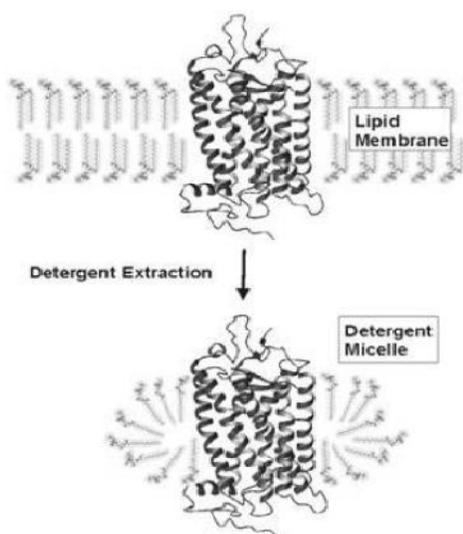


Figura 24 Solubilización de proteínas por detergentes no iónicos. (Helenius, et al., 1979).

Los detergentes no iónicos no poseen grupos cargados. El carácter hidrófilo de estos detergentes se debe al grupo hidroxilo, disuelve los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína, mientras que las interacciones proteína-proteína no resultan afectadas. De este modo se conserva la estructura nativa de las proteínas. Además, el detergente sustituye a los lípidos, que normalmente están unidos a la parte hidrófoba de las proteínas, con lo que crean un entorno de tipo lípido y pueden estabilizar proteínas solubilizadas.

Es importante tener presente que los lípidos y proteínas de una membrana nativa actúan recíprocamente uno con el otro de una manera compleja que diferirá con todo detalle de membrana a membrana.

Estudios han establecido que el Tween 20® por ser un detergente no iónico es usado para estudiar la estructura de las subunidades de proteínas de membrana y las interacciones de proteínas de membrana con estructuras externas, ya que no desnaturalizan a las proteínas porque débilmente desnaturalizan y no alteran la carga de las proteínas a las que se unen (Figura 25).

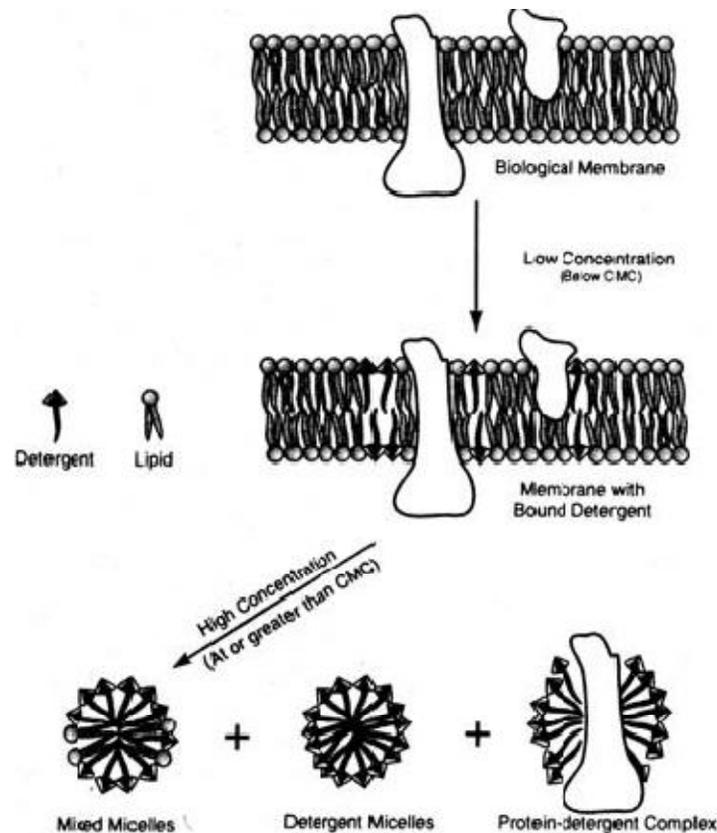


Figura 25. Propiedad de Detergentes (Helenius et al., 1979)

Por las propiedades mencionadas, el Tween 20® se emplea para estabilizar la solución de proteínas purificadas usada en pruebas de piel para la exposición de tuberculosis, como un agente para lavar las marcas de pruebas de inmunoensayos como el de Western Blot y ELISA. Se puede disolver en Tris-Buffer Salino o buffer de fosfato salino en diluciones de 0.05% a 0.5% de v/v. (Joint, 1974).

ASIMETRÍAS NEUROENDÓCRINAS

El hipotálamo es una región del diencefalo dividida por el tercer ventrículo, en dos porciones anatómicas semejantes pero fisiológicamente diferentes, ya que en la rata hemiovariectomizada, la lesión (por radiofrecuencia) del lado derecho del hipotálamo anterior inhibe la hipertrofia compensadora del ovario *in situ*, mientras que la lesión del lado izquierdo no la modifica (Nance y Moger, 1983). La lesión del lado derecho del área retro-quiasmática con ácido kaínico, bloquea el desarrollo de hipertrofia compensadora cuando se extirpa el ovario del mismo lado de la lesión. La lesión del lado derecho del área preóptica (POA) en el día del estro, disminuye el número de animales ovulantes (Nance, et al., 1984).

La primera observación que mostró la existencia de funciones asimétricas del eje hipotálamo-hipófisis-gónada fue dada por Gerendai y colaboradores (1978), al indicar que en la rata hembra, la concentración de la hormona estimulante de la secreción de las gonadotropinas (GnRH) en la porción derecha del hipotálamo medio basal era el doble que la del lado izquierdo. Dicha asimetría también se ha mostrado en la rata macho, pero ésta solo se observa en horas específicas del día (Bakalkin et al 1984). En el ratón macho el número de células inmunoreactivas a GnRH es mayor en el lado derecho del cerebro que en el izquierdo (Inase y Machida, 1992). Recientemente hemos mostrado que la síntesis del ARNm de la GnRH también es asimétrica y varía durante el ciclo estral (Arteaga et al., 2004): la mayor cantidad de ARNm se observa en la tarde del diestro-2, en la porción derecha del área preóptica-hipotalámica anterior (POA- AHA).

La actividad asimétrica de la neurona GnRH es regulada por las gónadas: la orquidectomía bilateral o la extirpación del testículo izquierdo disminuye el número de células GnRH, en tanto que la extirpación de la gónada derecha no cambia este hecho (Inase y Machida, 1992). La falta de una gónada incrementa el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal del mismo lado que se extirpa la gónada, de manera que la hemiovariectomía derecha incrementa el contenido de GnRH del lado derecho del hipotálamo (haciendo más marcada la asimetría), mientras que la extirpación del ovario izquierdo aumenta el contenido del decapeptido en el lado izquierdo del hipotálamo (anulando la asimetría) (Gerendai, et al., 1978).

La secreción asimétrica de GnRH del hipotálamo es regulada por señales extrahipotalámicas: en la rata macho, la deaferentación del lado derecho del hipotálamo y extirpación del testículo derecho, bloquea el incremento en la concentración plasmática de FSH que normalmente ocurre después de la hemicastración (Nance y Moger, 1983)

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

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

ASIMETRIA OVARICA

En mamíferos, las diferencias en el desempeño funcional de los ovarios se pueden observar en el murciélago *Taphozous melanopogon melanopogon*, en quienes la ovulación ocurre sólo en el ovario derecho, a pesar de que la foliculogénesis se da en ambos ovarios; o en las musarañas, donde el ovario izquierdo es el dominante en la ovulación. En humanos, el ovario derecho recibe mayor inervación que el izquierdo, es por eso que existe evidencia de que la inervación en los ovarios juegan un papel importante en la diferenciación entre ovario izquierdo y derecho.

El análisis de los efectos de la denervación, de la inyección sistémica o local de neurotoxinas, o fármacos que afectan la transmisión neuronal, ha mostrado que la inervación proveniente del nervio ovárico superior regula la respuesta de los folículos ováricos a las gonadotropinas. El ovario envía información neuronal de estas actividades hacia el sistema nervioso central por medio del nervio vago. La respuesta de esta señal neuronal proveniente del ovario puede ser ipsilateral o contralateral. Más aún, la regulación de las funciones del ovario dependen no solo de las gonadotropinas, sino también, de los efectos moduladores de la inervación ovárica en las acciones gonadotrópicas y el ovario en específico bajo estudio. (Domínguez, et al., 1982)

De acuerdo con Vercellini y colaboradores (1998), la incidencia de quistes ováricos en humanos es significativamente mayor en el ovario izquierdo que en el derecho, mientras que la incidencia de miosarcomas es significativamente mayor en el ovario derecho que en el izquierdo (Vercellini, et al., 1998)

En mamíferos poli-ovulantes, se han observado diferencias de ovulación entre el ovario izquierdo y el derecho.

De acuerdo con OWS y Chow (1987) en el día 9 de preñez del hámster, el número de cuerpos lúteos en el ovario derecho es mayor al del ovario izquierdo. A pesar de los porcentajes de ovocitos fertilizados de ambos lados no hubo diferencia, el porcentaje de ovocitos perdidos fue mayor del lado izquierdo que del derecho.

Después del apareamiento, el número de espermatozoides fue mayor en el testículo derecho que en el izquierdo (OWS y Chow, 1987)

En la rata, se ha observado que en ratas cíclicas, en el día del estro, el ovario izquierdo libera en promedio seis ovocitos, mientras que el derecho solo libera cuatro (Butterfields y Matthews, 1979)

En la rata adulta, sección de uno de los nervios ováricos superiores da como resultado la disminución o la falta total de ovulación por parte del ovario desnervado; y los efectos en la ovulación varían según el día del ciclo estral en que se realizó la cirugía (Chavez y Dominguez, 1994).

Las concentraciones de FSH y prolactina circulantes son más bajas en ratas con el nervio ovárico superior seccionado que en ratas control, mientras que la concentración de LH no varía. Las concentraciones de progesterona sérica son más altas en ratas desnervadas, y aumenta el contenido de noradrenalina en el ovario (Forneris y Aguado, 2002)

ASIMETRÍAS DEL SISTEMA NEUROENDOCRINO

La primera evidencia acerca de la existencia de una asimetría cerebral fue dada por Paul Broca (Springer y Deutsch, 1985), al informar que las afasias cerebrales eran provocadas por malformaciones o lesiones en el lado izquierdo del cerebro. Posteriormente se mostró que la región temporal de la corteza del lado izquierdo (área de Wernicke) es más grande que la del lado derecho (Geschwind y Levitsky, 1968). Estas observaciones llevaron a plantear el concepto de lateralización cerebral y posteriormente en el de dominancia cerebral. Este concepto fue también modificado con base en el hecho de que ambos hemisferios tienen la misma complejidad con funciones diferentes, es decir que cada hemisferio era dominante en funciones específicas (Gerendai y Halász, 1997).

En el hombre, el hemisferio izquierdo se especializa en la organización de la información en forma analítica, como el lenguaje y las habilidades matemáticas, mientras que el hemisferio derecho se especializa en procesar la información en forma holística, como la relacionada con el reconocimiento espacial y las emociones (Sánchez y Dominguez, 1994).

