



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**Expresión de la Hormona Inhibidora de las Gonadotropinas
(GnIH) y de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas
(GnRH) en el hipotálamo de ratas adultas estresadas
prenatalmente**

T E S I S

Para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal presenta:

MVZ. Azhalea Guadalupe García Soto

Co-directores:

Dra. María del Socorro I. Retana Márquez

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Asesora:

Dra. Wendy Portillo Martínez

México D.F. a 15 de diciembre de 2016

COMITÉ TUTORAL:

CODIRECTORA:

Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Área de Biología Conductual y Reproductiva

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

rems@xanum.uam.mx

CODIRECTOR:

Dr. Luis Enrique Gómez Quirioz

Área de Bioquímica y Fisiología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

legq@xanum.uam.mx

ASESORA:

Dra. Wendy Portillo Martínez

Instituto de Neurobiología, Juriquilla Querétaro

Universidad Autónoma de México

portillo@unam.mx

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Wendy Portillo Martínez

Instituto de Neurobiología, Juriquilla, Querétaro

Universidad Autónoma de México

portillo@unam.mx

Dra. Beatriz Gómez González

Área de Neurociencias. Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

clasebgg@gmail.com

Dr. Oscar González Flores

Área de Neurociencias. Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

oglezflo@gmail.com

M en C. Susana Rojas Maya

Departamento de Reproducción

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Autónoma de México

srm@unam.mx

Agradecimientos:

Agradezco al programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, el cual pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT con un número de registro 003797 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo a través de la beca número: 397927

A la Dra. Socorro Retana Márquez por el financiamiento del proyecto a través del convenio SEP-PRODEP 1035-09-1247

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Expresión de la Hormona Inhibidora de las Gonadotropinas (GnIH y de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo de ratas adultas estresadas prenatalmente" que presentó: Azhalea Guadalupe García Soto

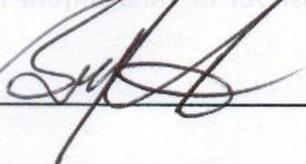
El día 15 de diciembre de 2016

MIEMBROS DEL JURADO

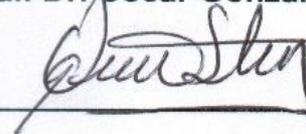
Presidenta: Dra. Wendy Portillo Martínez



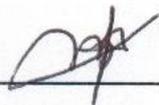
Secretaria: Dra. Beatriz Gómez González



Vocal: Dr. Oscar González Flores



Vocal: M en C. Susana Rojas Maya



DEDICATORIAS

Dedico el presente trabajo a mis padres, el Sr. Alfredo Adrián García Muciño y a la Sra. María Guadalupe Soto Murillo por haber procurado desde siempre mi formación académica y profesional y apoyarme en todo cuanto ha estado a su alcance, pues lo han hecho durante toda su vida con esfuerzo y amor; son para mí, un gran ejemplo de vida.

A mi hijo Osvaldo Tawil García por brindarme su amor incondicional y a mi esposo Osvaldo Tawil Sánchez por haberme apoyado en todo durante esta etapa de mi vida, ser comprensivo, ser mi confidente y creer en mí. Sin el apoyo de ambos, no hubiese podido desarrollar este trabajo.

A mis hermanos: David, Jazmín, Ademir, Alfredo y Omar, por ser mis compañeros por tantos años y una gran inspiración al luchar día con día por superarse a sí mismos y salir adelante.

A mis sobrinos: Demian, Yunué, Sofía, Natalia, David, Aldair, Damara y Scarlett.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Socorro Retana Márquez por su dedicación, por su exigencia en el trabajo, lo cual fue un aliciente para cada día esforzarme y lograr ser mejor.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por su apoyo en el desarrollo de las técnicas y por sus apreciables consejos y opiniones.

A la Dra. Wendy Portillo Martínez por su valiosa guía y sus excelentes observaciones.

A la M. en C. Susana Rojas Maya, por permitirme trabajar en su laboratorio y dedicar parte de su tiempo a orientar y enseñar con calma y paciencia.

A la Dra. Adriana Lizbeth Juárez Rojas pues estuvo todos los días con su invaluable paciencia y dedicación, enseñándome, animándome y contagiando su carácter entusiasta y perseverante.

A mi compañera de generación, Mónica Díaz Pacheco por acompañarme en este trayecto desde el inicio y ser siempre solidaria y optimista.

A mis compañeros de laboratorio: Eunice, Flor, Sergio, Felipe, Diana y Fahiel por su compañía y hacer agradable el trabajo y mi estancia con ustedes.

A los compañeros del laboratorio de Fisiología celular del Departamento de Ciencias de la salud por brindarme su apoyo y espacio para poder trabajar en su laboratorio.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GONADAL.....	12
Hipotálamo (GnRH).....	12
GnIH.....	18
Hipófisis.....	20
Mecanismo de acción de GnIH.....	22
Gonadotropinas (LH y FSH).....	23
Gónadas.....	24
Testículos.....	24
Ovarios.....	28
Concepto de estrés.....	32
Efecto del estrés en la reproducción.....	35
GnIH y estrés.....	36
ANTECEDENTES.....	38
Estrés prenatal y reproducción.....	38
JUSTIFICACIÓN.....	43
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	43
HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVO GENERAL.....	43
Objetivos Particulares.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
Diseño experimental.....	44
Aimales de laboratorio.....	44
Estrés por inmersión en agua fría.....	45
Obtención de las muestras.....	45

Western Blot.....	47
Extracción de las proteínas.....	47
Preparación de las proteínas.....	47
Preparación de los geles.....	47
Electroforesis y transferencia de las proteínas.....	47
RT-PCR para evaluar la expresión del gen de GnIH y GnRH.....	49
Elaboración del primer para GnRH y GnIH.....	49
Extracción de RNA para la realización de RT-PCR.....	50
Electroforesis en gel de agarosa con formaldehído para determinar la integridad del RNA.....	51
RT-PCR semicuantitativo para la amplificación de un segmento del gen para GnRH y GnIH de hipotálamo de rata.....	51
Electroforesis en gel de agarosa.....	52
Prueba de ELISA.....	52
Análisis estadístico.....	53
RESULTADOS.....	54
Contenido hipotalámico de GnRH y GnIH en machos EP.....	54
Expresión del RNAm para GnRH y GnIH en machos.....	56
Concentración de testosterona.....	58
Contenido hipotalámico de GnRH y GnIH en hembras EP.....	59
Expresión de RNAm de GnRH y GnIH en hembras.....	61
Concentración de Estradiol y Progesterona (P4).....	63
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIÓN.....	73
REFERENCIAS.....	74

RESUMEN

El estrés prenatal (EP) en mamíferos, es un factor involucrado en la programación fetal de trastornos reproductivos a largo plazo. Al presentarse durante la etapa crítica del desarrollo fetal, causa alteraciones en los ejes adrenal y gonadal.

A la fecha se desconoce si dichas alteraciones involucran el control neuroendócrino de la reproducción, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios que se presentan en la expresión de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) en el hipotálamo de ratas macho y hembra adultas sometidas a EP, así como los niveles de hormonas sexuales. Se utilizaron hembras gestantes asignadas a un grupo control y otras a estrés por inmersión en agua fría (IAF). Las crías se destetaron al día 21, se sexaron y se separaron en machos y hembras. A los 3 meses de edad, los animales de ambos sexos se sacrificaron para obtener el hipotálamo y el suero sanguíneo. A las hembras se les sacrificó en la etapa de proestro y diestro. El contenido de GnRH y de GnIH del hipotálamo se evaluó por Western Blot y la expresión del RNAm para estas hormonas se cuantificó mediante RT-PCR. Las hormonas sexuales se cuantificaron mediante la técnica de ELISA. Los resultados muestran disminución en el contenido hipotalámico y la expresión de GnRH, así como aumento en el de GnIH en las hembras del grupo EP con respecto al control, tanto en la etapa de proestro como en el diestro. En los machos EP también se observó un incremento del contenido y expresión de GnIH así como disminución en el contenido y expresión de la GnRH. Estos resultados indican que el EP es capaz de alterar el control neuroendócrino de la reproducción, tanto en hembras como en machos, lo que puede repercutir en

alteraciones endócrinas que afectan diversos aspectos reproductivos en ambos sexos en la etapa adulta.

ABSTRACT

Prenatal stress (PS) in mammals is a factor involved in fetal programming of long-term reproductive disorders. When PE is present during critical stages of fetal development it can cause alterations in adrenal and gonadal axes. Currently, it is unknown whether these changes are involved in the neuroendocrine control of reproduction. Therefore, the aim of this study was to evaluate changes in the content and expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), as well as gonadotropin-inhibiting hormone (GnIH) in the hypothalamus of prenatally stressed adult male and female rats, as well as their serum sex hormone levels. Pregnant females were assigned to control or stress by immersion in cold water group. The pups were weaned on day 21, sexed and separated into males and females. At the age of 3 months, animals of both sexes were sacrificed to obtain the hypothalamus and blood serum. Females were sacrificed at proestrus or diestrus stages of the estrous cycle. The hypothalamic content of GnRH and GnIH was evaluated by Western blotting and mRNA expression for these hormones was quantified by semi-quantitative RT-PCR. Sex hormones were evaluated by ELISA. A decrease in GnRH content and an increase in GnIH content was observed in the hypothalamus of PE females at both proestrus and diestrus stages. In PE males an increase in GnIH together with a decrease in GnRH was also observed. These results indicate that PE can disrupt the neuroendocrine control of reproduction in both, females and males, and these effects may cause endocrine disorders impairing reproductive function in both sexes during adulthood.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso biológico y una función esencial de los seres vivos, que asegura la supervivencia de los organismos a lo largo del tiempo, dando lugar a nuevos individuos semejantes a sus antecesores. Los organismos han desarrollado mecanismos para multiplicarse y producir descendencia. El hábitat del organismo, su fisiología interna y varios otros factores como los climáticos, alimenticios, sociales, son responsables de su modo de reproducción.

En los vertebrados, la reproducción es dirigida desde el sistema nervioso central a través de estructuras nerviosas y endocrinas, las cuales se comunican entre sí mediante hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores. La región cerebral mayormente involucrada en este proceso es el hipotálamo, que se encuentra dividido en diversos núcleos hipotalámicos, los cuales controlan la síntesis y secreción de las gonadotropinas -hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH)- desde los gonadotropos hipofisarios hacia la circulación sanguínea, tanto en hembras como en machos (Asimakopoulous, 2012).

Las gonadotropinas al llegar a sus órganos blanco, las gónadas, estimulan la secreción de hormonas (andrógenos y estrógenos y progesterona) que controlan y dirigen eventos reproductivos tales como la conducta reproductiva y el correcto funcionamiento de los órganos sexuales, asegurando de este modo, el éxito reproductivo de los individuos (Plant, 2015).

El estrés, tiene efectos perjudiciales sobre la reproducción en individuos adultos mediante la activación del eje hipotálamo-hipófisis adrenal (HHA) (Kirby

et. al., 2009), pero también durante etapas críticas del desarrollo como lo es el desarrollo prenatal. Esto puede causar un inadecuado desarrollo de estructuras neuroendócrinas debido al incremento de los glucocorticoides maternos, los cuales generan cambios en la morfología y en el funcionamiento cerebral. Al llegar a la madurez, los individuos expuestos a estrés prenatal presentan alteraciones en diversas funciones, incluyendo la función reproductiva y el comportamiento sexual. Estas alteraciones pueden ser desde la inhibición de la función reproductiva hasta deficiencias en la secreción hormonal y ausencia o disminución de la receptividad sexual (Del Cerro et. al, 2015).

A continuación se mencionan los diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, el cual es el responsable de dirigir la función reproductiva en los mamíferos.

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GONADAL (HHG)

Hipotálamo (GnRH)

El hipotálamo es una estructura cerebral del cerebro que regula procesos vitales y varios comportamientos viscerales y somáticos (Díaz, 2014). En los vertebrados, se encuentra en la base del cerebro, rodeando al tercer ventrículo y se extiende desde un plano inmediatamente anterior al quiasma óptico a uno inmediatamente posterior a los cuerpos mamilares (Daniel, 1976).

El hipotálamo y la hipófisis se unen anatómicamente por la eminencia media y funcionalmente se conectan por vías neuronales (en el caso de la neurohipófisis) y mediante un sistema venoso local denominado sistema portal hipotalámico-hipofisial (en el caso de la hipófisis anterior o adenohipófisis) (Mc Cartney y Marshall, 2013). El área preóptica (POA) y la región medio basal del hipotálamo,

particularmente el núcleo arcuato (NA) contienen neuronas peptidérgicas que secretan a la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (Griffin y Wilson, 2003). Las neuronas GnRHérgicas envían proyecciones axonales a la eminencia media (EM), en donde se localiza el sistema portal hipotálamo-hipofisario, el cual está compuesto por capilares que surgen de las arterias hipofisarias superiores y atraviesan el tallo hipofisario formando una red capilar dentro de la hipófisis anterior (adenohipófisis). Esta red capilar permite que la GnRH sea transportada hacia los gonadotropos hipofisarios (Ehlers y Halyorson, 2013).

El origen embrionario de las neuronas GnRHérgicas son las células progenitoras ubicadas en el epitelio de la placa olfatoria. Las neuronas GnRH nacientes migran a lo largo de los axones del órgano vomeronasal a través de la lámina cribosa y llegan al hipotálamo mediobasal donde la migración termina y dichas neuronas se desprenden de las neuronas guía (Ehlers y Halyorson, 2013). En muchas especies, incluyendo cabras, ratas, monos y ovejas, además de las neuronas GnRHérgicas en el POA y en el NA, existe la presencia un pequeño grupo de neuronas GnRHérgicas en la región medio basal del hipotálamo (MBH) (Jia y Yang, 2014).

La filogenia molecular muestra que existen tres formas distintas de GnRH: GnRH I, GnRHII y GnRH III, las cuales proceden de un origen común. Sin embargo, la mayoría de los vertebrados, incluyendo a los mamíferos, anfibios y teleósteos, presentan solamente GnRHI y GnRHII, mientras que la GnRHIII se ha encontrado en algunos teleósteos y lampreas (Chen y Fernald, 2008, Liu y Veldhius, 2013).

Para la secreción de la GnRH desde el hipotálamo, se requiere de la participación de la dopamina (DA), de la noradrenalina y de la norepinefrina (NA y NE) así como del glutamato, el ácido gama aminobutírico (GABA), e incluso del óxido nítrico (NO) (McCartney y Marshall, 2013). Asimismo, las neuronas GnRH reciben terminales axónicas de neuronas que liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), el neuropéptido Y (NPY) y las β -endorfinas (Sagrillo et. al., 1996).

En ratas ovariectomizadas se han realizado estudios en donde se ha demostrado que la administración de la DA por vía intravenosa estimula la liberación de GnRH y LH (Vijayan, 1985).

Por otro lado, las neuronas GnRHérgicas presentan receptores α -adrenérgicos, los cuales han sido implicados en la estimulación de la liberación pulsátil y preovulatoria de GnRH, mientras que la noradrenalina se encuentra relacionada con la frecuencia de pulsos de LH (León, 2014).

