



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Laboratorio de Neuroendocrinología**

**Estudio del efecto de la inserción de una aguja de micro-  
inyección en el lado derecho del área preóptica e hipotalámica  
anterior (POA-AHA), realizada en el diestro-1, sobre la expresión del  
ARNm de citocinas pro-inflamatorias. Posible vinculación con la  
secreción de gonadotropinas**

**TESIS**

**Para obtener el título de Biólogo**

**Presenta**

**Gonzalez Cruz Luis Enrique**

**Directora de tesis**

**Dr. María Esther Cruz Beltrán**

**Tesis financiada por DGAPA-PAPIIT (Convenio: IN-220014-3)**

**México, D. F. 2015**





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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Laboratorio de Neuroendocrinología

Estudio del efecto de la inserción de una aguja de micro-inyección en el lado derecho del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA), realizada en el diestro-1, sobre la expresión del ARNm de citocinas pro-inflamatorias. Posible vinculación con la secreción de gonadotropinas

TESIS

Para obtener el título de Biólogo

Presenta

Gonzalez Cruz Luis Enrique

Directora de tesis

Dr. María Esther Cruz Beltrán

Tesis financiada por DGAPA-PAPIIT (Convenio: IN-220014-3)



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno **GONZÁLEZ CRUZ LUIS ENRIQUE**, con número de cuenta **306104019**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **25 de noviembre de 2015** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO  
**VOCAL** Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN  
**SECRETARIO** Dra. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
**SUPLENTE** Dra. ROSALVA RANGEL CORONA  
**SUPLENTE** Dra. JUANA MONROY MORENO

El título de la tesis que presenta es: **Estudio del efecto de la inserción de una aguja de micro-inyección en el lado derecho del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA), realizada en el diestro-1, sobre la expresión del ARNm de citocinas pro-inflamatorias. Posible vinculación con la secreción de gonadotropinas.**

Opción de titulación: Tesis.

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F., a 09 de noviembre de 2015

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR  
DIRECCIÓN

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Zaragoza en la cual pase mucho tiempo y en la cual aprendí muchas cosas, conocí a varios amigos.

A los miembros de este jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Juana Monroy Moreno

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. María Elena Ayala Escobar

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Por el valioso apoyo, por las observaciones y el tiempo aportado a este trabajo.

A la Dr Cruz por la paciencia y el apoyo para realizar este trabajo, gracias por enseñarme a ver la ciencia de otra forma.

Gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio, Raul, Adriana, Gaby, Katy, Kevin, Toño y Gil por el tiempo y la ayuda que me brindaron.

A mi papa Honorio y mama Mónica . A mis hermanos Gabriel, Rocio Lucia, Héctor Juan por todo el apoyo que me dieron para que siguiera estudiando.

Mi familia Luisa y mi hijo Emiliano por estar conmigo en este camino, por su comprensión y su cariño.

“Todo lo que usted toca usted lo cambia. Todo lo que usted cambia lo cambia a usted la única verdad perdurable es el cambio” Butler (1998)

## Contenido

Resumen.....	5
Introducción.....	7
Marco teórico.....	9
Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	9
El Hipotálamo.....	9
La GnRH.....	13
Las Hormonas Esteroides.....	15
La Hipófisis.....	18
La FSH y la LH.....	19
El Ciclo Estral.....	20
La Asimetría hipotalámica.....	23
La Inflamación.....	25
Evidencia experimentales de inflamación en lesiones agudas del SNC.....	26
Las Citocinas.....	28
La interleucina 1- $\beta$ .....	28
El factor de necrosis tumoral $\alpha$ .....	30
El interferón gammay.....	31
Justificación.....	32
Hipótesis.....	32
Objetivos Generales.....	33
Objetivos particulares.....	33
Materiales y métodos.....	34
Análisis estadístico.....	44
Resultados.....	45
Discusión.....	61
Conclusiones.....	66
Bibliografía.....	67

## RESUMEN

Numerosos han sido los protocolos experimentales utilizados en el Sistema Nervioso Central (SNC) para el estudio de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), los cuales van desde lesiones electrofíticas, deafferentaciones hasta la micro-inyección de fármacos. En cualquiera de estos métodos se utiliza un electrodo o una aguja de diferentes dimensiones. La introducción de una aguja de acero inoxidable 25G en la porción derecha de POA-AHA, a las 09:00 h del diestro-1 bloquea la ovulación en el 100% de los animales (Cruz y cols, 2014), mientras que la micro-inyección de agua o de solución salina al 0.9% induce la ovulación en el 40% de los animales tratados (Min, 2012; Pérez, 2012).

Este tipo de manipulaciones experimentales generan daño en el tejido nervioso que va desde la isquemia hasta el proceso inflamatorio, lo que induce la activación del sistema inmune, el que podría estar participando como uno de los múltiples factores que alteran la ovulación. Por lo tanto, en este estudio se decidió analizar los efectos de la inserción de una aguja de 25G y la micro-inyección de agua en la porción derecha de POA-AHA, sobre la expresión de citocinas pro-inflamatorias en ambas porciones de esta zona hipotalámica, y su posible vinculación con el bajo porcentaje de animales que ovulan después de micro-inyectar el agua. Por lo que también se cuantificó la concentración de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), progesterona (P4), hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) en el suero de animales sacrificados en horas posteriores a cada tratamiento.

Ratas adultas (3 meses), con ciclos estrales de 4 días fueron seleccionadas al azar en la fase del diestro-1. Entre las 8:30 y 9:30 horas las ratas fueron colocadas en un estereotáxico, a 5 grupos de ratas ( $n=9$ ) se les insertó una aguja 25G mantenida en la porción derecha de POA-AHA durante un minuto, y a otros 5 se les micro-inyectó un  $\mu$ L de agua en un minuto. Un grupo de ratas con cada tratamiento fueron sacrificadas a las 3, 6, 24 y 50 horas después de la cirugía, para cuantificar por RT-PCR la expresión del ARNm para la interleucina- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), para del factor de crecimiento tumoral alfa

(TNF- $\alpha$ ) y para el interferón gama (INF- $\gamma$ ) en la porción izquierda y derecha de POA-AHA. En estos grupos experimentales y en otros sacrificados a las 56 h, se cuantificó por RIA la concentración de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, LH y FSH, así como los pesos de los ovarios y del útero. Como grupo experimental control de comparación para los micro-inyectados con agua, se utilizaron animales sin tratamiento sacrificados a las mismas horas ya descritas.

En la región POA-AHA de las ratas intactas, la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  y del INF- $\gamma$  se observó a las 12:00 y 15:00 h del día del diestro-1; mientras que la del TNF- $\alpha$  se presentó en todas las horas analizadas. Este patrón es muy similar en una y otra porción de POA-AHA. La inserción de la aguja incrementa la expresión de los ARNm de las tres citocinas, pero principalmente el de la IL-1 $\beta$ , ya que este se expresa desde las tres a las 50 horas de insertar la aguja, en particular del lado de POA-AHA estudiado. Este efecto no fue modificado por la micro-inyección del agua, pero a las 50 h de realizar este tratamiento, no fue cuantificable el ARNm del IL-1 $\beta$  en ninguna porción de POA-AHA.

La inserción de la aguja estimula la secreción de P<sub>4</sub> a las 50 horas; efecto que no fue modificado por la micro-inyección del agua, e impide la secreción pre-ovulatoria de FSH y LH. Finalmente, la inserción de la aguja incrementa el peso de los ovarios a las tres y seis horas, pero lo disminuye a las 50. Estos efectos son revertidos por la micro-inyección de agua.

En conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que la inserción de una aguja de acero inoxidable 25G a las 09:00 h del diestro-1 estimula la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, especialmente de la IL-1 $\beta$ . Esta citocina estaría promoviendo la secreción prematura de P<sub>4</sub>, lo que provocaría la inhibición de la secreción preovulatoria de LH y FSH. La falta de expresión del ARNm para IL-1 $\beta$  en una y otra porción de POA-AHA, a las 50 horas de micro-inyectar el agua podría explicar que el 40% de los animales tratados ovulen.



## INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, el proceso reproductivo está regulado por la interacción de tres sistemas de regulación: el sistema endocrino, el nervioso y el inmune. El Sistema Nervioso Central (SNC) recibe estímulos del entorno ambiental por medio de los órganos de los sentidos y por vías nerviosas provenientes de los órganos periféricos. El sistema endocrino regula la reproducción mediante la secreción de hormonas secretadas por el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, que actúan mediante mecanismos de retro-alimentación (también conocidos como retro-control o “feedback”, por sus siglas en inglés) sobre los tres componentes del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (Ptaszynska y Molina, 2007). El sistema inmune proporciona protección frente a enfermedades infecciosas por medio de células y moléculas responsables del proceso inmune (Abbas y cols, 2012), pero además regulan de manera inhibitoria la secreción de la GnRH (Wu y Wolf, 2012).

Estos tres sistemas están intercomunicados por medio de citocinas, neuropéptidos, hormonas proteicas, esteroideas, factores de crecimiento, neurotransmisores, aminoácidos, entre otros. Cada uno de estos factores de comunicación celular pueden regular la expresión o la actividad de los demás (Sternberg, 1998).

El estudio de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de GnRH se llevan a cabo a través de diseños experimentales que van desde las lesiones electrolíticas, las deafferentaciones hasta la micro-inyección de fármacos en zonas hipotalámicas y extra-hipotalámicas que están involucradas en esta función. En cualquiera de estos métodos se utiliza la inserción de electrodos o agujas de diferentes dimensiones en el SNC. Por ejemplo, la introducción de una aguja de acero inoxidable 25G (25x16mm ó 5/8´´) en la porción derecha de POA-AHA, a las 09:00 h del estro, bloquea la ovulación en el 100% de los animales. Este efecto no ocurre si la aguja se introduce en POA-AHA izquierda. En el día del diestro-1, la inserción de la aguja en uno u otro lado de POA-AHA provoca el bloqueo de la ovulación. En cambio, en el diestro-2 y el proestro este tratamiento no la afecta (Cruz et al., 2014).

La micro-inyección de solución salina al 0.9% o de agua en la porción izquierda de POA-AHA en el día del diestro-1 revierte el efecto provocado por la aguja, es decir induce la ovulación en todos los animales tratados. En cambio, cuando se realiza este procedimiento en el lado derecho, induce la ovulación en el 40% de los animales (Min, 2012, Pérez, 2012).

Este tipo de manipulaciones experimentales generan daño en el tejido nervioso que va desde la isquemia hasta el proceso inflamatorio, lo que induce la puesta en marcha del sistema inmune, lo que podría impactar en la ovulación. Por lo tanto, en este estudio se decidió analizar los efectos de la inserción de una aguja de 25 G y de la micro-inyección de agua (como uno de los diferentes vehículos que son utilizados) en la porción derecha de POA-AHA, sobre la expresión de citocinas pro-inflamatorias en ambas porciones de esta zona hipotalámica, como posible explicación al bloqueo o a la disminución en el porcentaje de animales que ovulan en el día del estro esperado después de realizar dichas manipulaciones experimentales en la fase de diestro-1.

# MARCO TEÓRICO

## ***Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario***

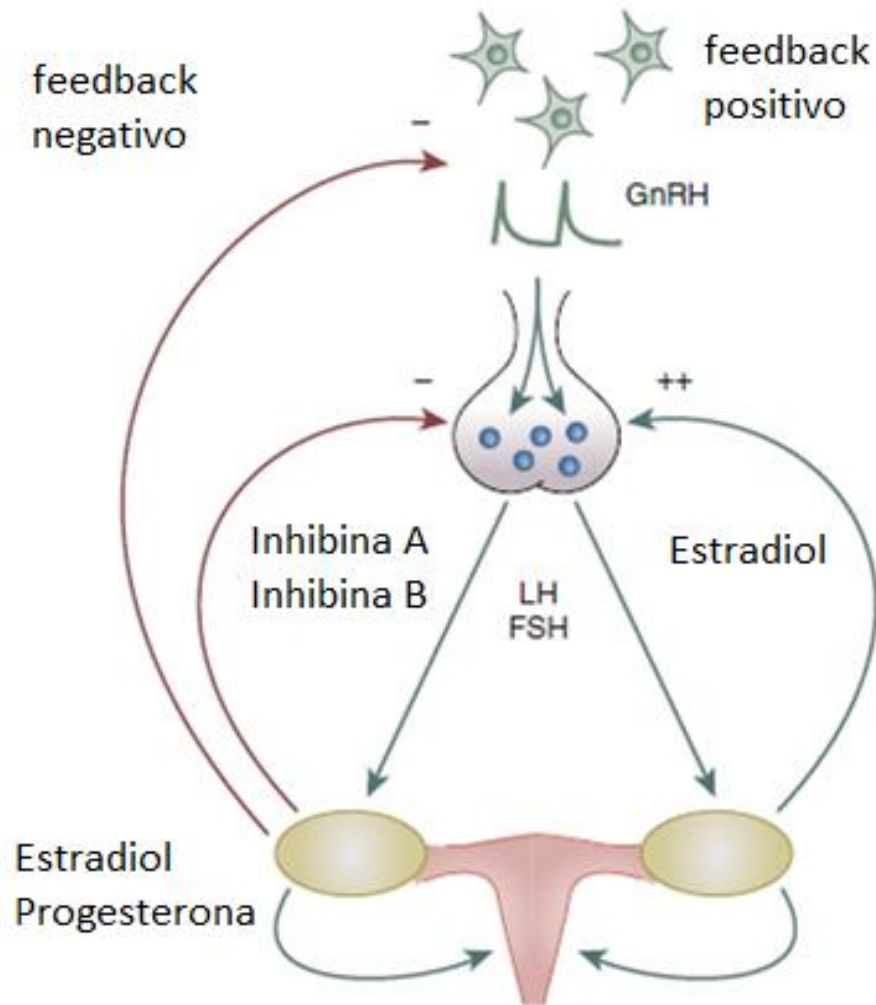
En los mamíferos, el proceso reproductivo está regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Welsh y cols, 1998). El hipotálamo y la hipófisis conforman una unidad funcional cuya comunicación se establece por diversas hormonas peptídicas entre las cuales se encuentra, la hormona liberadora de la gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), cuya secreción es modulada por las hormonas esteroides, péptidos, opioides, neurotransmisores y los aminoácidos (Yao y Bahr, 1998).

La GnRH es secretada por neuronas localizadas en el área preóptica (POA) y en el área hipotalámica anterior (AHA), cuyos axones establecen contacto con los capilares y venas del sistema porta hipotalámico-hipofisario, donde liberan la GnRH, que al ser transportada a la hipófisis anterior, estimula de manera pulsátil la secreción de dos hormonas glucoproteicas: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Yen, 2001).

Ambas gonadotropinas al actuar en el ovario, regulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos, la secreción de hormonas esteroides (estrógenos, progesterona y andrógenos), la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Arimura, 2000). La ovulación es la etapa final de esta serie de procesos que se iniciaron en el hipotálamo (Figura.1).

## ***El Hipotálamo***

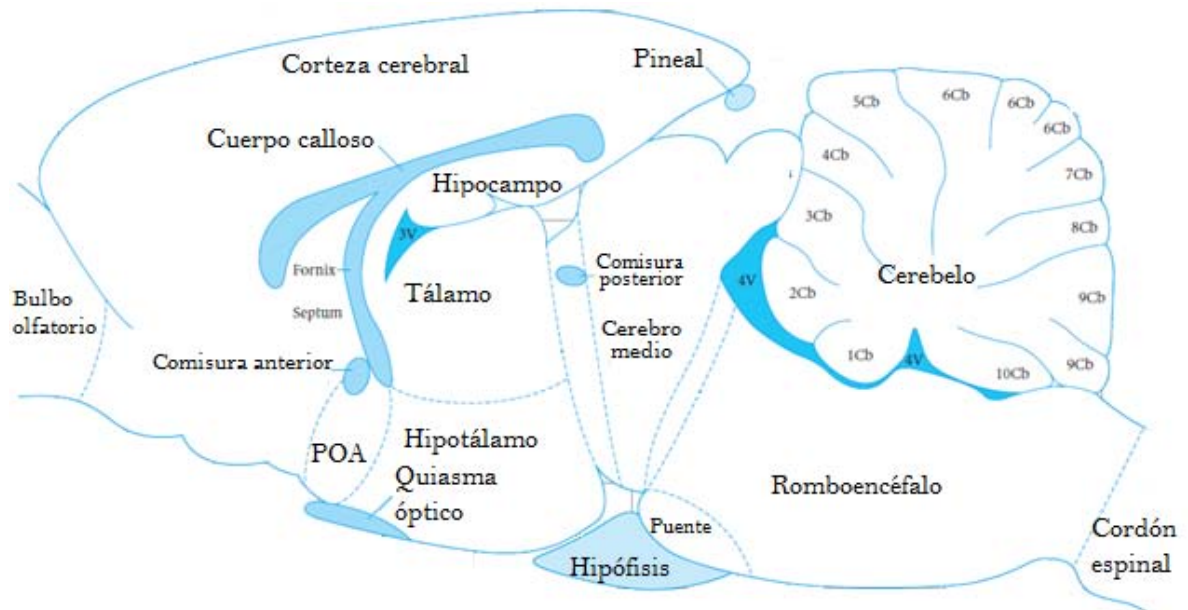
El piso del tercer ventrículo recibe el nombre de hipotálamo, donde están dispuestos los centros que regulan la temperatura del cuerpo, el apetito, el equilibrio del agua y el metabolismo de los hidratos de carbono y de las grasas, la presión arterial y el sueño (Villem, 1996).



*Figura 1. El proceso reproductivo de los mamíferos está regulado por una cascada de señales endocrinas y nerviosas entre el sistema nervioso central, ciertos tejidos secretores, tejidos diana y varias hormonas. El esquema es una representación de los órganos y hormonas más importantes implicadas en la reproducción de la hembra (Tomado de Yen, 2001)*

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y está dividido por el tercer ventrículo en dos porciones: el hipotálamo izquierdo y derecho (McGeer y cols, 1987). Histológicamente, la arquitectura de esta región del cerebro se compone de núcleos y de áreas celulares. Los núcleos son conglomerados de cuerpos neuronales (Norris, 1996), mientras que las áreas son sectores de tejido en los que se reconoce una clara delimitación arquitectónica. El hipotálamo se divide en cuatro

regiones organizadas rostro-caudalmente: el área preóptica (POA), el hipotálamo anterior, el medio y el posterior (Figura 2).



*Figura 2. Corte sagital del cerebro de ratona donde se muestra la ubicación del hipotálamo y el área preóptica, con respecto a las otras zonas del cerebro (tomado y modificado de Paxinos y Watson, 2007)*

**Área preóptica:** Desde el punto de vista funcional se le considera parte del hipotálamo aunque su origen embriológico es diferente. En la ratona esta área ocupa una cuarta parte del total del hipotálamo e incluye el núcleo preópticomedial, el núcleo preóptico periventricular y el órgano vasculoso de la lámina terminal.

**Hipotálamo anterior:** Es una continuación del área preóptica. La parte medial está formada por los núcleos periventricular, supraquiasmático, hipotálamo anterior y paraventricular; la parte lateral contiene el núcleo supraóptico. En el *hipotálamo medio* se reconocen tres zonas: media basal, dorsal y lateral. La zona media basal incluye la eminencia media y los núcleos arcuato y ventromedial; la zona dorsal es ocupada completamente por el núcleo dorsomedial; el borde de la zona medial y lateral se localiza el núcleo perifornical.

*Hipotálamo posterior*: representa una pequeña parte del hipotálamo y también se conoce como región premamilar. Incluye los núcleos: Premamillardorsal y ventral, tuberomamilar, supramamilar, hipotálamo posterior y núcleo arcuato (Silveran, 1994; Palkovits, 2000).

El hipotálamo secreta diferentes péptidos y algunos de ellos son liberados a la circulación local y actúan sobre sus células blanco a distancia. Otros péptidos son liberados en el sistema sináptico, donde actúan como neurotransmisores. La mayoría de las neuronas peptidérgicas del hipotálamo proyectan axones al sistema límbico y otras estructuras relacionadas con el sistema nervioso autónomo (Yamashita y col, 1983; Kupfermann, 1985).

Las neurohormonas liberadas por las neuronas del hipotálamo son: la GnRH, la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), la hormona liberadora de la tirotropina (THR), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), la hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (GHIH) y el factor inhibidor de la liberación de la prolactina (PIF) ( Brown, 1994)

Las neuronas que regulan la función reproductora en los mamíferos se encuentran principalmente a lo largo de la pared del tercer ventrículo y en la parte rostral o anterior del hipotálamo. Los cuerpos celulares que secretan a la GnRH pueden encontrarse en cualquier lugar a lo largo de un eje que se extiende desde los bulbos olfatorios a los núcleos septales mediales, banda diagonal de Broca y área preóptica medial hasta el hipotálamo medio basal (MBH) (Herbison, 2006 ).