El concepto de lateralidad cerebral fue aplicado en otras especies, al mostrarse en algunas especies de aves, que ciertas conductas del canto son controladas por el lado izquierdo del cerebro y por el nervio hipogloso del mismo lado (Nottebohm, 1977) y que en la rata, aspectos emocionales y de orientación espacial son controlados por el hemisferio derecho (Donnenberg, 1981), semejante a lo que ocurre en los humanos.

Estas asimetrías funcionales están relacionadas con asimetrías químicas y bioquímicas; por ejemplo, en la rata la conducta de giro producida por lesión unilateral de la sustancia negra o por la inyección de amfetamina, provoca un desbalance neuroquímico en el lado opuesto al que gira el animal (Glick et al., 1977). El entrenamiento del uso de una de las patas conduce a un incremento en la concentración de la enzima acetilcolinesterasa (Krivoneck y Buresova, 1972) y a alteraciones del árbol dendrítico en la corteza sensorio motora contralateral a la pata usada (Greenough y Larson, 1985), así como a cambios asimétricos en el metabolismo de la dopamina (Yamamoto y Freed, 1982); (Schwating et al, 1987). Además se mostró que sólo el receptor D1 dopaminérgico está asociado al control asimétrico de la actividad locomotora regulada por el núcleo accumbens (Belcheva, et al. 1990).

ASIMETRÍAS HIPOTALÁMICAS

En el ratón macho el número de células inmunoreactivas a GnRH es mayor del lado derecho del cerebro que del lado izquierdo. La orquidectomía bilateral o la extirpación del testículo izquierdo disminuyen el número de células GnRH, en tanto que la extirpación de la gónada derecha no cambia este hecho (Inase y Machida, 1992)

Diferentes estudios llevan a considerar que el hipotálamo regula en forma asimétrica la función de los ovarios. En la rata hemiovariectomizada, la lesión del lado derecho del hipotálamo anterior (por radiofrecuencia) inhibe la hipertrofia compensadora del ovario *in situ*, mientras que la lesión del lado izquierdo no la modifica (Fukuda, et al 1984). La falta de una gónada incrementa el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal del mismo lado que se extirpa la gónada: la hemiovariectomía derecha incrementa el contenido de GnRH del lado derecho del hipotálamo (haciendo más marcada la asimetría), mientras que la extirpación del ovario izquierdo aumenta el contenido del decapeptido en el lado izquierdo del hipotálamo (anulando la asimetría) (Gerendai, et al. 1978). La lesión del lado derecho del área retroquiasmática con ácido kaínico, bloquea el desarrollo de hipertrofia compensadora cuando se extirpa el ovario del mismo lado de la lesión (Nance y Bhargava, 1984). La lesión del lado derecho del área preóptica en el día del estro, disminuye el número de animales ovulantes (Morán et al., 1994).

Los receptores muscarínicos localizados en el área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) regulan en forma asimétrica la secreción de la GnRH y la ovulación. Dicha asimetría cambia durante el ciclo estral (Cruz et al., 1992). El implante de atropina del lado derecho POA-AHA (colocado a las 13:00 horas del día del estro) bloquea la ovulación, mientras que el implante del lado izquierdo no lo hace. Cuando el implante se realiza en el día del diestro 1, ambos implantes bloquean la ovulación; en el día del diestro 2, sólo los implantes del lado izquierdo bloquean la ovulación. En el día del proestro los implantes en uno u otro lado POA-AHA no la alteran (Cruz et al., 1989).

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

Esta modificación en la secreción fásica de la GnRH parece ser el resultado de una alteración en el efecto de “feedback” estimulante de los estrógenos, ya que al reestablecer la señal ovárica en el día del diestro 2, sólo ovulan aquellos animales en los que el implante de atropina se colocó en el lado izquierdo de POA-AHA (Cruz et al., 1992)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la rata, el estradiol es una de las señales que regulan la función del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Existen dos tipos de receptores a estrógenos: el RE α y el RE β . En el area preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) se han identificado ambos RE (Butler et al., 1999); sin embargo sólo el RE β ha sido identificado en las neuronas GnRHérgicas y se ha sugerido que tanto el RE α como el RE β están involucrados en los efectos de “feedback” inhibitorios de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH y las gonadotropinas. Por medio del uso de ratones “knockout”, en los que el RE α o RE β son desactivados, se ha sugerido que el RE α pero no el RE β es necesario y suficiente para que se manifieste el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH. Y en consecuencia estimular la secreción preovulatoria de LH (Wintermantel et al., 2006).

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

Por otra parte, previamente se ha mostrado que el máximo número de células inmunoreactivas al RE α en POA-AHA se observa a las 9:00 Y 17:00 horas de cada día del ciclo estral (Mendoza et al., 2007).

Por lo tanto, en este proyecto de tesis se estudiarán los efectos del bloqueo de los RE α del lado derecho de POA-AHA sobre la secreción de gonadotropinas, progesterona, estradiol y la ovulación.

HIPÓTESIS

Dado que por medio del uso de ratones “knockout”, en los que el RE α o RE β son desactivados, se ha sugerido que el RE α pero no el RE β es necesario y suficiente para que se manifieste el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH, y en consecuencia la secreción preovulatoria de LH, entonces el bloqueo de los RE α de POA-AHA bloqueará la ovulación y la secreción preovulatoria de las gonadotropinas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del bloqueo de los RE α del lado derecho de POA-AHA durante los cuatro días del ciclo de la rata, sobre la ovulación, la secreción de FSH, LH, progesterona, estradiol y el peso de los ovarios y del útero.

Objetivos particulares

Demostrar los efectos del bloqueo de los RE α del lado derecho de POA-AHA durante el ciclo estral, sobre la ovulación espontánea y el peso de los ovarios y del útero en el día del estro esperado.

Valorar los efectos del bloqueo de los RE α del lado derecho de POA-AHA en el día del proestro, sobre la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, progesterona, estradiol, la ovulación y peso de los ovarios y del útero.

Calcular los efectos del bloqueo de los RE α del lado derecho de POA-AHA en el día del estro, sobre la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, progesterona, estradiol, la ovulación y peso de los ovarios y del útero.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes de 3-4 meses de edad de la cepa CIIZ-V, con un peso corporal de entre 195 y 225g, mantenidas en grupos de siete animales por jaula (43x27x19), en períodos controlados de luz-oscuridad (luces encendidas de 5:00-19:00 horas) y con libre acceso al agua y al alimento.

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

Entre las 8:30 y 9:30 horas del día del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro, grupos de 9 a 10 animales fueron anestesiados con 45mg/kg peso de pentobarbital sódico por vía intra-peritoneal. Una vez anestesiados se colocaron en un aparato estereotáxico para ubicar la zona de estudio, con base a las coordenadas del Atlas del Cerebro de la Rata de König y Klippel (König & Klippel, 1963). Una vez en la zona de estudio, las ratas fueron micro-inyectadas en el lado derecho de POA-AHA con 25µg de MPP (Metil-piperidino-pirazol, antagonista al RE α , Sigma-Aldrich, México) disuelto en 1µL de una solución de Tween 20® al 1%, durante 1 minuto. Como grupos control se utilizaron animales inyectados con vehículo (1µL durante un minuto).

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación, a las 13:00 y 17:00 horas del día del estro esperado, se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados; los ovarios y el útero para pesarlos y el cerebro para verificar la zona donde se inyectó el fármaco o el vehículo.

Con la finalidad de conocer las causas endocrinas por las que los animales no hayan ovulado, como resultado del bloqueo de los RE α , se inyectaron nuevamente animales bajo el mismo procedimiento y fueron sacrificados a las 11:00 y 17:00 horas del proestro.

Los animales así tratados fueron sacrificados por decapitación; y se recogió la sangre del tronco, que se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000rpm durante 15 minutos para obtener el suero, el cual se almacenó a -4°C hasta la cuantificación de hormonas esteroides y gonadotropinas por radio-inmunoanálisis (RIA).

Los grupos de referencia correspondieron a animales sin tratamiento sacrificados en las mismas horas que los grupos experimentales.

Cuantificación de Hormonas.

La cuantificación de las concentraciones plasmáticas de estradiol (E₂) y progesterona (P₄) se realizaron por RIA usando estuches comerciales marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA), que contienen tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (¹²⁵I-Progesterona ó ¹²⁵I-Estradiol) y calibradores para la realización de la curva patrón (P₄ 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.0, 20.0 y 40.0ng/ml; E₂: 0.0, 10.0, 20.0, 50.0, 150.0, 250.0, 500.0 y 900.0 pg/ml). A cada tubo del estuche se le adicionaron 100 μ l de suero problema más 1000 μ l de la hormona marcada (¹²⁵I-P ó ¹²⁵I-E₂). Los tubos se agitaron durante 1 minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas; posteriormente se decantaron y limpiaron, finalmente con la ayuda de un contador de centelleo Gama, se cuantificó la cantidad de la hormona problema. Los datos de la concentración de E₂ se expresaron en pg/ml y los de P₄ en ng/ml.

La cuantificación de LH y FSH se realizó por RIA usando el anticuerpo rLH-RP3 (NIAMDD-Rat), para el programa de LH y rFSH-RP2 (NIAMDD-Rat) para FSH, proporcionados por la National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). A 100 μ L de suero se le adicionaron 100 μ l de hormona marcada con ¹²⁵I y

100µl del primer anticuerpo de suero de borrega para LH o para FSH, y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se le agregaron 100µl del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubaron durante dos horas; los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a -4 °C por 30 min. El sobrenadante se decantó, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en un contador de centelleo Gama para su análisis.

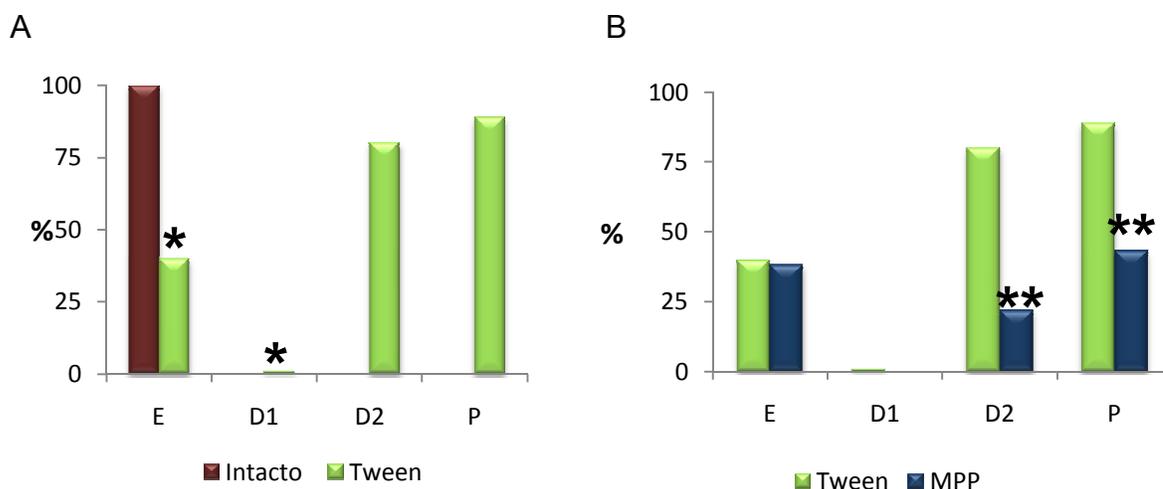
RESULTADOS

EFFECTOS DEL TWEEN Y MPP

OVULACIÓN ESPONTÁNEA

La microinyección del vehículo en la fase de estro y diestro-1 provocó la disminución del número de animales que ovularon en el día del estro esperado; mientras que en las fases de diestro-2 y proestro, el vehículo no modificó este parámetro (Gráfica 1, panel A).