La administración de glutamato *in vivo*, vía intracerebroventricular es capaz de inducir la liberación de LH demostrando su acción directa a nivel hipofisiario. (Brann et. al, 1994)

En el caso del NO, se ha comprobado que éste es capaz de estimular la liberación de GnRH *in vitro* en neuronas GT1-7; además, diversos estudios farmacológicos muestran que el NO incrementa los niveles de GnRH al establecimiento del pico pre-ovulatorio de LH (León, 2014).

En cuanto a los reguladores negativos, el GABA es un neurotransmisor que participa en la inhibición de la secreción de GnRH. Algunos estudios realizados en

ratas macho intactas muestran que el GABA disminuye los niveles de RNAm para GnRH (Sagrillo et. al., 1996)

Los péptidos opioides endógenos (EOPs) -que se clasifican en tres grupos: encefalinas, β -endorfinas (β -END) y dinorfinas (Dyn)-, son también potentes inhibidores fisiológicos de la secreción de GnRH y LH. No se ha detectado la expresión de receptores para EOPs en las neuronas GnRH, pero dichos receptores se localizan en el área preóptica del hipotálamo. El neuropéptido Y es otro modulador de la función reproductiva y se ha demostrado en machos y hembras su acción inhibitoria sobre GnRH (León, 2014)

A nivel central, también existe una inhibición de GnRH mediada por la liberación de CRH (Johnson et. al., 1992).

Desde que la kisspeptina fue descubierta en 1996 por Lee et. al. (como un gen supresor de metástasis en células de melanoma maligno), comenzó a estudiarse la importancia de este neuropéptido sobre la regulación de la liberación de GnRH y se demostró su importante papel sobre dichas neuronas, ya que estimula la secreción pulsátil de GnRH (Roseweir y Millar, 2009). Otra función que se le ha atribuido es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) para el inicio de la pubertad (Smith y Clarke, 2006)

Las neuronas kisspeptinérgicas hacen sinapsis con las neuronas GnRHérgicas en la zona externa de la eminencia media, estimulando la exocitosis de la GnRH (Mc Cartney y Marshall 2013). En el núcleo arcuato, las neuronas kisspeptinérgicas coexpresan además neurokinina B (NKB) y dinorfina (Dyn), -por lo que se les ha llamado neuronas KNDy (kisspeptina, Neurokinina B, dinorfina)-;

mientras la NKB estimula, la Dyn inhibe la liberación de kisspeptina, lo cual influye sobre la actividad de las neuronas kisspeptidérgicas que a su vez, tienen actividad sobre las neuronas GnRH (Figura 1) (MacCartney y Marshall, 2013).

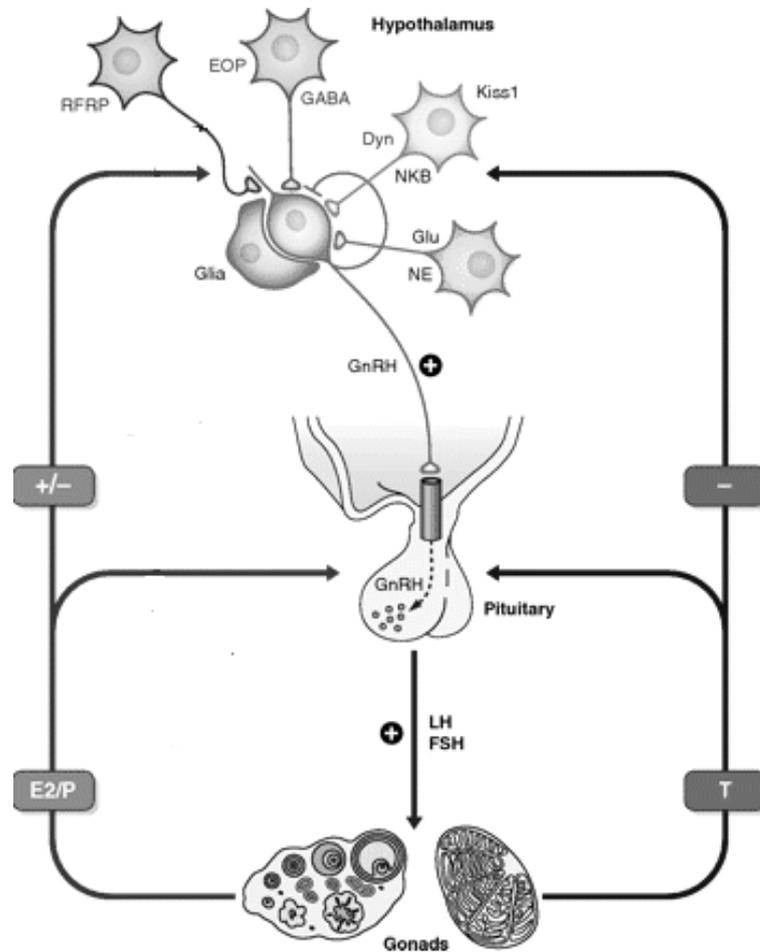


Fig. 1 Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. La GnRH es regulada centralmente por diversos neurotransmisores. Al ser secretada en el sistema porta-hipofisiario es transportada a la adenohipófisis donde se une a sus receptores en los gonadotropos hipofisarios. De este modo, estimula la liberación de LH y FSH, las cuales al unirse a sus receptores en sus órganos blanco, en las gónadas, estimulan la síntesis y secreción de hormonas sexuales. Adaptado de Pinilla et. al. (2012).

La pulsatilidad en la secreción de GnRH, es necesaria para la expresión de sus receptores (GnRHR) en los gonadotropos adenohipofisarios; mientras mayor sea la frecuencia en los pulsos, se logra la estimulación máxima. Por el contrario, la administración continua de GnRH disminuye la cantidad de los GnRHR en la membrana celular de los gonadotropos, debido a un rápido desacoplamiento del receptor para GnRH con sus moléculas de señalización intracelular (Ehlers y Halyorson, 2013).

Existen tres teorías sobre la pulsatilidad de la GnRH, la primera de ellas considera que la pulsatilidad es intrínseca a las neuronas GnRH ya que se ha demostrado en neuronas GnRH inmortalizadas la generación de pulsos de manera autónoma y también sincronizada una vez que entraron en contacto con otras neuronas GnRH (Tsutsumi y Webster, 2009).

La segunda teoría, sugiere que neuronas del hipotálamo medio basal (MBH) tienen como blanco directo a la red neuronal de GnRH, dirigiendo la liberación intermitente de GnRH. La tercera teoría señala que la kisspeptina localizada en el núcleo arcuato puede ser un componente generador de la pulsatilidad de GnRH al coexpresar otros dos neuropéptidos, la Neurokinina B y la Dinorfina, las cuales que juegan un papel regulador positivo y negativo respectivamente, en la liberación de kisspeptina y ésta a su vez, influye en la manera en que la GnRH es liberada (Plant, 2015). Las tres teorías aportan elementos importantes al entendimiento de la fisiología de las neuronas GnRHérgicas y están relacionadas a factores internos y externos.

GnIH

La GnRH no es la única neurohormona hipotalámica que juega un papel central en el control de la reproducción en vertebrados (Retana et. al., 2012)

La hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH) fue descubierta en el hipotálamo de la codorniz japonesa en el año 2000 (Tsutsui et. al., 2000). Estudios subsecuentes mostraron que la GnIH también se sintetiza en el hipotálamo de mamíferos tales como los roedores, las ovejas, los bovinos, los monos y los humanos (Bentley et. al., 2009; Ubuka et. al., 2012)

La GnIH, es un neuropéptido relacionado con la regulación neuroendócrina inhibitoria de la reproducción y actúa sobre la fisiología reproductiva a diversos niveles del eje HHG para regular la liberación de gonadotropinas (Tsutsui et. al., 2000; Bentley et. al., 2009). La GnIH forma parte del grupo de péptidos relacionado con la RF amida (RFRP) por poseer un grupo amino R (arginina) F (fenilalanina) (arg-phe-NH₂) en su carbono terminal (Clarke et al., 2009; Ebling y Luckman, 2008; Yang et al., 1985).

La GnIH no se expresa en el cerebro de los mamíferos a diferencia del RFRP-1 y el RFRP-3 que sí se producen y son codificados por un gen ortólogo al de la GnIH (Plant, 2015). Por esta razón, a los homólogos de la GnIH en mamíferos se les conoce con el nombre de RFRPs*.

Los cuerpos celulares de las neuronas GnIH en mamíferos están localizadas en el área dorsomedial hipotalámica (DMH). En la rata, las fibras neuronales se extienden a la eminencia media y al área preóptica, donde

*En el presente trabajo, los RFRPs se denominan de este modo o como GnIH de manera indiferenciada para referirse a la hormona hipotalámica estudiada.

hacen contacto con las neuronas GnRH (Smith y Clarke, 2010).

Debido a su actividad, la GnIH, es modulador central muy importante de las funciones reproductivas, ya que no solo participa en la retroalimentación negativa en la hipófisis y las gónadas, sino se demostró que no sólo provoca un incremento de la retroalimentación negativa en el cerebro desde la hipófisis y las gónadas, sino que tiene un papel antagónico al de la GnRH, disminuyendo directamente la actividad de las neuronas GnRHérgicas y reduciendo la síntesis y liberación de gonadotropinas desde la adenohipófisis y de hormonas sexuales desde las gónadas (Figura 2) (Calisi, 2014).

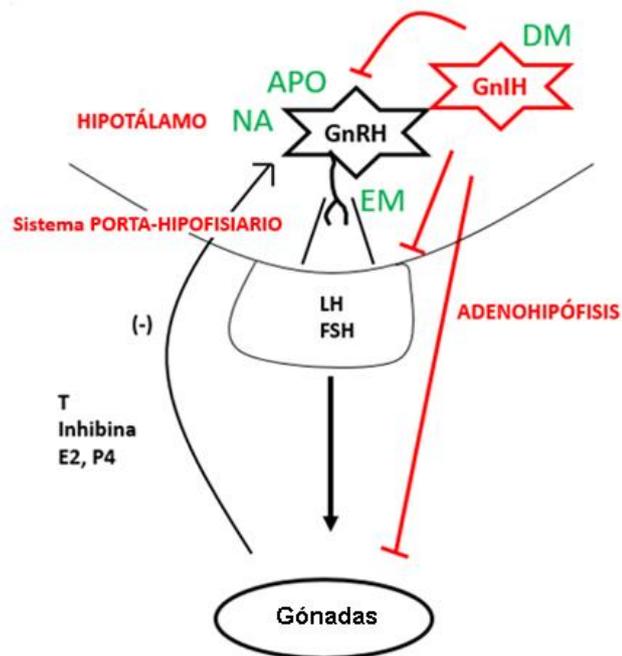


Fig. 2 La GnIH actúa en los tres niveles del eje HHG, directamente sobre las neuronas GnRH disminuyendo su actividad, insensibilizando a los gonadotrópos hipofisarios y con la presencia de receptores a GnIH en las gónadas. APO: área preóptica; NA: núcleo arcuato; DM: núcleo dorsomedial; EM: eminencia media

Hipófisis

La hipófisis es una glándula endocrina que produce distintas hormonas que tienen importantes funciones en la regulación del metabolismo, el crecimiento y la reproducción. Esta glándula se encuentra situada en una depresión central del cuerpo del hueso basiesfenoides, llamada fosa hipofisaria de la silla turca (Bernabé et. al., 2012). Es un órgano pequeño, de distinto tamaño y morfología según la especie animal, ya que las relaciones topográficas de las tres partes principales que la conforman (adenohipófisis, pars intermedia y neurohipófisis) presentan diferencias entre algunas especies como se ha observado en el caballo, bovino, cerdo y perro (Dyce et. al, 2012). La adenohipófisis, participa en la regulación del eje HHG; los gonadotropos contienen receptores acoplados a proteína G para GnRH. La unión de la GnRH con su receptor estimula la síntesis y liberación de hormonas gonadotrópicas, Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) hacia el torrente sanguíneo. Este evento ocurre mediante dos vías:

a) La unión del ligando con su receptor activa a la proteína $G_{\alpha q}$, cuya subunidad α activa a la fosfolipasa C (PLC); esta enzima rompe al fosfatidil inositol bifosfato, localizado en la membrana plasmática, generando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El IP3 estimula la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico liso, incrementando así la concentración intracelular de Ca^{2+} y activa a la proteína cinasa C (PKC), la cual su vez, activa a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). El aumento de Ca^{2+} intracelular estimula la liberación de gonadotropinas, mientras que otras proteínas cinasas, participan estimulando la transcripción de genes que codifican la subunidad β de las

gonadotropinas. b) La GnRH se acopla a la proteína $G_{\alpha s}$ y activa a la adenilato ciclasa (AC), la cual rompe ATP, provocando un incremento en los niveles intracelulares de adenosin monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), el cual estimulará a la proteína cinasa A (PKA) los cuales se unirán y estimularán a la proteína cinasa A (PKA) para que lleve a cabo la regulación de varios genes por medio de la estimulación de las proteínas CREB (Figura 3) (Bedecarrats et. al., 2009).

Los efectos rápidos de la GnRH sobre la secreción de gonadotropinas son mediados por la elevación citoplasmática de Ca^{2+} , mientras que los productos intermedios de señalización y efectores incluyen a las proteínas cinasas dependientes de calmodulina (CaMK) que también median los efectos crónicos de la expresión génica de la GnRH. La síntesis de gonadotropinas es mediada en gran parte a través de MAPK/ERK, los cuales median la transcripción de los genes que codifican para las subunidades α y β de la LH y de la FSH (Perren y McArdle, 2013).

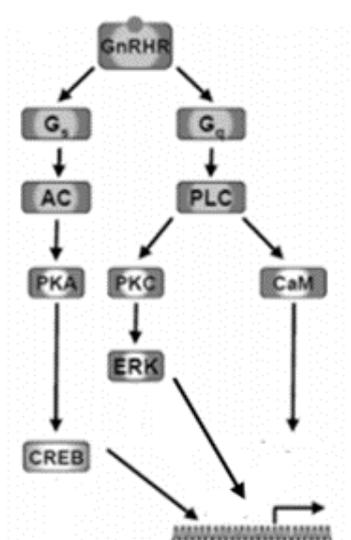


Fig. 3 Esquema de la activación del receptor de GnRH. El GnRHR activa G_s y G_q conduce a la activación de AC y PLC. AC genera cAMP, la estimulación de PKA que activa el factor de transcripción CREB. PLC conduce a la activación de la PKC que activa al factor de transcripción ERK. Los productos intermedios de señalización y efectores incluyen a las proteínas cinasas dependientes de calmodulina (CaMK) Adaptado de Perret and McArdle (2013).

Mecanismo de acción de GnIH

La GnIH actúa mediante receptores acoplados a proteína G (GPCR) los cuales se expresan en múltiples regiones cerebrales incluyendo las neuronas GnRHérgicas del APO, la hipófisis y las gónadas (Bentley et. al., 2009).