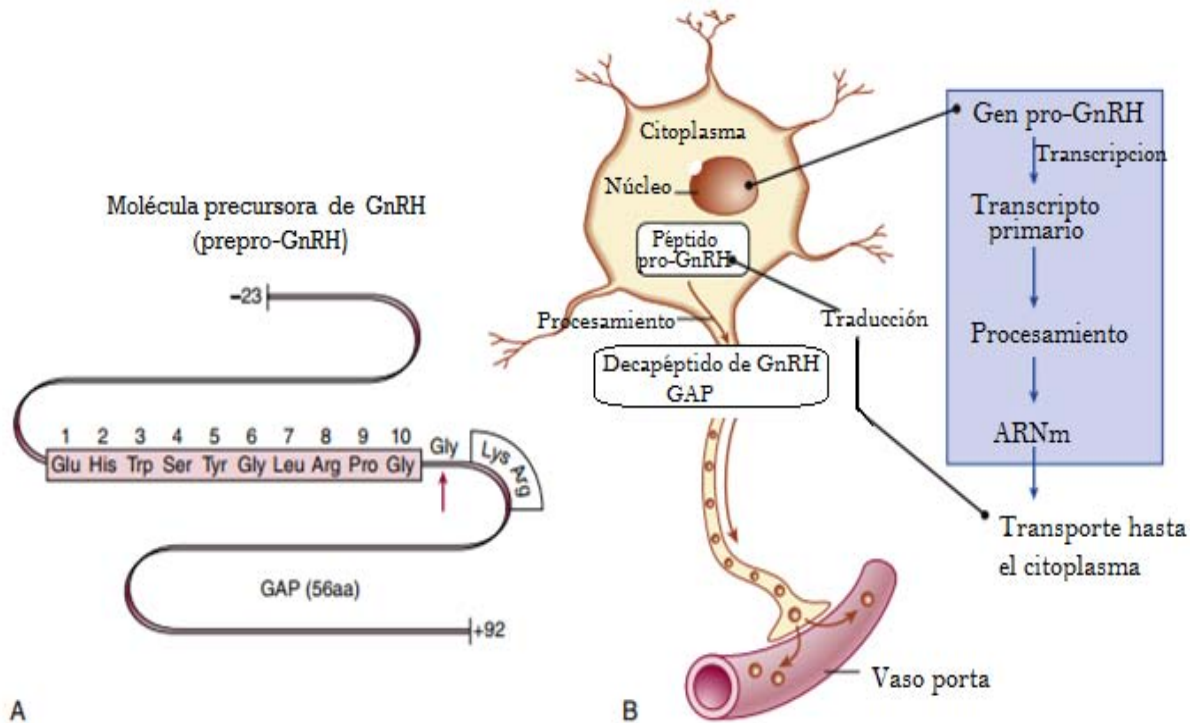
## **La GnRH**

Es un decapeptido que se ha conservado desde los peces hasta el hombre. Esta hormona se genera por pulsos regulados por diferentes neuromoduladores y por los estrógenos. En la de la regulación de la secreción del decapeptido, intervienen, además, otros factores como las endorfinas, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la dopamina, la noradrenalina y la serotonina, la acetilcolina (ACh), el glutamato, la glicina, la kipeptina, el neuropéptido Y (NPY), la sustancia P (SP), el péptido intestinal vasoactivo VIP, estradiol ( $E_2$ ) y la progesterona ( $P_4$ ) (Prieto y Velázquez, 2002).

La GnRH se sintetiza a partir de un precursor (pro-GnRH), que consiste de 92 aminoácidos, dividido en tres partes: un péptido de 23 aminoácidos, seguido por una secuencia de Gly-Lys-Arg esencial para el procesamiento proteolítico y por un residuo de 56 aminoácidos conocido como péptido asociado con la GnRH (GAP) (Yen, 2001). EL gen que codifica GnRH está situado en el cromosoma 8 en humanos y en el cromosoma 14 en ratón. El gen forma parte de cuatro exones cortos y tres largos intrones de aproximadamente 4.5 kb (Herbison, 2006). El primero exon (I) contiene la región 5' no traducida; el exón dos (II) codifica para el péptido señal del decapeptido de la GnRH, para el sitio de amidación y para el sitio del precursor, también codifica para el sitio de amino terminal de once aminoácidos de un segundo péptido asociado de 56 aminoácidos denominado GAP, el cual contiene el segmento prepro-GnRH; el exón tres(III) codifica para los siguientes 32 residuos del GAP; el exón cuatro (IV) codifica para los últimos trece aminoácidos del GAP, para el codón de terminación y para la región 3' no traducida del ARN mensajero (Fan y col, 1995).

El procesamiento molecular en el interior de las neuronas de GnRH ocurre fundamentalmente en el núcleo. Después de la transcripción y el procesamiento del gen de la Pro-GnRH, el ARNm es transportado hasta el citoplasma o el ribosoma, donde tiene lugar la traducción con la generación de GnRH (Yen, 2001). Una vez sintetizado el péptido, es transportado en la vesícula hasta la terminal sináptica, la cual finaliza en la eminencia media, en donde es liberado en los vasos del sistema portal hipotalámico hipofisario (Figura. 3). La liberación de la GnRH se realiza por exocitosis en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la

apertura de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje (Sitges, 1993). Como resultado de la entrada de calcio se activan las enzimas proteolíticas que degradan la membrana plasmática, de tal forma que el péptido es liberado (Charli y cols, 1991).



**Figura 3.-A.** Representación esquemática de la estructura y la secuencia de 92 aminoácidos de la prepro-GnRH. El decapeptido (aminoácidos 1 a 10) ocupa el lugar intermedio entre el péptido señal y la secuencia Gly-Lys-Arg. La flecha indica el sitio de procesamiento proteolítico y la amidación del C terminal de la molécula de GnRH.

**B.** Procesamiento molecular del decapeptido de GnRH. En el núcleo, el gen de pro-GnRH es procesado a ARNm después de la transcripción; el ARNm es transportado hasta el citoplasma del cuerpo celular (soma), donde se genera el péptido pro-GnRH y del péptido asociado con la GnRH (GAP). Luego la GnRH y el GAP son transportados hasta las terminaciones nerviosas y secretados en la circulación porta (tomado de Yen 2001).



## ***Las Hormonas Esteroides***

El colesterol es el precursor de los esteroides, las células lo obtienen 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 las células a partir de acetato producido del ciclo de Krebs y 3) de esteres de colesterol acumulado en el citoplasma de esa célula (O' Malley y Strott, 2001)

Entre las hormonas esteroideas se encuentran los estrógenos,(las más importantes son el  $17\beta$ -estradiol y la estrona), los andrógenos (testosterona y dihidrostestosterona), la hormona progestativa (progesterona) y las hormonas del cortex adrenal (cortisol, aldosterona y la corticosterona).En los machos, los estrógenos regulan el comportamiento sexual, mantienen el sistema óseo, el cardiovascular y participan en la función normal de los testículos y la próstata. La importancia de los andrógenos en la hembra es que son los precursores de los estrógenos y substratos en los que actúa la aromatasa, enzima que sintetiza el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), así como su papel regulador en órganos como el útero, la glándula mamaria y el cerebro (Pettersson y Gustafsson,2001).

Las células de la teca interna del folículo ovárico sintetizan androstenediona y testosterona a partir de colesterol. Los folículos obtienen el colesterol de tres fuentes: 1) de lipoproteínas de baja densidad en la sangre; 2) del colesterol almacenado en las células foliculares o 3) de la síntesis de colesterol por las mismas células foliculares (Gore-Langton y cols., 1994; Hinshelwood, 1999). El primer paso en la síntesis de hormonas esteroides es la formación de la pregnenolona, que es estimulada por la unión de la LH a los receptores que se encuentran en la membrana celular, lo cual induce la formación de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) a partir de adenosintrifosfato (ATP), el cual activa al complejo enzimático citocromo P450 que cataliza la formación de pregnenolona en la membrana interna de las mitocondrias de las células de la teca (Gore-Langton y cols., 1994;Hinshelwood, 1999).

Una vez sintetizada la pregnenolona, sale de la mitocondria y se transforma en progesterona; es a partir de ésta que se forma la 17-hidroxiprogesterona; esta ultima por la acción de la C17,20-liasa se biotransforma a androstenediona, que se convierte a testosterona por acción de la enzima 17 $\beta$ -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) (Gore-Langton y cols, 1994; Hinshelwood, 1999). La androstenediona y testosterona se difunden a través de la membrana basal y llegan a las células de la granulosa, donde son aromatizadas a estrógenos por el complejo enzimático P450-aromatasa, que se activa por el incremento de AMPc a partir de ATP inducido por la unión de la FSH a sus receptores. La testosterona se transformara en E<sub>2</sub> y la androstenediona se transforma en estrona, que será transformada en E<sub>2</sub> por medio de la enzima 17 $\beta$ -HSD (Gore-Langton y cols, 1994).

En la rata, los estrógenos regulan la secreción de la GnRH (Silverman y cols, 1998), al actuar directamente sobre la neurona GnRHérgica o indirectamente, por medio de neuronas que se vinculan con ella, localizadas principalmente en POA-AHA. La función estimulante o inhibitoria de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH, cambia durante el ciclo, como resultado de modificaciones en su concentración en la sangre. Lo que determina el patrón de secreción de la GnRH durante la edad adulta (Freeman ,1994; Funabashi y cols,2002).

Los receptores a estrógenos (RE) son proteínas activadoras ligando-dependientes, que median la actividad de los estrógenos en las células que los poseen o las células blanco (MacGregor yJordan, 1998).

En 1996 Kuiper y colaboradores clonaron el ácido desoxi-ribonucleico complementario (DNAc) del RE de la próstata de rata, al cual denominaron RE subtipo  $\beta$ , para distinguirlo del que previamente se había clonado del útero de la rata, al cual consecuentemente se denominó RE subtipo  $\alpha$ . La importancia biológica de los dos subtipos del RE aún no es muy clara. Mediante la detección del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (por hibridización *in situ*) y la cuantificación de los RE (por la técnica de unión con estrógeno tritiado) en neuronas GnRHérgicas (identificadas por

inmuno-histoquímica) se mostró (Hrabovsky, Shughreu y cols, 2000), que la mayoría de las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE- $\beta$  pero no el ARNm para el RE- $\alpha$ . Otros investigadores (Butler, Sjoberg y cols, 1999) 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 GnRHérgicas que co-expresan el ARNm para ambos tipos de RE, otras expresan sólo el ARNm del RE $\alpha$  y otras sólo el del RE $\beta$  (Shughrue, Lane y cols, 1998).

Hay evidencia de que las células gliales participan en la plasticidad gonadal dependiente de esteroides dentro del hipotálamo. Los astrocitos y células ependimarias expresan REs y pueden servir como dianas importantes para el estrógeno en la alteración de la actividad de la GnRH. El estrógeno podría actuar en la glía para alterar sus relaciones con las neuronas GnRH o cambiar su patrón de secreción del factor de crecimiento (Petrov, 2002).

Un buen ejemplo de la plasticidad inducida por los estrógenos se produce dentro de la eminencia media en el momento de la oleada de GnRH. En este caso no hay evidencia de un reordenamiento de la relación entre los pies del tanacito y las terminales de GnRH que se traduce en un mayor número de terminales de GnRH dentro del espacio pericapilar (King y Letourneau, 1994; Petrov y cols, 1999). Esto está previsto para promover el acceso de la GnRH vertido a la vasculatura portal (Petrov, 2002; King, Ronshei y cols, 1995). También se han reportado cambios dependientes de esteroides gonadales en aposiciones de células glial con los cuerpos celulares de GnRH (Witkin, Ferin y cols, 1991). Cabe señalar que las alteraciones dependientes de estrógenos en la morfología celular glial no son necesariamente lentos, ya que *in vitro* cambios significativos se puede observar en 5 horas (García-Segura, Luquin y cols, 1994).

Hay evidencia que sugiere que el estrógeno altera la secreción de factores de crecimiento derivados de células gliales para modular la actividad de las neuronas GnRH. Estudios *in vitro* en células GT1 han demostrado que el estrógeno puede aumentar la síntesis y la liberación de TGF- $\beta$  de los astrocitos y que esto puede

entonces actuar para estimular la secreción de GnRH (Makarenko, Ugrumov y cols, 2001).

### **La Hipófisis**

Se denomina glándula pituitaria en el hombre, es una pequeña glándula dealrededor de 1 cm de diámetro y 0.5-1 g de peso, situada en la depresión del hueso esfenoides (una cavidad ósea de la base del cráneo) y unida al hipotálamo mediante el tallo hipofisario, el cual contiene el sistema porta hipofisario de vasos sanguíneos. Desde una perspectiva fisiológica, la hipófisis se divide en dos partes bien diferenciadas: el lóbulo anterior o adenohipófisis y el lóbulo posterior o neurohipófisis. Entre ambos existe una pequeña zona poco vascularizada denominada parte intermedia (Guyton y Hall, 2001).

Los lóbulos son en realidad dos órganos endocrinos más o menos separados, (en algunas especies tres) que secretan hormonas. Las hormonas conocidas que secreta la hipófisis anterior son la hormona estimulante del tiroides (TSH); adrenocorticotrópica (ACTH); leutinizante (LH); estimulante del folículo (FSH); crecimiento (GH) y prolactina. La ACTH, la prolactina y la hormona del crecimiento son simplemente polipéptidos o proteínas, en tanto que la TSH, la LH, la FSH son glucoproteínas. Las hormonas secretadas por la porción posterior de la hipófisis en los mamíferos son la oxitocina y la vasopresina. En algunas especies se ha localizado un lóbulo hipofisario intermedio, que contiene derivados hormonales de la molécula pro-opiomelanocorticona, las hormonas estimulantes de melanocitos (MSH), las cuales son la hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH) y la hormona estimulante de melanocitos  $\beta$  ( $\beta$ -MSH) (Kim y cols, 2010).

Desde el punto de vista embriológico, las dos porciones de la hipófisis tienen procedencias diferentes: la adenohipófisis deriva de la bolsa de Rathke, una invaginación embrionaria del epitelio faríngeo, y la neurohipófisis lo hace de una evaginación de tejido nervioso del hipotálamo. El origen de la adenohipófisis en el

epitelio faríngeo explica la naturaleza epitelial de sus células, mientras que el origen de la neurohipófisis en el tejido nervioso justifica la presencia de abundantes células de tipo glial en esta glándula.

La reproducción en casi todas las especies animales está regulada por un mecanismo neuro-hormonal a través de la FSH y la LH producen la maduración de la gónada y la esteroidogénesis (Prieto y Velázquez, 2002).

### **La FSH y LH**

Estas hormonas conocidas como gonadotropinas, pertenecen a una familia de hormonas diméricas glicoproteicas, que comparten características estructurales. Cada hormona es heterodimérica, lo que consiste en dos subunidades diferentes asociadas no-covalentemente; una subunidad- $\alpha$  y una subunidad- $\beta$ . Mientras que la subunidad- $\alpha$  es común para ambos, cada subunidad- $\beta$  tiene una secuencia diferente de aminoácidos, siendo de 111 para la FSH y de 121 para la LH, respectivamente, confiriendo así la especificidad biológica (Bernard y cols, 2000; Káiser, 2011).

Los mecanismos que regulan su secreción son complejos. En parte, depende de la estimulación ejercida por la GnRH y en parte por la acción de inhibinas, que como su nombre lo indica inhiben su secreción, y de activinas que la estimulan (Carroll y cols, 1991). Se ha sugerido que la potencia de la regulación de la GnRH sobre la secreción de las gonadotropinas sería diferente como se ha mostrado en el carnero, especie en la que la GnRH-II libera más FSH que LH cuando se comparan los efectos con la GnRH (Millar y cols, 2001). Otro decapeptido GnRH para el que se sugiere tiene un papel en la regulación de la gonadotropina en el mamífero es la GnRH-III. Esta molécula fue identificada en el hipotálamo humano en 1988 y se ha demostrado que tiene una distribución en el cerebro muy similar a la de GnRH en los seres humanos y ratas, y es posible que esta variante sea secretada desde las terminales nerviosas GnRH en la eminencia media. Y que desempeña un papel fisiológico relacionado con su capacidad de inducir la liberación de FSH (Stopa y cols, 1988).

El evento inicial en el mecanismo de acción de las gonadotropinas es la unión a sus respectivos receptores altamente específicos, localizados en las membranas de las células blanco. Estos receptores pertenecen a una súper familia de receptores acoplados a la proteína G, cuya característica es la de presentar siete regiones transmembranales. La estructura particular del receptor, y los cambios conformacionales que se generan cuando este reconoce a los carbohidratos de la subunidad beta de la hormona, permiten activar al receptor (Ulloa-Aguirre y Timossi 1998; Ulloa-Aguirre y cols, 1999; Zambrano y cols, 1995). Una vez que la hormona se une con su receptor, altamente específicos, se lleva a cabo la activación de una o más proteínas asociadas al nucleótido guanina (proteína G), que realiza el proceso de transducción de señales. Se ha descrito que la glicosilación de la subunidad alfa es esencial para inducir la transducción de señales de las moléculas de FSH y de LH (Ulloa-Aguirre y cols, 1999). Las gonadotropinas pueden ser producidas, no solo por distintos gonadotropos, sino también por el mismo tipo de células. Estas cumplen diferentes funciones biológicas y su síntesis y secreción están reguladas diferencialmente. Esto se debe en gran medida a las diferencias en los mecanismos de regulación transcripcional, post-transcripcional y post-translacional de sus subunidades beta, que son únicas y diferentes para cada gonadotropina (Bernard y cols, 2010).

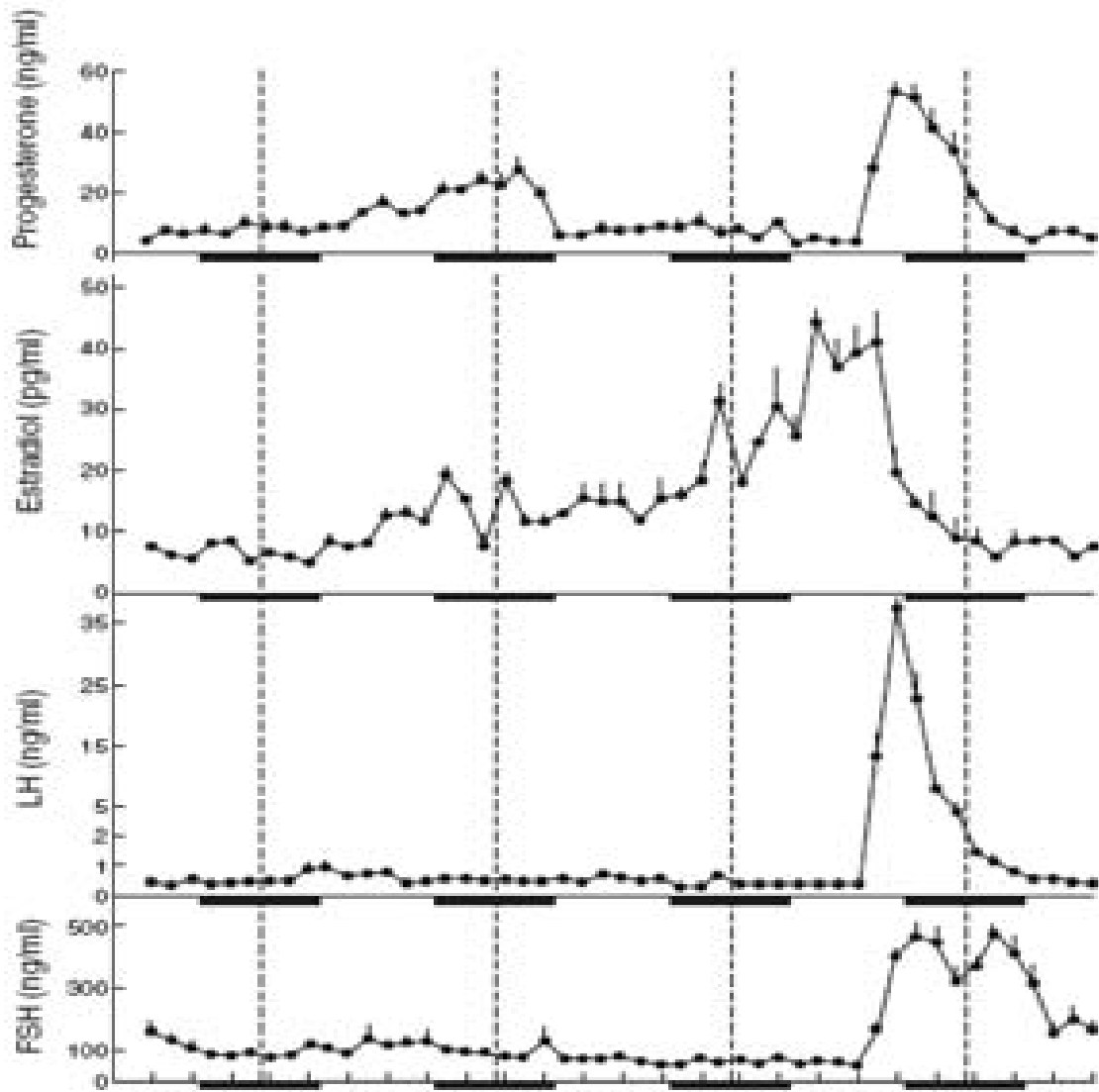
### ***El Ciclo Estral***

La palabra *estro* es una adaptación latina de la palabra griega “oistros” que significa tábano, picadura, o frenesí. Este término fue utilizado por primera vez por Heape en 1900 para describir el “período de deseo sexual de la hembra”. Por el contrario, utilizó el término de *anestro* para describir la época no reproductiva o período de descanso en la hembra, cuando los ovarios y órganos reproductivos accesorios son relativamente hipofuncionales y los intentos de apareamiento del macho son mínimos. 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, lo que depende de la cepa. El ciclo estral de la rata se ha dividido en cuatro fases: diestro-1, diestro-2, proestro y *estro* (Hrabovszky y cols, 2000).