El bloqueo de los RE α , por la microinyección del MPP, en las fases de diestro-2 y proestro, provocó la disminución del porcentaje de animales que ovularon en el estro esperado con respecto a los animales tratados con el vehículo. (Gráfica 1, panel B).



Gráfica 1. Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado después de inyectarles el vehículo o el antagonista de los RE α (MPP) en el lado derecho de POA-AHA, en cada fase del ciclo estral.

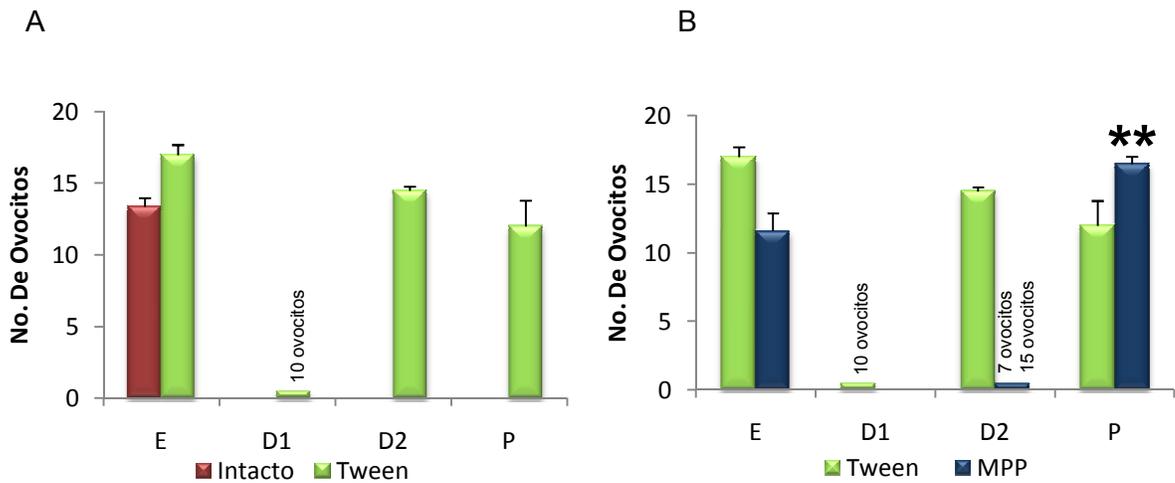
* $p < 0.05$ vs. intactos; ** $p < 0.05$ vs. Tween (Prueba χ^2)

Cuando se analizaron los resultados en función del ovario, se observó que el bloqueo del RE α en el día del proestro provocó que el 100% de los animales ovularan del ovario izquierdo y 65% lo hicieran del ovario derecho ($p < 0.05$).

NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS

La microinyección del vehículo del lado derecho de POA-AHA en los diferentes días del ciclo estral no modificó el número total de ovocitos liberados con respecto a los animales intactos (Gráfica 2, panel A).

Sólo cuando se bloquearon los REα en la mañana del proestro, el número promedio de ovocitos liberados aumentó (Gráfica 2, panel B).



* $p < 0.05$ vs. grupo intacto ** vs. grupo inyectado con Tween (Kruskal-Wallis, seguida de "U" de Mann-Whitney)

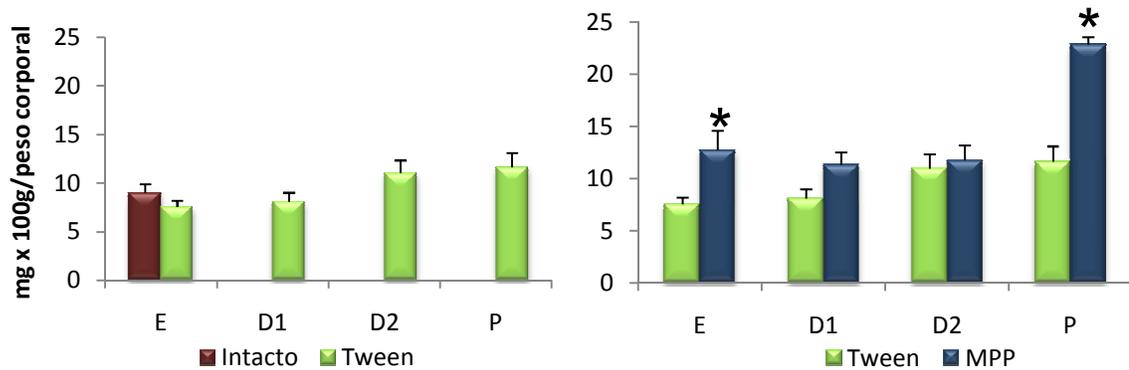
Gráfica 2. Media \pm e.e.m. del número total de ovocitos liberados en los animales intactos o microinyectados con Tween (panel A) o MPP (panel B) en el lado derecho de POA-AHA durante el ciclo estral. Los valores sobre la barra indican el número de ovocitos liberados por el animal ovulante en ese grupo.

PESO OVARIOS

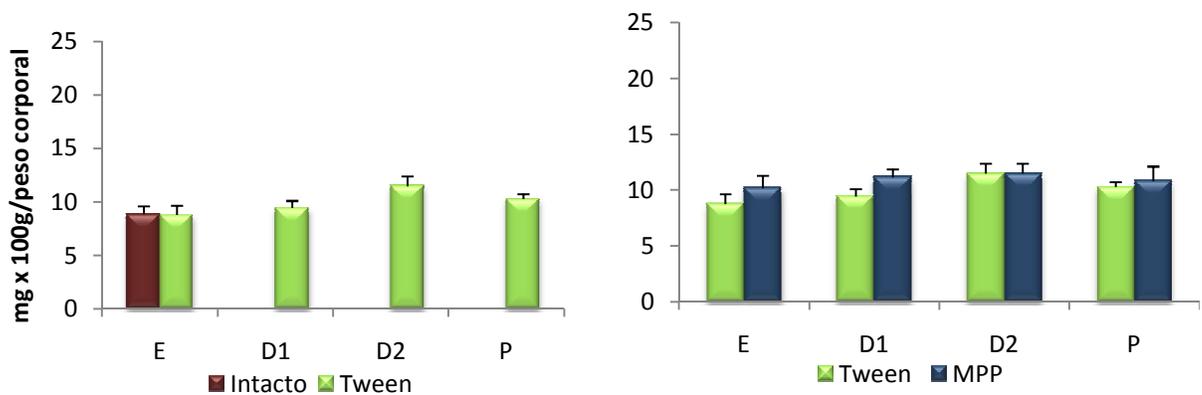
La microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA en alguno de los días del ciclo estral, no modificó el peso de los ovarios respecto al grupo de animales intactos. (Gráfica 3).

La inyección de MPP en la fase del estro o del proestro provocó aumento del peso del ovario izquierdo pero no modificó el del ovario derecho (Gráficas 4). Hecho que se refleja en la masa ovárica (sumatoria del peso de los dos ovarios de cada animal) (Gráfica 5).

Peso Ovario Izquierdo



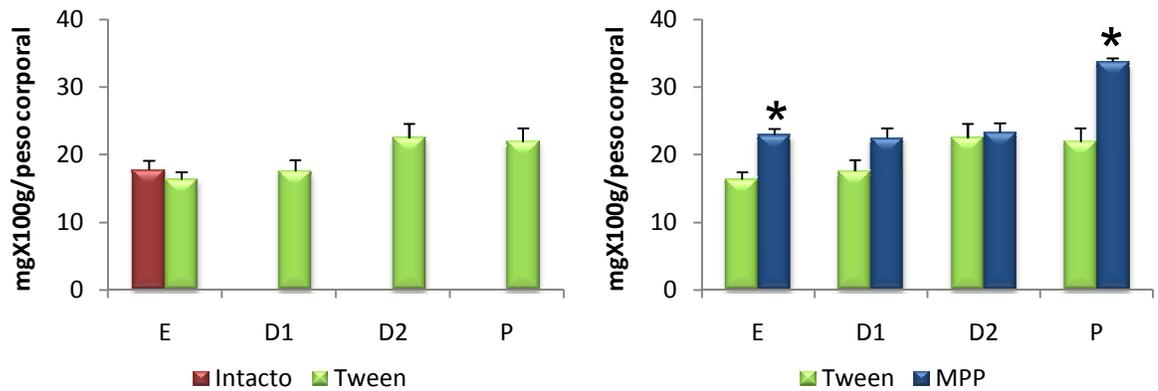
Peso Ovario Derecho



* p<0.05 vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)

Gráficas 3 y 4. Media ± e.e.m. del peso del ovario izquierdo y derecho en los animales intactos o microinyectados con Tween o MPP en el lado derecho de POA-AHA durante el ciclo estral.

MASA OVÁRICA

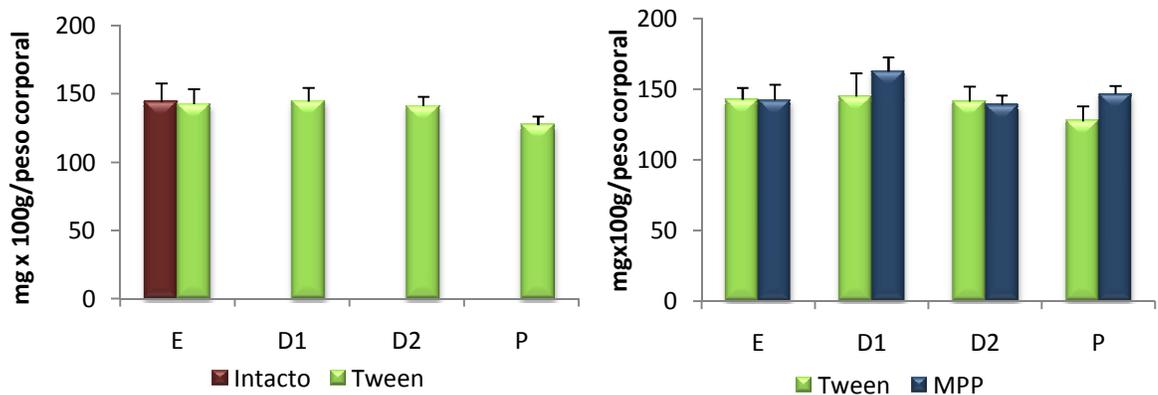


* $p < 0.05$ vs. Tween (ANDEVA seguida de Tukey)

Gráfica 5. Media \pm e.e.m. de la masa ovárica de los animales intactos o microinyectados con Tween o MPP en el lado derecho de POA-AHA durante el ciclo estral.