En el año 2000, se identificaron dos receptores denominados NPFF2R (antiguo GPR147) y NPFF2R (antiguo GPR74) (Yoshida et. al., 2003). Ese mismo año, otros investigadores indicaron que, en ratas, el RFRP-1 y el RFRP-3 ejercen sus acciones tras su interacción con un receptor al que denominaron OT7T022. Estudios posteriores demostraron que el denominado NPFF1R era al mismo que el OT7T022 ya que se asociaron las acciones de los péptidos RFamida de la familia GnIH/RFRPs (Yoshida et. al., 2003).

En ratas, el ARNm del receptor para GnIH se expresa en el SNC, concretamente en el hipotálamo, en la médula espinal, en la amígdala, en el hipocampo y en la sustancia negra, así como en la hipófisis, gónadas y el ojo (Bonini et. al, 2000). Estudios en aves demostraron su expresión en el cerebro y en la hipófisis (Ubuka et. al., 2010), así como en los gonadotropos en la oveja y en el humano (Ubuka et. al., 2012), mientras que en el hámster se ha observado también en las células germinales y en los espermatozoides (Tsutsui et. al., 2014). En el mono, se ha encontrado en las células de Leydig, en las espermatogonias y y en los espermatoцитos, además en células de la granulosa, en los folículos preantrales y en el cuerpo lúteo en el humano (Bonini et. al, 2000).

La unión de GnIH a su receptor inhibe la AC a través de la proteína $G_{\alpha i}$. Esta inhibición da como resultado una disminución en la concentración de AMPc inducida por GnRH (Bedecarrts et. al, 2009; Tsutsui et. al., 2010). Adicionalmente,

puede inhibir el incremento de calcio intracelular y la fosforilación de las MAPK, lo que provoca decremento en la transcripción de genes inducida por GnRH y en la secreción de gonadotropinas (Bedecarrats et. al., 2009) (Figura 4). La administración central o periférica de GnIH inhibe la liberación de gonadotropinas en los gorriones de corona blanca, en los hámsteres sirios, en las ratas y en los hámsteres siberianos (Ubuka et al, 2012).

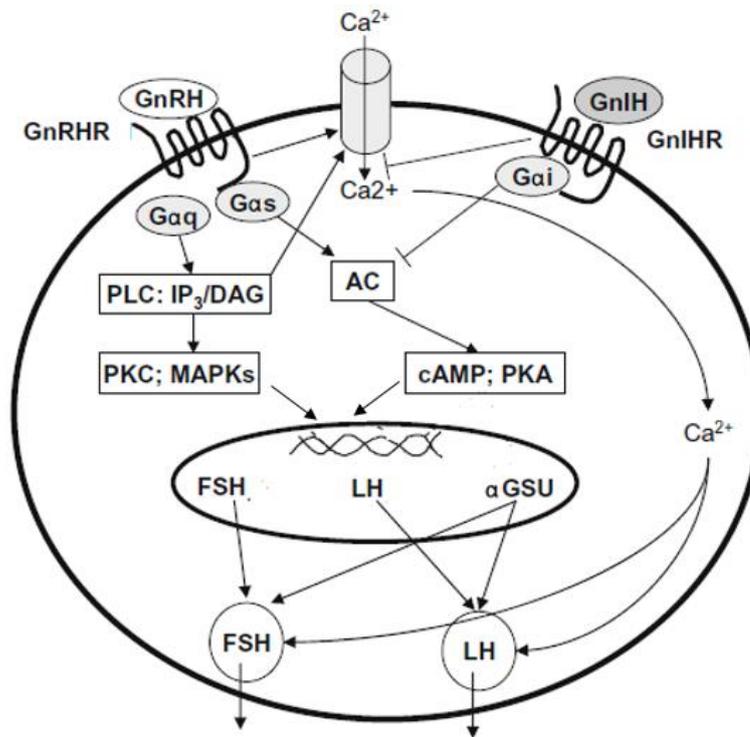


Fig. 4 Interacciones entre el receptor de GnRH y el receptor de GnIH en un gonadotropo hipofisiario. Adaptado de Bedecarrats et. al. (2009).

Gonadotropinas

Cada gonadotropina consiste de 2 subunidades proteicas, α y β . La subunidad α de 92 aminoácidos es común a LH y FSH. La subunidad β de LH y FSH contiene 121 y 117 aminoácidos respectivamente y a ella se debe la especificidad biológica de esas dos hormonas (McCartney y Marshall, 2013).

Antes de la pubertad, la secreción de FSH en respuesta a GnRH es mayor que la de LH. La secreción pulsátil de GnRH en el sistema portal hipofisiario causa la secreción pulsátil de LH (Dufau et. al., 1983). Los pulsos de baja frecuencia de GnRH favorecen la secreción de FSH, mientras que los pulsos más frecuentes favorecen la secreción de LH (Marshall y Griffin, 1993). La secreción pulsátil de FSH está acoplada en tiempo a la de LH, pero es de menor amplitud (Veldhuis et. al., 1987). La vida media de la LH es más corta que la de FSH, por lo que sus pulsos son de mayor amplitud (Beshay y Carr, 2013).

Gónadas

Los testículos y los ovarios son glándulas bipotenciales ya que por un lado son capaces de producir gametos maduros a partir de células germinales (gametogénesis) y de la síntesis y liberación de hormonas esteroideas, las cuales se encargan de la producción de dichos gametos, así como los caracteres sexuales secundarios en machos y hembras y la expresión de la conducta sexual (León, 2014).

Testículos

Los testículos son estructuras pares y ovaladas que constan de cientos de túbulos seminíferos contorneados muy plegados, que se encuentran revestidos de epitelio seminífero (Figura 5). Producen tanto los gametos como las hormonas sexuales masculinas (andrógenos y estrógenos). La espermatogénesis y la esteroidogénesis se lleva a cabo en dos compartimentos morfológica y funcionalmente distinguibles entre sí: los túbulos seminíferos, donde se sitúan las células de Sertoli y el espacio intersticial entre túbulos seminíferos, donde se sitúan las células de Leydig (Figura 6). Aunque ambos compartimentos están

estrechamente relacionados entre sí, su regulación hormonal y la espermatogénesis es controlada por el hipotálamo y la adenohipófisis mediante la secreción de la LH y la FSH (Weinbauer et. al., 2010).

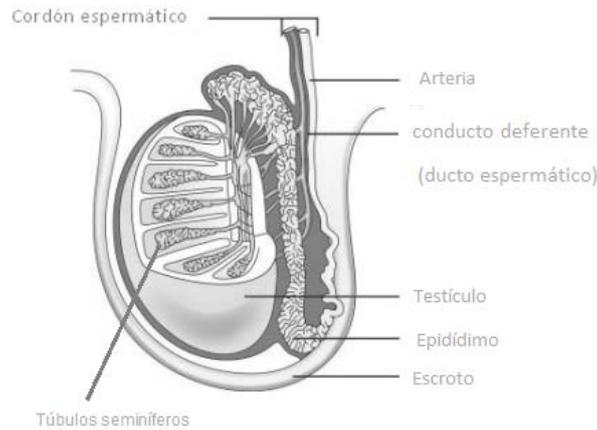


Fig. 5 Diagrama del sistema reproductor masculino. Tomado de Agarwal (2014).

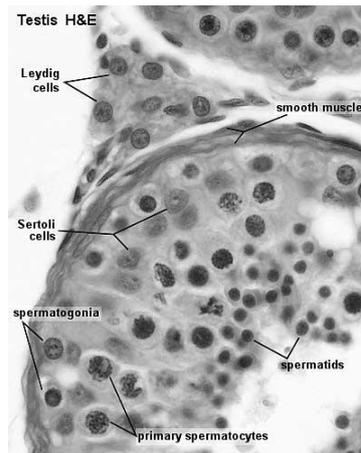


Fig. 6 Sección transversal de túbulos seminíferos y células de sostén. Tomado de Hill (2016).

En los machos, las cantidades de LH y FSH liberadas en respuesta a la GnRH dependen de su edad y estatus hormonal (Dufau et. al., 1983). En la rata se ha demostrado que los niveles de GnRH hipotalámica, gonadotropinas y testosterona se reducen en machos viejos en comparación con ratas macho

jóvenes, debido a factores hormonales testiculares de retroalimentación (Gruenewald y Matsumoto, 1990).

La LH es el principal estímulo para la biosíntesis de andrógenos en las células de Leydig localizadas en el testículo. La transducción de señales de LH se inicia con la unión de la hormona a sus receptores específicos en la membrana de las células de Leydig, que activa a la proteína G_s para que se promueva la estimulación de la AC con la subsecuente formación de AMPc a partir de ATP (Griffin y Wilson, 2003) el cual provoca la síntesis de testosterona (Dong and Hardy, 2004).

La biosíntesis de testosterona se lleva a cabo mediante 2 vías que se han designado como $\Delta 5$ y $\Delta 4$, según la localización del punto de instauración (doble enlace) de los compuestos intermediarios. La primera predomina en humanos y conejos y la segunda en roedores (Lemus y Pérez, 2000). El primer paso en la vía de biosíntesis de andrógenos lo constituye la conversión a nivel mitocondrial, de colesterol a pregnenolona, que tiene como paso limitante la hidroxilación enzimática en el C20 mediante la enzima cP450scc. Este paso limitante se activa selectivamente en el testículo del adulto por medio de la LH (Lemus y Pérez, 2000). Posteriormente, en el retículo endoplásmico liso, la pregnenolona se transforma a 17-hidroxi-pregnenolona, dihidroepiandrosterona, androstendiol y androstendiona, y finalmente en testosterona (Figura 7) (Ferrán, 2011).

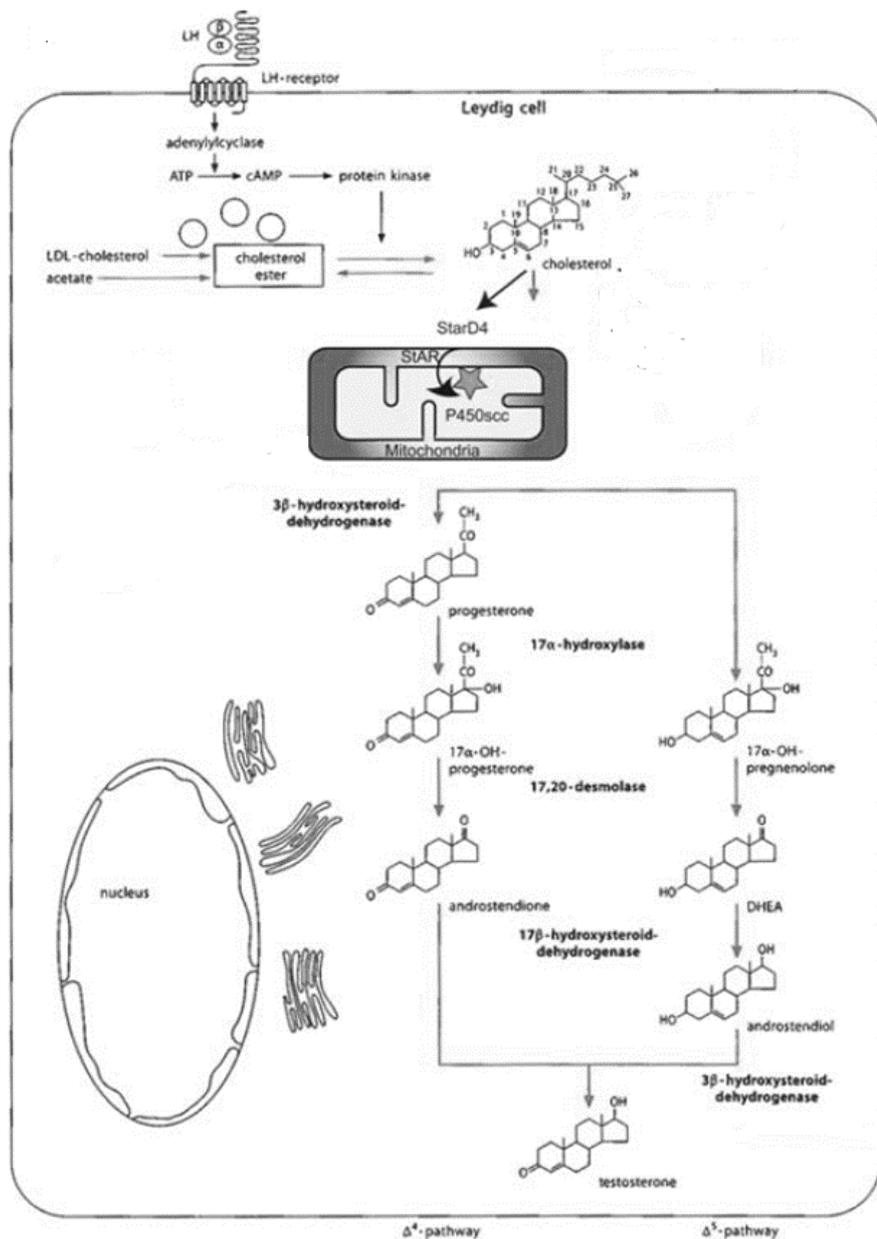


Fig. 7 La biosíntesis esteroide en célula de Leydig es inducida por LH a través de la activación de adenilato ciclasa. La proteína StAR es la encargada del transporte del colesterol de la membrana externa mitocondrial a su membrana interna. Inicia con colesterol o acetato el cual sufre diversas modificaciones enzimáticas y es convertido por P450scc a pregnenolona. Posteriormente, a través de la acción de otras enzimas sufre una serie de modificaciones estructurales hasta la formación de testosterona. Adaptado de Weinbauen et. al. (2010).

Por su parte, la FSH, se une a sus receptores membranales en las células de Sertoli y junto con la testosterona, regula la espermatogénesis (Jin y Yang, 2014). Además, las células de Sertoli, sintetizan numerosas proteínas esenciales para el correcto funcionamiento del testículo como a las activinas e inhibinas que, una vez liberadas a la circulación general, actúan a nivel hipofisario regulando específicamente la liberación de FSH (León, 2014).

La FSH se une a receptores acoplados a proteína G, localizados en la membrana de las células de Sertoli (Walstrom et. al., 1983) y activa la síntesis del AMPc, el cual activa a la proteína cinasa A para estimular la síntesis de la proteína unidora de andrógenos (ABP), necesaria para el transporte de la testosterona a los túbulos seminíferos (Means et. al., 1976).

La secreción de LH y FSH están bajo un control por retroalimentación negativa que ejerce la testosterona a nivel hipotalámico e hipofisario (Anawalt et. al., 1996). Adicionalmente, la inhibina, una hormona peptídica testicular, tiene un rol importante en la regulación de la secreción de FSH por acción de retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis (Mc Cartney y Marshall, 2013; Plant, 2015).

OVARIOS

Los ovarios son dos cuerpos ovalados alojados en la cavidad pélvica fijados mediante un ligamento y un pliegue peritoneal denominado mesovario, que junto con estructuras fibromusculares, mantienen al ovario anexado a la entrada de las trompas de Falopio. Esta glándula recibe un aporte nervioso, vascular y linfático a través del mesovario. Sus principales funciones son la producción de gametos

fertilizables (ovogénesis) y la síntesis y secreción de hormonas sexuales femeninas, principalmente estradiol (E2) y progesterona (P4) (Tresguerres y Castillo, 2005).