La identificación de las diferentes etapas del ciclo estral están basadas en monitoreo diario del frotis vaginal. En la etapa de diestro-1, la citología vaginal se caracteriza por presentar una gran cantidad de leucocitos. En el día siguiente, diestro-2, en el frotis vaginal se observan una menor cantidad de leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas. En el día del proestro, el frotis vaginal se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas. En el día del estro, el frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas y sin núcleo (Schwartz, 2000).

En los días de estro, diestro-1, diestro-2 y la mañana del proestro, las concentraciones plasmáticas de LH y FSH se mantienen en concentraciones basales, principalmente por el efecto “feedback negativo” o inhibitorio que ejercen los estrógenos y la inhibina. Las concentraciones de LH y FSH circulantes, si bien son bajas, son suficientes para estimular el crecimiento de los folículos ováricos. Conforme los folículos crecen y maduran, la concentración plasmática de  $E_2$  aumenta hasta alcanzar su concentración máxima en la mañana del proestro, evento también llamado secreción preovulatoria de estrógenos o “pico de estrógenos” (Hrabovszky y cols, 2000). La secreción preovulatoria de  $E_2$  estimula la secreción fásica de ambas gonadotropinas, que horas después (en madrugada del estro) induce la ovulación (Figura.4).

Esta secreción masiva de ambas gonadotropinas se conoce como “pico” o secreción preovulatoria de las gonadotropinas. En la mañana del estro ocurre un segundo aumento en la concentración de FSH, cuya función es reclutar los folículos ováricos que iniciarán su crecimiento. Una vez que se produce la ovulación, el folículo se transforma en el cuerpo lúteo, cuya función principal es la secreción de  $P_4$ , como resultado del efecto luteinizante que la LH ejerce en la estructura de este órgano, de tal forma que en la noche del proestro se observa un máximo en la concentración de  $P_4$ , y el otro ocurre en el diestro-1 (Smith y cols, 1975).



*Figura 4. Las concentraciones de progesterona, estradiol, LH, FSH y en el plasma periférico en intervalos de 2 hora a lo largo del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la concentración de la hormona media ( $\pm$ SE) de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en la sala de los animales 06:00-18:00 (tomado y modificado de Freeman, 2006)*



### ***La Asimetría Hipotalámica***

La existencia de una función asimétrica ha sido descrita en los distintos órganos endocrinos pares, incluyendo, la glándula tiroides, las suprarrenales y las gónadas, incluso en el sistema nervioso central (SNC) (Gerendai, 1986). Una de las primeras evidencias de la función asimétrica del hipotálamo, fue mostrada por Gerendai y colaboradores en 1978, al observar que en la porción derecha del hipotálamo medio basal (HMB) hay dos veces más GnRH que en la izquierda. La expresión del ARNm de la GnRH en POA-AHA derecha es mayor que en la izquierda a las 13:00 del diestro-2 (Arteaga y col, 2003).

No solo existe una asimetría en POA-AHA de rata, la cantidad de ARNm para el  $RE\alpha$  tiene un máximo en la tarde del estro (17:00 horas), seguido de un aumento de menor magnitud al mediodía del diestro-2 (13:00 horas); mientras que para el  $RE\beta$ , la máxima expresión del gen se observa al mediodía del diestro-2 (13:00 horas). Estas variaciones durante el ciclo estral también son asimétricas, de tal forma que el lado de POA-AHA que más expresa el  $RE\alpha$  es el lado derecho, mientras que el mensajero del  $RE\beta$  se expresa en ambos lados: en el lado izquierdo a las 09:00 horas y en el lado derecho a la una de la tarde del diestro-2, (Arteaga y col, 2003). Estos resultados ponen de manifiesto que los mecanismos neuroendocrinos que se generan en las porciones izquierda y derecha de POA-AHA son diferentes.

Los estudios llevados a cabo para analizar la participación del hipotálamo en los mecanismos de regulación de la ovulación implican la utilización de técnicas invasivas, ya que se introducen al SNC electrodos para estimular y lesionar ciertas zonas del cerebro, cánulas de acero inoxidable para micro-inyectar fármacos, el cuchillo de Haláz para deaferentar secciones específicas del hipotálamo, etc.

Por ejemplo, la inserción de una aguja de acero inoxidable para micro-inyectar fármacos, involucra la ruptura de capilares que desencadenan la activación de células sanguíneas como macrófagos, leucocitos y glóbulos rojos, que generan una respuesta

inmune. Entre las sustancias que se liberan están citocinas que pueden actuar directamente sobre la neurona GnRH. Introducir una aguja hasta POA-AHA y mantenerla allí durante un minuto, bloquear la ovulación, pero que depende de la porción izquierda o derecha de POA-AHA en la que se introduce la aguja y de la fase del ciclo en el que se lleva a cabo la operación simulada. En la fase del estro, la inserción de la aguja en POA-AHA derecha provocó el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales, mientras que la inserción en POA-AHA izquierda no induce modificaciones, ya que el 80% de los animales ovula. El número de ovocitos, liberados por el ovario izquierdo disminuye en los animales con inserción de la aguja en POA-AHA izquierda, pero el peso de este ovario es semejante al grupo control. En cambio, en las ratas con inserción de la aguja en POA-AHA derecha, se observó aumento significativo del peso de los ovarios. Estos resultados se acompañaron del aumento del peso del útero (Cruz y cols., 2009). En la fase de diestro-1, la inserción de la aguja en POA-AHA izquierda o derecha resulta en el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales, así como el aumento del peso del útero. En las fases de diestro-2 y proestro, la inserción de la aguja en POA-AHA de uno u otro lado no afecta la ovulación (Cruz y cols, 2009).

Cuando se analiza la participación de moléculas endógenas en la regulación de un mecanismo generado en el cerebro, se utilizan fármacos que requieren disolverse para que puedan actuar con facilidad en la zona de estudio. Dos de estos solventes serán agua y solución salina. Estos resultados sugieren que en las fases del estro y diestro-1 la aguja durante un minuto dentro de POA-AHA genera cambios que son fundamentales para que la secreción de GnRH ocurra en el tiempo y la forma que garantiza la ovulación de la rata.

La micro-inyección de agua durante un minuto en el lado derecho de POA-AHA, induce que el porcentaje de animales ovulantes disminuya con respecto a los animales intactos. En cambio, la micro-inyección de agua en la porción izquierda de POA-AHA no modifica la ovulación (Min ,2012). Pero cuando estos resultados se comparan con los obtenidos en los grupos en los que se introduce una aguja vacía, podemos decir que el

agua estimula la ovulación. Estos resultados muestran que todas estas formas de penetrar al hipotálamo provocan daños al tejido que puede ir desde la isquemia, el desequilibrio osmótico del líquido intercelular hasta la necrosis. El daño producido al tejido puede enmascarar los efectos reales de la variable a estudiar.

### ***La Inflamación***

La inflamación es una respuesta innata del sistema inmune que tiene como objetivo proteger y defender el cuerpo. Los desencadenantes pueden ser una intervención que aunque bien esterilizada puede inducir una respuesta inflamatoria causada el daño tisular por la lesión mecánica, o por la falla de asepsia (como la invasión bacteriana o viral). La respuesta inflamatoria está regulada por la movilización y la interacción de varios tipos de células y moléculas de señalización, produciendo una respuesta que es tanto local como sistémica (Monty y cols, 2014). Suele acompañarse de una respuesta generalizada que se conoce como reacción de fase aguda, y se caracteriza por la alteración rápida de las concentraciones de varias proteínas plasmáticas. En algunas enfermedades la activación inmunológica persistente puede ocasionar inflamación crónica, que a menudo tiene consecuencias patológicas (Kindt y cols, 2006).

El tipo de respuesta inflamatoria aguda es de corta duración y, en general beneficiosa para neutralizar amenazas potenciales para el sistema nervioso central, reduciendo al mínimo el daño celular (Skaper, 2007; Fernandes-Alnemri y cols, 2009). Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva puede causar o contribuir al daño tisular y a una patología conocida como el Alzheimer o la esclerosis múltiple. Una vez desencadenadas, las células activadas se dirigen no sólo el sitio inicial de la inflamación, sino también a sitios remotos que están respondiendo al estímulo inflamatorio. La inflamación periférica desencadena una respuesta neuro-inflamatoria que implica a la barrera hematoencefálica, la glía y neuronas. La neuro-inflamación es un término usado para describir la amplia gama de respuestas inmunes del SNC. La

barrera hematoencefálica, es un endotelio (de Vries y cols, 1996; Laflamme y cols, 1999) que protege al cerebro de las respuestas inmunes e inflamatorias periféricas, el SNC también es capaz de activar el sistema inmune innato de protección en respuesta a varias formas de lesión, incluyendo trauma, infección, accidente cerebrovascular y neurotoxinas (Skaper, 2007).

### ***Evidencia experimentales de inflamación en lesiones agudas del SNC***

Condiciones neurodegenerativas agudas tales como la isquemia cerebral y la lesión cerebral traumática se caracterizan por lesiones rápidas y severas al cerebro que conducen a la pérdida sustancial de células nerviosas con déficits en su función (Figura. 5). El primero está relacionado con la interrupción brusca del suministro de sangre al cerebro como resultado de un coágulo o hemorragia, mientras que el segundo es resultado de una lesión física, que en sí a menudo conduce a la isquemia secundaria. Varios procesos han sido implicados en el daño subsiguiente, incluyendo el aumento de la liberación de glutamato (exocitotoxicidad), el estrés oxidativo y alteraciones en la homeostasis iónica (Allan y Stuard, 2003). La revisión del campo de la inflamación en los procesos de isquemia, abarcan la respuesta inflamatoria celular junto con los mediadores inflamatorios y los factores de transcripción. Las principales citocinas que actúan en los procesos de inflamación son: las interleucinas (IL) IL-1, IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), todas ellas pro inflamatorias (Cuenca-López y cols, 2010).

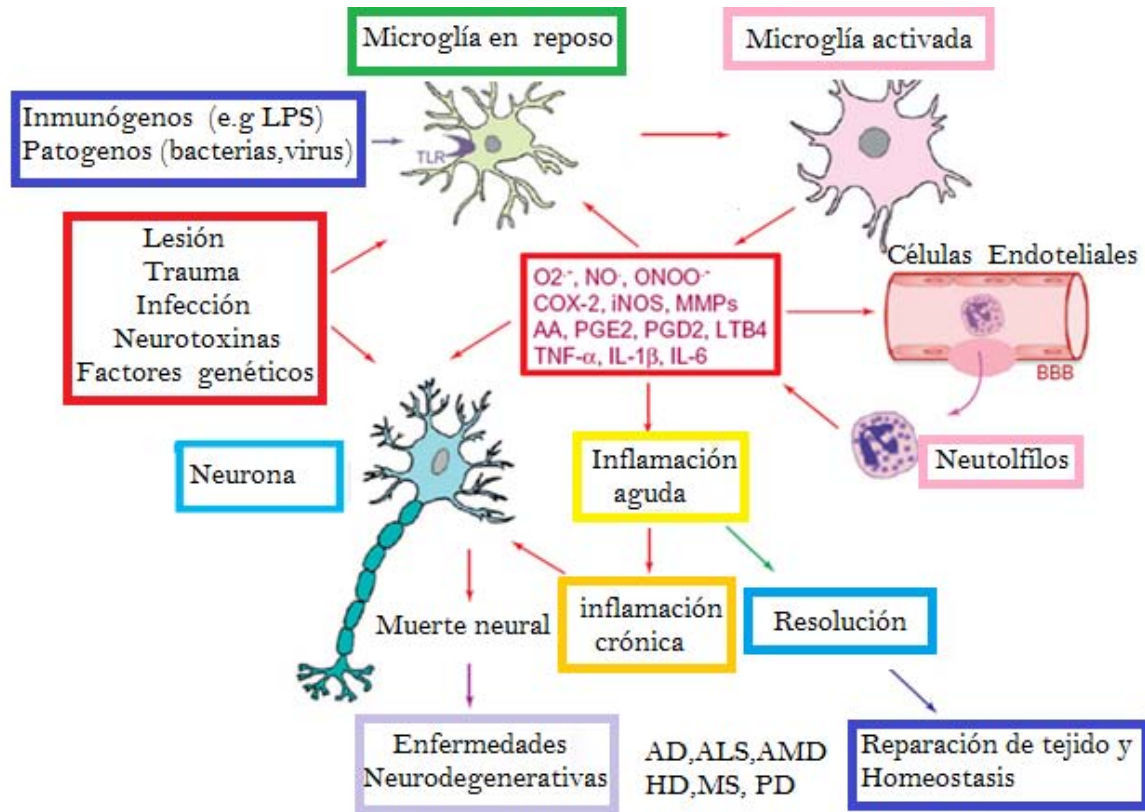


Figura 5. La activación de la microglía en la neuroinflamación y la neurodegeneración. La microglía en reposo se activa tras la exposición a una variedad de los estímulos del sistema nervioso central, incluyendo lesiones traumáticas, accidentes cerebro vascular, infecciones, contaminantes del aire como el ozono y las partículas en el aire, varias neurotoxinas, funciones celulares desreguladas de origen genético o la acumulación de péptidos beta-amiloídes. A pesar de la naturaleza protectora de la barrera hematoencefálica (BBB), cualquier interrupción puede exponer la microglía a una variedad de agentes de circulación pro-inflamatorios que pueden conducir a la activación y reconocimiento por parte de los receptores de superficie de la microglía. Estos incluyen citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1, IL-6, TNF), óxido nítrico (NO) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), así como moléculas inmunogénicas (por ejemplo, LPS, ADN bacteriano) que activan microglía. Los receptores tipo Toll (TLRs). Tras la activación, la microglía desencadenan la liberación de mediadores pro-inflamatorios, incluyendo: Especies de oxígeno reactivo (ROS), así como citocinas y quimiocinas (por ejemplo, IL-1β, IL-6, TNF). Como resultado de la liberación de mediadores pro-inflamatorios, este proceso se amplifica rápidamente a través de la activación adicional de la microglía, dando como resultado una respuesta inflamatoria aguda que puede ser beneficioso para el sistema nervioso central, a condición de que se corta. La progresión normal de la inflamación aguda resulta en la reparación de tejidos, el despacho de fagocitosis y la homeostasis, es presumiblemente mediado por citocinas anti-inflamatorias (por ejemplo, IL-10), y la liberación de anti-inflamatorio y pro-resolución de mediadores lipídicos, como lipoxinas, resolvinas y neuroprotectinas. La respuesta inflamatoria prolongada conduce a la inflamación crónica destructiva (neuroinflamación) que resulta en la muerte neuronal y en última instancia a la aparición de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (AD), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la enfermedad de Huntington (HD), esclerosis múltiple (MS) y la enfermedad de Parkinson (PD) (tomado de Bazan y cols. 2012)

## **Las Citocinas**

En el SNC, las citoquinas son responsables de la activación de la microglía, astrocitos, células endoteliales (Gehrmann y cols, 1995; Cuenca-López y cols, 2010;). Entre las citocinas que pueden actuar directamente sobre la neurona GnRH están la interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e interferón gama (INF $\gamma$ ) (Wu y Wolfe, 2012).

### **La Interleucina-1 (IL-1)**

La IL-1 es una citocina producida por múltiples estirpes celulares, principalmente por macrófagos activados, monocitos y células dendríticas. Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Se conocen tres isoformas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA), inhibidora de las dos anteriores (Thornberry y cols, 1992).

La IL-1 actúa a través de dos receptores diferentes, los receptores tipo I y II (Dinarello, 1991). El receptor tipo I puede encontrarse en varios tipos celulares y se une a ambas isoformas de la IL-1. Por el contrario, el receptor tipo II se encuentra sobre la superficie celular de neutrófilos, linfocitos B y macrófagos, y manifiesta una alta afinidad por la IL-1 $\beta$  (Koga y cols, 1992).

En condiciones fisiológicas, la IL-1 es sintetizada en el SNC por varios tipos celulares como la microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales en concentraciones bajas o indetectables (Rothwell, 1991). Sin embargo, la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  aumenta rápidamente después de diferentes estímulos neurotóxicos, como la neurotoxicidad inducida por cainato o lipopolisacáridos, o después de un proceso isquémico (Buttin y cols, 1994), lo que conduce a un aumento de la proteína unas horas después (Davies y cols, 1999). En modelos animales, se ha observado que tan solo 20 minutos después de una oclusión cerebral global transitoria aumentaron tanto las concentraciones de ARNm como de proteína de la IL-1 $\beta$ , no solo durante la

repercusión temprana (1 h) sino también en las 6 a 24 horas posteriores, indicando la existencia de una expresión bifásica de dicha citocina (Haqqaniy cols,2005).

Las dos isoformas y su inhibidor endógeno, el IL-1RA, se han estudiado en el infarto cerebral experimental. Diversos estudios han correlacionado el aumento de las concentraciones de IL-1 después de la isquemia con un incremento en el volumen del infarto. Además, las concentraciones elevadas de IL-1 se han asociado al mal pronóstico en los pacientes con infarto cerebral. Este hecho podría deberse a que la IL-1 es un potente pirógeno, que media en el aumento de la temperatura corporal (Azzimondi y cols, 1995).

Por otro lado, diferentes estudios llevados a cabo en rata han demostrado que la inyección interventricular de IL-1 $\beta$  recombinante después de una oclusión de la arteria cerebral media (ACM) aumenta la formación del edema cerebral, el tamaño de la zona infartada y la infiltración de neutrófilos (Yamasaki y cols, 1995). Sin embargo, y a pesar de los resultados hasta ahora expuestos, la neurotoxicidad de la IL-1 es controversial, ya que la administración de IL-1 en el cerebro sano no causa ningún daño, y cuando se añade a neuronas aisladas en cultivo, tampoco causa su muerte. Es más, otros estudios han reflejado un posible efecto neuroprotector de la IL-1. Así, la adición de IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  a cultivos celulares de neuronas corticales de ratón produjo la atenuación de la neurotoxicidad inducida por N-metil-D-aspartato (NMDA) (Carlson y cols, 1999). El tratamiento de neuronas corticales de rata en cultivo con IL-1 $\beta$  atenuó la muerte neuronal causada por la exposición aminoácidos excito tóxicos como glutamato, NMDA, AMPA o cainato. Asimismo, los ratones deficientes en IL-1, en comparación con ratones silvestres, presentan infartos más pequeños cuando se sometieron a modelos de isquemia. La sobreexpresión o el tratamiento con IL-1RA reduce el tamaño del infarto y la gravedad de los déficit neurológicos, mientras que ratones deficientes en IL-1RA exhiben un aumento drástico del daño isquémico. Se ha postulado que los efectos neuroprotectores atribuidos a IL-1 $\beta$  puedan estar parcialmente mediados por la inducción de factor de crecimiento nervioso (NGF), ya que en algunos casos la

neuroprotección mediada por la IL-1 se inhibió tras la administración de un anticuerpo neutralizante de la actividad del NGF (Carlson y cols, 1999).

Evidencia experimental mostró que en el hipotálamo, IL-1 $\beta$  mejoró los niveles de síntesis, y la liberación de péptidos opioides endógenos (POE) y taquiquininas (Tachs), dos familias de los neuropéptidos que inhiben la actividad LHRH. Farmacológica y datos bioquímicos sugieren que la IL-1 estimula taquiquininas en el hipotálamo, que inhiben las neuronas LHRH, ya sea mediante la estimulación de la actividad de  $\beta$ -endorfina o por la acción directa. IL-1 puede mejorar en sí POE en el hipotálamo para suprimir LHRH (Kalra y cols, 1998)

### ***El Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ )***

El TNF- $\alpha$  es una sustancia química del grupo de las citocinas pro-inflamatorias que es liberada por células del sistema inmune. En el SNC, esta citocina constituye el principal mediador de inflamación que induce una cascada de eventos celulares que culminan con la muerte neuronal. El TNF- $\alpha$  posee una diversidad de funciones implicadas en la defensa inmunitaria, homeostasis celular y protección frente a varios tóxicos neurológicos (Sriram y cols, 2007). Las acciones biológicas del TNF- $\alpha$  están mediadas por dos tipos de receptores celulares: el receptor 1 (TNFR1, p55) y el receptor 2 (TNFR2, p75) (Wang y cols, 1994).

Se ha demostrado que, después de una oclusión de la ACM, la inducción de TNF- $\alpha$  se asocia con la exacerbación del déficit neurológico y el incremento del tamaño del infarto cerebral (Barone y Feuerstein, 1999).