PESO DEL ÚTERO

Ni la microinyección de Tween 20® o de MPP en el lado derecho de POA-AHA, durante el ciclo estral, modificó el peso del útero. (Gráfica 6)



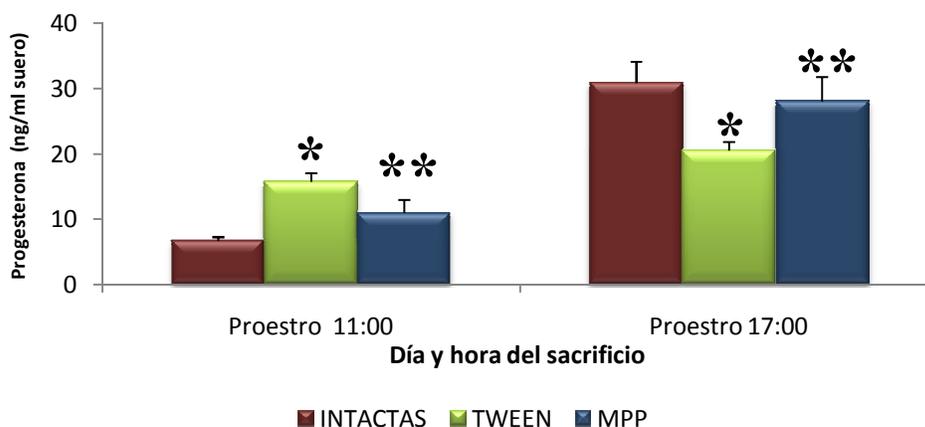
Gráfica 6. Efecto de la microinyección de Tween en el lado derecho de POA-AHA, en cada uno de los días del estro el peso del útero de los animales que ovularon en el día del estro esperado

Dado que en el día del estro y del proestro, la microinyección de MPP provocó asimetría sobre el peso de los ovarios, se microinyectaron otros grupos de animales en estas fases del ciclo para evaluar los cambios en las concentraciones séricas de estradiol, progesterona, FSH y LH.

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS

PROGESTERONA

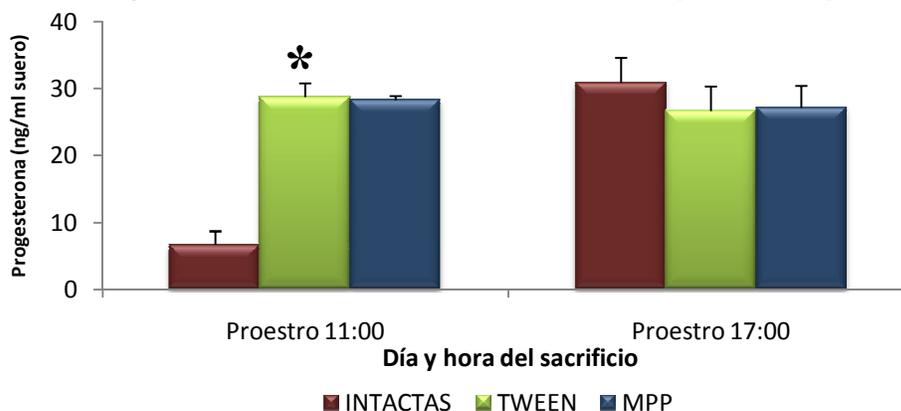
En el día del estro, la microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA provocó aumento de la concentración de progesterona en la mañana del proestro y disminución en la tarde de este día del ciclo, cuando se compara con respecto al grupo de animales sin tratamiento (intactos). Por el contrario, la inyección del antagonista de los RE α provoca un efecto opuesto al del Tween 20®, es decir, a las 11:00 de la mañana del proestro, la concentración de progesterona disminuyó pero aumento a las 17:00 h del mismo día.



* $p < 0.01$ vs. Intacto; ** $p < 0.01$ vs. Tween (ANDEVA, seguida de la prueba de Tuckey)

Gráfica 7.- Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de progesterona a las 11:00 ó 17:00 h del proestro, en animales intactos o microinyectados con Tween o MPP (antagonista del RE α) en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del estro.

En el día del proestro, la microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA provocó aumento de la concentración de progesterona sólo en la mañana de este día. La microinyección del MPP no modificó el efecto producido por el Tween.

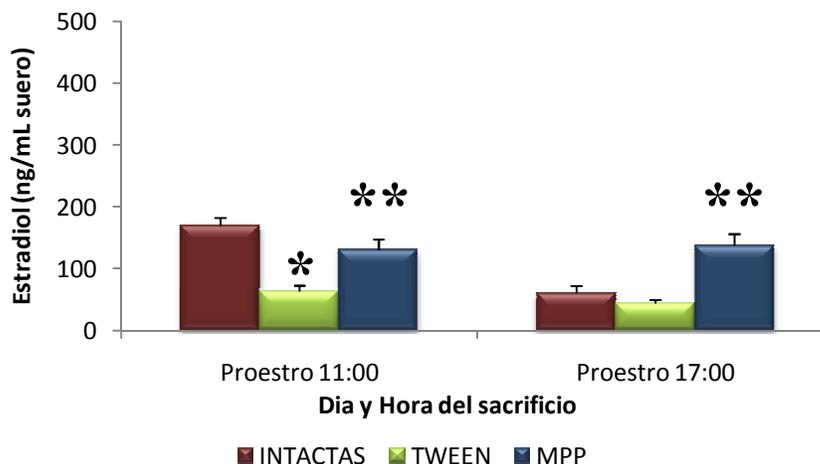


* $p < 0.01$ vs. Intacto (ANDEVA, seguida de la prueba de Tuckey)

Gráfica 8.- Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de progesterona a las 11:00 ó 17:00 h del proestro, en animales intactos o microinyectados con Tween o MPP (antagonista del RE α) en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del proestro.

ESTRADIOL

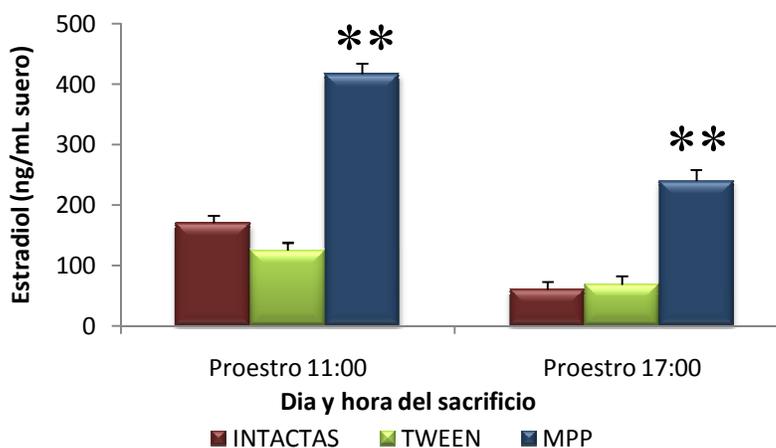
En el día del estro, la microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA provocó disminución en la concentración de estradiol, mientras que en la tarde no provocó cambios en la concentración de esta hormona con respecto al grupo de animales sin tratamiento (intactas). Sin embargo la microinyección del antagonista a los RE α aumentó la concentración de estradiol tanto en la mañana como en la tarde del estro (Gráfica 9).



* $p < 0.01$ vs. Intacto; ** $p < 0.01$ vs. Tween (ANDEVA, seguida de la prueba de Tuckey)

Gráfica 9.- Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de estradiol a las 11:00 ó 17:00 h del proestro, en animales intactos o microinyectados con Tween o MPP (antagonista del RE α) en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del día del estro.

En el día del proestro, la microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA no modificó la concentración de estradiol ni en la mañana, ni en la en la tarde del proestro. Por otro lado, la inyección de MPP incrementó la concentración de estradiol tanto en la mañana como en la tarde de este día (Gráfica 10)



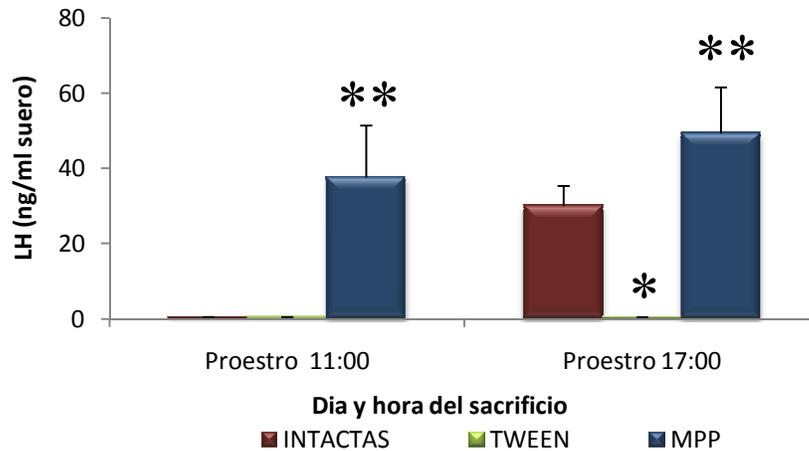
** $p < 0.01$ vs. Tween (ANDEVA, seguida de la prueba de Tuckey)

Gráfica 10.- Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de estradiol a las 11:00 ó 17:00 h del proestro, en animales intactos o microinyectados con Tween o MPP (antagonista del RE α) en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del proestro.

LH

La microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del estro, no modificó la concentración de LH, mientras que en la tarde de este día, la disminuyó (Gráfica 11).

Por otro lado, la inyección de MPP aumento en la concentración de LH tanto en la mañana como en la tarde del proestro (Gráfica 11)

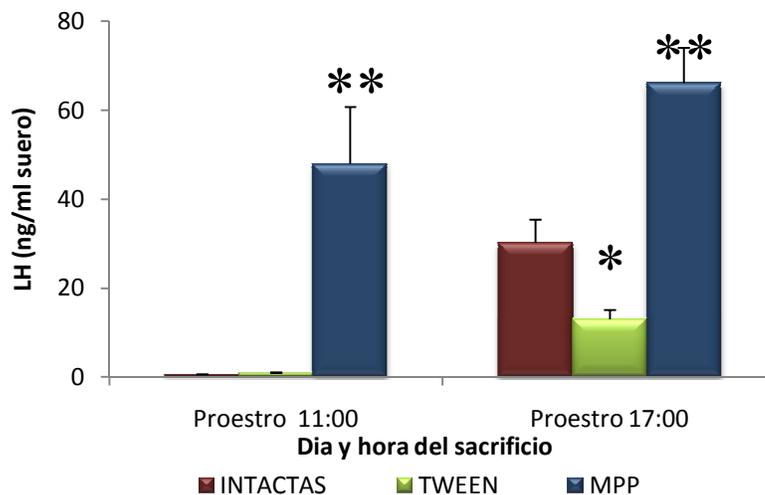


* P<0.001 VS. INTACTO ** p<0.01 vs. Tween (ANDEVA, seguida de la prueba de Tuckey)

Gráfica 11.- Media ± e.e.m. de la concentración sérica de LH a las 11:00 ó 17:00 h del proestro, en animales intactos o microinyectados con Tween o MPP (antagonista del REα) en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del día del estro.

En el día del proestro, la microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA no modificó la concentración de LH en la mañana del proestro pero en la tarde la disminuyó (Gráfica12).

En cambio, la inyección de MPP indujo aumento de la concentración de LH tanto en la mañana como en la tarde del proestro (Gráfica 12).