En el caso de las hembras, la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH, así como la retroalimentación por parte de la P4 y E2, controla los procesos de síntesis y secreción de LH y FSH. La secreción de ambas gonadotropinas es fundamental para el crecimiento folicular (Ehlers y Halyorson, 2013). La FSH comienza a elevarse tiempo después de que se ha producido la ovulación, siendo responsable del reclutamiento de folículos ováricos y de seleccionar al folículo dominante del que posteriormente será liberado el ovocito. La FSH induce el crecimiento de las células de la granulosa y activa a la enzima aromatasa la cual convierte los andrógenos en estrógenos (Beshay y Carr, 2013). Los niveles de FSH declinan debido a la concentración de los estrógenos circulantes y a la inhibina. A pesar de la caída en el nivel de FSH, el folículo dominante continúa creciendo a medida que se adquiere una mayor concentración de receptores para FSH lo cual lo hace más resistente a la caída de FSH. (Beshay y Carr, 2013). Además, diversos núcleos hipotalámicos, controlan la retroalimentación negativa de esteroides gonadales en las hembras, ya que las neuronas kisspeptinérgicas del NA están involucradas en la retroalimentación negativa, mientras que las neuronas del núcleo anteroventral periventricular (AVPV) participan en la oleada preovulatoria de LH mediante la retroalimentación positiva del estradiol (E2). En otras palabras, el E2 ejerce efectos de retroalimentación opuestas sobre el hipotálamo (Ehlers y Halyorson, 2013).

Por otro lado, el incremento en los niveles de LH durante la fase folicular del ciclo, es gradual. Inmediatamente antes de la ovulación, la LH tiene un incremento conocido como pico preovulatorio en respuesta al E2 producido por el folículo dominante, disminuyendo después de la ovulación.

Los receptores para FSH y LH pertenecen a la familia de GPCR. Los de FSH se pueden encontrar exclusivamente en la membrana de las células de la granulosa, mientras que los receptores de LH se encuentran en las membranas de las células de la teca. (Beshay y Carr, 2013). La activación del receptor de LH estimula principalmente la producción de androstendiona en las células de la teca, la cual se transporta a las células de la granulosa en donde es aromatizada a estrona y finalmente convertida en estradiol. Esta es la base de la teoría de las dos células del ovario. (Figura 8) (Beshay y Carr, 2013).

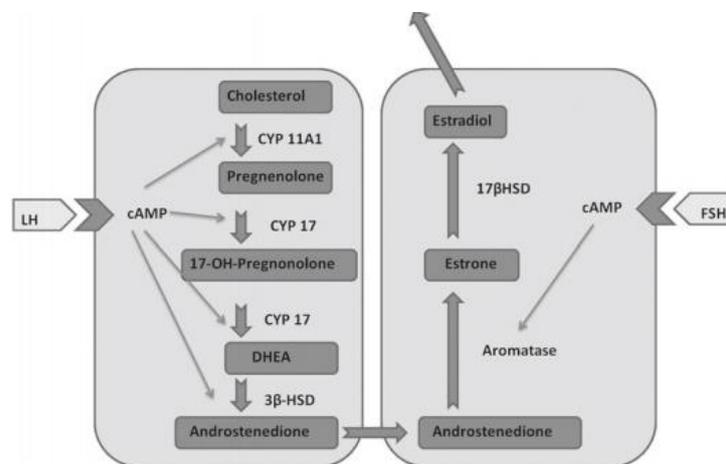


Fig. 8 La teoría de las dos células en la esteroidogénesis ovárica. La LH se une a su receptor en las células de la teca y estimula la conversión de colesterol en androstendiona. La FSH unida a su receptor en células de la granulosa del ovario estimula la aromatización de andrógenos a estrógenos. cAMP: Adenosina monofosfato cíclico; CYP11A1: enzima que escinde la cadena lateral, CYP17: 17-hidroxilasa; HSD: hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17OH pregnenolona: 17 hidroxipregnenolona. Tomado de Beshay y Carr (2013).

La rata hembra presenta variaciones cíclicas en su actividad reproductora y cambios tanto a nivel del epitelio vaginal, ovárico, en la secreción de hormonas y hasta en el comportamiento sexual. Esas variaciones se van produciendo durante diferentes fases denominadas proestro (P), estro (E), metaestro (M), diestro (D), las cuales se repiten cada 4 o 5 días debido a la falta de cuerpo lúteo funcional. Durante el proestro, los niveles séricos de estrógenos se elevan provocando un pico preovulatorio de LH (Goldman et. al., 2007). Posteriormente, en la mañana del estro (con una duración aproximada entre 10 y 12 h) se presenta un incremento en las concentraciones séricas de P4 que provoca que la hembra pueda copular con el macho al tiempo que se está produciendo la ovulación. Por lo tanto, el término estro significa “calor” o receptividad sexual y ésta receptividad es paralela al inicio de la aparición de células cornificadas en la vagina (Figura 9) (Goldman et. al.,2007)

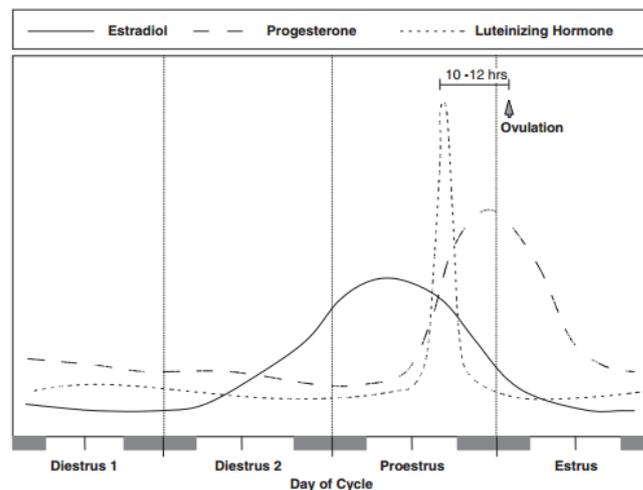


Fig. 9 Patrones del ciclo estral de la rata (4 días). Se representan las concentraciones de estradiol y progesterona y su relación con el surgimiento del pico preovulatorio de LH. La ovulación puede ocurrir durante las primeras horas del estro, aproximadamente 10 a 12 horas después del pico de LH. Los bloques de la base indican la porción oscura del fotoperíodo. Tomado de Goldman et. al. (2007).

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada puede ser inhibido o alterado no sólo por aspectos relacionados a sus mecanismos intrínsecos, sino que además puede sufrir diversas alteraciones por factores externos como el fotoperiodo, la nutrición o el estrés (Millar et. al., 2012)

Concepto de estrés

El estrés, se ha definido como una respuesta fisiológica ante la alteración de la homeostasis (Chrousos, 2009). Actualmente, el término se ajusta a condiciones donde las demandas ambientales exceden la capacidad reguladora natural del organismo frente a estímulos (estresores) que son impredecibles e incontrolables (Koolhaas et. al., 2001). Los estresores, pueden ser físicos o psicológicos y dependiendo de su magnitud y duración activan una respuesta de estrés aguda o crónica (Jhonson, et. al., 1992).

La respuesta del estrés es dirigida por el sistema de estrés, el cual está constituido por estructuras del sistema nervioso central y por órganos periféricos. Los dos componentes principales son: a) el sistema locus coeruleus (LC)- sistema nervioso simpático (SNS) -médula adrenal y b) el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). Ambos componentes interactúan entre sí para responder a las demandas del medio (Figura 10) (Habib et al., 2001; Charmandari et al., 2005).

El sistema de estrés recibe e integra diversas señales cognitivas, emocionales, neurosensoriales y periféricas que llegan a través de diferentes vías. La activación del sistema de estrés provoca cambios conductuales y físicos que son marcadamente consistentes y en conjunto se definen como el síndrome de estrés (Selye, 1946).

Al recibir un estímulo estresante, se activan las neuronas noradrenérgicas del LC las cuales liberan noradrenalina a distintas áreas cerebrales y así aumenta el estado de alerta y vigilancia del organismo (Jhonson, et. al, 1992).

Mediante el sistema nervioso simpático, también se estimula la liberación de adrenalina y noradrenalina de la médula adrenal, lo cual conduce a diversos cambios conductuales y fisiológicos que permiten al organismo responder (reacción de lucha o huida) ante un estímulo que pueda poner en riesgo la supervivencia del individuo. (Jhonson, et. al, 1992). Simultáneamente, se activan las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) encargadas de la síntesis y liberación de hormona liberadora de corticotropinas (CRH), lo que provoca que el eje HHA se active. Por otro lado, la CRH estimula a las células corticotropicas en la adenohipófisis para liberar a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que a su vez, estimula la producción de glucocorticoides (GC) desde la corteza adrenal (Mc Cartney y Marshall, 2013).

Los GC, la adrenalina y la noradrenalina, que son liberadas desde las glándulas adrenales, disminuyen el almacenamiento de energía, de ácidos grasos y la síntesis de proteínas, evento que promueve la liberación de sustratos energéticos como la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres del músculo, tejido graso e hígado.

Estos cambios en la disponibilidad de energía son paralelos a la estimulación cardiovascular y la función pulmonar, los cuales incluyen el incremento en la frecuencia cardiaca, la presión sanguínea y la respiración. Simultáneamente, los procesos anabólicos como la digestión, el crecimiento, el sistema inmune y la reproducción son suprimidos (Johnson et., al., 1992).

Los glucocorticoides pueden ejercer un efecto permisivo para mantener la homeostasis en un nivel basal, pero si se exceden en la respuesta regulatoria durante el estrés crónico, la activación catabólica crónica puede dar como resultado procesos destructivos (Johnson et., al., 1992).

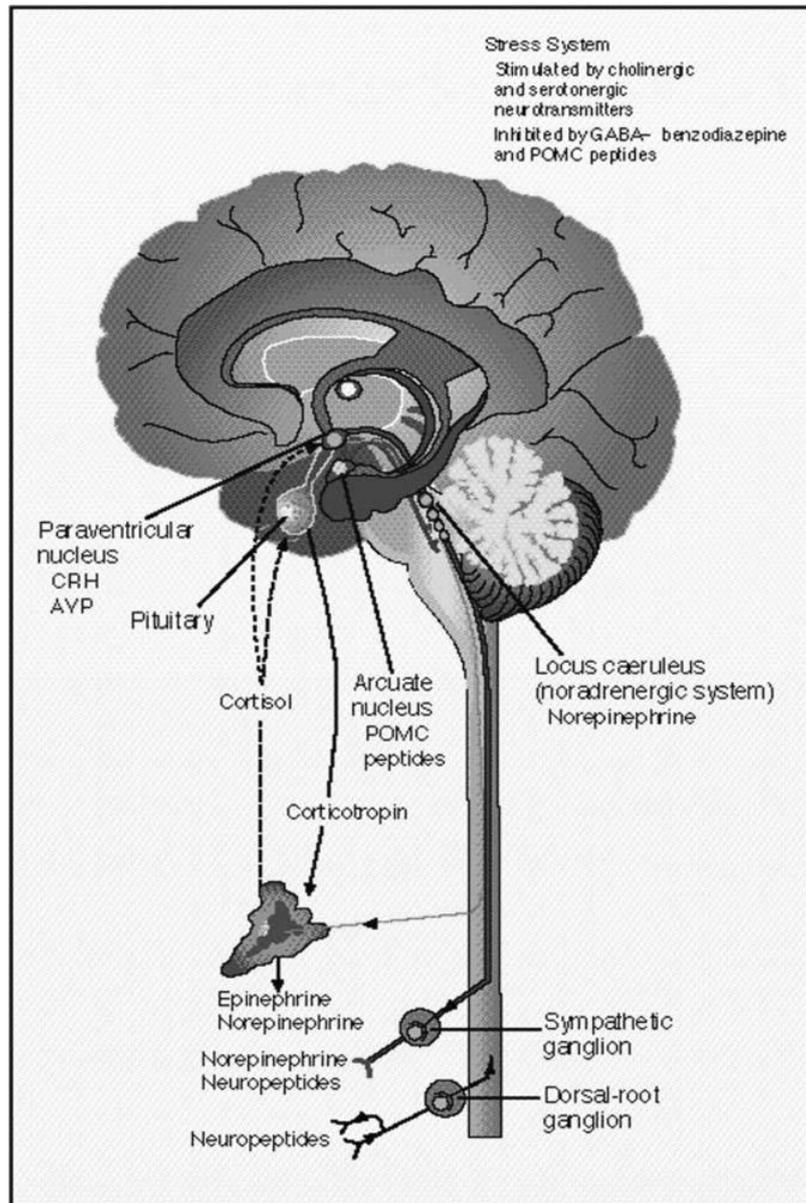


Fig. 10 Representación de los componentes del sistema del estrés y su relación con otros componentes del sistema nervioso. Tomado de Charmandari et. al. (2005).

Efecto del estrés en la reproducción.

El estrés crónico disminuye la actividad del eje hipotálamo-hipófisis gónada (HHG) (Selye, 1946). Esta supresión es causada por las acciones de las hormonas del eje HHA (hormona liberadora de corticotropinas [CRH], hormona adrenocorticotrópica [ACTH], β -endorfinas y glucocorticoides) sobre la función del HHG, ya que ambos sistemas están interconectados (Tsigos y Chrousos, 2002).

En el hipotálamo, la liberación de GnRH del MPOA es suprimida por la CRH a través de conexiones directas entre las neuronas secretoras de CRH y las neuronas secretoras de GnRH (MacLusky et al., 1988). En la hipófisis, la secreción de la LH disminuye como resultado de la reducción en la capacidad de respuesta a la GnRH, la cual es mediada por los GC (Hagino et. al., 1969). Los GC también ejercen efectos directos sobre las gónadas, alterando en consecuencia, la secreción de esteroides sexuales (Hardy et al., 2005). Adicionalmente, los GC inducen resistencia a las hormonas sexuales en los tejidos periféricos; esto es, que pueden inhibir el efecto de las hormonas sexuales sobre sus órganos blanco ya que disminuye la expresión de sus receptores (Rabin et. al., 1990).

Algunos estudios han mostrado que hembras expuestas a estrés psicosocial pueden desarrollar retraso de la pubertad, falta de receptividad sexual, alteraciones en la ovulación o implantación embrionaria, abortos espontáneos e incremento de mortalidad en las crías (Jhonson et. al., 1992). En los machos, se puede presentar una supresión o disminución en la secreción de testosterona, la espermatogénesis, así como una marcada disminución de la conducta sexual (Jhonson et. al., 1992).