El análisis de la expresión temporal del ARNm de citocinas en ratas isquémicas ha revelado que la sobrerregulación del ARNm del TNF- $\alpha$  es proporcional a la sobreexpresión de IL-1 e IL-6. Inicialmente se observan aumentos en la expresión entre 1-3 horas después de la inducción de la isquemia cerebral y, posteriormente, vuelve a



haber un segundo pico de expresión entre las 24-36 horas, mostrando por tanto una expresión en dos fases (Murakami y cols, 2005).

### ***El Interferón Gamma IFN- $\gamma$***

Los interferones se caracterizaron primero como proteínas antivirales producidos por células huésped. Más tarde se encontró que los interferones tienen actividad antiproliferativa y también sirven como agentes moduladores de los macrófagos y las células asesinas naturales. Consisten en tres familias de moléculas proteínicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) cuya producción puede ser inducida, en la mayoría de las células, por varios estímulos diferentes. El interferón- $\alpha$  es inducido en varios tipos de leucocitos por células extrañas, células infectadas por virus, células tumorales, células bacterianas y virales. El interferón- $\beta$  se produce en fibroblastos, células epiteliales y macrófagos por ácidos nucleicos virales y otras. El interferón- $\gamma$  se induce en los linfocitos T por antígenos extraños a la que las células T se sensibilizan (Ballou, 2005; Samuel, 2001), y las células asesinas naturales (NK). Tiene importancia fisiológica en regulación inmune y eventos inflamatorios. IFN- $\gamma$  también promueve respuestas anti y pro-inflamatorias, a través de su capacidad para mejorar la producción TNF- $\alpha$ . Se proponen que esta citocina participa en el proceso inflamatorio del cerebro, ya que está asociada al desarrollo de mielina y la re-mielinización (Tanner y cols, 2011).

## JUSTIFICACIÓN

Previamente se ha mostrado que la inserción de una aguja de acero inoxidable en la porción derecha de POA-AHA en el día del diestro-1, a las 9:00 de la mañana, provoca bloqueo de la ovulación, mientras que la inyección de agua provoca que se estimule la ovulación en el 40% de los animales. Ambas manipulaciones quirúrgicas provocan daño físico al tejido, y quizá isquemia y edema transitorios, lo que podría estar vinculado con la falta de ovulación. Por lo que en este estudio se decidió analizar los cambios en la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  en la porción izquierda y derecha de POA-AHA de animales a los que se les inserto una aguja de acero inoxidable o se les micro-inyectora 1  $\mu$ L agua en POA-AHA derecha. Con la finalidad de analizar las causas por las que uno y otro tratamiento modifica la ovulación, en grupos con inserción de la aguja de acero inoxidable o con micro-inyección de 1  $\mu$ L agua en POA-AHA derecha se les cuantificó las concentraciones séricas de 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), progesterona (P<sub>4</sub>), FSH y LH.

## HIPÓTESIS

Dado que en la mañana del diestro-1, la inserción de una aguja de acero inoxidable, en la porción derecha de POA-AHA provoca el bloqueo de la ovulación, como resultado del daño físico al tejido nervioso, entonces la expresión del ARNm de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  estará aumentada y la concentración sérica de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, FSH y LH se verán alteradas.

Si la micro-inyección de 1  $\mu$ L de agua en la porción derecha de POA-AHA induce la ovulación solo en el 40% de los animales, entonces tanto la expresión del ARNm de citocinas pro-inflamatorias como la concentración sérica de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, FSH y LH serán diferentes a las observadas en los animales con inserción de la aguja.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar si la modificación en la ovulación resultado de la inserción de una aguja de acero inoxidable o la micro-inyección de agua en la porción derecha de POA-AHA en el día del diestro-1, se debe a un proceso inflamatorio en esta zona hipotalámica.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  de lado derecho e izquierda de POA-AHA, en animales con inserción de una aguja de acero inoxidable en la porción derecha de POA-AHA a las 3, 6, 24 y 50 horas posteriores a la cirugía.
- Cuantificar la concentración de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> FSH y LH, en el suero de animales con inserción de una aguja de acero inoxidable en la porción derecha de POA-AHA a las 3, 6, 24, 50 y 56 horas posteriores a la cirugía.
- Analizar la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  de lado derecho e izquierda de POA-AHA, en animales con micro-inyección de agua en la porción derecha de POA-AHA a las 3, 6, 24 y 50 horas posteriores a la cirugía.
- Cuantificar la concentración de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> FSH y LH en el suero de animales con micro-inyección de agua en la porción derecha de POA-AHA a las 3, 6, 24, 50 y 56 horas posteriores a la cirugía.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### ***Animales***

Se utilizaron ratas hembra adultas de tres a cuatro meses de edad, de la cepa CIIZV, las cuales fueron mantenidas desde su nacimiento en un periodo de 14 horas luz y 10 horas de obscuridad (luz de 05:00 a 19:00 horas), a una temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con libre acceso al agua y alimento. El ciclo estral fue monitoreado diariamente por medio de la toma de frotis vaginales, sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración.

### ***Cirugía esterotóxica***

A las 8:00 h del día del diestro-1, las ratas se anestesiaron con 25 mg/kg de pentobarbital sódico (PISA Agropecuaria) por vía intra-peritoneal. Una vez anestesiadas, entre las 8:30 y 9:30 horas los animales se colocaron en el aparato esterotóxico, fueron afeitadas en la zona dorsal de su cabeza, con jabón antiséptico para dejar al descubierto el cuero cabelludo y realizar una incisión de aproximadamente un centímetro de largo, desde el hueso frontal a la parte media de los parietales.

Se procedió a limpiar el área con agua oxigenada hasta que se visualizó Bregma (punto donde se unen los dos huesos parietales con el frontal). Para llegar a la zona de estudio e introducir la aguja, se utilizaron las coordenadas: Antero-Posterior=0.4, Lateral=0.6 y Vertical= 0.85, con base a las coordenadas del Atlas del cerebro de rata de Köning y Klippel (1963).

Una vez en el punto cero o Bregma, se perforó el cráneo, mediante el uso de una fresa acoplada a un roto-motor odontológico y se conformaron los siguientes grupos experimentales.

Operación simulada: se introdujo una aguja de acero inoxidable de 25G (0.5mm) de diámetro x16 mm de largo (marca BD plastipak) hacia la porción derecha de POA-AHA.

Micro-inyección de agua: una vez introducida la aguja en POA-AHA se inyectó 1 µl de agua (destilada y estéril) a una velocidad de 60 segundos, a través de un tubo de teflón de 0.06 de diámetro interno, conectado a una jeringa Hamilton de 25µL, acoplada a una bomba de micro-inyección automática (CMA/100). Finalmente se retiró la aguja, se suturo la herida.

Grupos control: intactos los cuales no se les realizó modificación alguna.

### ***Sacrificio y autopsia***

Los animales de inserción de aguja y micro-inyección con agua fueron sacrificados por decapitación a las 3, 6, 24, 50 y 56 horas posteriores a la cirugía. Se colectó la sangre del tronco, y se dejó a temperatura ambiente por 20 min. Después fue centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero, el cual se almacenó a -4°C hasta la cuantificación de gonadotropinas por radio-inmuno-análisis. Los ovarios y el útero fueron extraídos y pesados en una balanza analítica.

### ***Extracción de ARN total***

El cerebro se extrajo de la cavidad craneal y fue colocado en solución salina estéril fría, se disectó POA-AHA, y se procedió a separar en lado izquierdo y derecho las porciones del área, inmediatamente se colocaron en tubos eppendorf con 500 µL de Trizol®, es importante mencionar que por cada punto evaluado de POA-AHA izquierda o derecha son tres porciones izquierdas y derechas respectivamente. En total se procesaron los cerebro de 9 animales, e haciendo un total de 3 tubos por modelo experimental. Estas muestras fueron homogenizadas en un Politron; modelo PT-MR3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza).

Se adicionaron 250 $\mu$ L de cloroformo al 99% de pureza y se agito por 30 segundos. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C durante 30 minutos.

Los tubos presentaron dos fases: una fase inferior orgánica de color rosa y la fase superior incolora.

La fase incolora se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen, similar a lo extraído, de alcohol isopropilico. Después fueron almacenadas a 4°C durante 24 hrs como mínimo y como máximo 72horas.

Los tubos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 15 min para la precipitación del ARN, terminada la centrifugación se decantó el isopropilico con cloroformo del tubo y se le adicionaron 100  $\mu$ L de alcohol al 80% y se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm.

Finalizada la centrifugación se decantó y se colocaron los tubos de forma inversa sobre una gasa estéril y se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min, esto debido la insolubilidad del ARN en alcohol.

Ya seco el ARN se hidrato con 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O con DEPC 0.1% y se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de la muestra.

### ***Cuantificación del ARNm***

La concentración de ARN en la muestra de POA-AHA, se determinó con una dilución de 1:100, obteniendo 2 µL de la muestra, previamente centrifugada durante 5 segundos, a los cuales se adicionaron 198 µL de agua estéril, esto por cada muestra.

Se realizó la lectura de las muestras a una absorbancia de 260 nm y 280 nm, la concentración de ARN se determinó por la siguiente relación:

$$(\text{ARN}) = \frac{\text{Abs}_{260\text{nm}} \times (40) \times \text{FD}}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Donde:  $\text{Abs}_{260\text{nm}}$  es la absorbancia a 260nm.

40 es el coeficiente absortividad molar del ARN

FD es el factor de dilución

### ***Obtención del ADNc a partir del ARN mediante retrotranscripción***

La obtención del ADNc se realizó mediante una retrotranscripción en la cual se adicionaron 2 µg de ARN total. La desnaturalización se llevó a cabo en un volumen de 10 µL con los siguientes componentes:

Agua + 0.5 µL de oligo dT (0.5 µg/ µL) + 2.0 µg ARN=10 µL.

Se incubaron a 65°C por 10 minutos en el termociclador ( Eppendorf Scientific Inc. Alemania), e inmediatamente después se colocaron en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó por 5 segundos, y se volvió a colocar en hielo.

A cada muestra se le adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de retrotranscripción cuyos componentes se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.- Reactivos utilizados en la retrotranscripción**

Reactivos	Para c/ muestra
Amortiguador RT 5x	4.0 $\mu\text{L}$
DTT	2.0 $\mu\text{L}$
dNTP'S	2.0 $\mu\text{L}$
RT M-MLV	0.5 $\mu\text{L}$

Después se incubaron a  $62^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos, inmediatamente se incubaron a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Se colocaron en hielo durante 5 minutos y se centrifugaron a 14,000rpm durante 5 segundos. Se etiquetaron los tubos con fecha y se enumeran dependiendo de la muestra, se les adicionaran 80  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizó el PCR punto final.

### **Evaluación de la expresión de citocinas mediante PCR punto final**

Para la evaluación de la expresión de los genes de citocinas se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen a amplificar, los genes amplificados fueron Interleucina  $-1\beta$ (IL- $1\beta$ ), Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), y como control interno se utilizó  $\beta$ -actina, en la tabla 2 se especifican las secuencia de los oligonucleótidos y en el tabla 4 los reactivos y volúmenes utilizados en la técnica de PCR punto final.



**Tabla 2.- Secuencia de los oligonucleótidos, temperatura y número de ciclos del PCR**

<b>Gen</b>	<b>Secuencia sentido</b>	<b>Secuencia antisentido</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>B-actina</b>	AGA GGG AAA TCG	CAA TAG TGA TGA	<b>56 °C</b>	<b>29</b>
	TGC GTG AC	CCT GGC CGT		
<b>IL-1</b>	CAA CCA ACA AGT	GAT CCA CAC TCT	<b>56 °C</b>	<b>29</b>
	GAT ATT CTC CAT G	CCA GCT GCA		
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CAT CTT CTC AAA ATT	TGG GAG TAG ACA	<b>56 °C</b>	<b>29</b>
	CGA GTG ACA A	AGG TAC AAC CC		
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	TCA AGT GGC ATA	TGG CTC TGC AGG	<b>55 °C</b>	<b>29</b>
	GAT GTG GAA GAA	ATT TTC ATG		

Las reacciones se efectuaron en un termociclador de gradiente a las temperaturas y ciclos que se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.- Reactivos utilizados en el PCR punto final**

<b>Reactivos</b>	<b>Para c/ muestra</b>
Amortiguador 10x	1 $\mu$ L
dNTP'S	0.4 $\mu$ L
Oligos	0.4 $\mu$ L
Agua	4.95 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	1.2 $\mu$ L
Taq Polimerasa	0.05 $\mu$ L

Los números de ciclos además de la temperatura de alineación de los genes en cuestión fueron previamente estandarizados para la optimización del experimento.

## Electroforesis

Los productos de PCR se evaluaron mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida, para los cuales en la tabla 4, se mencionan los componentes para la reacción de los geles.

**Tabla 4.- Reactivos utilizados en la electroforesis**

Reactivos	Cantidad c/ muestra
Agua Destilada	2.75 ml
Acrilamida – Bisacrilamida	1.66 ml
TBE 10x	0.5 ml
APS	80 $\mu$ L
TEMED	6 $\mu$ L

A cada tubo con los productos de PCR se le añadieron 5  $\mu$ l de solución amortiguadora de carga, después se colocaron en los pozos de los geles. La electroforesis se realizó en una cámara vertical (modelo Mini-PROTEAN 3 Dodeca Cell para 1 a 12 geles, marca Bio-Rad), para la corrida de las muestras, se llenó la cámara de electroforesis con buffer amortiguador TBE 1x. Se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, se graduó el voltaje a 150V y se dejaron correr durante 45 min.

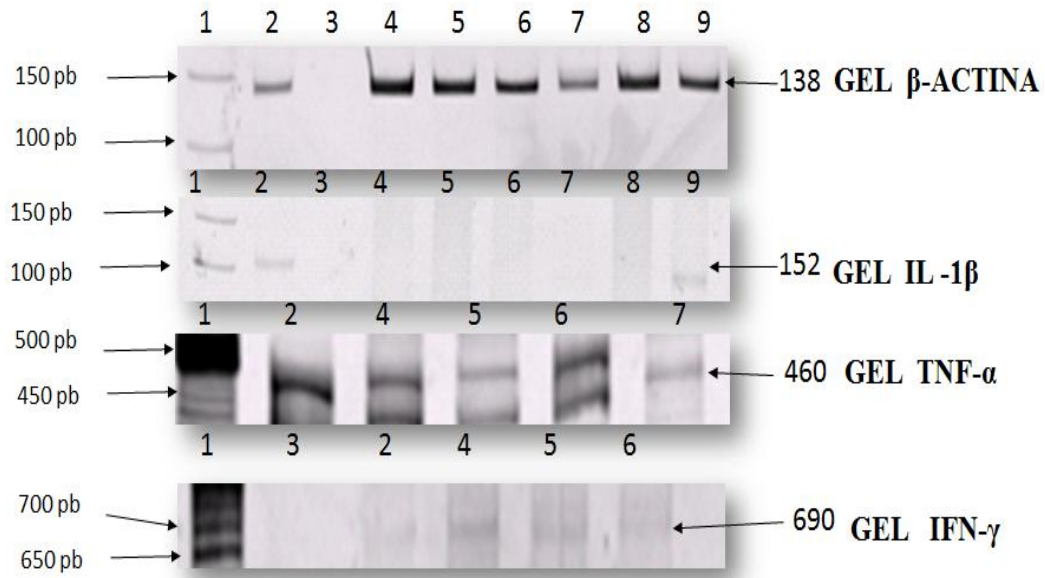
Las bandas resultantes de los corrimientos de las muestras en los geles se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Las fotografías del gel fueron tomadas con una cámara Kodak EDAS 216. Y las bandas fueron analizadas por medio del sistema de análisis Logic Gel 112. Los pesos para cada una de las citocinas y del control se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.- Peso de las secuencias esperadas en las reacciones de PCR punto final.**

<b>GEN</b>	<b>PESO DEL GEN</b>
B-ACTINA	138 pb
IL-1 $\beta$	152 pb
TNF- $\alpha$	460 pb
INF- $\gamma$	690 pb

**Valoración del entre cruzamiento de las muestras de rata con oligonucleótidos de ratón por electroforesis**

Debido a que los oligonucleótidos utilizados para evaluar las muestras utilizadas en esta tesis fueron de rata, se hizo una evaluación de las mismas muestras mediante una electroforesis con muestras de rata y como control positivo una muestra de ratón, en la siguiente imagen se muestran cada uno de los geles evaluados para cada uno de los oligonucleótidos utilizados en este experimento (Figura 7).



**Figura 5.- Evaluación de geles de poliacrilamida de cada gen. Los números corresponden a las siguientes muestras de los grupos experimentales 1.- Marcador de peso, 2.-Control positivo, 3.- Control negativo, 4.- Intacto izquierdo, 5.-Intacto derecho, 6.-Micro-inyección izquierda lado derecho POA-AHA, 7.- -Micro-inyección izquierdalado izquierdo POA-AHA, 8.-Micro-inyección derecha lado izquierdo POA-AHA, 9.- Micro-inyección izquierda lado derecho POA-AHA.**

### **Cuantificación de hormonas**

Para realizar la cuantificación de la concentración de hormonas esteroideas y proteicas, se realizaron por ensayo por Radio Inmuno Analisis (RIA), de las cuales se determinó la concentración de FSH y LH, los estuches comerciales de la marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) fueron utilizados para determinar la concentración de estas hormonas; para el caso de la determinación de hormonas esteroideas se cuantificó mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) y por RIA, en la cual se utilizó el kit para Elisa de DRG® Progesterone.

Para la cuantificación por medio de RIA se utilizaron tubos de polipropileno impregnados con anticuerpo de coneja, viales de hormonas marcadas (FSH marcado con I-<sup>125</sup> anticuerpo policlonal en fase líquida y anti-FSH monoclonal inmovilizado en los tubos de polipropileno; LH marcado con I-<sup>125</sup> anticuerpo policlonal en fase líquida y anti-LH monoclonal inmovilizado en los tubos de polipropileno), los calibradores para

establecer la curva patrón para cada hormona (FSH: $I^{125}$  0, 1.5, 5, 15, 30, 60 y 100 ng/ml; LH: $I^{125}$  0, 1, 5, 7, 15, 30, 75, 150 y 300 ng/ml).

A cada tubo se le adicionaron 100 $\mu$ L del suero de la muestra más 1000 $\mu$ L de la hormona marcada. Los tubos fueron agitados durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas.

Posteriormente se los tubos se decantaron y se limpiaron por la parte externa, finalmente con la ayuda de un contador de centello Gama (modelo Cobra 5005, packard), se cuantificó la cantidad de hormona problema. Los datos de la concentración de FSH y LH se expresaron en ng/ml.

Para las cuantificaciones de las hormonas progesterona y estradiol por ELISA se utilizó el kit para progesterona y estradiol de DGR®, el cual consta de una placa de 96 pozos sensibiliza de anticuerpo policlonal anti-progesterona y anti-estradiol, además para construir la curva patrón se utilizaron calibradores para cada hormona (P<sub>4</sub>: 0, 0.3, 1.25, 2.5, 5, 15 y 40 ng/ml; E<sub>2</sub>: 0, 25, 100, 250, 500, 1000 y 2000 ng/ml).

Se añadieron 25  $\mu$ L de la muestra o del control esto dependiendo del arreglo en la placa y se dejaron incubar durante 5 minutos.

Después se le agregaron 200  $\mu$ L de enzima conjugada esto para los dos tipos de ensayos, se agitó durante 10 segundos.

Se incubaron 60 minutos esto para progesterona, mientras que el estradiol se dejó incubar durante 120 minutos.

Pasado el tiempo de incubación se hizo un lavado en tres tiempos usando la solución de lavado antes preparada como menciona el inserto del kit.

Inmediatamente después se le adicionaron 200  $\mu$ L de solución de sustrato en el caso de progesterona y 100  $\mu$ L para estradiol, se dejan incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se le agregan 100 $\mu$ L de solución de paro esto para progesterona, mientras que estradiol se le adicionaron 50 $\mu$ L de la misma, y se dejaron reposar durante 10 minutos.

Para la lectura se utilizó el espectrofotómetro Multiskan™ GO (Marca Thermo Scientific™), a una absorbancia de 450 $\pm$ 10 nm.

Los datos de la concentración de progesterona se expresaron en ng/ml y los de estradiol en pg/ml.