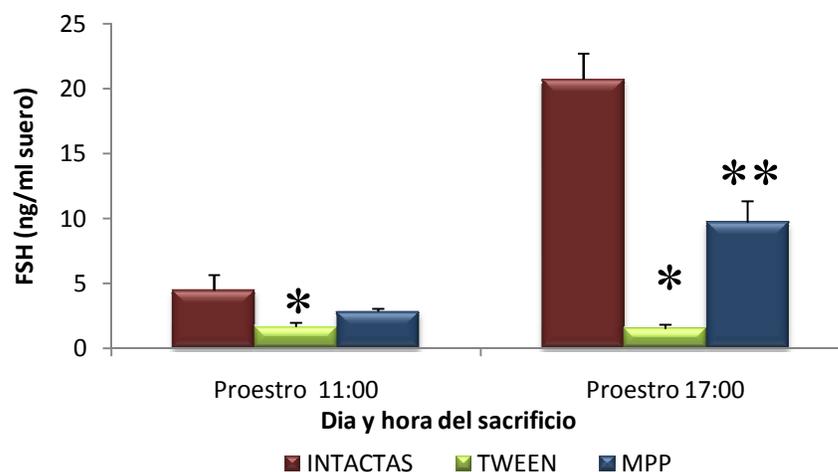
* P<0.001 VS. INTACTO ** p<0.01 vs. Tween (ANDEVA, seguida de la prueba de Tuckey)

Gráfica 12.- Media ± e.e.m. de la concentración sérica de LH a las 11:00 ó 17:00 h del proestro, en animales intactos o microinyectados con Tween o MPP (antagonista del REα) en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del proestro.

FSH

En el día del estro, la microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA bloqueó la secreción preovulatoria de FSH en la tarde de este día (Gráfica 13).

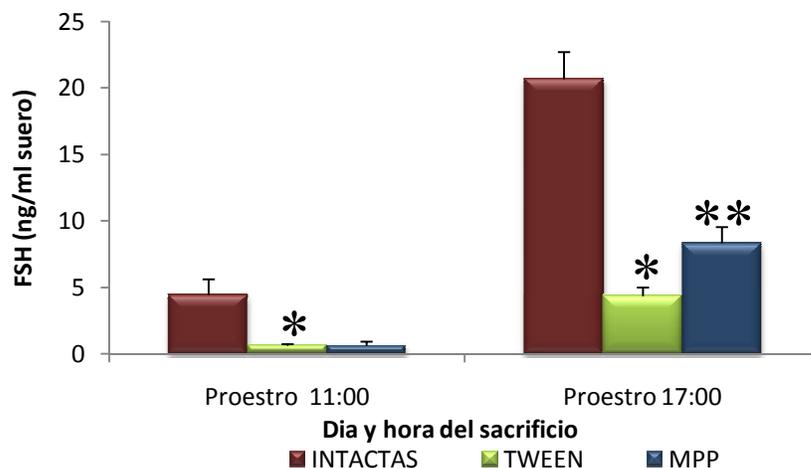
Con respecto al grupo de animales inyectados con Tween20®, el bloqueo del RE α aumentó la concentración de esta hormona en la tarde del proestro (Gráfica 14).



* P<0.001 VS. INTACTO ** p<0.01 vs. Tween (ANDEVA, seguida de la prueba de Tuckey)

Gráfica 13.- Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de FSH a las 11:00 ó 17:00 h del proestro, en animales intactos o microinyectados con Tween o MPP (antagonista del RE α) en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del día del estro.

En el día del proestro, la microinyección de Tween 20® en el lado derecho de POA-AHA provocó disminución de la concentración de FSH en la tarde del proestro, cuando se compara con respecto al grupo de animales sin tratamiento (intactos). La inyección del antagonista de los RE α no modificó los efectos del Tween 20® (Gráfica 14).



* P<0.001 VS. INTACTO (ANDEVA, seguida de la prueba de Tuckey)

Gráfica 14.- Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de FSH a las 11:00 ó 17:00 h del proestro, en animales intactos o microinyectados con Tween o MPP (antagonista del RE α) en el lado derecho de POA-AHA, en la mañana del día del proestro.

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los RE α del lado derecho de POA-AHA regulan de manera estimulante la ovulación en los días del diestro-2 y del proestro. En el día del proestro, la unión del estradiol a su receptor α estimula la secreción preovulatoria de estradiol y de la LH.

Dado que la inyección del Tween 20®, el solvente del fármaco, en los días del estro y del diestro-1, bloqueó la ovulación, sugerimos que este efecto es el resultado de la alteración de la secreción de la GnRH. El Tween 20® es un surfactante (detergente no iónico) que se utiliza para solubilizar las membranas celulares al disolver los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína; este efecto podría modificar la disposición de las proteínas de contacto celular que existen en POA-AHA, lo que alteraría las estructuras proteicas de los receptores de neuromoduladores estimulantes o inhibitorios que regulan la actividad de las neuronas, las sinapsis entre las neuronas GnRH, la glía y otras neuronas. Dado que la inyección del Tween 20® en los días del estro y del diestro-1 bloqueó la ovulación espontánea en el día del estro esperado, efecto que no fue observado en el diestro-2 y el proestro, podemos sugerir que estos posibles contactos celulares y receptores membranales que se establecen en estro y diestro-1 determinan que el animal ovule normalmente, al encenderse la cascada de eventos que culminan con esta función.

La alteración de estas señales neuroendocrinas en la mañana del estro, por la inyección de Tween 20®, estaría modificando la frecuencia de los pulsos de secreción tónica de la GnRH, lo que en parte, se tradujo en la disminución de la secreción preovulatoria de estradiol en la mañana del proestro, como consecuencia de modificaciones en el crecimiento de los folículos. Se ha mostrado que la secreción de estradiol se correlaciona con la concentración de FSH (Ferin, 1969) (Neill, et al. 1971)

A su vez, esta disminución de la concentración de estradiol en los animales inyectados con el Tween 20® en la mañana del estro, quizá alteró la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH, lo que se tradujo en el bloqueo de la secreción preovulatoria de ambas gonadotropinas, ya que en las ratas tratadas en estro con el vehículo disminuyó la concentración de LH y FSH en la tarde del

proestro. Se ha mostrado que la administración de inhibidores de estrógenos (Palafox, 2007), de antisuero al estradiol (Chavez et al., 1987), (Krivoneck y Buresova, 1972) o la ovariectomía (Flores, et al. 2005) realizada en el diestro-2, bloquea la secreción preovulatoria de LH en la tarde del proestro. Mientras que la administración de estas sustancias o la ovariectomía realizada en la mañana del proestro no bloquean el “pico” de LH en la tarde del proestro.

Otra de las explicaciones a la falta de ovulación en los animales inyectados con Tween 20® en la mañana del estro es que el aumento en la concentración de progesterona (dos horas después del tratamiento experimental) haya provocado el retraso en los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación. Everett mostró que en ratas con cuatro días de ciclo estral, la inyección de 1mg de progesterona en los días de diestro-1 ó diestro-2 retrasaban la ovulación por 24 horas (Everett, 1948). Otra explicación sería que el aumento en la concentración sanguínea de progesterona haya sido metabolizada a alopregnenolona por las células de la glía de POA-AHA, metabolito que promueve directamente la apertura de los canales a cloro asociados al receptor GABA_A en las neuronas GnRH, lo que suprimiría la secreción de GnRH, la liberación de la LH y la ovulación. Altas concentraciones de progesterona inhiben la transcripción génica de FSH β en células de la hipófisis en ovinos. La progesterona actúa de manera selectiva al estimular la expresión del ARNm de la FSH β . Explicaciones semejantes podemos sugerir cuando los animales fueron inyectados con el Tween 20® en la mañana del proestro (Herbison, 2006).

En la mañana del estro, la unión del estradiol a los RE α del lado derecho de POA-AHA regula de manera inhibitoria la secreción de GnRH, ya que el bloqueo de estos receptores por la inyección del MPP resultó en el aumento de la concentración de estradiol, progesterona, LH y FSH en el día del proestro. A la fecha, se reconoce que la secreción de FSH o de LH depende de la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH; pulsos a frecuencias altas (cada 30 minutos) estimula la biosíntesis y secreción de la LH, mientras que pulsos de GnRH a frecuencias bajas (cada 2 horas) induce la secreción de FSH. Por lo tanto, es posible que el bloqueo del RE α en POA-AHA haya modificado el generador de los pulsos de GnRH, lo que se

trajo en la activación de los diferentes mecanismos regulados por el estradiol, tanto en el hipotálamo como en la hipófisis. Otra explicación es que la falta de disponibilidad de RE α , los cuales no son expresados por la neurona GnRH haya ocasionado que las neuronas que lo expresan produjeran señales nerviosas que condujeron a la hipersensibilidad al “feedback” estimulante de los estrógenos, a la síntesis de GnRH, de los GnRHR en la hipófisis y por tanto de la secreción de FSH y LH (Herbison, 2006).

Si consideramos que la GnRH regula la secreción de ambas gonadotropinas, ¿cómo se puede explicar que sólo la concentración sérica de la LH haya aumentado en forma excesiva? Se han identificado en la parte rostral del diencefalo (el área preóptica y en el órgano vasculoso de la estría terminal) neuronas inmunoreactivas a la isoforma conocida como GnRH de lamprea tipo III (GnRH-III), la cual regula específicamente la secreción de la FSH (Hinney, et al. 2001). Por tanto, es posible que el RE α regule de manera inhibitoria la actividad sintética de estas neuronas, lo que explicaría la ausencia de modificaciones excesivas en las concentraciones de FSH en las horas posteriores a la inyección intra-hipotalámica del fármaco.

Con base en los resultados obtenidos en esta tesis sugerimos que el estradiol por medio de los RE α en el lado derecho de POA-AHA regula de manera diferente la síntesis de LH y de FSH, lo que apoyaría la hipótesis de la existencia de dos factores hipotalámicos de regulación de las gonadotropinas, un LHRH y un FSHRH (Buttler et al., 1999).

Si se comparan los resultados de esta tesis con los obtenidos por Rodríguez (2010) (tablas 1 y 2), se deduce que en POA-AHA el estradiol regula de manera diferente la secreción de gonadotropinas y las funciones del ovario al unirse al RE α ó al RE β , y que la función de esta hormona esteroide cambia durante el ciclo estral de la rata:

En el día del estro, el RE α juega un papel inhibitorio en la secreción de LH, mientras que el RE β la estimula. En cambio, la secreción de FSH no se modifica por la activación del RE α o del RE β .

En el día del proestro, el papel de cada receptor sobre la secreción de la LH es igual que en el día del estro. Con respecto a la secreción de la FSH, la activación del RE β la inhibe y no se modifica cuando se une al RE α .

La secreción de estradiol es estimulada al bloquearse el RE α y no se modifica al desactivar el RE β . Este hecho podría ser explicado si al unirse el estradiol al RE α se hubiese modificado la forma de secreción y los tipos de FSH (Ulloa-Aguirre, et al. 1996) y de LH. O que, por medio de una conexión nerviosa entre la zona de estudio y el ovario, haya aumentado la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas y por tanto la secreción de estradiol. Dado que en general, la concentración de progesterona no cambió de manera inversa a la concentración de estradiol, podemos pensar que la vía sintética de progesterona y de testosterona fue estimulada, y como resultado de este efecto, aumentase la activación de la aromatasa y así la concentración de estradiol. En el ovario la LH estimula tanto a la enzima aromatasa como la síntesis de testosterona y androstenediona mediante la acción reguladora del segundo mensajero AMPc. La acción de la aromatasa incluye hidroxilaciones y deshidrataciones lo que concluye en la aromatización del anillo A de los andrógenos.