GnIH y estrés

La investigación reciente en el contexto del control de la reproducción involucra la participación de GnIH en la inhibición del eje HHG durante el estrés. Kirby y colaboradores (2009) demostraron que el estrés inducido por inmovilización estimula aumento en la expresión de la GnIH en el hipotálamo dorsomedial (DMH) de ratas adultas. Este mecanismo incluye a los GC, esteroides liberados durante el estrés que actúan sobre los receptores para glucocorticoides (GR) en las neuronas GnIH del hipotálamo, en donde aumentan la transcripción del gen para GnIH y por ende, su expresión en el DMH (Figura 11). La GnIH liberada de esta área hipotalámica inhibe la liberación de la GnRH a través de un mecanismo postsináptico directo, hiperpolarizando a las neuronas GnRH (Wu et. al., 2009) y disminuyendo la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Kirby et al., 2009; Murakami et. al., 2008) suprimiendo al hipotálamo y por ende, a la función reproductiva.

Se ha demostrado que, en ratas macho, el 53% de las neuronas GnIH expresan receptores a GC y que en situación de estrés se incrementa la actividad de esas neuronas (León, 2014).

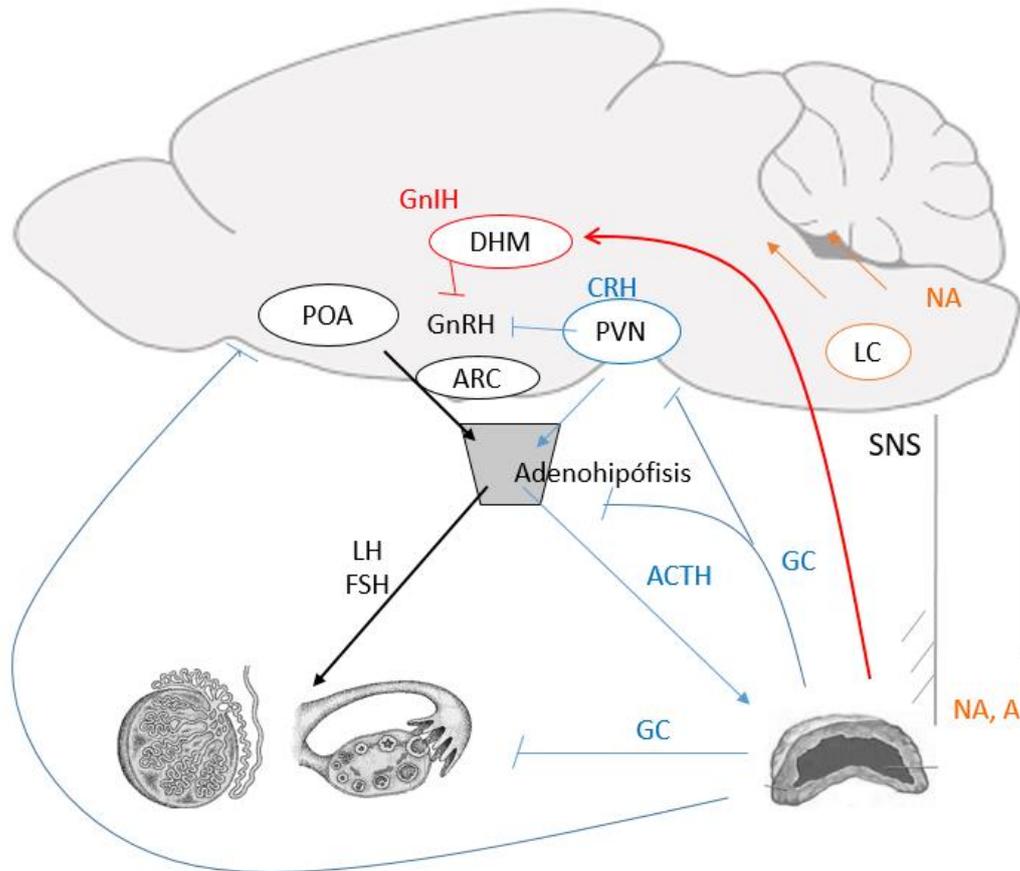


Fig.11 Vías neuroendócrinas que suprimen el eje gonadal. Durante el estrés se activa el eje HHA. El eje HHG es inhibido a todos los niveles por el HHA. Directamente en el POA por la CRH. Los GC producidos disminuyen la capacidad de respuesta de los gonadotrópos a la GnRH y reducen la esteroidogénesis en las gónadas. También inhiben la liberación de GnRH directa o indirectamente a través de la GnIH. Adaptado de Retana-Márquez et. al. (2012).

Antecedentes

Estrés prenatal (EP) y reproducción

El estrés prenatal (EP) ha sido definido como la influencia o factores que perturban el adecuado desarrollo del feto y representa un factor de riesgo para el desarrollo de futuras patologías (Del Giudice, 2012). Además, el EP ha sido relacionado con el mecanismo de programación fetal (PF), que se ha establecido como un proceso de predisposición para generar ciertos desórdenes o enfermedades durante la madurez (Remedi, 2010)

Barker y Osmond (1986) definieron la PF como acontecimientos que se producen durante la gestación y pueden afectar la salud y el desarrollo del individuo a largo plazo. Actualmente, también se considera como un proceso adaptativo o de readecuamiento fisiológico durante un periodo sensible del desarrollo (Remedi, 2010).

El proceso por el cual acontece la PF es mediante la inducción, delección e impedimento del desarrollo de estructuras como resultado de un daño en un periodo crítico. Los mecanismos comprenden cambios en la expresión génica, en la diferenciación tisular y en la expresión enzimática (Remedi, 2010).

Durante la gestación, la hembra presenta elevados niveles de cortisol, glucocorticoide esencial para el crecimiento fetal. Sin embargo, bajo condiciones particulares de excesivo estrés, las concentraciones de cortisol materno (corticosterona en el caso de las ratas), pueden alcanzar niveles elevados anormales y llegar a la sangre del feto en altas concentraciones, lo cual puede desencadenar respuestas fisiológicas que alteran potencialmente el desarrollo y crecimiento fetal (Ward y Weisz 1984; Takahashi et al., 1998; Charil et. al., 2010).

En condiciones basales, los GC activos en la placenta de la hembra gestante son oxidados por la enzima 11 beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 (11BHSD) a esteroides inactivos (cortisol a cortisona o corticosterona a 11 dehidrocorticosterona) para reducir los niveles de glucocorticoides intracelulares. Sin embargo, la actividad y la expresión de esta enzima placentaria se encuentra reducida en las madres estresadas lo que permite que los GC activos pasen al feto y modifiquen los procesos de organización y maduración neuronal (Charil et. al., 2010).

Los GC son hormonas que ejercen su efecto a través de receptores intracelulares que se encuentran en el citoplasma unidos a un complejo multiproteínico. Una vez que se unen al receptor, se disocian las proteínas y dímeros de complejo GC-receptor y se traslocan al núcleo. En el núcleo, se unen a los elementos de respuesta localizados en las regiones promotoras de genes blanco y regulan la expresión de la respuesta a GC de manera positiva o negativa (Charmandari et. al., 2005). Así, la presencia de altos niveles de GC durante el establecimiento del sistema neuroendócrino reproductivo durante la etapa prenatal, puede traer consecuencias adversas en su correcto desarrollo.

El EP afecta diversas regiones cerebrales en los individuos en desarrollo dentro de las cuales, se encuentra el hipotálamo. Asimismo, la exposición fetal a altos niveles de GC, retarda y/o, altera el desarrollo de neuronas en el cerebro incluyendo procesos como proliferación celular, migración, diferenciación, sinaptogénesis, mielinización y apoptosis (Charil et. al., 2010).

En el caso de los procesos reproductivos, las hormonas sexuales organizan los circuitos neuronales implicados en las funciones neuroendocrinas y

la conducta sexual y son responsables de las diferencias de género en el tamaño de ciertas áreas del cerebro como el núcleo sexual dimórfico del área preóptica (SDN-POA), las conexiones sinápticas, las concentraciones de neurotransmisores y su actividad (Weinstock, 2007).

Ratas que durante su desarrollo estuvieron sujetas a estrés prenatal, muestran un incremento en la respuesta del eje HHA ante situaciones estresantes durante la vida posnatal (Morley-Fletcher et. al., 2003) de las cuales se recuperan lentamente (Maccari et. al., 1995).

La diferenciación sexual gonadal en las ratas se produce por la secreción de hormonas esteroides desde las gónadas fetales durante el último trimestre de la gestación (días 14-21) y se extiende hasta las dos primeras semanas de vida posnatal (Segarra et. al., 1991).

Durante este periodo de diferenciación sexual, la testosterona, es fundamental para masculinizar o desfeminizar la expresión de la conducta sexual y para establecer los futuros patrones de secreción de las gonadotropinas. Cuando la testosterona es producida y liberada en el SNC, se aromatiza a estradiol mediante la enzima aromatasa.

Así el estradiol es la hormona responsable de diferenciar sexualmente el cerebro a masculino y establecer un dimorfismo en etapas tempranas del desarrollo, que en el caso de la rata es del día 15 al 21 de la gestación (García, 2014).

En la rata, el núcleo sexual dimórfico del hipotálamo es mayor en los machos que en las hembras. Una vez que la testosterona ha sido convertida a estradiol, en lugar de promover el crecimiento celular en futuras regiones sexuales

dimórficas, determinan qué células pueden someterse a apoptosis (Charil et. al., 2010).

Diferencias volumétricas en el núcleo sexual dimórfico del área preóptica (SDN-POA) del hipotálamo están ausentes entre el macho y la hembra al nacimiento, pero durante la primera semana postnatal, las células de esa región se someten a apoptosis en el caso de las hembras, resultando consecuentemente en un volumen menor (Charil et. al., 2010). En cambio en los machos, existe un incremento en el tamaño del SDN-POA por la acción que ejercen las hormonas sexuales masculinas en este núcleo (Hutchison et al, 1999). Otra región que presenta diferencias dimórficas es el núcleo AVPV hipotalámico, el cual es más grande en el caso de las hembras, lo cual se atribuye al papel de los estrógenos cuyos receptores se localizan en mayor cantidad en ésta área si se le compara con los machos (Ehlers y Halyorson, 2013).

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se ha observado que los machos estresados prenatalmente presentan menor concentración de testosterona plasmática, además de una disminución de la conducta sexual y una disminución en el tamaño de los órganos sexuales durante la vida adulta, así como menor calidad espermática, presentando disminución de la motilidad y viabilidad (García Vargas, 2014). Por otro lado, las hembras muestran niveles altos de estradiol con ciclos estrales alterados presentando proestros y estros prolongados, así como una disminución en la conducta de lordosis e infertilidad (García Vargas, 2014).

Otros estudios de mamíferos han demostrado que el EP afecta muchos aspectos de la reproducción incluyendo el desarrollo de órganos reproductores, el

comienzo de la pubertad, la conducta reproductiva, la función gonadal y la concentración de hormonas reproductivas (Ashworth et. al., 2016). Asimismo, modifica patrones físicos como la distancia anogenital en el caso de las ratas – que debe ser mayor en el caso de los machos que en las hembras-, la concentración de hormonas reproductivas, perfiles de neurotransmisores y expresión génica. También reduce la diferencia entre la conducta sexual y la fisiología reproductiva en machos y hembras (Figura 12) (Ashworth et. al., 2016).

Con base a lo anterior, se confirma que el EP genera efectos adversos en las crías y que se expresan hasta la vida adulta afectando de manera importante aspectos sexuales y reproductivos (Del Cerro et. al., 2015)

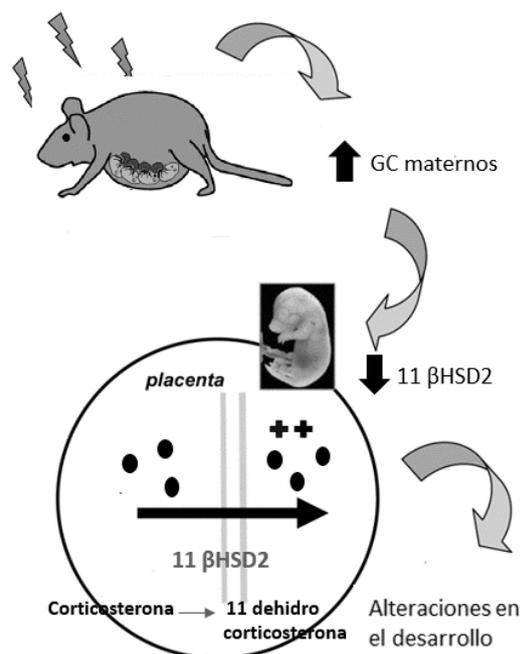


Fig. 12 El estrés materno genera un incremento anormal de GC, los cuales rebasan la capacidad de la enzima placentaria 11β-HSD para inactivarlos. De este modo, los GC activos alcanzan al feto, provocando alteraciones en su desarrollo. Esquema adaptado de Sale, et. al. (2012,); Keverne y Curley (2008).

JUSTIFICACIÓN

El EP genera alteraciones reproductivas en los individuos al alcanzar la edad adulta. Sin embargo, en la actualidad, no existen reportes acerca de los cambios que se presentan en la expresión de la GnRH y la GnIH, así como la relación entre su expresión con los niveles de hormonas sexuales en ratas macho y hembra adultos que fueron estresados prenatalmente. Es necesario que se siga investigando acerca de las consecuencias que genera el estrés materno en la descendencia, ya que los estudios en animales y en humanos señalan que el EP puede inducir el desarrollo de alteraciones metabólicas y neuroquímicas, lo cual involucra aspectos reproductivos, hormonales y conductuales.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tendrá el estrés prenatal sobre la expresión de la GnRH y GnIH en ratas macho y hembra al alcanzar la madurez sexual?

HIPÓTESIS

La regulación neuroendócrina en ratas estresadas prenatalmente se verá afectada con la disminución de la expresión y el contenido de GnRH y el aumento de la GnIH en el hipotálamo. Además, los niveles de hormonas sexuales serán menores que en los animales control.

OBJETIVOS:

General:

Determinar las alteraciones neuroendocrinas que existen en la expresión de GnRH y de GnIH en ratas adultas cuando la madre fue expuesta a estrés prenatal.

Particulares:

- Evaluar las alteraciones del control neuroendocrino del eje testicular en ratas macho adultas que fueron estresadas prenatalmente
- Evaluar las alteraciones del control neuroendócrino del eje ovárico de ratas hembra adultas que fueron estresadas prenatalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Animales de laboratorio. Se utilizaran 10 ratas hembras de la cepa Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) de 250 gramos de peso, las cuales presentaban estro natural y 10 machos sexualmente expertos de aproximadamente 300gramos, adquiridas del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, donde permanecieron. Los animales se separaron en sexos en cajas plexiglás transparente (50x30x20cm) antes del inicio del apareamiento, a temperatura constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), en ciclo invertido de luz/oscuridad (12/12h), con agua y alimento *ad libitum*. El manejo de los animales y los experimentos se sujetaron a las normas oficiales mexicanas (NOM-062-ZOO-1999), así como a la reglamentación de animales domésticos y de laboratorio, publicado en los Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (Mayo 2010).

Las hembras en estro copularon con machos sexualmente expertos durante media hora aproximadamente. Permitiendo que los machos eyacularan de 2 a 3 veces. Ese día se consideró como el día cero de gestación.