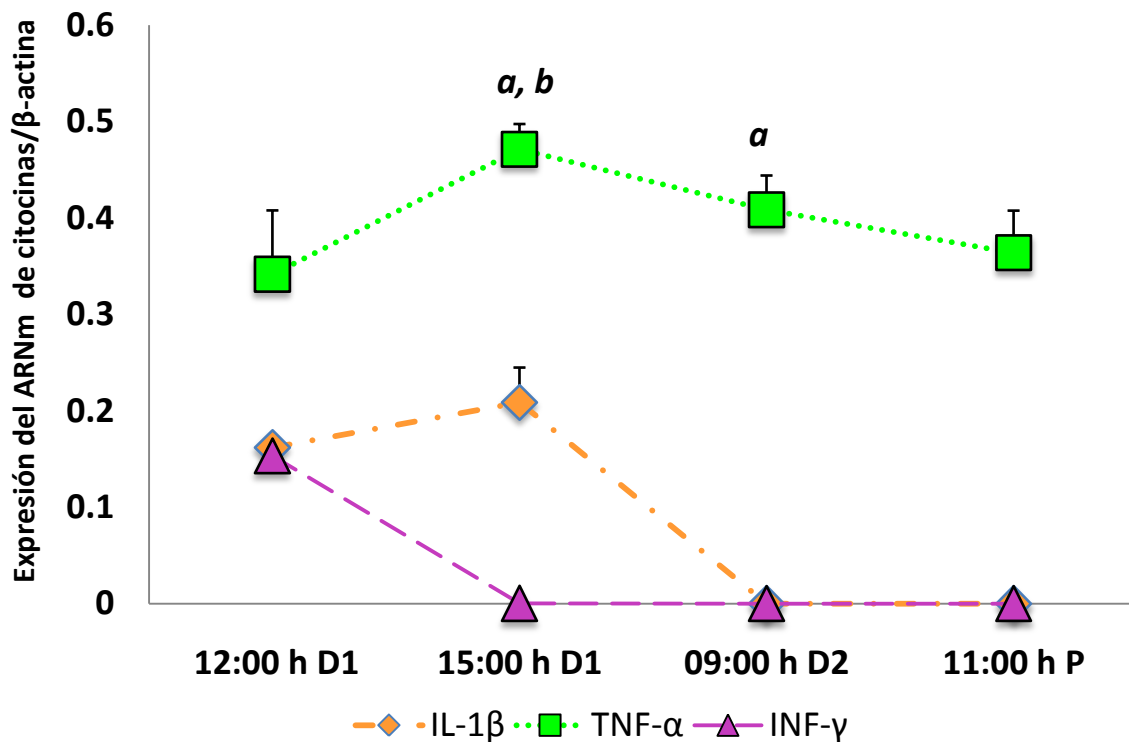
### ***ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

Los resultados de los datos del peso de los ovarios, del útero, de la concentración sérica de las hormonas y de la expresión relativa del ARNm para  $\beta$ -actina, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza múltiple (ANOVA), seguida de la prueba de Tukey. En el caso en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de una “t” de Student. En todos los casos se aceptaron como significativas todas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue  $\leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### Expresión de citocinas en diferentes momentos del ciclo estral de la rata adulta intacta

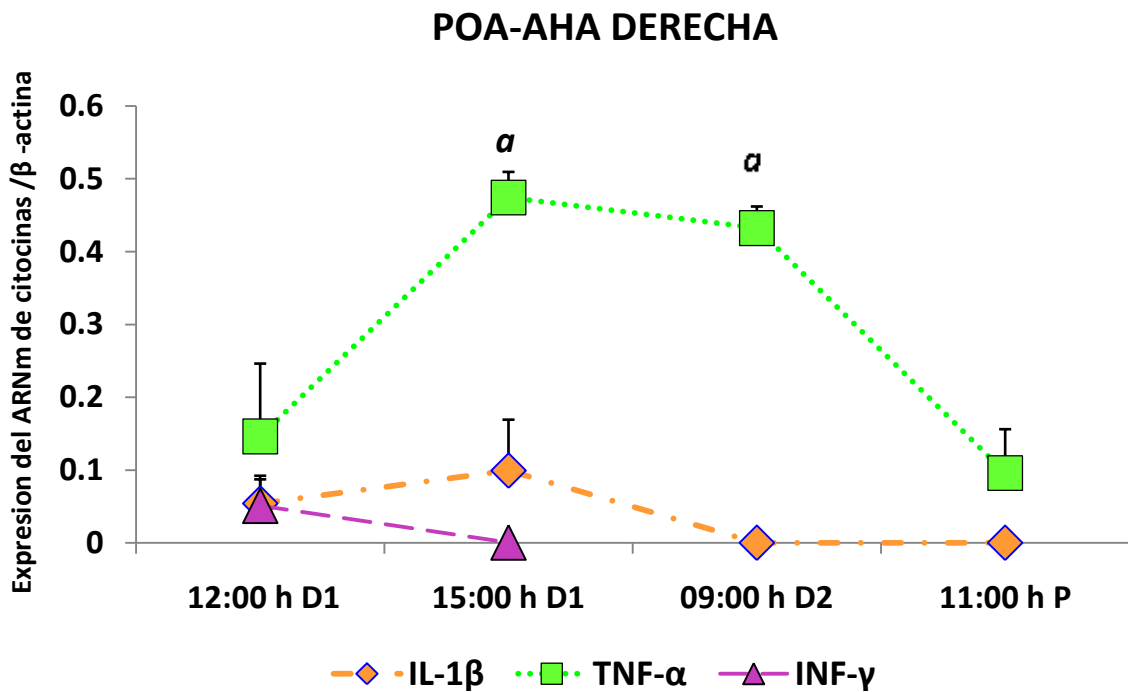
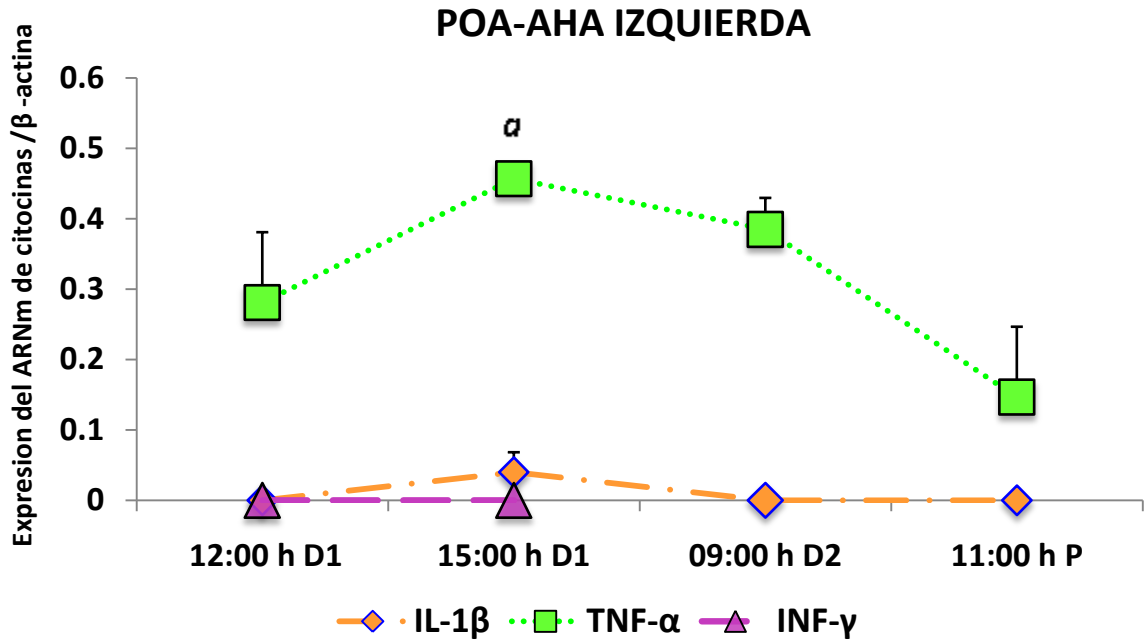
En la región POA-AHA de las ratas intactas, la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  y del INF- $\gamma$  se observó a las 12:00 y 15:00 h del día del diestro-1; la del TNF- $\alpha$  se presenta en todas las horas analizadas (Grafica 1).



*a*;  $p < 0.05$  vs 12:00 h diestro-1 y 11 h proestro (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey); *b*,  $p < 0.001$  vs 15:00 h Diestro-1 (Prueba "t" de Student).

**Grafica 1.** Expresión relativa del ARNm de la Interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e Interferón gama (INF- $\gamma$ ) en la región POA-AHA de ratas adultas en diferentes momentos del ciclo estral.

El patrón de expresión en la porción izquierda y derecha de POA-AHA del animal intacto es muy semejante durante las fases y horas del ciclo estral estudiadas (Grafica 2).



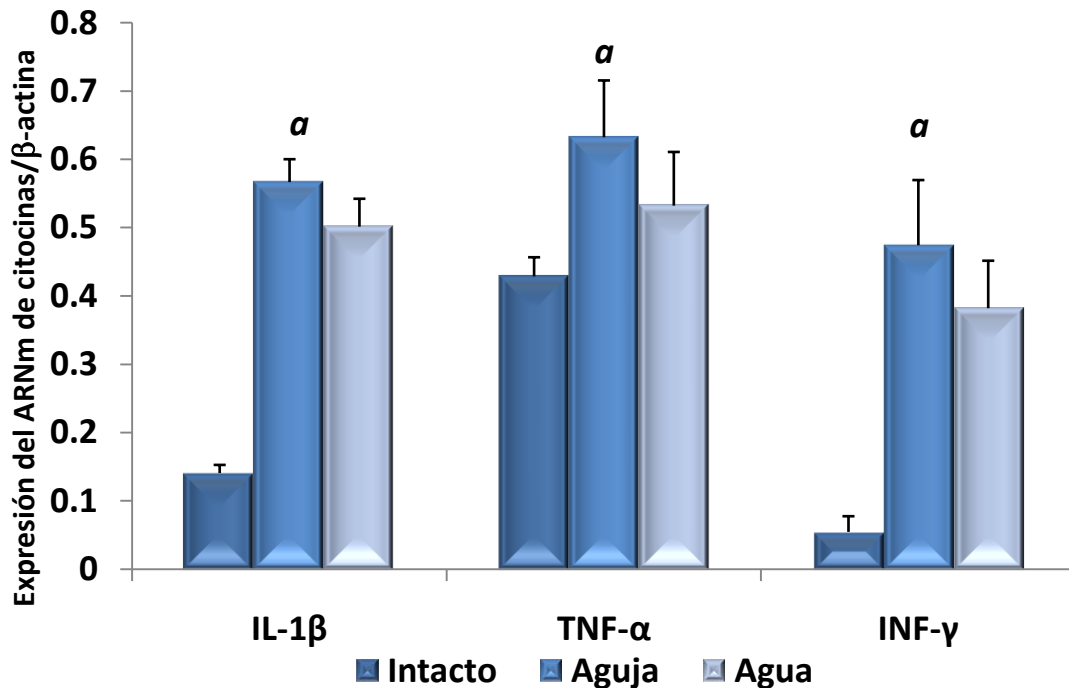
$\alpha$ :  $p < 0.01$  vs. 12:00 h diestro-1 (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

**Grafica 2.** Expresión relativa del ARNm de la Interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e Interferón gama (INF- $\gamma$ ) en la región izquierda y derecha de POA-AHA de ratas adultas en diferentes momentos del ciclo estral



## *Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua sobre la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ en diferentes momentos del ciclo estral*

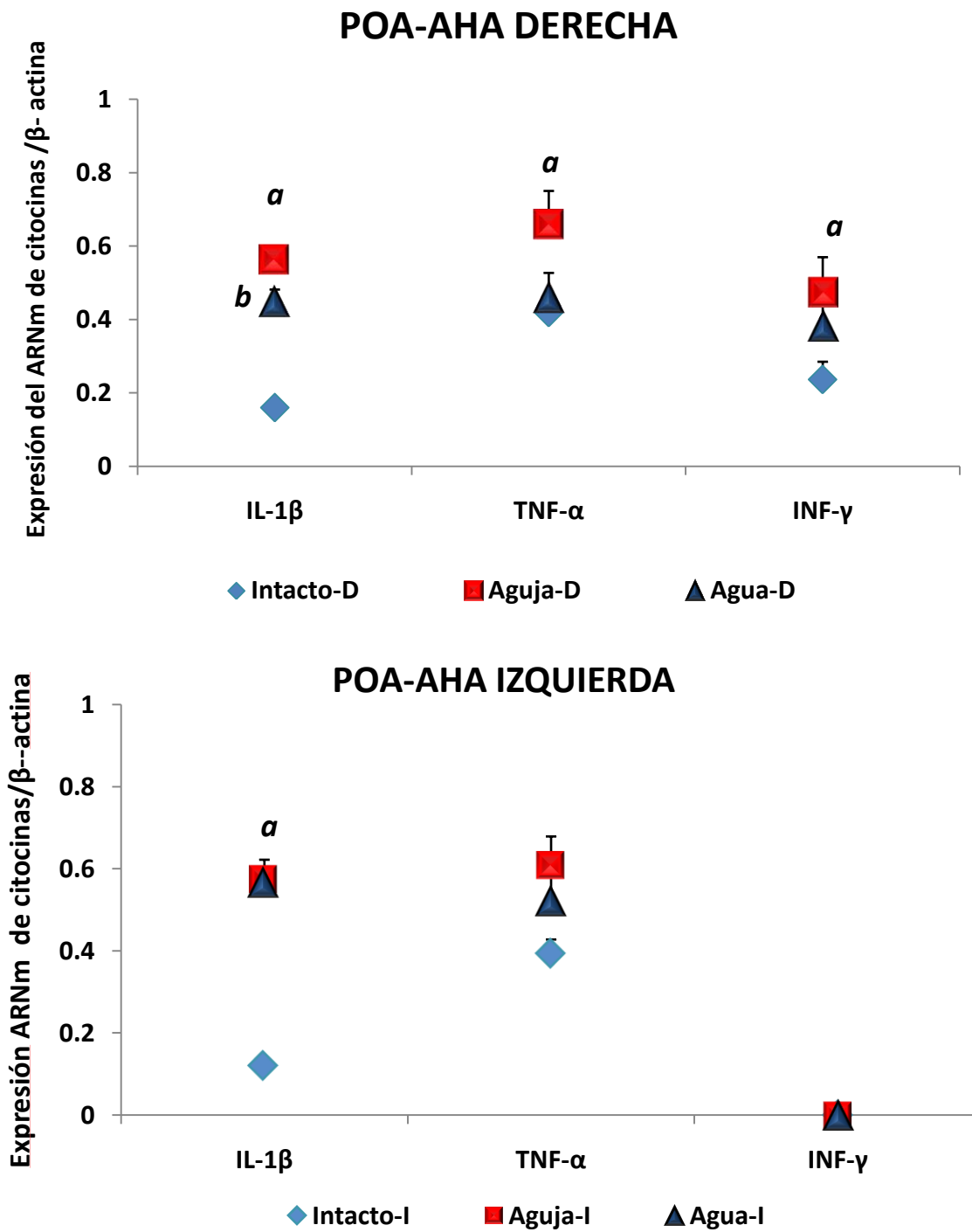
La inserción de la aguja en POA-AHA a las 09:00 h del diestro-1 resulta en una mayor expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y del INF- $\gamma$ . La micro-inyección de agua no modifica los efectos de la aguja (Grafica 3).



$\alpha$ :  $p < 0.05$  vs. *intacto* (ANDEVA seguida de Tukey)

*Grafica 3. Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua en POA-AHA sobre la expresión relativa del ARNm de la Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e Interferón gama (INF- $\gamma$ )*

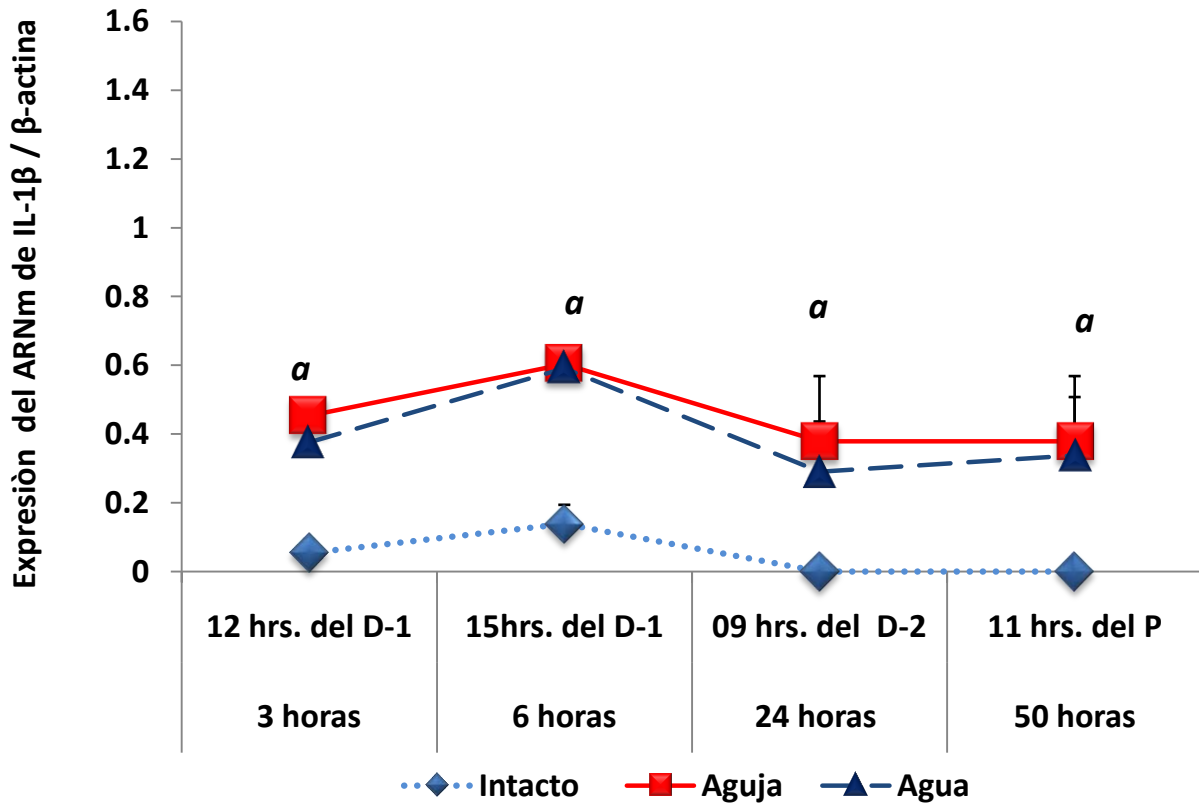
La expresión del ARNm del TNF $\alpha$  y del INF- $\gamma$  se incrementó en la porción derecha de POA-AHA por introducir la aguja. En cambio, la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  aumentó en ambas porciones. La micro-inyección de agua reduce la expresión del mensajero para la IL-1 sólo en la porción derecha de POA-AHA (Grafica 4).



*a: p<0.05 vs. Intacto, b: p<0.05 vs. agua (ANDEVAseguida de Tukey)*

*Grafica 4. Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua izquierda y derecha de POA-AHA sobre la expresión relativa del ARNm de la Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e Interferón gama (INF- $\gamma$ )*

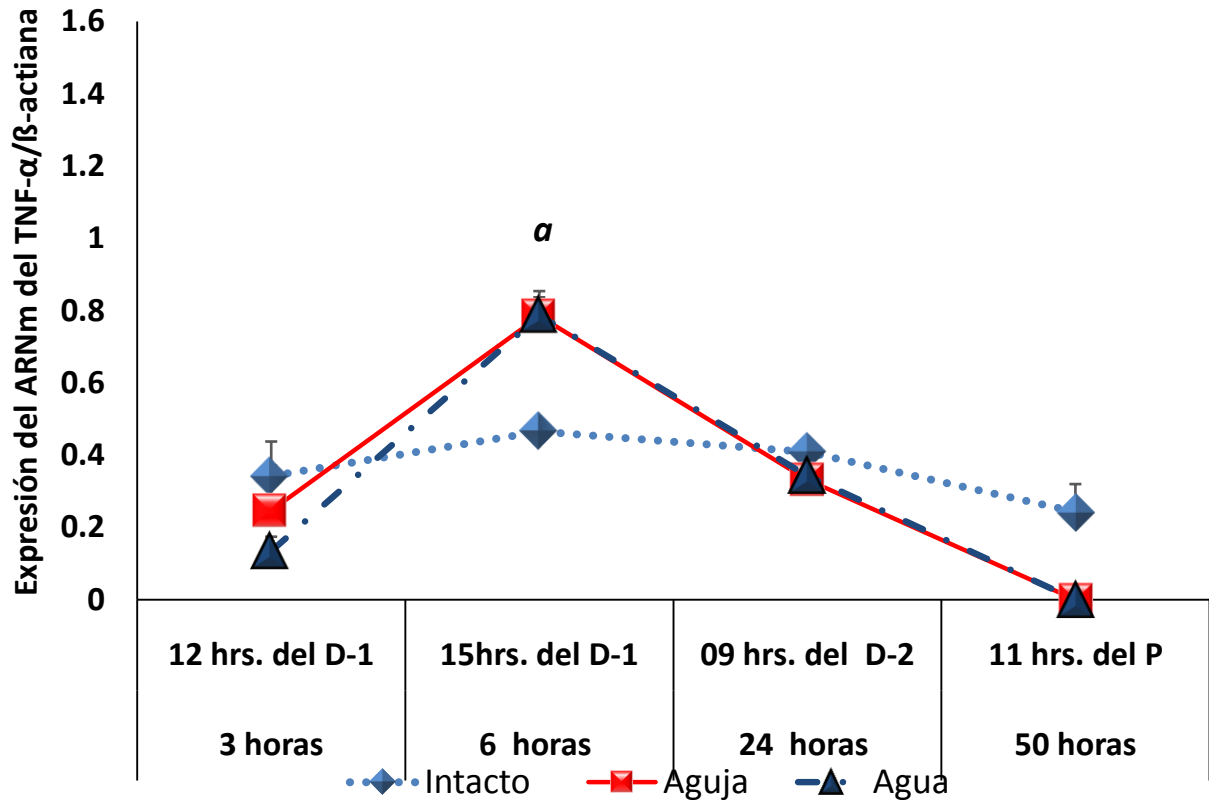
Cuando se analizan los resultados en las horas subsiguientes al tratamiento observamos que la expresión de la IL-1 $\beta$  aumenta significativamente a las 3, 6, 24 y 56 horas la inserción de la aguja, y no se modificó por la micro-inyección de agua (Grafica 5).