Con respecto a la ovulación, es necesaria la activación de ambos receptores, ya que el bloqueo de uno u otro reduce el número de ratas que ovulan. Sin embargo, hay dos fases del ciclo en el que la falta de la señal generada por el estradiol a través de uno de los receptores no compromete la ovulación: para el estro es el RE α y para el proestro, es el RE β .

| LADO DERECHO | T.A.O. | OVOCITOS TOTALES | PESO OVARIOS | UTERO |
|--------------|--------|------------------|--------------|----------------|
| ESTRO | | | | NO HAY CAMBIOS |
| RE α | = | = | ↑ | |
| RE β * | ↓ | = | ↓ | |
| DIESTRO-2 | | | | |
| RE α | ↓ | = | = | |
| RE β * | ↓ | = | = | |
| PROESTRO | | | | |
| RE α | ↓ | ↑ | ↑ | |
| RE β * | = | = | = | |

Tabla 2. Comparación del efecto del bloqueo del RE α y del RE β del lado derecho en la tasa de animales ovulantes, ovocitos totales, peso de ovarios y peso del útero.

| | E-P | P4 | E2 | FSH | LH |
|--------------|-------|----|----|-----|----|
| RE α | 11:00 | ↓ | ↑ | = | ↑↑ |
| | 17:00 | ↑ | ↑ | ↑ | ↑↑ |
| RE β * | 11:00 | = | = | = | ↓↓ |
| | 17:00 | = | = | = | ↓↓ |
| | P-P | P4 | E2 | FSH | LH |
| RE α | 11:00 | = | ↑↑ | = | ↑↑ |
| | 17:00 | = | ↑↑ | = | ↑ |
| RE β * | 11:00 | ↑ | = | ↑ | = |
| | 17:00 | = | = | ↑ | ↓ |

Tabla 3. Comparación del efecto del bloqueo del RE α y del RE β en la liberación de las gonadotropinas, progesterona y estradiol a las 11: y 17:00 horas del proestro.

| | |
|----|----------------------------|
| ↑ | AUMENTO vs. TWEEN |
| ↓ | DISMINUCIÓN vs. TWEEN |
| ↑↑ | GRAN AUMENTO vs. TWEEN |
| ↓↓ | GRAN DISMINUCIÓN vs. TWEEN |
| = | SEMEJANTE A TWEEN |

* Rodríguez, 2010

Conclusiones

La activación de los RE α del lado derecho de POA-AHA, por la unión del 17 β -estradiol, en las fases de diestro-2 y proestro, regula de manera estimulante la ovulación espontánea de la rata.

La unión de los estrógenos a sus RE α regula de manera inhibitoria la secreción preovulatoria de la LH y de estradiol pero no modifica la secreción de la FSH.

BIBLIOGRAFÍA

- ♣ Anderson, L. (1996). Intracellular mechanism triggering gonadotropin secretion. *Reviews of reproduction* , 1, 193-202.
- ♣ Arteaga, P. R., Dominguez, R., Cerbón, M. A., Arrieta, I., Mendoza, C. A., & Cruz, M. E. (2003). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and HnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine* , 21, 251-256.
- ♣ Arteaga-López, P. R., Domínguez, R., Cerbón, M. A., Arrieta, I., Mendoza, C. A., & Cruz, M. E. (2004). Effects of cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the preoptic and hypothalamic area of cyclic female rats. *Endocrine* , 21, 251-260.
- ♣ Attardi, B., & Winters, S. J. (1993). Decay of follicle-stimulating hormone-b messenger RNA in the presence of transcriptional inhibitors and/or inhibin, activin, or follistatin. *Mol. Endocrinol* , 7, 668-680.
- ♣ Bahr, J. M., Yao, H., Chun, S., McGee, E. A., Hsu, S. Y., Minami, S., y otros. (1999). Restricted Expression of WT1 Messenger Ribonucleic Acid in Immature Ovarian Follicles: Uniformity in Mammalian and Avian Species and Maintenance during Reproductive Senescence. *Biology Of Reproduction* , 60, 365-373.
- ♣ Bakalkin, G. Y., Tsibezov, V., Sjutkin, E., Veselova, S., Novikov, I., & Krivosheev, O. G. (1984). "Laterization of LH-RH in the rat hypothalamus". *Brain Res* , 296, 361-364.
- ♣ Baker, W., Marrant, & Harris. (1892). *Kirke's Hand-book of physiology*. Philadelphia: P. Blakiston's Son & Co.
- ♣ Bartsch, W., Spooner, G., Dietman, K., & Fuchs, G. (1976). *Arzneim-Forsch* , 26, 1581-1583.
- ♣ Bauer-Dantoin, A. C., Hollenberg, A. N., & Jameson, J. L. (1993). Dynamic of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in the anterior pituitary gland during the rat estrous cycle. *Endocrinology* , 133, 1911-1914.
- ♣ Belchetz, P. E., Plant, T. M., Y., N., Keogh, E. J., & Knobil, E. (1978). Hypophysial responses to continuous and intermitent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* , 202, 631-633.
- ♣ Belcheva, I., Bryer, J., Starkstein, S., Honig, M., Moran, T., & Robinson, R. (1990). "Hemispheric asymmetry in behavioral response to D1 and D2 receptor agonist in the nucleus accumbens". *Brain Res* , 533, 286-291.

- ♣ Benedetti, W. L., Lozdziejczyk, R., Sala, M. A., Monti, J. M., & Griñó, E. (1969). Blockade of ovulation after atropine implants in the lateral hypothalamus of the rat. *Experientia* , 25 (11), 1158-9.
- ♣ Bottino, M. C., & Lanari, C. (2010). Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina* , 70, 173-184.
- ♣ Brown, T. R. (1999). Steroid hormones, overview. En K. E. D., *Encyclopedia of reproduction* (Vol. 4, págs. 634-644). U.S.A.: Academic Press.
- ♣ Burris, T. P. (1999). Progestins. En K. E. D., *Encyclopedia of reproduction* (Vol. 4, págs. 23-40). U.S.A.: Academic Press.
- ♣ Butcher, R. L., Collins, W. E., & Fugo, N. W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* , 94, 1704-1708.
- ♣ Butler, J., Sjöberg, M., & Coen, C. W. (1999). Evidence for oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons. *Neuroendocrinol* , 11, 331-335.
- ♣ Butterfields, R. M., & Matthews, R. G. (1979). Ovulation and the movement of the conceptus in the first 35 days of pregnancy in thoroughbred mares. *J Reprod Fertil Suppl* , 27, 447-52.
- ♣ Cabrera, E. (2009). Efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos alfa y beta sobre la ovulación, el crecimiento folicular, el peso del útero y los ovarios, durante el ciclo estral de la rata. En *Tesis*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- ♣ Carroll, R. S., Corrigan, A. Z., Vale, W., & Cjin, W. W. (1991). Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* , 129, 1721-1726.
- ♣ Chavez, R., & Domínguez, R. (1994). participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *J Endocrinol* , 140 (2), 197-201.
- ♣ Chavez, R., Cruz, M. E., & Domínguez, R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right and left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effects of ipsi- and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *Journal of Endocrinology* , 113, 397-401.
- ♣ Childs, G. V., Miller, B. T., & Miller, W. L. (1997). Differential effects of inhibin on gonadotropin-releasing hormone binding to pituitary cells from cycling female rats. *Endocrinology* , 138 (4), 1577-84.
- ♣ Comparato, M. R. (2000). *Ginecología en esquemas* (3 ed.). El Ateneo.
- ♣ Conn, P. M. (1986). The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action. *Endocr. Rev* , 7, 3-10.

- ♣ Conn, P. M., & Jennes, L. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain. *Front Neuroendocrinol* , 15 (1), 51-77.
- ♣ Cook, J., & Eidne, K. A. (1997). An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin-releasing hormone receptor is essential for binding and activation. *Endocrinology* , 138 (7), 2800-6.
- ♣ Cruz, M. E., Jaramillo, L., & Domínguez, R. (1989). "Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat". *Endocrinol* , 24, 739-742.
- ♣ Cruz, M., Castro, J., & Domínguez, R. (1992). "A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats". *Endocrinol* , 133, 205-210.
- ♣ Dalkin, A. C., Paul, S. J., Haisenleder, D. J., Ortolano, G. A., Yasin, M., & Marshall, J. C. (1992). Gonadal steroids effects similar regulation of gonadotropin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J. Endocrinol* , 132, 39-45.
- ♣ Davis, A. M., Ellersieck, M., Grimm, K., & Rosenfeld, C. (2006). "The Effects of the Selective Estrogen Receptor Modulators, Methyl-Piperidino-Pyrazole (MPP), and Ramoxifene in Normal and Cancerous Endometrial Cell Lines and the Murine Uterus". *Molecular Reproduction and Development* , 73, 1034-1044.
- ♣ Dickson, R. B., & Stancel, G. M. (2000). Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr* , 27, 135-45.
- ♣ Domínguez, L., Yunes, R. M., Fornés, M. W., Burgos, M., & Mayorga, L. (1999). Calcium and phospholipase A2 are both required for the acrosome reaction mediated by G-proteins stimulation in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* , 52 (3), 297-302.
- ♣ Domínguez, R., Chavez, R., & Cruz, M. E. (1991). La regularización del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. *Tópicos selectos en biología de la reproducción* , 7, 161-192.
- ♣ Domínguez, R., López, E., & Cruz, M. E. (1997). Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the adult rat. *Arch Med Res* , 28 (3), 343-8.
- ♣ Domínguez, R., Riboni, L., Zipitría, D., & Revilla, R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *J Endocrinol* , 85 (2), 175-80.
- ♣ Donnenberg, V. H. (1981). "Hemispheric laterality in animals and the effects of early experience". *Behav brain Sci* , 4, 1-49.
- ♣ Duax, W. L., Griffin, J. F., Weeks, C. M., & Korach, K. S. (1985). Molecular conformation, receptor binding, and hormone action of natural and synthetic estrogens and antiestrogens. *Environ Health Perspect* , 61, 111-121.