Estrés por inmersión en agua fría

Una vez apareados los animales, las hembras gestantes se asignaron al azar al grupo control (CON) o al grupo de EP y se colocaron en cajas individuales de plexiglás transparente.

Las hembras gestantes asignadas al grupo de EP, durante la última semana de gestación (días 16 al 21), fueron sometidas a dos sesiones de estrés por inmersión en agua fría, la primera a las 09:00 h y la segunda a las 15:00 h. El estrés consistió en colocar a las ratas de forma individual en una caja de plexiglás con agua a 15°C y una profundidad de 15 cm, durante 15 minutos (Retana-Márquez et. al., 2003). La caja se cubrió con una reja para evitar que se escaparan y los animales permanecieron de pie o sujetos a la reja. Al terminar las sesiones de estrés, los animales se secaron con un trapo y se regresaron a sus cajas.

Las hembras asignadas al grupo control se mantuvieron en sus cajas de forma individual y solamente recibieron la limpieza de rutina.

Obtención de las muestras

Al momento del nacimiento, las camadas del grupo control y el grupo con EP se homogeneizaron para que cada hembra contara con el mismo número de crías (en promedio 8 crías por hembra). En el destete (21 días de vida postnatal), los animales se separaron por sexo.

A las hembras se les realizaron frotis vaginales para examinar las etapas del ciclo estral y sacrificarlas en la etapa de proestro y a otras en etapa de diestro,

mientras que los machos permanecieron en sus cajas. A los 3 meses de edad, tanto los machos como las hembras fueron sacrificados.

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (25mg/kg IP) e inmediatamente decapitados. Se obtuvieron los cerebros y se disecó el hipotálamo, los cuales se mantuvieron a una temperatura de -70°C hasta el momento de la evaluación de las proteínas por western blot y para la extracción de RNA para RT-PCR. Asimismo, se obtuvo la sangre para la cuantificación de hormonas sexuales en suero. Se utilizó una n=5 para cada grupo C y EP tanto en machos como en hembras (Figura 13).

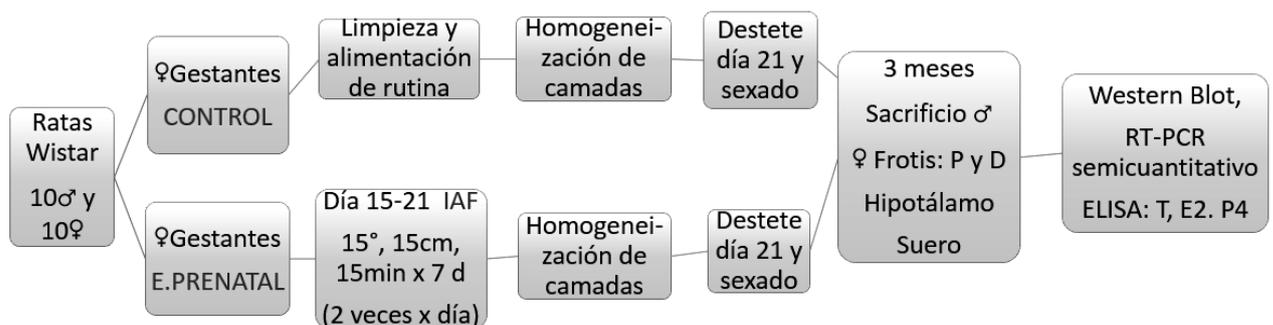


Fig. 13. Esquema del diseño experimental que señala grupo C y EP, realización del estrés por IAF y pruebas realizadas.

Como controles fisiológicos para nuestros experimentos, se utilizaron hembras y machos de 3 meses de edad que fueron gonadectomizados y sacrificados dos días después para tomarlos como control positivo (C+) de las hormonas hipotalámicas estudiadas. Otras fueron sacrificadas un mes después para emplearse como control negativo (C-).

Western blot

Extracción de proteínas

Los hipotálamos se descongelaron sobre hielo. Posteriormente se añadieron 100 µl de buffer de extracción de tejido (T-PER) para lisar el tejido. Una vez homogeneizados se incubaron 15 min sobre el hielo; después las muestras se centrifugaron a 12000 RPM a 4°C por 10 min (Kim et. al, 2001). Se obtuvieron los sobrenadantes, los cuales contienen el total de proteínas extraídas en tubos nuevos. Con ellos se cuantificaron las proteínas en el espectrofotómetro (The Thermo Scientific Nanodrop 2000c) en un rango de absorbancia de 280nm.

Preparación de las proteínas

Se colocaron 2 µl de buffer de muestra (SDS Protein Gel Loading Solution 2x, Quality Biological, Inc) en tubos eppendorf de 0.2 ml, se agregó el volumen de la proteína equivalente a 100µg de proteínas totales de cada muestra y se incubaron en baño maría a 95°C durante 5 minutos.

Preparación de los geles

Se consideraron las cantidades indicadas más adelante para el gel de corrida al12%: agua desionizada 3.34ml, Tris HCl 1.5M p.H 8.8 2.5ml, SDS al 10% 100 microlitros, Acrilamida 4ml, TEMED 10 microlitros, Persulfato de amonio 50 microlitros y para el gel concentrador: agua desionizada 3.05ml, Tris HCl 0.5M p.H 6.8 1.25ml, SDS al 10% 50 microlitros, Acrilamida 650 microlitros, TEMED 10 microlitros, Persulfato de amonio 25 microlitros.

Electroforesis y transferencia de proteínas

El análisis electroforético fue realizado de acuerdo al método reportado por Laemmli en 1970. Una vez listos los geles, se colocaron en la cámara de

electroforesis y se llenó tanto el exterior como el espacio entre los cristales con el buffer de electroforesis (Tris-base 25mM, glicina 190mM, SDS1%). Enseguida, se colocaron cada una de las muestras en los carriles del gel y se corrió la electroforesis a 120 V en una cámara de Mini-protein II Cell (Bio-Rad) en presencia de un marcador de peso molecular (See Blue 2-500-UL) durante 90 min.

Terminada la electroforesis, se despegaron los geles de los cristales y se colocaron en un recipiente con buffer de transferencia (Tris base 25mM, glicina 190mM, metanol 20%) y las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Invitrogen), de acuerdo con los métodos reportados por Towbin en 1979. El procedimiento inició apilando sucesivamente papel filtro, la membrana en contacto directo con el gel y más papel filtro, empapados en buffer de transferencia.

Una vez listos todos los componentes, se colocaron en el sistema de transferencia de proteínas Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) y se llevó a cabo a 120 V durante 30 min. Terminada la transferencia, se sacaron las membranas y se incubaron en solución de bloqueo con 0.5% de leche sin grasa (w/v) en buffer TBS-T (20 mM Tris-HCl, NaCl 137 mM, 0.5% Tween 20 (v/v), pH 7.6) por una hora a temperatura ambiente. Después de un lavado con TBS-T por 5 min, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (GnRH polyclonal antibody 1:1000 Sta. Cruz Biotechnology y RFRP polyclonal antibody 1:1000 Sta Cruz Biotechnology, respectivamente) diluido en 10ml de TBS-Tween 20 (para 2 membranas) a 4°C toda la noche en agitación constante.

Al día siguiente, después de 3 lavados de 10 min con TBS-Tween 20, las membranas se incubaron con su anticuerpo secundario peroxidasa-conjugated

goat antirabbit (Vector Laboratories) a una dilución 1:10:000 (1µl de anticuerpo secundario en 10ml de TBS-Tween 20), durante 2 horas en agitación constante a temperatura ambiente.

Al terminar, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-Tween 20. Como controles positivos se utilizaron hembras ovariectomizadas y machos castrados que fueron sacrificados 2 días después para extraer las muestras.

Se utilizó β -actina monoclonal como control de carga (Sigma Aldrich, (A3854), 1:3000). Las bandas se visualizaron utilizando un sistema digital de imagen KODAK Gel Logic 1500.

RT-PCR para evaluar la expresión del gen de GnIH y GnRH

Elaboración del primer para GnRH y GnIH

Para el diseño de los primers se utilizaron distintas páginas electrónicas. La secuencia de los genes de GnRH y GnIH se obtuvieron del acceso al GenBank: NM_012767.2 (mRNA GnRH1) y NM_023952.1 (mRNA GnIH [RFRP]) ubicado en la [página](http://www.ensembl.org/index.html) **e!Ensembl** (www.ensembl.org/index.html)

Posteriormente se consideraron los siguientes *softwares*:

Primer 3. Input: <http://primer3.ut.ee/> y **Sigma Aldrich Oligo Evaluator:** <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligo-evaluator.html>, disponibles en la red.

Los primers utilizados para el RT-PCR fueron los siguientes:

Hormona	Secuencia	Tamaño (pb)
GnRH	Forward agcactggctcctatggggtg	100
	Reverse tctgccatttgatcctcctc	
GnIH (RFRP)	Forward ccaaaggttgggagaacaa	110
	Reverse gggatcatggcatagagcaat	

Extracción de RNA para la realización de RT-PCR

Se extrajo RNA total de hipotálamos obtenidos de animales control y del grupo de EP. Siguiendo las instrucciones del reactivo TRIZOL® (Ambion™), se procedió de la siguiente manera: los hipotálamos fueron homogeneizados en 1ml de TRIZOL® (1ml/50-100 mg de tejido), incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos y se les agregó 200µl de Cloroformo/ml. Luego de agitar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente por 15 min, los tubos se centrifugaron a 12,000 RPM durante 15min a 4°C. A la fase acuosa obtenida se le agregaron 500µl de Isopropanol y se agitaron invirtiendo suavemente los tubos, incubándolos a -20°C toda la noche. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12 000RPM durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con 1ml etanol al 75%. Nuevamente se centrifugaron a 12,000 RPM durante 5 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 25 µl de agua DEPC y un día después se calculó la concentración de ARN en el espectrofotómetro midiendo absorbancia a 260/280 nm.

Electroforesis en gel de agarosa con formaldehído para determinar la integridad del RNA.

Para preparar el gel se colocaron 0.4g de agarosa en 34.8ml de agua DEPC y la mezcla se fundió en el microondas. Entre 50-55°C, se le agregaron 4 mL de MAE 10X, 1.2ml de formaldehído y 1.5µL de GelRed. Tras gelificación, se colocó dentro del tanque de electroforesis buffer MAE 1X. Se prepararon las muestras de RNA/Buffer de carga para RNA 1:1 (formamida, formaldehido, MAE10X, glicerol 80%, azul de bromofenol), se pusieron dentro de cada pocillo y se corrió el gel 1 hora con 20 min a 60 V. Las bandas se visualizaron con la luz UV en el fotodocumentador utilizando el sistema digital de imagen KODAK Gel Logic 1500.

RT-PCR semicuantitativo para la amplificación de un segmento del gen para GnRH y GnIH de hipotálamo de rata

Se llevó a cabo RT-PCR semicuantitativo de un paso y la mezcla de la reacción se preparó con el estuche comercial RT-PCR (Access RT-PCR System Promega).

Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de: Agua desionizada 14 microlitros, Buffer 5x 5 microlitros, dNTP's 0.5 microlitros, MgSO₄ 1.5 microlitros, AMV (transcriptasa reversa) 0.5 microlitros, Tfl (polimerasa) 0.5 microlitros, Primer (F) 1 microlitro, Primer (R) 1 microlitro, RNA 1 microlitro

Colocando 1000mg/µl de RNA de cada muestra, llevando la mezcla a 25µl en total y colocándola en el termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo 45 minutos a 45°C; 1 ciclo 2 minutos a 95°C; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C (GnRH) por 60 segundos (68°C en el caso de la GnIH), 72°C por 50

segundos; 1 ciclo 10 minutos a 72°C. El tamaño de los productos se comprobó en un gel de agarosa al 1%. Como gen de referencia se empleó el gen 18S (220pb).

Electroforesis en gel de agarosa

Para separar fragmentos de ADN se corrieron las muestras en gel de agarosa al 1%. Se pesaron 0.50 gr de agarosa y se diluyeron con 50 ml de TBE al 1X, la mezcla se fundió en microondas, se agregó al molde de electroforesis alineado, colocando el peine adecuado. Una vez gelificada la agarosa, se agregó el molde a la cámara de electroforesis y se rellenoó con buffer de corrida TBE 1X. Para cargar las muestras, se colocaron 5 μ L de LB (glicerol al 80% y azul de bromofenol) con 5 μ L de muestra de DNA y se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler™ 100pb (Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo a 60 V durante 1hr. El producto de la electroforesis se observó en el fotodocumentador con luz UV y una exposición de 0.17 segundos para observar las bandas amplificadas.

Prueba de ELISA

Las muestras fueron recolectadas al momento del sacrificio de los animales y se centrifugaron para la obtención del suero los cuales se recolectaron en tubos de ensayo y se congelaron a -20° C, el día del ensayo se descongelaron a temperatura ambiente y se homogenizaron cuidadosamente antes de su uso.

La concentración de testosterona se determinó mediante el método de ELISA, con un kit comercial marca DRG específico para testosterona (EIA-1559) y se trabajó de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El ensayo incluyó una curva estándar, el límite de detección para testosterona fue de 0.10pg/mL. Se determinó una absorbancia de cada pocillo a 420 nm con un lector de placa de microtitulación.

La concentración de estradiol y progesterona se determinó mediante el método de ELISA, con ensayos comerciales marca DRG específicos para cada hormona progesterona (EIA-1561), estradiol (EIA-2693), y se trabajaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El ensayo incluyó una curva estándar, el límite de detección para estradiol fue de 0.49 ng/mL. Se determinó la absorbancia de cada pocillo a 420 nm con un lector de placa de microtitulación.

Análisis Estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. El análisis estadístico utilizado en el caso del Western Blot y el RT-PCR fue ANOVA de una vía. Los resultados se muestran como la media \pm error estándar (E.E.). Las diferencias entre los grupos se analizaron con una prueba post-hoc de Tukey. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

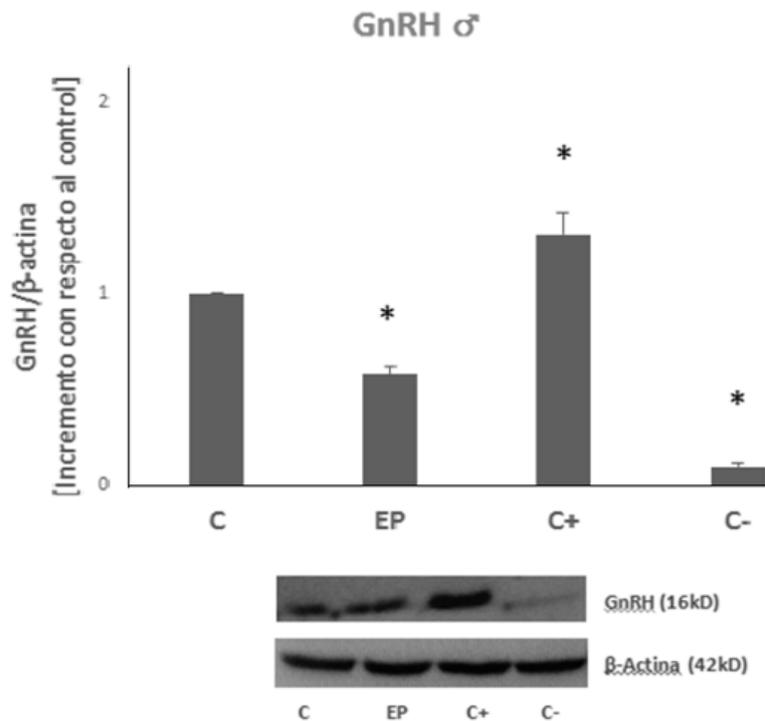
Para medir los niveles hormonales, el análisis estadístico fue U-Mann-Whitney para comparación múltiple de medianas.