*a: p<0.05 vs. intacto (ANDEVA seguida de Tukey)*

**Grafica 5. Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua en POA-AHA derecha, sobre la expresión relativa del ARNm de la Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).**

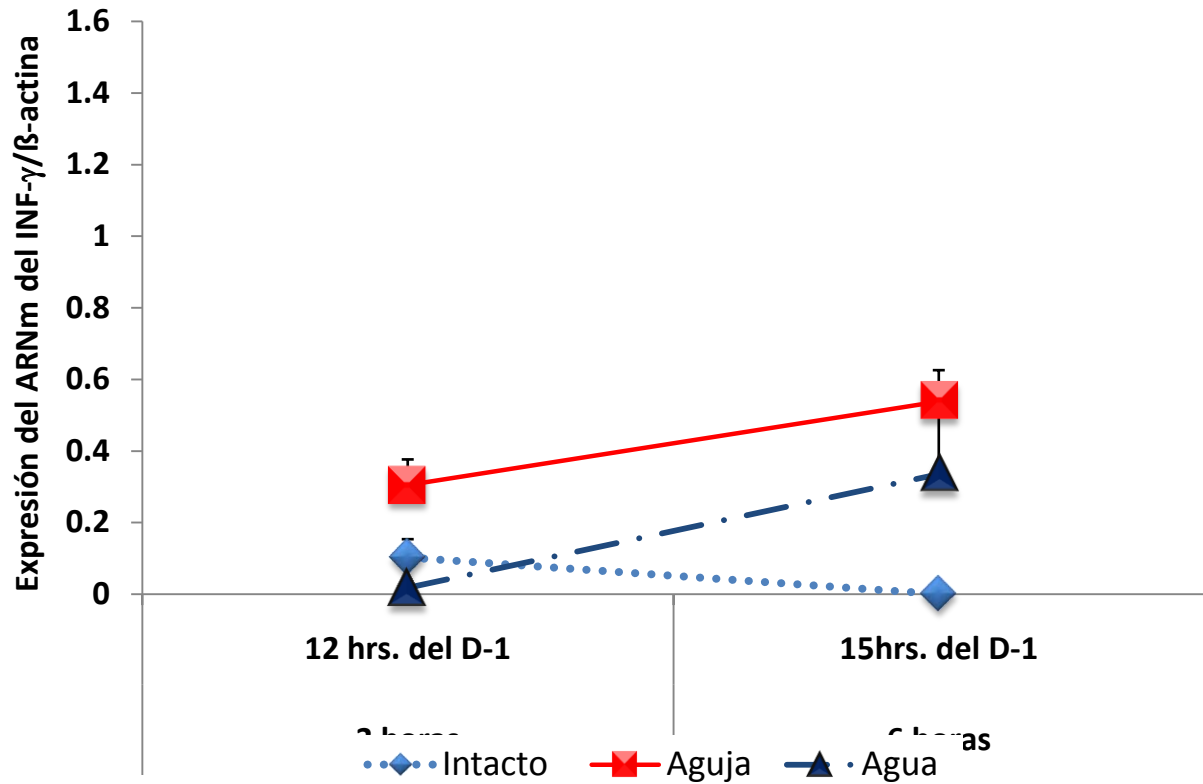
A las 6 horas de insertar la aguja en POA-AHA derecha, la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  aumentó respecto al grupo de ratas intactas (Grafica 6).



$\alpha$ :  $p < 0.05$  vs. intacto (ANDEVA seguida de Tukey)

Grafica 6. Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua en POA-AHA sobre la expresión relativa del ARNm del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ).

La expresión del ARNm del  $\text{INF-}\gamma$  aumenta en los animales con inserción de la aguja a las 3 horas posteriores al sacrificio; este efecto no es modificado por la microinyección del agua (Grafica 7)



**Grafica 7. Efectos de la inserción de la aguja y de la microinyección de agua en POA-AHA sobre la expresión relativa del ARNm del Interferón gama ( $\text{INF-}\gamma$ )**

El análisis de los resultados en función del lado de POA-AHA muestra que la expresión relativa del ARNm de la IL-1 $\beta$  aumentó en ambas porciones de POA-AHA a las tres y seis horas posteriores a la inserción de la aguja. Dicho incremento se mantuvo hasta las 50 h únicamente en el lado derecho. Por otro lado, la micro-inyección de agua no modificó los efectos de la inserción de la aguja (Tabla 6).

#### Expresión relativa del ARNm de la IL-1 $\beta$

Grupo	POA-AHA izquierda				POA-AHA derecha			
	3 hrs	6 hrs	24hrs	50 hrs	3 hrs	6 hrs	24 hrs	50 hrs
Intacto	nd	0.04 $\pm$ 0.03	nd	nd	0.05 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.07	nd	nd
Aguja	0.33 $\pm$ 0.14	<b>0.59<math>\pm</math>0.05<math>\alpha</math></b>	nd	Nd	<b>0.50 <math>\pm</math>0.02<math>\alpha</math></b>	<b>0.62<math>\pm</math>0.04<math>\alpha</math></b>	<b>0.19<math>\pm</math>0.13</b>	<b>0.19<math>\pm</math>0.13</b>
Agua	0.31 $\pm$ 0.13	0.63 $\pm$ 0.03	nd	0.17 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.007	0.55 $\pm$ 0.07	0.15 $\pm$ 0.10	nd

$\alpha$ ,  $p < 0.05$  vs. Intacto (ANDEVA, seguida de la Prueba de Tukey)

**Tabla 6. Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm de la IL-1 $\beta$  en POA-AHA izquierda y derecha en horas posteriores a la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua en el lado derecho de POA-AHA a las 09:00 h del diestro-1.**

La expresión relativa del ARNm del TNF- $\alpha$  no fue detectada en el lado izquierdo de POA-AHA a las tres horas de insertar la aguja, mientras que la micro-inyección del agua favoreció la expresión de este mensajero. Uno y otro tratamiento no modificó la cantidad relativa del mensajero a las seis y 24 horas subsiguientes, pero a las 50 horas el ARNm del TNF- $\alpha$  no se detectó en ninguna de las POA-AHA (Tabla 7).

#### Expresión relativa del ARNm de la TNF- $\alpha$

Grupo	POA-AHA izquierda				POA-AHA derecha			
	3 hrs	6 hrs	24 hrs	50 hrs	3 hrs	6 hrs	24 hrs	50 hrs
Intacto	0.28 $\pm$ 0.14	0.46 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.1	0.15 $\pm$ 0.1	0.48 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.07
Aguja	nd	0.74 $\pm$ 0.09 $\alpha$	0.36 $\pm$ 0.05	nd	0.12 $\pm$ 0.09	0.83 $\pm$ 0.11 $\alpha$	0.29 $\pm$ 0.1	nd
Agua	0.07 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.05	nd	0.06 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.07	nd

$\alpha$ ,  $p < 0.05$  vs. Intacto;  $\beta$ ,  $p < 0.05$  vs. aguja (ANDEVA, seguida de la Prueba de t de Student)

**Tabla 7. Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm de la TNF- $\alpha$  en POA-AHA izquierda y derecha en horas posteriores a la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua en el lado derecho de POA-AHA a las 09:00 h del diestro-1.**

Muy interesante resulta el hecho que el ARNm del  $INF-\gamma$  solamente se expresó en el lado derecho de POA-AHA y que ninguno de los tratamientos modifica los resultados observados en el grupo de ratas intactas (Tabla 8).

Expresión relativa del ARNm del  $INF-\gamma$

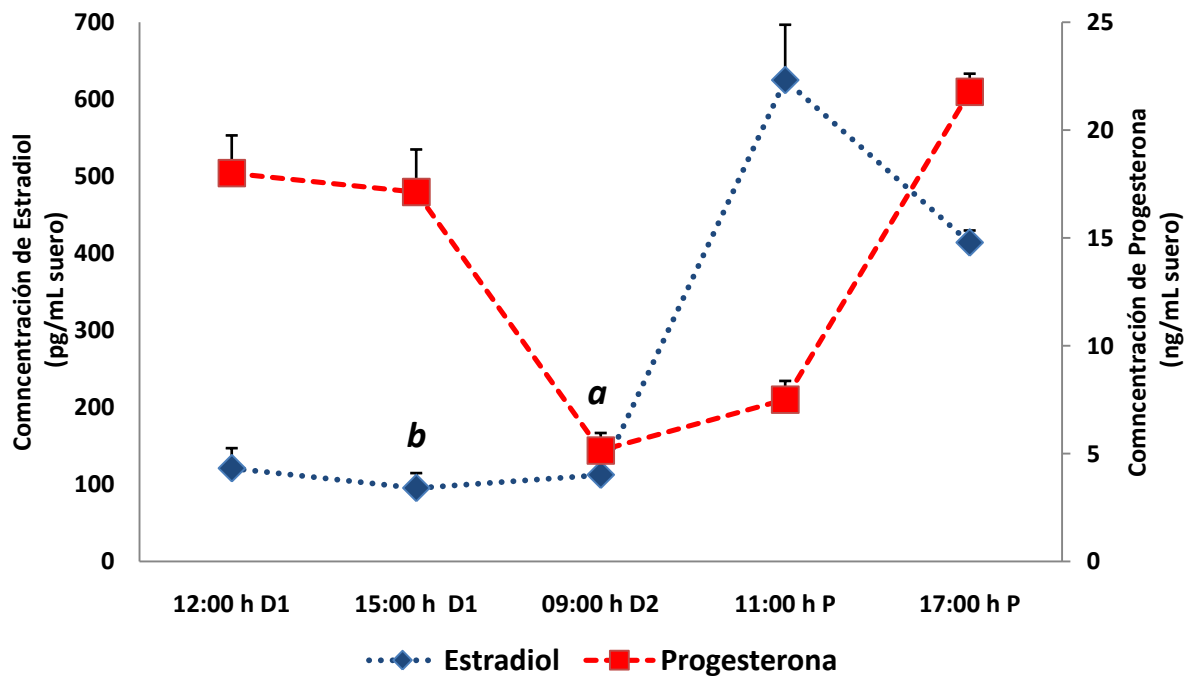
Grupo	POA-AHA izquierda				POA-AHA derecha			
	3 hrs	6 hrs	24 hrs	50 hrs	3 hrs	6 hrs	24 hrs	50 hrs
Intacto	nd	nd	nd	nd	0.05±0.04	nd	nd	nd
Aguja	nd	nd	nd	nd	0.23±0.1	0.40±0.15	nd	nd
Agua	nd	nd	nd	nd	0.09±0.06	0.16±0.12	nd	nd

(ANDEVA, seguida de la Prueba de Tukey)

**Tabla 8. Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm de la  $INF-\gamma$  en POA-AHA izquierda y derecha en horas posteriores a la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua en el lado derecho de POA-AHA a las 09:00 h del diestro-1.**

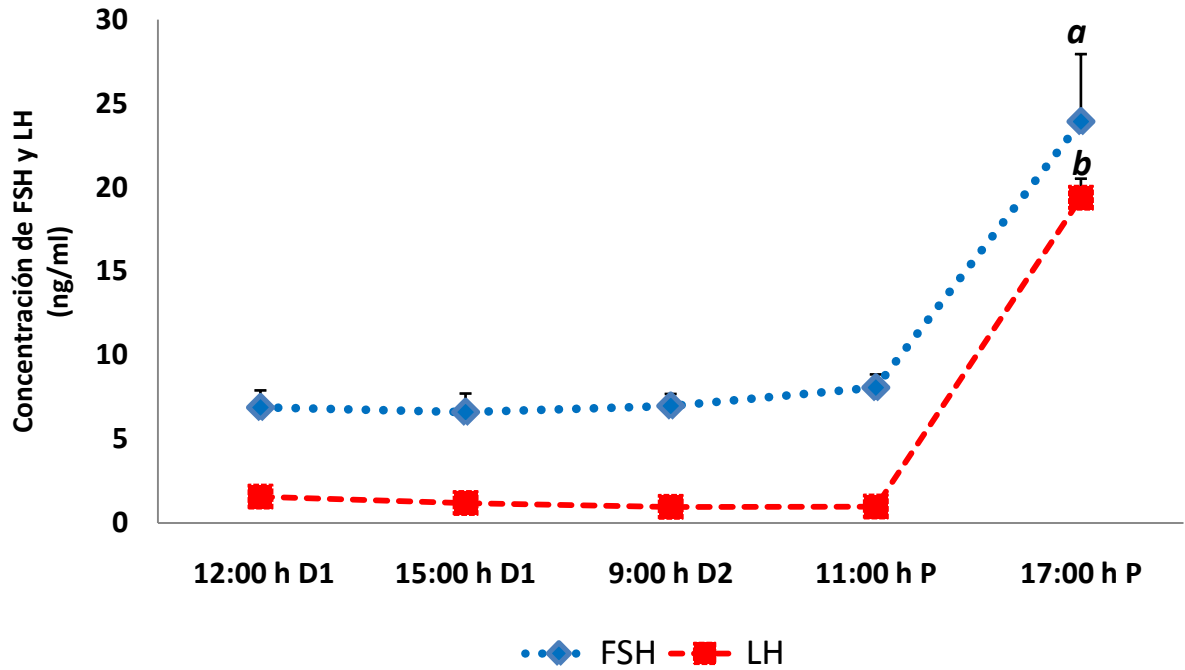
### CONCENTRACIÓN DE HORMONAS

En animales intactos la concentración de progesterona es máxima a las 12:00 y 15:00 h del diestro-1, el estradiol tiene un máximo a las 11:00 del proestro (Grafica 8). La máxima concentración de FSH y LH ocurre a las 17:00 h del proestro (Grafica 9).



*a*,  $p < 0.001$  vs. 17:00 h del proestro, *b*,  $p < 0.001$  vs. 11:00 h del proestro (ANOVA seguida de la prueba de Tukey)  
 Grafica 8. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de progesterona y estradiol de animales intactos, en diferentes momentos del ciclo estral

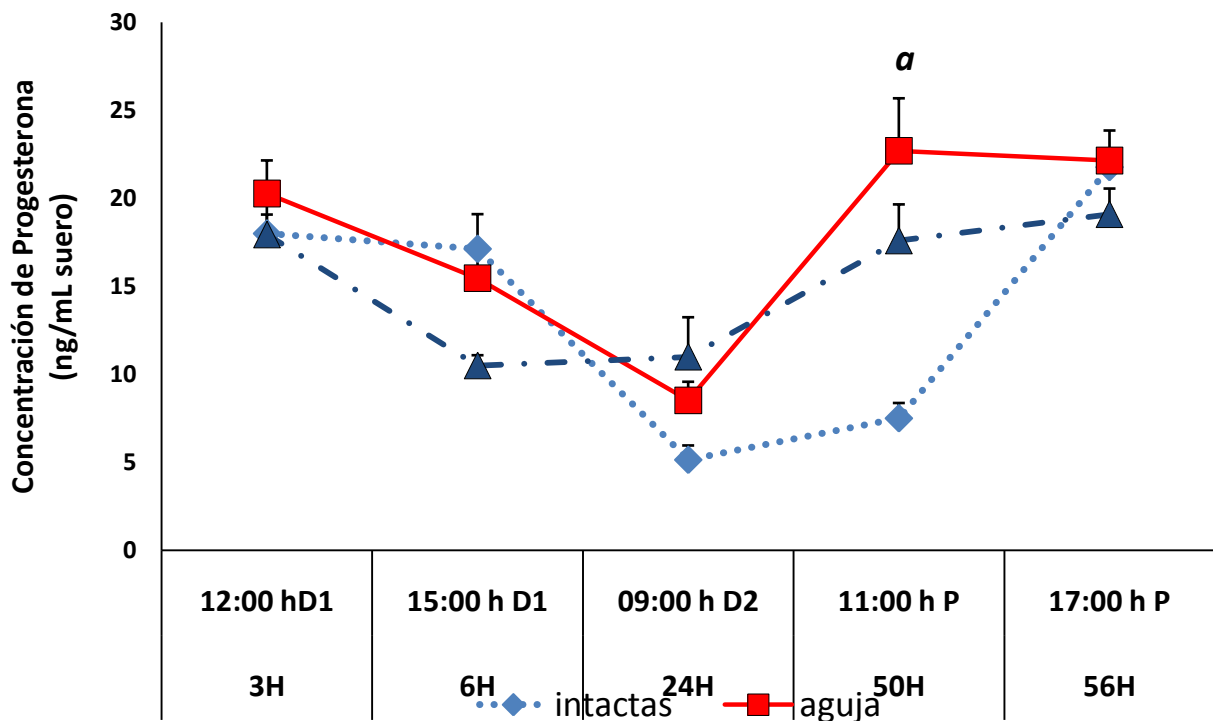




*a y b,  $p < 0.001$  vs. las otras horas y días del ciclo estral (ANOVA seguida de la prueba de Tukey)*  
*Grafica 9. Media  $\pm$  e.e.m. de la Concentración de FSH y LH de animales intactos, en diferentes momentos del ciclo estral*

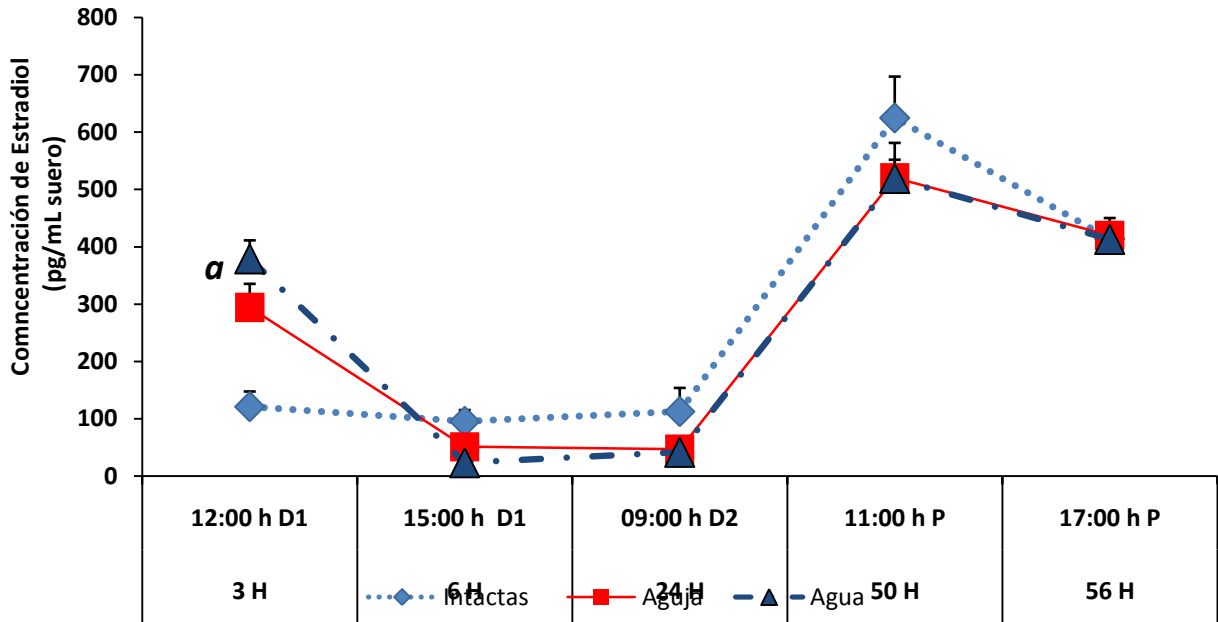
***EFFECTOS DE LA INSERCIÓN DE LA AGUJA Y DE LA MICRO-INYECCIÓN DE AGUA SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA, ESTRADIOL, FSH Y LH EN DIFERENTES MOMENTOS DEL CICLO ESTRAL.***

Con respecto al grupo de animales intactos, la inserción de la aguja resulta en el aumento de la concentración de progesterona (Grafica 12) a las 11:00 h del proestro); mientras que la de estradiol aumenta a las 12:00 h del diestro-1 (Grafica 13).