- ♣ Dupon, C., & Kim, M. H. (1973). peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione and oestradiol during the rat estrous cycle. *Science* , 59, 653-654.
- ♣ Espey, L. L. (1994). Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* , 50 (2), 233-8.
- ♣ Espey, M. G., & basile, A. S. (1999). glutamate augments retrovirus-induced immunodeficiency through chronic stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Immunol* , 162 (8), 4998-5002.
- ♣ Eto, T., Masuda, H., Suzuki, Y., & Hosi, T. (1962). Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in rat ovarian venous blood at different stages in reproductive cycle. *Jpn J Anim reprod* , 8, 34-40.
- ♣ Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* , 240 (4854), 889-95.
- ♣ Everett, J. W. (1948). Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* , 43 (6), 389-405.
- ♣ Ferin, M. (1969). Ovarian Cycle, mammals. En E. Knobil, & D. Neill, *Encyclopedia of reproduction* (págs. 547-553). Academic Press.
- ♣ Fernandez-Vazquez, G., Kaiser, U. B., Albarracin, C. T., & Chin, W. W. (1996). Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin A. *Mol, Endocrinol* , 10, 356-366.
- ♣ Fink, G. (1988). Gonadotropin secretion and its control. En Knobil, & Neill, *The physiology of reproduction* (págs. 1349-1377). Nueva York: Raven Press.
- ♣ Flores, A., Melendez, G., Palafox, M. T., Rodríguez, J., Barco, A. L., Chavira, R., y otros. (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along estrous cycle. *Endocrine* , 28, 145-152.
- ♣ Forneris, M. L., & Aguado, L. I. (2002). Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* , 82 (1), 75-82.
- ♣ Freedman, L. P. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* , 13 (2), 129-45.
- ♣ Freeman, E. M. (1994). "The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the rat". *The Physiology of Reproduction* , 2 (46), 613-615.
- ♣ Fukuda, M., Yamanouchi, K., Nakano, Y., Furuya, H., & Arai, Y. (1984). "Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy". *Neurosci Lett* , 51, 367-370.

- ♣ Ganong, W. F. (2004). *Fisiología Médica* (19 ed.). México: Manual Moderno.
- ♣ Garrido-Gracia, J. C., Gordon, A., Bellido, C., Aguilar, R., Barranco, I., Millan, Y., y otros. (2007). "The integrated action of oestrogen receptor isoforms and sites with progesterone receptor in the gonadotrope modulates LH secretion: evidence from tamoxifen-treated ovariectomized rats". *Journal Of Endocrinology* , 193, 107-119.
- ♣ Gay, V. L., & Tomacari, R. L. (1974). Follicle stimulating hormone in the female rat: Cyclic release is dependent on circulating androgen. *Science* , 184, 75-77.
- ♣ Gerendai, I., & Halász, B. (1997). Neuroendocrine Assimetry. *Frontiers in Neuroendocrinology* , 18, 354-381.
- ♣ Gerendai, I., Rotsztejn, W., Marchetti, B., Kordon, C., & Scapagnani, U. (1978). "Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus". *Neurosc Lett* , 9, 333-336.
- ♣ Geschwind, N., & Levitsky, W. (1968). "Left-right asymmetry in temporal speech region". *Science* , 161, 186-187.
- ♣ Glick, S., Jerussi, T., & Zimmerberg, B. (1977). "Behavioral and neuropharmacological correlates of nigrostriatal asymmetry in rats". *Academic Press* , 213-240.
- ♣ Gore, A., & Roberts, J. L. (1997). Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Expression in Vivo and in Vitro. *FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY* , 18, 209-245.
- ♣ Gore-Langton, R. E. (1988). Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat cells in vitro. *Mo Cell Endocrinol* , 57, 187-198.
- ♣ Greenough, W., Larson, J., & Withers, G. (1985). "Effects of unilateral and bilateral training in a reaching task on dendritic branching of neurons in the rat motosensory forelimb cortex". *Behav Neuro Biol* (44), 301-314.
- ♣ Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. México: McGraw Hill Interamericana.
- ♣ Hashimoto, I., Hendricks, D. M., Anderson, L. L., & Melampy, R. M. (1968). Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol β -onein ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* , 82, 333-341.
- ♣ Helenius, A., McCaslin, D., Fries, E., & Tanford, C. (1979). Properties of detergents. *Methods Enzymol* , 56, 734-49.
- ♣ Herbison, A. (1998). "Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons". *Endocr Rev* , 19, 302-330.

- ♣ Herbison, A. (2006). Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* , 3 (28), 1514-1416.
- ♣ Hinney, A., Geller, F., Neupert, T., Sommerland, C., Gerber, G., Görg, T., y otros. (2001). No evidence for involvement alleles of the 825-C/T polymorphism of the G-protein subunit beta 3 in body weight regulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* , 109 (8), 402-5.
- ♣ Hrabovszky, E., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Hajsan, T., Carpenter, C. D., Liposits, Z., y otros. (2000). "Detection of receptor- β messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurones of the rat brain". *Endocrinology* , 141 (9), 3506-3509.
- ♣ Hsueh, A. J., Adashi, E. Y., Jones, P. B., & Welsh, T. H. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cell. *Endocr Rev* , 5, 76-127.
- ♣ Hutchison, J. S., Nelson, P. B., & Zeleznik, A. J. (1986). Effects of different gonadotropin pulse frequencies on corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkey. *Endocrinology* , 119, 1964-1971.
- ♣ Inase, Y., & Machida, T. (1992). "Differential effects of right-sided and left-sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain". *Brain Res* , 580, 338-340.
- ♣ Inase, Y., & Machida, T. (1992). Differential effects of the right-sided and left-sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Res* , 580 (1-2), 338-40.
- ♣ Janovick, J. A., & Conn, P. M. (1993). A cholera toxin-sensitive guanyl nucleotide binding protein mediates the movement of pituitary luteinizing hormone into a releasable pool: loss of this event is associated with the onset of homologous desensitization to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* , 132, 2131-2135.
- ♣ Jennes, L., Coy, D., & Conn, P. M. (1986). Receptor-mediated uptake of GnRH agonist and antagonist by cultured gonadotropes: evidence for differential intracellular routing. *peptides* , 7, 459-463.
- ♣ Jensen, A., & Jacobson, H. (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* , 18, 387-414.
- ♣ Jeong, K. (2006). Physiological regulators of gonadotropin biosynthesis and secretion. En Knobil, & Neill, *Physiology of reproduction* (págs. 1653-1677).
- ♣ Joint, F. (1974). Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. (W. H. Organization, Ed.) *WHO Food Additives Series No. 5* .
- ♣ Kaiser, U. B., Jakubowiak, A., A., S., & W., C. W. (1997). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit

and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology* , 138 (3), 1224-31.

- ♣ Kaiser, U. B., Norwitz, E. R., Xu, J. S., Park, J. S., Jeong, K. H., & McGee, E. A. (2002). direct binding of AP-1 (Fos/Jun) proteins to a SMAD binding elements facilitates both gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and activin-mediated transcriptional activation of the mouse GgRH receptor gene. *J. Biol. Chem.* , 277, 37469-37478.
- ♣ Katt, J. A., Duncan, J. A., Herbon, L., Barkan, A., & Marsall, J. C. (1985). the frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* , 116, 2113-2115.
- ♣ Knobil, E. (2005). Discovery of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator and of its physiologic significance. 1992. *Am J Obstet Gynecol.* , 193 (5), 1765-6.
- ♣ Köning, J. F., & Klipel, R. A. (1963). *The rat brain: a stereotaic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system*. Baltimore, U.S.A.: Williams and Willkins Co.
- ♣ Korach, K. S. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* , 266 (5190), 1524-7.
- ♣ Kordon, C., Drouva, S. V., Martínez, G., & Weiner, R. Y. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactine. *the phisiology of reproduction* , 27.
- ♣ Köves, K., & Molnár, J. (1986). effect of various hypothalamicdeafferentations injuring different parts of the GnRH pathway on ovulation, GnRH content of the median eminence, and plasma LH and FSH levls. *Neuroendocrinology* , 44 (2), 172-83.
- ♣ Krivoneck, J., & Buresova, O. (1972). "Cortical acetylcholinesterase and handedness in rat". *Experientia* , 28, 291.
- ♣ Krivoneck, J., & Buresova, O. (1972). Cortical acetylchoinesterase and handedness in rat. *Experientia* , 28, 291.
- ♣ Krsmanovic, L. Z., Hu, L., Leung, P. K., Feng, H., & Catt, K. J. (2009). The hypotalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* , 20 (8), 402-8.
- ♣ Krsmanovic, L. Z., Mores, N., Navarro, C. E., Saeed, S. A., Arora, K. K., & Catt, K. J. (1998). "Muscarinic regulation of intracellular signaling neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons". *Endocrinology* , 139 (10), 4037-4038.
- ♣ Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. (1996). "Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary". *Proc Natl Acad Sci* , 93, 5925-5930.

- ♣ Kumar, T. R., & Low, M. J. (1995). Hormonal regulation of human follicle-stimulating hormone- β subunit gene expression: GnRH stimulation and GnRH-independent androgen inhibition. *Neuroendocrinology*, *61*, 628-637.
- ♣ Legan, S., & Karsch, F. (1979). Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biol reprod*, *20* (1), 74-85.
- ♣ Leung, Y., Mak, P., Hassan, S., & Ho, S. (Agosto 2006). "Estrogen receptor (ER)- β isoforms: a key to understanding ER- β signaling". *Proc Nac Acad Sci*, *103* (35), 13162-7.
- ♣ Levine, J. E. (2000). The hypothalamus as a major integrating center. *Neuroendocrinology in physiology*, *5*, 75-93.
- ♣ Levine, J., Bauer-Dantoin, A., Besecke, L., Conaghan, L. L., Meredith, J., Strobl, F., y otros. (1991). "Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone pulse generator in the rat". *Recent Prog Horm Res*, *47*, 97-153.
- ♣ Loza, A. M., Lemus, A. E., & Pérez, G. P. (1995). Metabolismo de hormonas esteroides. En S. J. Díaz, & H. G. J., *Bioquímica* (págs. 605-660). México: Interamericana McGraw-Hill.
- ♣ Mandl, A. M. (1963). Pre-ovulatory changes in the oocyte of the adult rat. *Proc R Soc Lond*, *158*, 105-118.
- ♣ McGee, E. A., Perlas, E., LaPolt, P. S., Tsafirri, A., & Hsueh, A. J. (1997). follicle-stimulating hormone enhances the development of prenatal follicles in juvenile rats. *Biol Reprod*, *57* (5), 990-8.
- ♣ Mendoza, L., Arteaga, P. R., Dominguez, R., Cerbón, M. A., Arrieta, I., Flores, A., y otros. (2007). Changes in the number of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells on POA-AHA during the estrous cycle of the rat. *40th Annual meeting of society study of reproduction*, *128*, 106.
- ♣ Merchenthaler, I., Kovacs, G., Lovasz, G., & Setalo, G. (1980). THE PREOPTICO-INFUNDIBULAR LH-RH TRACT OF THE RAT. *Brain research*, *198*, 62-74.
- ♣ Merchenthaler, I., Setalo, G., Petrusz, P., Negro-Vilar, A., & Flerko, B. (1989). Identification of hypophysiotropic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons by combined retrograde labeling and immunocytochemistry. *Exp Clin Endocrinol*, *94*, 133-140.
- ♣ Morán, J., Cruz, M., & Dominguez, R. (1994). "Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic and anterior hypothalamic area performed on each day of the oestrous cycle of adult rat". *Brain Res bull*, *33*, 663-668.
- ♣ Mornex, R. (1978). 1977 nobel Prize for medicine. Roger Guillemin and Andrew Schally. *Pathol Biol (Paris)*, *26* (3-4), 150-1.