RESULTADOS

Contenido hipotalámico de GnRH y GnIH en machos EP

Los resultados del western blot señalan que los machos adultos cuyas madres fueron expuestas a estrés por inmersión en agua fría (IAF), muestran un contenido hipotalámico de GnRH con disminución significativa (Figura 14A) en comparación con los machos control cuyas madres no fueron estresadas durante la gestación. Por el contrario, el contenido hipotalámico de GnIH tuvo un incremento significativo en animales con EP en comparación con los machos control (Figura 14B). El control positivo gonadectomizado muestra un incremento excesivo del contenido hipotalámico de GnRH y GnIH fungiendo como control fisiológico positivo adecuado para las hormonas estudiadas. El negativo por su parte, señala escaso contenido de ambas hormonas hipotalámicas (Figuras 14A y 14B).

14A



14B

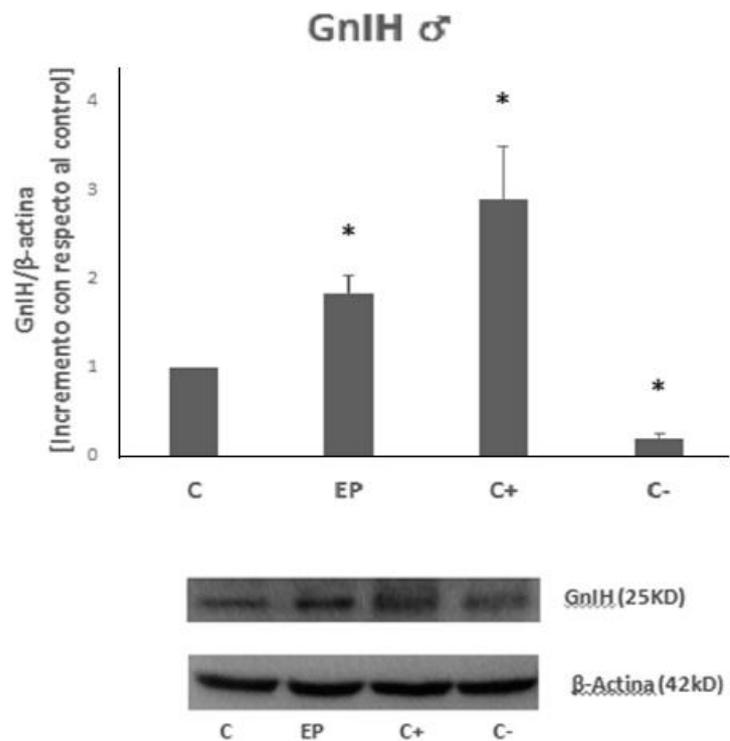
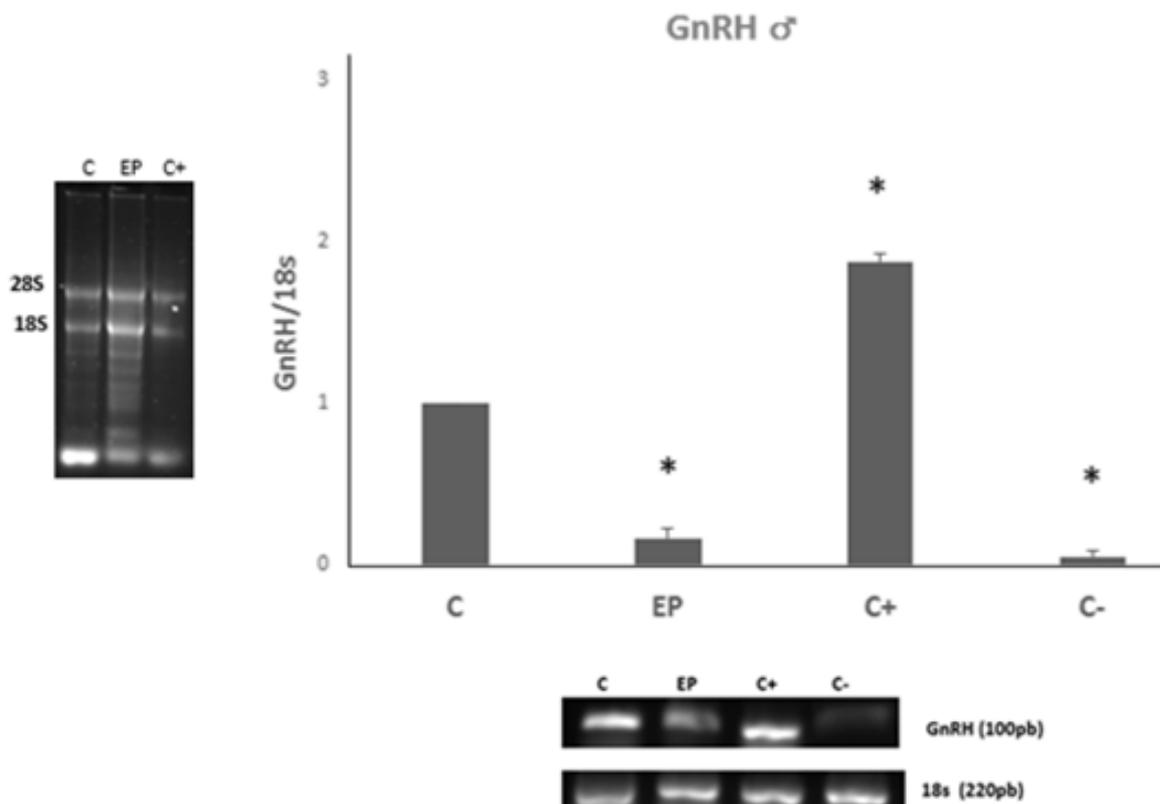


Figura 14 (A y B). Contenido hipotalámico de las hormonas GnRH (A) y GnIH (B) en machos control, estresados prenatalmente (EP), C+, y C-. Los datos son presentados como la expresión relativa de proteína (DO: densidad óptica) normalizada con β-actina. Los datos se presentan como la media \pm E.E. *Los asteriscos señalan diferencias significativas con respecto al control.

Expresión del RNAm para GnRH y GnIH en machos

El gel de integridad muestra la calidad del RNA extraído de las muestras del hipotálamo. La expresión del RNAm de la GnRH es mayor en animales control que en animales estresados prenatalmente (Figura 15A). Además, los resultados indican que los machos que fueron estresados prenatalmente muestran un aumento significativo de la expresión de GnIH en comparación con los animales control (Figura 15B) ($p < 0.05$). El control positivo gonadectomizado muestra una gran expresión hipotalámica de GnRH y GnIH, lo cual nos indica que se trata de un control fisiológico positivo adecuado a las hormonas en estudio. El negativo por su parte, señala muy poca expresión de ambas hormonas hipotalámicas (Figuras 15A y B).

15A



15B

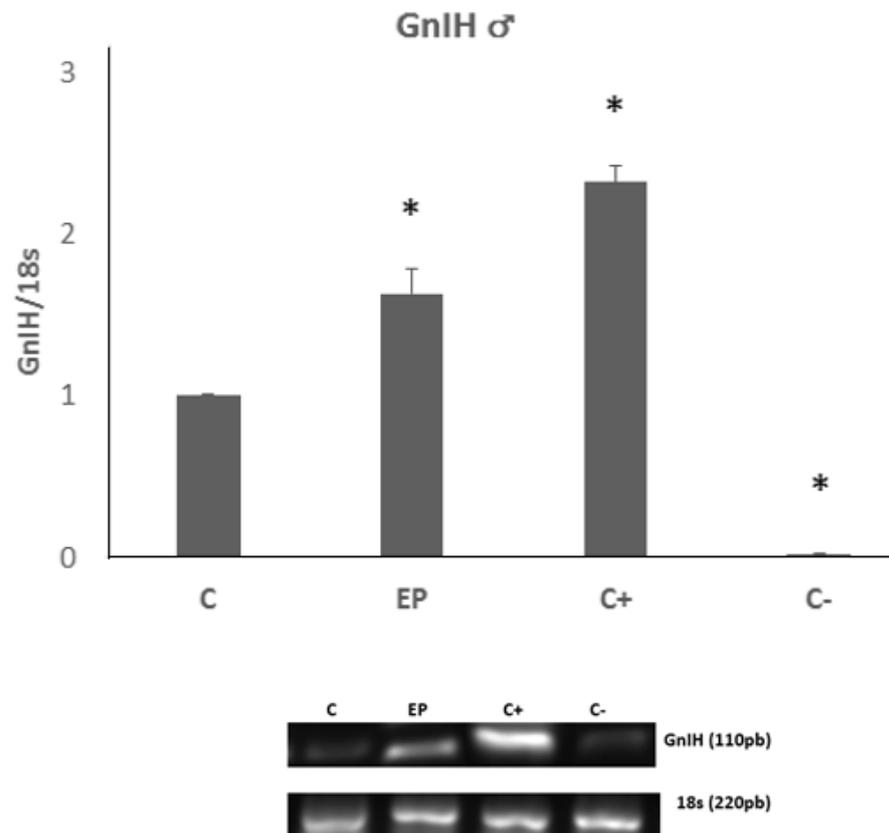


Figura 15 (A y B). Gel de integridad de muestras de RNA. Expresión del RNAm para GnRH (15A) y del RNAm para GnIH (15B) en hipotálamo de ratas macho adultas control, EP, C+ y C-. Los datos se presentan como la media \pm E.E. *Los asteriscos señalan diferencias significativas respecto al control.

Concentración de testosterona

Los machos adultos expuestos a estrés prenatal, presentaron concentraciones séricas de testosterona inferiores en comparación con los machos control (Figura 16) ($p < 0.05$)

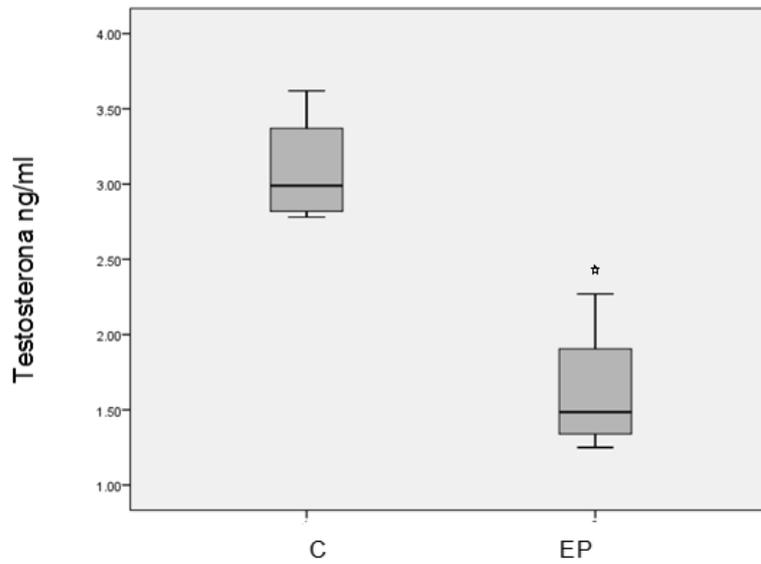
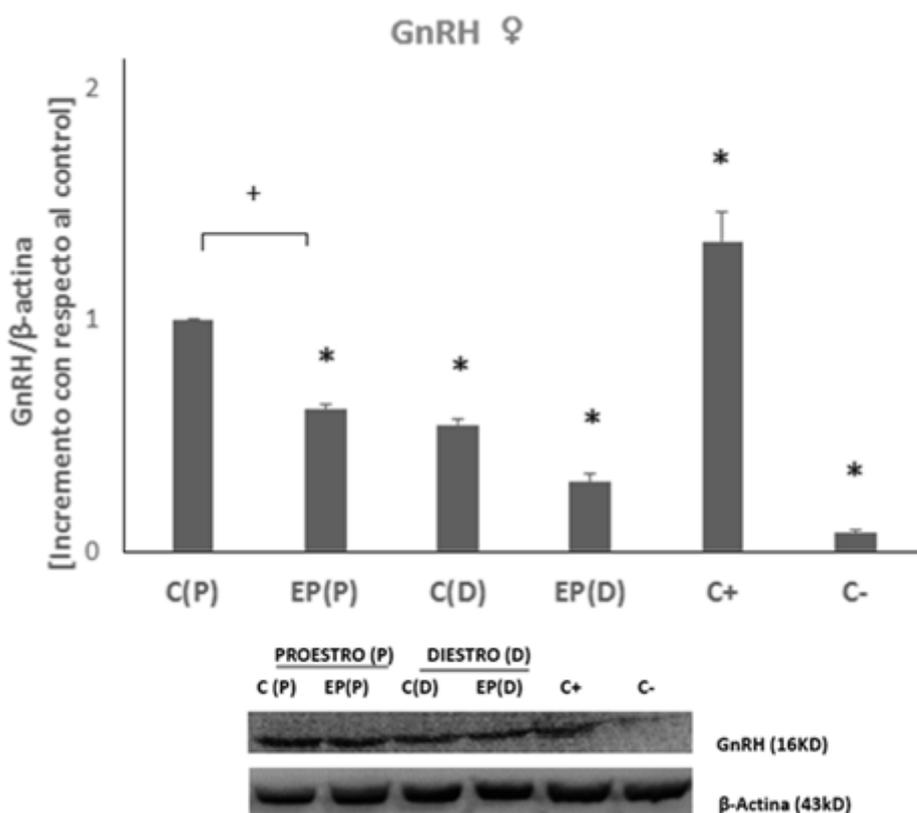


Figura 16. Concentración de testosterona en sueros **de machos control y EP.** *Los asteriscos señalan diferencias significativas.

Contenido hipotalámico de GnRH y GnIH en hembras EP

Las hembras expuestas a EP por IAF presentan un incremento significativo en el contenido hipotalámico de GnIH (Figura 17B) en comparación a la GnRH, la cual disminuye producto del EP tanto la etapa de proestro como diestro (Figura 17A), Los niveles de GnRH permanecen más elevados a los de la GnIH en el caso de las hembras control (Figura 17A y B) ($p < 0.05$). El control positivo gonadectomizado muestra un incremento excesivo del contenido hipotalámico de GnRH y GnIH por lo que es un control fisiológico positivo adecuado para ambas hormonas estudiadas. El negativo por su parte, señala escaso contenido de ambas hormonas hipotalámicas (Figura 17 A y B).