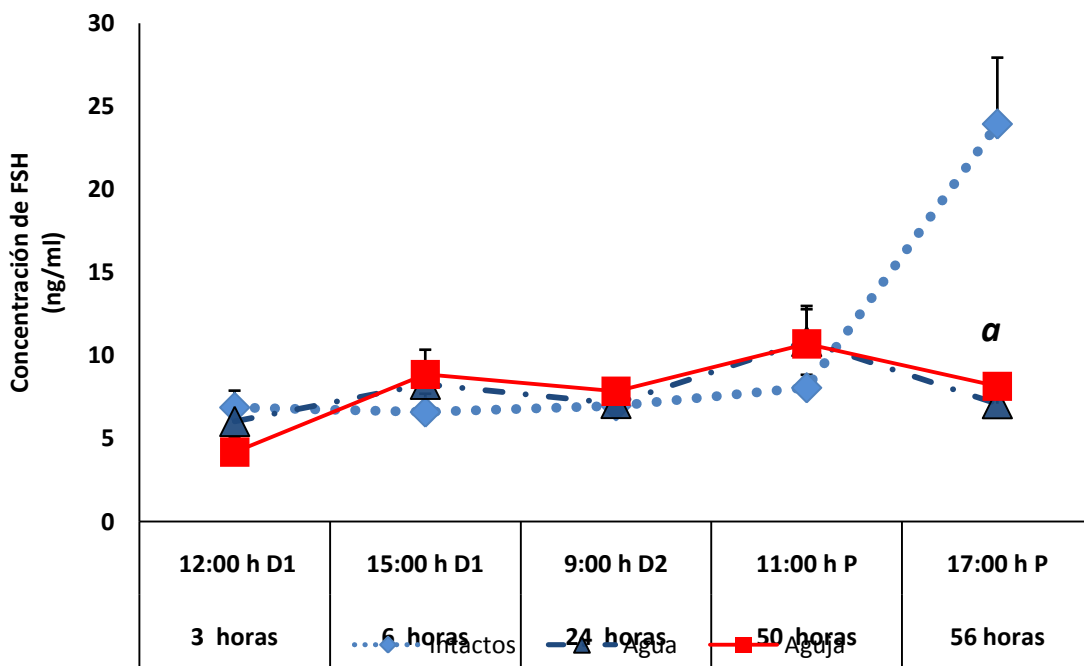
***a, p<0.001 vs. 11:00 h del proestro (ANOVA seguida de la prueba de Tukey)***

***Grafica 12. Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua sobre las concentraciones de progesterona (Media ± e.e.m.) en diferentes momentos del ciclo estral.***



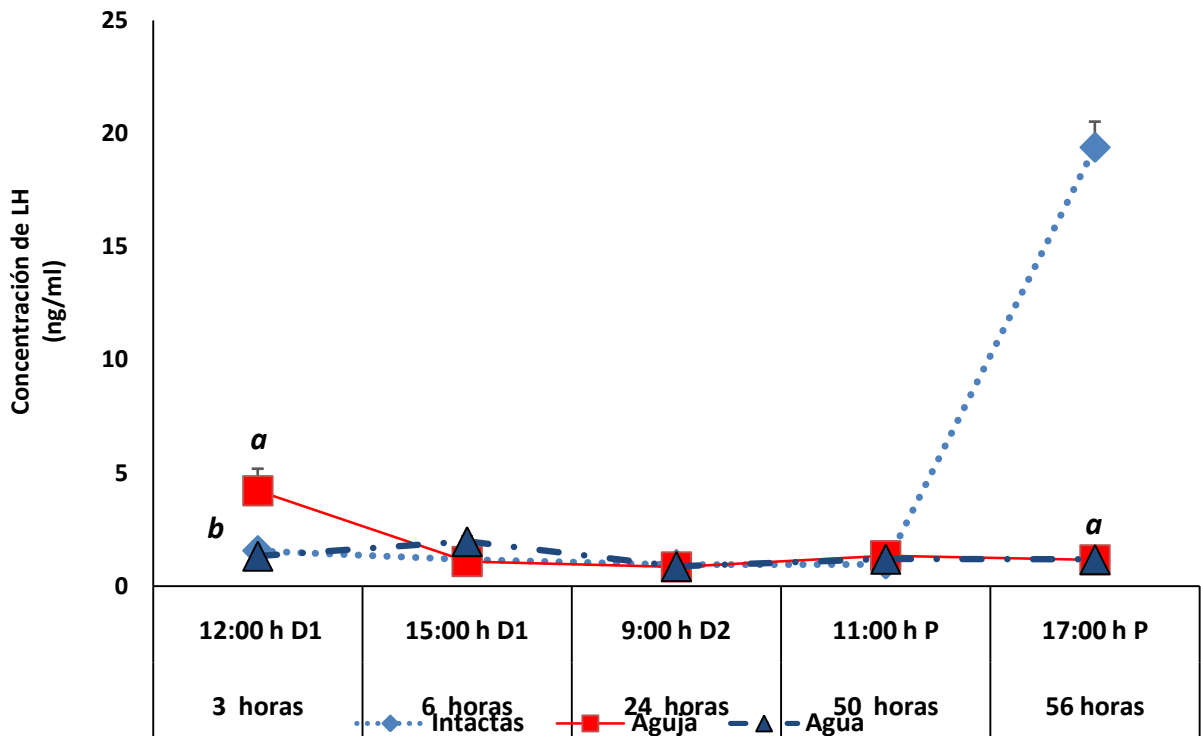
*a, p<0.05 vs. 12:00 h del diestro-1 (ANOVA seguida de la prueba de t de Student)*  
**Grafica 13. Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua sobre las concentraciones de estradiol (Media ± e.e.m.) en diferentes momentos del ciclo estral.**

La inserción de la aguja resultó en la disminución de la concentración de la FSH a las 17:00 h del proestro (Grafica 14).



*a, p<0.001 vs. Grupo intacto (ANOVA seguida de la prueba de Tukey)*  
**Grafica 14. Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua sobre las concentraciones de FSH (Media ± e.e.m.) en diferentes momentos del ciclo estral.**

Con respecto al grupo de ratas intactas, a las tres horas de la inserción de la aguja, la concentración sérica de LH aumentó, pero disminuyó a las 17:00 h del proestro. En cambio, a las tres horas (15:00 h del diestro-1) de la micro-inyección del agua, la concentración de LH disminuyó (Figura 14), y aumentó ( $1.9 \pm 0.22$  vs.  $1.08 \pm 0.17$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) seis horas después.



*a,  $p < 0.001$  vs. Grupo intacto; b  $p < 0.001$  vs. aguja (ANOVA seguida de la prueba de Tukey)*

*Grafica 14. Efectos de la inserción de la aguja y de la micro-inyección de agua sobre las concentraciones de LH (Media  $\pm$  e.e.m.) en diferentes momentos del ciclo estral*

***EFFECTO DE LA INSERCIÓN DE LA AGUJA Y LA MICRO-INYECCIÓN DE AGUA EN POA-AHA  
SOBRE EL PESO DE LOS OVARIOS Y DEL ÚTERO***

La inserción de la aguja provocó el aumento del peso del ovario izquierdo y en consecuencia la masa ovárica a las 12:00 h y 15:00 del diestro-1. Un efecto contrario se observó en el peso del útero, pero solo en los animales que fueron sacrificados a las 12:00h del diestro-1. En cambio, a las 11:00 h del proestro, el peso de ambos ovarios y la masa ovárica disminuyó con la inserción de la aguja, pero el peso del útero permaneció elevado (Tabla 9).

La micro-inyección de agua resultó en la disminución de la masa ovárica a las 12:00 h del diestro-1, y en el aumento del peso del ovario izquierdo en la mañana del proestro (Tabla 9).

	INTACTO				AGUJA				AGUA			
	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
<b>12 hrs</b>	13.8	13.5	27.3	143.7	21.4	19.4	40.85	121.9	14.2	15.7	29.9	125.0
<b>D-1</b>	±0.1	±0.7	±1.6	±4.8	±2.1a	±1.9a	±2.9a	±3.5a	±0.1b	±0.1	±1.7b	±5.3
<b>15 hrs</b>	9.9	11.1	11.0	114.5	13.80	13.2	27.0	120.6	12.0	10.9	22.9	120.6
<b>D-1</b>	±0.1	±1.0	±1.0	±6.1	±1.5a	±0.9	±2.0a	±5.0	±0.6	±0.5	±0.7	±5.5
<b>09 hrs</b>	11.2	13.4	24.6	138.1	12.40	12.8	25.2	156.3	14.06	15.3	29.4	136.8
<b>D-2</b>	±0.6	±1.3	±1.7	±7.7	±0.9	±0.8	±1.6	±11.0	±0.7	±1.2	±1.6	±4.7
<b>11 hrs P</b>	27.0	26.3	57.0	150	13.3	15.0	28.4	129.2	18.4	18.5	36.8	136.9
	±0.4	±4.2	±5.5	±26.5	±1.2a	±1.36a	±2.4a	±19.9a	±1.7b	±2.1	±3.7	±27.3
<b>17 hrs P</b>	19.7	20.0	39.7	223.2	16.4	15.6	32.0	236.0	19.8	15.0	34.7	175.0
	±1.1	±1.5	±2.3	±49.1	±0.8	±0.9	±1.1	±34.9	±4.3	±1.0	±4.9	±20.5

*a*<sub>p</sub><0.05 vs. Respectiv grupo intacto (prueba ANDEVA seguida de Tuckey), *b*<sub>p</sub><0.001 vs aguja (prueba ANDEVA seguida de Tuckey).

*Tabla 9. Media ± e.e.m. de los pesos de ovario izquierda, derecha y útero en horas posteriores a la inserción de la aguja y de la microinyección de agua en el lado derecho de POA-AHA a las 09:00 h del diestro-1.*

## DISCUSIÓN

Con base en la literatura existente, este es el primer estudio que muestra que en la rata adulta (3 a 4 meses) cíclica condiciones naturales el patrón de expresión del ARNm para el TNF- $\alpha$ , la IL- $\beta$  y el INF- $\gamma$  en la porción izquierda y derecha de POA-AHA en la mañana del diestro y -1, diestro-2 y proestro. El gen que codifica para el TNF- $\alpha$  se expresa de manera semejante en ambas porciones de POA-AHA. En cambio, la expresión del gen que codifica para la IL-1 $\beta$  sólo se expresa en la porción derecha, en los días del diestro, mientras que la del INF- $\gamma$  no es cuantificable en ninguna porción de POA-AHA con la técnica utilizada. En el tejido del SNC sano la mayoría de las citocinas se expresan en cantidades muy bajas y hasta indetectables (Rothwell y Luheshi, 2000).

El TNF- $\alpha$  es secretado por la microglía y los astrocitos al responder a patógenos o al daño tisular (trauma cerebral, isquemia, y las condiciones neurodegenerativas), por medio de receptores de reconocimiento como los tipo Toll (TLRs), lo que resulta en la expresión y liberación de altas cantidades de esta citocina (Jekabsone y cols, 2006; Clark y cols, 2010). Además se ha mostrado que los receptores para TNF- $\alpha$  están presentes en el hipotálamo (Nadeus y Rivest, 1999).

La inserción de la aguja resultó en el incremento del ARNm para TNF- $\alpha$  en la porción manipulada de POA-AHA, seis horas después. Este efecto estimulante en la expresión del gen, generado por la inserción de la aguja, disminuye hacia las 24 h y desaparece a las 50 h. *In vivo* el TNF- $\alpha$  inhibe la secreción de la GnRH y de la LH (Rivier y Vale, 1990; Yoo y cols, 1997; Yoo y cols, 1997; Kalra y cols, 1998) lo que explicaría el bloqueo de la secreción preovulatoria de la LH y de la ovulación espontánea en el día del estro esperado (Reynoso, 2013). Dado que la micro-inyección de agua no altera los efectos de la inserción de la aguja sugerimos que el volumen de agua infundido en el área no causaría una respuesta inmune adicional.

Después de la lesión del SNC, IL-1 $\beta$  es liberada rápidamente por la microglía activada (Lucas y Rothwell, 2006). Las funciones de la IL-1 $\beta$  en el SNC incluyen la inducción de factores de crecimiento, reducción de la liberación de glutamato, la modulación de respuestas neuronales a la NMDA y glicina, y aumento en la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) (Lucas y Rothwell, 2006). Por medio de diferentes modelos experimentales se ha mostrado que la IL-1 $\beta$  suprime la liberación de la LH como resultando del bloqueo de la secreción de la GnRH (Rivier y Vale, 1990; Ebisui, Fukata, y cols, 1992; Rivest, Lee y cols, 1993; Rivest y Rivier, 1993; Nappi y Rivest, 1997).

Turnbull y Rivier (1997) sugieren que hay evidencia de que los niveles de esta citocina en particular también pueden ser aumentados en el SNC en respuesta a la endotoxemia, inflamación periférica y después de la exposición a factores de estrés no inmunes. Colectivamente, estos datos sugieren que la síntesis de IL-1 $\beta$  en el SNC puede estar regulada por una variedad de amenazas homeostáticas. El efecto estimulante de la inserción de la aguja sobre la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$ , a las tres y seis horas subsecuentes al tratamiento, podría generar un efecto inhibitorio en la red neuronal de la región de POA-AHA vinculada a una posible reducción en la liberación de glutamato, lo que provocarían el efecto inhibitorio en la secreción de la GnRH (Herbison, 2006). Esta hipótesis es apoyada por la ausencia del “pico” de LH en la tarde del proestro observada en los animales con inserción de la aguja y el aumento del ARNm de esta citocina hasta la mañana del proestro.

El INF- $\gamma$  estimula en la microglía la síntesis de óxido nítrico, y se ha sugerido que esta citocina estaría implicada en el daño neuronal, por intermedio de las células gliales o los macrófagos (Suzumura y cols, 2006). El hecho que el INF- $\gamma$  induzca la síntesis de óxido nítrico y que en la porción derecha de POA-AHA se incremente el ARNm de esta citocina, aunque no de manera significativa, en las primeras seis horas a la inserción de la aguja sería otro factor potencial de la inhibición de la secreción de la LH.



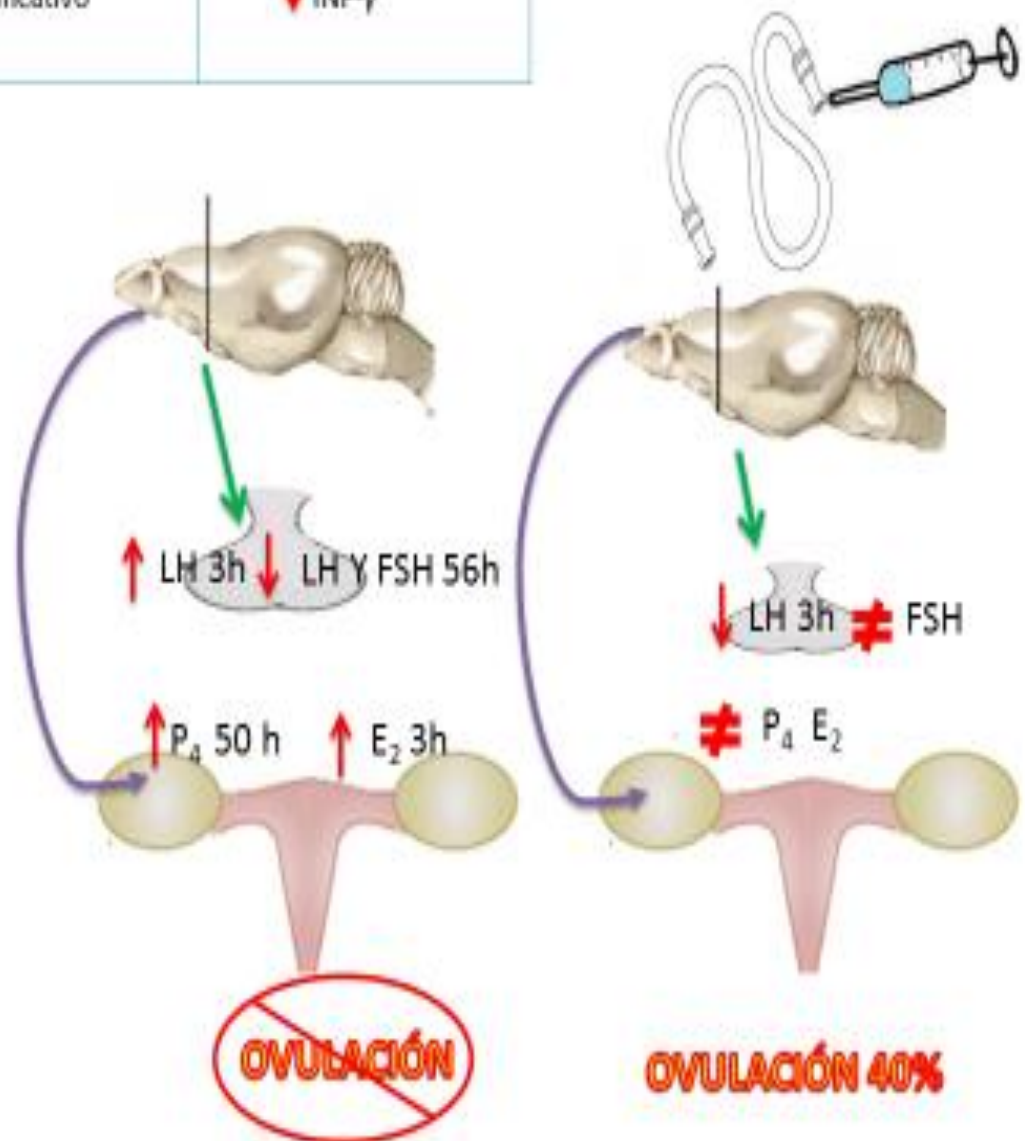
Las citocinas producidas durante la reacción inmune pueden alterar la actividad del eje reproductivo neuroendocrino (Gaillard, 1998). La capacidad de diversas citocinas para modular la expresión de genes de la GnRH y su secreción (Kang y cols, 2000) sugiere que estos efectos están mediados esencialmente a nivel hipotalámico (Rivier y Vale, 1990). Las células de la línea GNV-4 (células GnRH inmortalizadas obtenida de hipotálamo), expresan tanto el receptor de IL-1 $\beta$ , así como la proteína accesoria del receptor a IL-1 $\beta$  (componente obligatorio de la vía de transducción de señales de la IL-1 $\beta$ ) (Sims, 2002), lo que demuestra el efecto regulador de la IL-1 $\beta$  en la modulación de la expresión de GnRH (Kang y cols, 2000).

Rivest y Erickson en 1993 al realizar una inyección intra-cerebro-ventricular de IL-1 $\beta$  en ratas hembras, demostraron un incremento de P<sub>4</sub>. El aumento en la concentración de P<sub>4</sub>, a las 50 horas después de la inserción de la aguja, podría ser otro de los factores que actuarían en el efecto inhibitorio de la secreción preovulatoria de LH. En rata con estro persistente inducido por la administración constante de estradiol, la administración de 1 mg de P<sub>4</sub> puede inducir la ovulación y provocar ciclos estrales artificiales, si esta se inyecta en el diestro-2 (Everett, 1949). En el hipotálamo, la P<sub>4</sub> regula de manera inhibitoria la síntesis de sus propios receptores (P<sub>4</sub>R) (Camacho-Arroyo et. Al., 1998). También se plantea que la P<sub>4</sub> eleva la amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH (Clifton, 1975), pero este efecto es dependiente de la síntesis de los P<sub>4</sub>R inducidos por E<sub>2</sub> (Mahes y Brann, 1998). Por tanto, la falta de ovulación en animales con inserción de la aguja (Reynoso, 2012), resultado de la inhibición del “pico” de P<sub>4</sub> sería el efecto de una reducción en la síntesis de los P<sub>4</sub>R, provocada por el aumento temprano de P<sub>4</sub> en la mañana del proestro.

Por medio de una inyección intra-cerebro-ventricular de IL-1 $\beta$  (Turnbull y Rivier, 1997), se sugirió que la influencia inhibitoria que ejerce sobre la función testicular ocurre a través de una vía neural directa entre el SNC y los testículos. Si en la hembra existe esta misma comunicación neuronal explicaría el aumento del peso de los ovarios y de la masa ovárica por la inserción de la aguja. En ratas hembras, la evidencia de un enlace entre el cerebro endocrino y las gónadas se ha propuesto sobre la base de experimentos que muestran que la estimulación eléctrica de la zona prequiasmática basal medial de animales hipofisectomizados, aumenta la liberación de los estrógenos y la P<sub>4</sub> y que esta respuesta es abolida por denervación de ovario (Kawakami, Kubo y cols, 1981).