- ♣ Nance, D. M., White, J. P., & Moger, W. H. (1983). neural regulation of the ovary: evidence for hypothalamic asymetry in endocrine control. *Brain Res Bull* , 10 (3), 353-5.
- ♣ Nance, D., & Moger, W. (1983). "Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemicastration". *Brain Res Bull* , 10, 353-355.
- ♣ Nance, D., Bhargava, M., & Myatt, G. (1984). "Further evidence for hypothalamic asymetry in endocrine control of the ovary". *Brain Res Bull* , 13, 651-655.
- ♣ Negro-Vilar, A., Ojeda, S. R., & McCann, S. M. (1979). Catecholaminergic modulation of LHRH release by median eminence terminals in vitro. *Endocrinology* , 104, 1749–1757.
- ♣ Neill, J. D., Freeman, M. E., & Tillson, S. A. (1971). Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology* , 89 (6), 1448-53.
- ♣ Nilsson, S., Makela, S., & Treuter, E. (2001). "Mechanisms of estrogen action". *Physiol* , 81 (4), 1535-1565.
- ♣ Norden, E., & Yahr, P. (1982). "Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain". *Science* , 218, 391-393.
- ♣ Norwitz, E. R., Xu, S., Jeong, K. H., Bedecarrats, G. Y., Einebrenner, L. D., Chin, W. W., y otros. (2002). Activin A augments GnRH-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene. *Endocrinology* , 143, 985-997.
- ♣ Nottebohm, F. (1977). "Asymmetries in neural control of vocalization in the canary". (A. Press, Ed.) *Lateralization in the Nervous system* , 23-44.
- ♣ O, W. S., & Chow, P. H. (1987). Assymetry in the ovary and uterus of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Reprod Fertil* , 80 (1), 21-3.
- ♣ O'Malley, B. W., & Strott, A. C. (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En J. R. Yen S, *Endocrinología de la reproducción* (4 ed., págs. 119-143). México: Editorial Médica Panamericana.
- ♣ Palafox, T. (2007). Un estudio de las interacciones funcionales de las adrenales y la secreción de estrógenos por parte de los ovarios. En *Tesis para obtener el título de Biólogo* (pág. 58). D.F., México: FES Zaragoza UNAM.
- ♣ Pape, J. R., Skynner, M. J., Sim, J. A., & Herbison, A. E. (2001). "Profiling gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor subunit mRNA expression in postnatal gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons of the male mouse with single cell RT-PCR. *Neuroendocrinology* , 74, 300-308.

- ♣ Petersen, S. L., Ottem, E. N., & Carpenter, C. D. (2003). "Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol. Reprod.* , 69, 1771-1778.
- ♣ Prevot, V. (2002). "Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretions". *J. Neuroendocrinol.* , 14, 247-255.
- ♣ Prieto-Gomez, B., & Velazquez-Paniagua, M. (2002). "Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de las gonadotropinas". *Rev. Fac. Med. UNAM* , 45, 252-256.
- ♣ Rage, F., Lee, B. J., Ma, Y. J., & Ojeda, S. R. (1997). Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PEG2 by activating a glia-to-neuron signaling pathway. *J Neurosci* , 17 (23), 9145-56.
- ♣ Rissman, E. F., Wersinger, S. R., Taylor, J. A., & Lubahn, D. (1997). Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Horm Behav* , 31 (3), 232-43.
- ♣ Rivier, C., Roberts, V., & Vale, W. (1989). possible role of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in modulating inhibin secretion and expression during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* , 125, 876-882.
- ♣ Ronnekleiv, O. K., & Kelly, J. M. (2005). Diversity of ovarian steroid un the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology* , 26, 65-69.
- ♣ Ross, M. H., Kayle, G. I., & Pawlina, W. (2005). *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular* (4 ed.). Argentina: Médica Panamericana.
- ♣ Ross, M. H., Romell, L. J., & Kaye, G. Y. (1997). Aparato genital Femenino. *Histología. Texto y atlas color* , 674-737.
- ♣ Russell, D., & White, R. B. (1999). Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure and functions. *Frontiers in neuroendocrinology* , 20, 224-240.
- ♣ Sánchez, M., & Dominguez, R. (1994). "Asimetrías en los sistemas nervioso, inmune y endócrino". *Arch Inst Nac Neurol Neuroscir* , 9, 66-72.
- ♣ Sanchez-Criado, J. (2003). Fisiología del ovario. En T. J., *Fisiología humana* (págs. 1036-1048). McGraw-Hill interamericana.
- ♣ Sandhu, S., Cooke, P., Cooke, P., & Diamond, M. (1986). "Rat cerebral cortical estrogen receptors: male-female, right-left". *Exp Neurol* , 92, 186-196.
- ♣ Schwall, R. H., Szonyi, E., Mason, A. J., & Nokolics, K. (1988). Activin stimulates secretion of follicle-stimulating hormone from pituitary cells desensitized to gonaotropin-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 151, 1099-1104.
- ♣ Schwating, R., Nagel, J., & Iluston, J. (1987). "Asymmetries of brain dopamine metabolism related to conditioned paw usage in the rat". *Brain Res* , 417, 75-84.

- ♣ Shughrue, P. J., Scrimo, P. J., & Merchenthaler, I. (1998). "Evidence for the colocalization of estrogen receptor- β mRNA and estrogen receptor- α immunoreactivity in neurons of the rat forebrain". *Endocrinology* , 139 (12), 5267-5270.
- ♣ Shupnik, M. A. (1996). Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin. *TEM* , 7, 272-276.
- ♣ Silverman, A. J., Levine, I., & Within, J. W. (1998). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization. *The physiology of reproduction* , 1 (28), 1683-1709.
- ♣ Skinner, M. J., Sim, J. A., & Herbison, A. E. (1999). Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinol* , 140, 5195-5201.
- ♣ Smith. (1999). Estrogens, overview. En K. E. D., *Encyclopedia of reproduction* (Vol. 2, págs. 119-126). U.S.A.: Academic Press.
- ♣ Smith, M. J., & Jennes, L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* , 122, 1-10.
- ♣ Smith, M. S., Freeman, M. E., & Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* , 96 (1), 219-26.
- ♣ Springer, S., & Deutsh, G. (1985). "Cerebro izquierdo, cerebro derecho". (Gedisa, Ed.) 1-235.
- ♣ Stauffer, S., Coletta, C., Tedesco, R., Nishiguchi, G., Carlson, K., Jun, J., y otros. (2000). "Pyrazole Ligands: Structure-Affinity/Activity Relationships and Estrogen Receptor- α -Selective Agonists". *Journal of Medicinal Chemistry* , 43, 4934-4947.
- ♣ Sun, J., Huang, Y., Harrington, W., Sheng, S., Katzenellenbogen, J., & Katzenellenbogen, B. (2002). "Antagonists Selective for Estrogen Receptor α ". *Endocrinology* , 143 (3), 941-947.
- ♣ Sun, J., Meyers, M., Fink, B., Rajendran, R., Katzenellenbogen, J., & Katzenellenbogen, B. (1999). "Novel Ligands that Function as Selective Estrogens or Antiestrogens for Estrogen Receptor- α or Estrogen Receptor- β ". *Endocrinology* , 140 (2), 800-804.
- ♣ Susuki, M., Nishihara, M., & Takahashi, M. (1995). Hipotalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrous cycle. *Endocrine journal* , 42 (6), 789-796.
- ♣ Terranova, P. F., Roby, K. F., Rozman, K., Taylor, C. C., Gao, X., Ushinohama, K., y otros. (1999). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) blocks ovulation by a direct action on the ovary without alteration of ovarian steroidogenesis: lack of a

direct effect on ovarian granulosa and thecal-interstitial cell steroidogenesis in vitro. *Reprod Toxicol* , 13 (6), 521-30.

- ♣ Timossi, C., & Ulloa, A. (2000). Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reprod Biomed Online* , 1 (2), 48-62.
- ♣ Toft, D., & Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci* , 55 (6), 1574-1581.
- ♣ Tsafiriri, A. (1995). Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol* , 377, 121-40.
- ♣ Tsafiriri, A., & Reich, R. (1999). Molecular aspects of mammalian ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* , 07 (1), 1-11.
- ♣ Turi, G. F., Z., L., & Hrabovszky, E. (2007). Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochemistry International* , 52, 723-728.
- ♣ Uchida, K., Kadowaki, M., & Miyake, T. (1969). Ovarian secretion of progesterone and 20 α hydroxypregn-4-en-3-one during rat estrous cycle in chronological relation to pituitary release of luteinizing hormone. *Endocrinol Jpn* , 2, 227-237.
- ♣ Ukena, K., & Kohchi, C. T. (1999). Expression and activity of β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta4-isomerase in the rat purkinje neuron during neotl life. *Endocrinology* , 140, 805-813.
- ♣ Ulloa-Aguirre, A., Zambrano, E., Barrios-de-Tomasi, J., & Cárdenas, M. (1996). Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* , 2 (8), 563-71.
- ♣ Van-Voorhis, B. J., Sparks, A. E., Stovall, D. W., Adams, L. M., & Syrop, C. H. (1998). Selective early elimination of luteal support in assisted reproduction cycles using a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian stimulation. *FERTILITY AND STERILITY* , 70 (6), 1056-1063.
- ♣ Vecellini, P. A., De-Giorgio, O., Maddalena, S., Carinelli, S., & Crosignani, P. G. (1998). In cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease? *Br J Obstet Gynaecol* , 105 (9), 1018-21.
- ♣ Wenger, M., Bowman, A., Thorsteinsson, M., Little, K., Wang, L., Zhong, J., y otros. (2005). An automated homogeneous method for quantifying polysorbate using fluorescence polarization. *Anal Biochem* , 337 (1), 48-54.
- ♣ Wiest, W. G., Kidwell, W. R., & Kirschbaum, T. H. (1963). Inductionj of rat ovarian 2 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity by gonadotropic hormone administraron. *Steroids* , 2, 617-629.
- ♣ Wintermantel, Tim, M., Rebecca, E., Campbell, R., Porteous, Dagmar, B., y otros. (2006). "Definition of Estrogen receptor Pathway Critical for Estrogen Positive

Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Fertility". *Neuron* , 52, 271-280.

- ♣ Woodruff, T. K., D'Agostino, J., Schwartz, N. B., & Mayo, K. E. (1989). Decreased inhibin gene expression in preovulatory follicles requires primary gonadotropin surges. *Endocrinology* , 124, 2193-2199.
- ♣ Yamamoto, B., & Freed, C. (1982). "The trained circling rat: a model for indexing unilateral caudate dopamine metabolism". *Nature* , 298, 467-468.
- ♣ Yao, H. H., & Bahr, J. M. (1999). Ovary, overview. *Encyclopedia of reproduction* , 3, 590-595.
- ♣ Zhou, H., Carlson, K., Stossi, F., Katzenellenbogen, B., & Katzenellenbogen, J. (2009). Analogs of methyl-piperidinopyrazole (MPP): Antiestrogens with estrogen receptor α selective activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , 19 (1), 108-110.
- ♣ Zmeili, S. M., Papavasiliou, S. S., Thorner, M. O., Evans, W. S., Marshall, J. C., & Landefeld, T. D. (1986). Alpha and luteinizing hormone beta subunit messenger ribonucleic acids during the rat estrous cycle. *Endocrinology* , 119, 1867-1869.
- ♣ Zwain, I. H., & Yen, S. S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* , 140, 834-852.