Shanchez y colaboradores (1996) describió que los animales presentan una respuesta lateralizada, en función a la posición adoptada ya sea izquierda o derecha. Ésta prueba se realizó mediante un electroencefalograma (EEG), el cual muestra que dependiendo de la posición que adopte el animal izquierda o derecha, la amplitud de las ondas será mayor en el lado que se incline. Esto implicaría que la actividad neuronal es dominada por el lado derecho o izquierdo. Y que la falta de ovulación en el 40% de los animales se deba a una lateralización. Además la falta de expresión del ARNm para IL-1 $\beta$  en POA-AHA derecha, a las 50 horas de micro-inyectar el agua podría explicar que el 40% de los animales tratados ovulen (Reynoso, 2013). Además

CITOCINAS	
AGUIA	AGUA
↑ IL-1 $\beta$ en todas las horas	nd IL-1 $\beta$ 50 h
↑ TNF- $\alpha$ solo a las 6 h	nd TNF- $\alpha$ 50 h
↑ INF- $\gamma$ no significativo	↓ INF- $\gamma$



## **CONCLUSIONES**

En conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que la inserción de una aguja de acero inoxidable 25G a las 09:00 h del diestro-1 estimula la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, especialmente de la IL-1 $\beta$ .

Esta citocina estaría promoviendo la secreción prematura de P<sub>4</sub>, lo que provocaría la inhibición de la secreción preovulatoria de LH y FSH.

La falta de expresión del ARNm para IL-1 $\beta$  en la porción derecha e izquierda de POA-AHA, a las 50 horas de micro-inyectar el agua podría explicar que el 40% de los animales tratados ovulen (Reynoso, 2013).

## *Bibliografía*

- ❖ Abbas, KB., Lichtman, AH, Pillai S (2012). Inmunología celular y molecular. séptim a edición. Elsevier España, S.L. Barcelona, España.
- ❖ Arimura A. (2000). Hypothalamic hormones. En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine, Editores: Conn PM, Freeman ME. Humana Press Inc., Totowa, N.J., capítulo 3: 41-58.
- ❖ Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza-Rodríguez CA, Cruz ME. (2003). Differential ARNm expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*.21: 251-260.
- ❖ Azzimondi, G., Bassein, L., Nonino, F., Fiorani, L., Vignatelli, L., Re, G. (1995) Fever in acute stroke worsens prognosis. A prospective study. *Stroke*; 26: 2040-3.
- ❖ Barone, F., Feuerstein, G. (1999) Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow. Metab*; 19: 819-34.
- ❖ Barret K., Barman S., Boitano S., Brooks H. (2010). Ganong. Fisiología medica. 23° edición. McGraw-Hill. pp 377
- ❖ Bazan NG, Halabi A, Ertel M, Petasis NA (2012) Neuroinflammation. In: Siegel G, Albers RW, Brady ST, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 8th edition. pp. 610–620
- ❖ Bernard D, Fortin J, Wang Y, Lamba P. (2000). Mechanisms of FSH Synthesis: what we know, what we don't and why you should care. *Fertil Steril*.
- ❖ Brown R. (1994). The hypothalamic hormones. En: *Introduction To Neuroendocrinology*. Cambriadge University Press, Great Britain, 44-55.
- ❖ Butler, J., Sjoberg, M., Coen, W. (1999). Evidence for estrogen receptor alphas immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J. Neuroendocrinol* 11: 331-335.
- ❖ Buttini M, Sauter A, Boddeke HW. (1994). Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*; 23: 126-34.
- ❖ Buttini, M., Boddeke, H. (1995) Peripheral lipopolysaccharide stimulation induces interleukin-1 $\beta$  messenger RNA in rat brain microglial cells. *Neuroscience* 65:523–530

- ❖ Camacho-Arroyo. I., Perez-Palacios, G., Pasapera, A., Cerbon, M. (1994) Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 50:299–303.
- ❖ Carlson, N., Wieggl, W., Chen, J., Bacchi, A., Rogers, S., Gahring, C. (1999) Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol*; 163: 3963-8.
- ❖ Charli JL, Ponce G, Joseph-Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRHérgicas hipotálamicas. *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. Edit. R Domínguez, UNAM-PORRUA. México. 59-85
- ❖ Clark, I., Alleva., L., Vissel. B. (2010) The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacols, Ther.* 128 (3), 519–548.
- ❖ Clifton, D., Steiner, R., Resko, J., Spies, H. (1975). Estrogen-induced gonadotropin release in ovariectomized rhesus monkeys and its advancement by progesterone. *Biol. Reprod.* 13, 190–194.
- ❖ Corrigan, A., Bilezikjian, L., Carroll, R, Bald, L., Schmelzer, C., Fendly, B., Mason, A., Chin, W., Schwall, R., Vale, W. (1991). Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* 128, 1682–1684.
- ❖ Cruz ME, Esteban Olvera, Marian –Jesabel Perez, Enrique- Isid Min, Angelica Flores, Mario Cardenas, Roberto Chavira Roberto Dominguez (2014) Effects of unilaterally microinjecting etanol in the preoptic-anterior hypothalamic areas of rats on ovulation. *Alcohol clin exp res DIO:10.1111/hacer.12399* pp 1-11
- ❖ Cruz ME, Rodríguez D, Olvera E, Flores A, Galindo JL, Vázquez M, Domínguez R. (2009). Asymmetric effects of unilateral section of dorsal POAHA on spontaneous ovulation. Program No. 81.18/CC11. 39th Meeting of Society for Neuroscience. Chicago Illinois, pp: 17-21.
- ❖ Cruz ME. Jaramillo LP, Domínguez R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J. Endocrinol.* 123: 437-439.
- ❖ Cruz, ME, Morán, JL, Jaramillo LP, Domínguez, R. (1990). Differential effects of unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rat. *Journal of Endocrinology.* 124: 37- 41.

- ❖ Cuenca-López M D., Brea D., Segura T., Galindo MF, Martínez A., Agulla J., Castillo J., Jordán J. (2010). Inflammation as a therapeutic agent in cerebral infarction: cellular inflammatory response and inflammatory mediators. *Rev Neurol*; 50 (6): 349-359
- ❖ Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. (1999). The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*;19 : 87-98.
- ❖ de Vries, H., Blom-Roosemalen,C., van Oosten, M., de Boer, A., van Berkel, T.,Breimer,.D., Kuiper, J.(1996) The influence of cytokines on the integrity of theblood–brain barrier *in vitro*. *Journal of Neuroimmunology* 64, 37–43.
- ❖ Dinarello, A. (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* ; 77: 1627-52.
- ❖ Ebisui O, Fukata J, Tominaga T, Murakami N, Kobayashi, H., Segawa, H., Muro, S., Naito, Y., Nakai, Y., Masui Y. (1992) Roles of interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in endotoxin-induced suppression of plasma gonadotropin levels in rats. *Endocrinology* 130:3307–3313
- ❖ Everett, J. (1948) Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 43, 389–405
- ❖ Fan NC, Peng C, Krisinger J, Leung PC. (1995). The Human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiples promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol Cell Endocrinol* 107:R1-R8.
- ❖ Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., Alnemri, S. (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458,509–513.
- ❖ Freeman, M. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *The Physiology of Reproduction, Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A.
- ❖ Freeman,M. (1994). The Neuroendocrine control of the ovarian cycle of rat. *The Physiology of Reproduction, Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. Vol 1: 613-654
- ❖ Funabashi T, Mitsushima, D., Nakamura, T., Uemura, T., Hirahara, F., Shinohara ,K., Suyama, K., Kimuraf. (2002) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. En: *Gonadotropin- Releasing Hormone: Molecules and Receptors*. Parhar I. 141: 165-173.
- ❖ Gaillard R. (1998) Cytokines in the neuroendocrine system. *Int Rev Immunol* 17:181–216

- ❖ Garcia-Segura, L. M., Luquin, S., Parducz, A., and Naftolin, F. (1994). Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 10, 59–69.
- ❖ Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *NeuroscLett* 9: 333-336.
- ❖ Gerendai I. (1986). Laterality in the Neuroendocrine Systems. En: Duality and unity of the brain. Unified functioning and specialization of the hemispheres. Ottoson, D. (Ed.), Proceedings of an International Symposium held at The Wenner Green Center, Stockholm.
- ❖ Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: The physiology of reproduction. 3th Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Raven Press USA. 571-627.
- ❖ Haqqani AS, Nestic M, Preston E, Baumann E, Kelly J, Stanimirovic D. (2005). Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and icat-nanolc-ms/ms. *FASEB J*; 19:1809-2
- ❖ Herbison AE. (2006). Physiology of the gonadotropin-Releasing Hormone Neural Network. Cap 28. Editores: Knobil E, Neill JD. *Physiology of Reproduction*. 1:1415-1456.
- ❖ Hinshelwood M. (1999). Steroidogenesis, overview. En: Encyclopedia of reproduction. 3th Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. 644-653.
- ❖ Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. (2000). Detection of receptor- messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinol* 141 (9): 3506-3509
- ❖ Inase Y, Machida T. (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orquidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Res*; 580:338-340.
- ❖ Jekabsone, A., Mander, P., Tickler, A., Sharpe, M. and Brown, G. (2006) Fibrillar beta-amyloid peptide A $\beta$ 1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF- $\alpha$  release and H $_2$ O $_2$  derived from NADPH oxidase: a cellculture study. *J. Neuroinflammation* 3, 24.
- ❖ Kaiser UB, Conn P., Chin W. (1997). Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr Rev* 18, 46-70.
- ❖ Kalra, P., Edwards, T., Xu, B., Jain, M., (1998) The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides. *Domest Anim Endocrinol* 15:321–332



- ❖ Kang, S., Kim, R., Leonhardt, S., Jarry, H., Wuttke, W., Kim, K. (2000) Effect of interleukin-1 $\beta$  on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in castrated male rats. *J Neuroendocrinol* 12:421–429
- ❖ Kawakami M., Kubo K., Uemura T., Naganese M., Hayashi R. (1981) Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. *Endocrinology* 109:136–141
- ❖ Kilen S, Schwartz, B. (1998). Estrous cycle. En: Enciclopedia of Reproduction. Knobil E. y Neill JD editores. Volumen 2, Academic Press, USA, pp 127-136.
- ❖ Kindt, T., Osborne, B., Goldsby, R. (2006) *Inmunología de Kuby*. Sexta edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. pp 346-348
- ❖ King, J., Letourneau, R. (1994). Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology* 134, 1340–1351.
- ❖ Koga, S., Ogawa, S., Kuwabara, K., Brett, J., Leavy, J., Ryan, J. (1992). Synthesis and release of interleukin 1 by reoxygenated human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest*; 90: 1007-15.
- ❖ Köning JFR, Klippel RA. (1963) *The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system*. Eds. Williams and Wilkins Co. Baltimore U.S.A.
- ❖ Kupferman I. (1985). Hypothalamus, Limbic System and cerebral cortex: Homeostasis and Arousal. En: *Principles of neural Science*, Sec. 2da Ed, Ed, Elsevier. New York, 609.
- ❖ Laflamme, N., Lacroix, S., Rivest, S. (1999). An essential role of interleukin-1 $\beta$  in mediating NF- $\kappa$ B activity and COX-2 transcription in cells of the blood–brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, 10923–10930.
- ❖ Lucas, M., Rothwell, N., Gibson R., Alleva, C, Vissel, B. (2010) The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol, Ther.* 128 (3), 519–548
- ❖ Lyman M., Lloyd, D., Ji, X., Vizcaychipi, D. (2014) Neuroinflammation: the role and consequences.
- ❖ MacGregor JI, Jordan VC. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological reviews.* 50(2):151-96.
- ❖ Mahesh, V., Brann, D. (1998). Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids* 63, 616–629.

- ❖ Makarenko, I. G., Ugrumov, M. V., and Calas, A. (2001). Axonal projections from the hypothalamus to the median eminence in rats during ontogenesis: Dil tracing study. *Anat.Embryol. (Berl)*. 204, 239–252.
- ❖ McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG. (1987). *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. Segunda edición. Nueva York. 150.
- ❖ Millar, R., Lowe, S., Conklin, D., Pawson, A., Maudsley, S., Troskie, B., Ott, T., Millar, M., Lincoln, G., Sellar, R., Faurholm, B., Scobie, G., Kuestner, R., Terasawa, E., Katz, A. (2001). A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98,9636–9641
- ❖ Min, I. (2012). Efectos del bloqueo del RE- $\alpha$  en el lado izquierdo de POA-AHA sobre la ovulación, la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides Tesis de Licenciatura de Biólogo. FES. Zaragoza México.
- ❖ Murakami, Y., Saito, K., Hara, A., Zhu, Y., Sudo, K., Niwa, M. (2005) Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem*; 93: 1616-22.
- ❖ Nadeau S., Rivest S. (1999) Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood–brain barrier. *Neuroscience*93:1449–1464
- ❖ Naor Z. (1990). Signal transduction mechanisms of Ca<sup>2+</sup> mobilizing hormones: the case of gonadotropin-releasing hormone. *Endoc Rev* 11, 326-353
- ❖ Nappi, R., Rivest, S. (1997) Effect of immune and metabolic challenges on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system in cycling female rats: an evaluation at the transcriptional level. *Endocrinology* 138:1374–1384
- ❖ Norris OD. (1996). *An Overview of Chemical Regulation. Vertebrate Endocrinology*. Academic Press. 1-22: 146-150.
- ❖ O'Malley, B., Strott, A. (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. *Endocrinología de la Reproducción*. 4ª. Edición. Eds. Yen S, Jaffe R y R. Barbieri. Editorial Médica Panamericana: México. Págs. 119-143.
- ❖ Palkovits M. (2000). Micro and Macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Conn PM y Freeman ME. Human Press. 23-31.
- ❖ Paxinos, G., Watson C. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic.

- ❖ Pérez, M. (2012). Efectos del bloqueo del RE- $\alpha$  en el lado izquierdo de POA-AHA sobre la ovulación, la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides. Tesis de Licenciatura de Biólogo. FES. Zaragoza México.
- ❖ Pettersson K, Gustafsson J. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annual Reviews Physiology* 63: 165-192.
- ❖ Prevot, V. (2002). Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J. Neuroendocrinol.* 14, 247–255.
- ❖ Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G. B., and Beauvillain, J. C. (1999). Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrouscycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* 94,809–819.
- ❖ Prieto, B; Velázquez M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas *Rev Fac Med UNAM Vol.45 No.6 Noviembre-Diciembre,*
- ❖ Ptaszynska, M., Molina, J. (2007). Compendio de reproducción animal. Novena edición. Intervet. Paraguay.
- ❖ Reynosos Juárez A. (2013). Efectos del bloqueo del RE- $\alpha$  en el lado izquierdo de POA-AHA sobre la ovulación, la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides Tesis de Licenciatura de Biólogo. FES. Zaragoza México
- ❖ Rivest S, Rivier C .(1993) Centrally injected interleukin-1 $\beta$  inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats. *J Neuroendocrinol* 5:445–450
- ❖ Rivest, S., Lee, S., Attardi, B., Rivier, C. (1993)The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 $\beta$  alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. I. Effect on LHRH and gonadotropin biosynthesis and secretion. *Endocrinology* 133:2424–2430
- ❖ Rivest, S., Rivier C. (1993) Interleukin-1 $\beta$  inhibits the endogenous expression of the early gene c-fos located within the nucleus of LH-RH neurons and interferes with hypothalamic LH-RH release during proestrus in the rat. *Brain Res* 613:132–142
- ❖ Rivier C, Vale W. (1990) Cytokines act within the brain to inhibit luteinizing hormone secretion and ovulation in the rat. *Endocrinology* 127:849–856
- ❖ Rivier C; Erickson G (1993). The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 beta alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. II. Induction of pseudopregnant-like corpora lutea. *Endocrinology* 6:2431-6

- ❖ Rothwell NJ.(1991). Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. Trends Pharmacol Sci; 12: 430-6.
- ❖ Rothwell, N., Luheshi, N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. Trends Neurosci., 23,618–625
- ❖ Sánchez M., Manjarrez J., Cruz ME., Alvarado R., Dominguez R (1996). EEG asymmetry in the preoptic-anterior hypothalamic area related with the body postural position in rats. Med. Sci. Res. 24:665-666
- ❖ Schwartz, N. (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. En: Neuroendocrinology in Physiology and medicine. PM Conn y Mefreema (Eds.). Raven Press. USA.135-145.
- ❖ Shintani, F., Nakaki, T., Kanba, S., Sato, K., Yagi, G., Shiozawa, M., Aiso, S., Kato, R., Asai, M.(1995) Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotrophic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. J Neurosci 15:1961–1970
- ❖ Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ y Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and (ER $\beta$ ) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. Steroids. 1998;63: 498-504.
- ❖ Silverman AJ. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: immunocytochemistry and in situ hybridization. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E y Neill D. Raven Press. 1: 1638-1709.
- ❖ Silverman, A., Levine, I., Within J. (1998). The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hibridization. En: The Phisiology of Reproduction. Knobil E. Y Nelly JD editores. Vol. 1, Cap. 28, Raven Press, Nueva York, pp 1683-1709
- ❖ Sims, J. (2002) IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. Curr Opin Immunol 14:117–122
- ❖ Sitges M. (1993). Comunicaciónentre las células nerviosas. Sinapsis. Comunicación neuroendocrina. Bases celulares moleculares. Sociedad mexicana de ciencias fisiológicas CONACyT y SEP. p.22.
- ❖ Skaper, S. (2007). The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. Annals of the New York Academy of Sciences, 1122, 23–24.
- ❖ Smith. M., Freeman, M., Neill, 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.
- ❖ Squires, J. (2003) *Applied Animal Endocrinology* 4ta edición, Editorial CABI Publishing, Massachusetts USA, 234 ppt.
  - ❖ Sriram K, O'Callaghan J. (2007). Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*; 2: 140-53.
  - ❖ Sternberg E. (1998). Overview of the conference and the field. *Ann NY Acad Sci.*; 840:18
  - ❖ Sternberg EM. (1998). Overview of the conference and the field. *Ann NY Acad Sci.*; 840:1-8
  - ❖ Stojilkovic SS, KJ Catt. 1995. Novel aspects of GnRH-induced intracellular signalling and secretion in pituitary gonadotrophs. *J Neuroendocrinol* 7, 739-757.
  - ❖ Stopa, E., Sower, S., Svendsen, C., and King, C.(1988). Polygenic expression of gonadotropin-releasing hormone(GnRH) in human? *Peptides* 9, 419–423.
  - ❖ Suzumura, A., Takeuchi, H., Zhang, G., Kuno, R., Mizuno, T. (2006) Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 219-29.
  - ❖ Tanner D., Cherry D., Mayer-Pröschel M. (2011) Oligodendrocyte Progenitors Reversibly Exit the Cell Cycle and Give Rise to Astrocytes in Response to Interferon- $\gamma$ . *The Journal of Neuroscience*, 31(16):6235– 6246
  - ❖ Thornberry, N., Bull, H., Calaycay, J., Chapman, K., Howard, A., Kostura, M. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*; 356: 768-74.
  - ❖ Turnbull A, Rivier C. (1997) Inhibition of gonadotropin-induced testosterone secretion by the intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta in the male rat. *Endocrinology*. Vol-138:1008–1013.
  - ❖ Ugrumov M, Hisano S and Daikoku S. (1989). Topographic relations between tyrosine hydroxylase- and luteinizing hormone-releasing hormoneimmunoreactive fibers in the median eminence of adult rats. *Neurosci. Lett.* 102, 59–164.
  - ❖ Ulloa-Aguirre A y Timossi C. (1998). Structure-function relationship of folliclestimulating hormone and its receptor. *Human Reprod.* 260-283.
  - ❖ Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsmura P y Dias JA. (1999). Role of glycositation in function of Follicle-stimulating hormone. *Endocrine*, 205-215.
  - ❖ Villet, C. (1996). *Biología*. Octava edición. McGraw-Hill. México.
  - ❖ Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. (1994). Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early

- response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 23: 103-114.
- ❖ Welsh, T., Nann, K., Kimberly, N., Livingston A. (1998). Stress and reproduction. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.). Academic Press. U.S.A. 4: 662, 665, 668.
  - ❖ Witkin, J. W., Ferin, M., Popilskis, S. J., Silverman, A.(1991). Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* 129, 1083–109
  - ❖ Wu, S., Wolfe, A. (2012). Signaling of Cytokines is important in regulation of GnRH neurons. *Mol Neurobiol* 45: pp: 119-125.
  - ❖ Yabuuchi, K., Maruta, E., Minami, M., Satoh, M. (1996) Induction of interleukin-1 $\beta$  mRNA in the hypothalamus following subcutaneous injections of formalin into the rat hind paws. *Neurosci Lett* 207:109–112
  - ❖ Yamasaki, Y., Matsuura, N., Shozuhara, H., Onodera, H., Itoyama, Y., Kogure K. (1995) Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*; 26: 676-681.
  - ❖ Yamashita H, Kannan H, Inenaga K, Koizumi K. (1983). Electro physiological and immunocytochemical studies of neurons in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Biomed Res*; 4:217.
  - ❖ Yao, H., Bahr J. (1998). Ovary, overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 3: 590-595.
  - ❖ Yen, S. (2001). *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
  - ❖ Yoo, M., Nishihara, M., Takahashi, M. (1997) Involvement of prostaglandins in suppression of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Reprod Dev* 43:181–187
  - ❖ Yoo, M., Nishihara, M., Takahashi, M. (1997) Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates endotoxin induced suppression of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rat. *Endocr J* 44:141–148
  - ❖ Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Díaz-Cueto L, Veldhuis, D, Ulloa-Aguirre A. (1995). Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoforms distribution through the human menstrual cycle. *J Clin. Endocrinol Metab.* 1647-1656.