17^a



17B

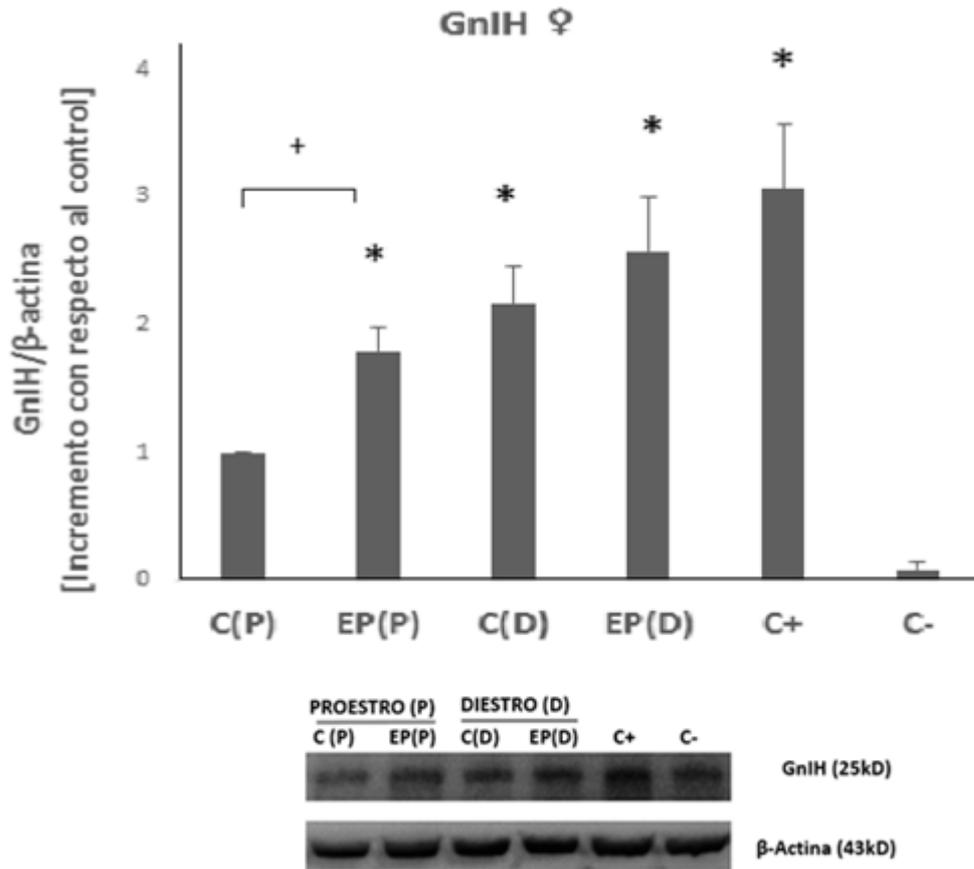
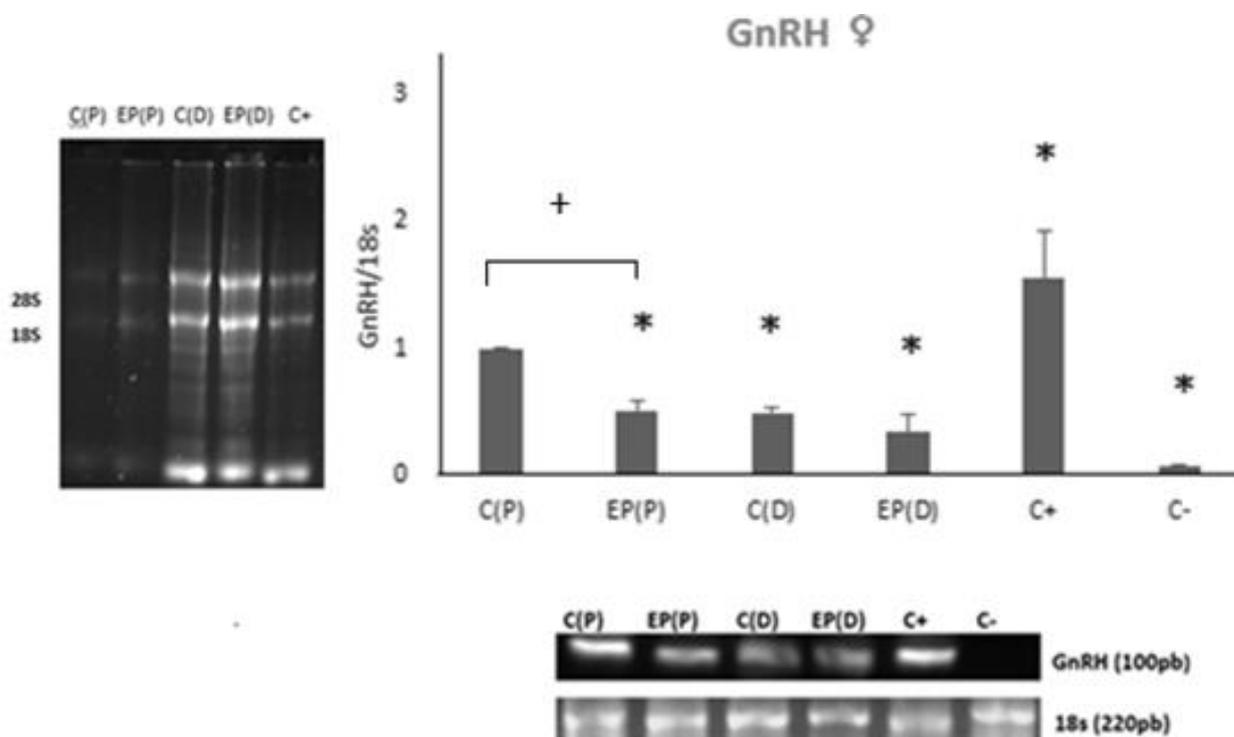


Figura 17. Contenido hipotalámico de las hormonas GnRH (17A) y GnIH (17B) en hembras C, EP, C+, y C-. Los datos son presentados como la expresión relativa de proteína (DO: densidad óptica) normalizada con β -actina. Los datos se presentan como la media \pm E.E. *Los asteriscos señalan diferencias significativas.

Expresión de RNAm de GnRH y GnIH en hembras

El gel de integridad muestra la calidad del RNA extraído de las muestras del hipotálamo. Las hembras con EP presentan un aumento significativo en la expresión de la GnIH en el hipotálamo tanto en etapa de proestro como en diestro en comparación a los animales control (Figura 18B). En el caso de la GnRH, disminuye al tratarse de hembras EP y se presentan niveles más elevados al tratarse de hembras control (Figura 18A) ($p < 0.05$). El control positivo gonadectomizado muestra una gran expresión hipotalámica de GnRH y GnIH, lo cual nos indica que se trata de un control fisiológico positivo adecuado a las hormonas en estudio. El negativo por su parte, señala muy poca expresión de ambas hormonas hipotalámicas (Figuras 18A y B).

18A



18B

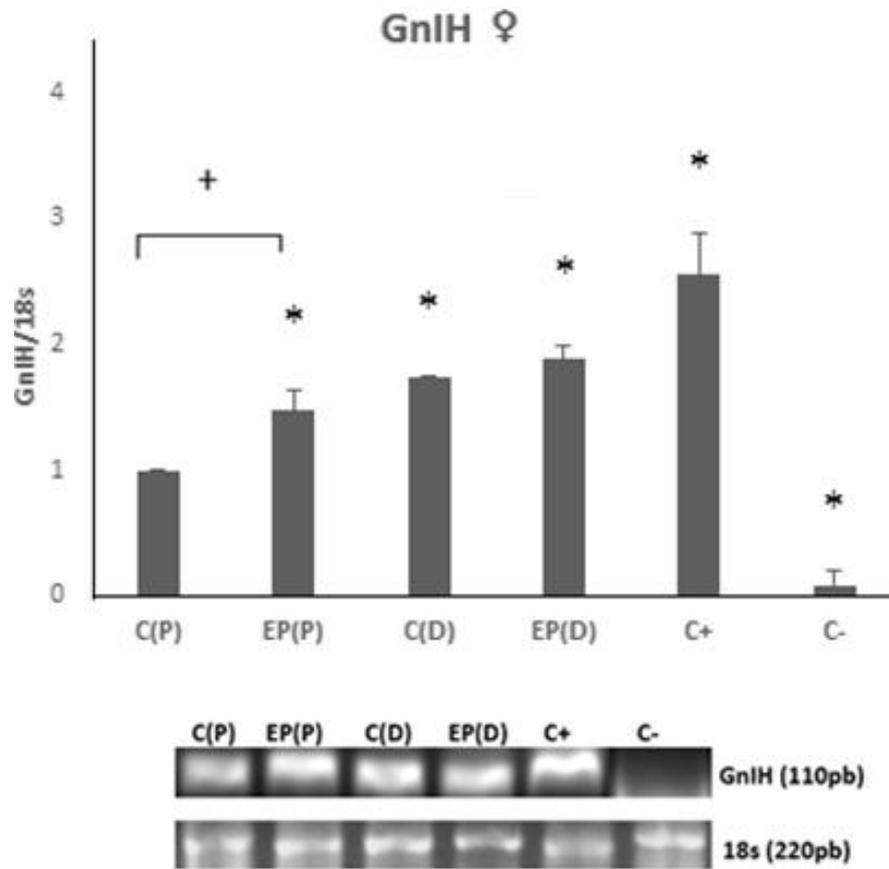


Figura 18 (A y B) 5. Gel de integridad de muestras de RNA. Expresión del RNAm para GnRH (18A) y GnIH (18B) en hembras adultas C, EP C+, C-. Los datos se presentan como la media \pm E.E. *Los asteriscos señalan diferencias significativas.

Concentración de Estradiol y Progesterona (P4)

En el caso de las hembras adultas cuya etapa del ciclo estral se encontraba en proestro, el estradiol disminuye significativamente cuando fueron sometidas a estrés prenatal en comparación a las hembras control ($p < 0.05$). En el caso de las hembras que se encontraban en etapa de diestro, tanto las que fueron estresadas prenatalmente como las hembras control, no presentaron diferencias significativas (Figura 19).

19

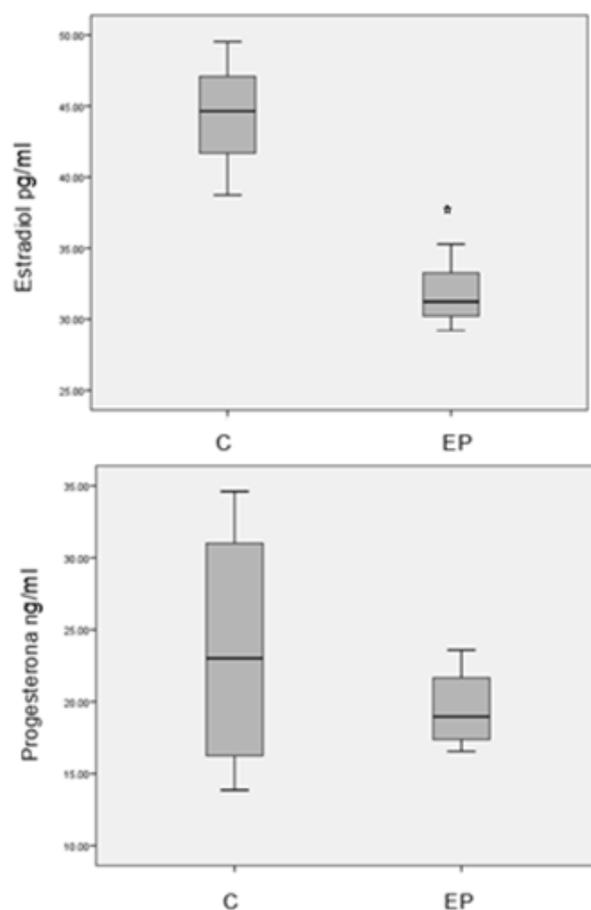


Figura 19. Concentración de estradiol en hembras en P y progesterona en hembras en D, tanto control como EP. *Los asteriscos señalan diferencias significativas.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró que el estrés prenatal generado por la exposición de hembras gestantes a estrés por IAF, provocó un aumento en expresión y el contenido hipotalámico de la GnIH en descendencia adulta, tanto en machos como en hembras y disminuyó la expresión y el contenido de GnRH en la misma estructura nerviosa. Lo anterior muestra que la IAF es un tipo de estresor de alta intensidad (Retana-Márquez et. al., 2003), que al ser aplicado a la madre provoca modificaciones en las crías durante etapas críticas del desarrollo y éstas se ven reflejadas como alteraciones neuroendócrinas en las hormonas hipotalámicas que regulan la reproducción; una vez que estos individuos alcanzan la madurez. Dicho evento se denomina programación del desarrollo, la cual se define como una respuesta del organismo a un desafío específico durante una ventana de tiempo crítica del desarrollo, que altera la trayectoria del mismo, con efectos persistentes sobre el fenotipo de la descendencia (Zambrano et. al., 2014) Los fetos expuestos a EP son sensibles a modificaciones en su medio durante el desarrollo, lo cual puede generar alteraciones reproductivas y afectar de manera importante las estructuras neuroendócrinas responsables de la actividad sexual una vez que se alcanza la madurez.

Bock et. al., (2015), puntualizaron que los mecanismos neuronales subyacentes al EP pueden estar relacionados con cambios en los circuitos sinápticos, dependiendo de la región cerebral afectada, por lo que las neuronas de esa área pueden estar expuestas a cambios fisiológicos durante la neurogénesis, tales como la migración o la diferenciación neuronal.

La migración de las neuronas GnRH de los roedores, ocurre del bulbo olfatorio hacia el área preóptica después del día 15 ó 16 de gestación (Veldhuis et. al., 1987). Si el EP está presente durante esta etapa del desarrollo, a través del aumento en las concentraciones de glucocorticoides maternos, y puede alterarse dicha migración, lo que consecuentemente modificará los patrones de secreción neuroendócrina una vez que el individuo alcance la madurez, pues la cantidad de GnRH que se secrete podrá no ser suficiente como resultado de las modificaciones ocasionadas en etapas muy tempranas y críticas del desarrollo y la diferenciación sexual hipotalámica. En efecto, se ha demostrado que la administración del glucocorticoide sintético dexametasona en ratas gestantes disminuye la migración y el número de neuronas GnRH en el APO (Lim et. al., 2014), lo cual se ha relacionado con la disminución de GnRH hipotalámica y de LH en la hipófisis en la descendencia (Lalau et. al., 1990), lo cual puede resultar en la disminución de la fertilidad en la etapa adulta. También se ha reportado que la administración neonatal de dexametasona puede inhibir la expresión del gen para GnRH en las neuronas GnRHérgicas del APO (Soga et. al, 2012). Estos datos, aunados a los resultados de este trabajo, sugieren que los glucocorticoides maternos liberados durante el estrés en la gestación pueden inhibir la expresión de GnRH directamente (a través de receptores para glucocorticoides tipo II) e indirectamente (mediante el aumento en la expresión de receptores para GnRH) en las neuronas GnRHérgicas. Debe también considerarse que las neuronas GnRH tienen receptores para glucocorticoides (Dondi et. al., 2005), los cuales podrían también inhibir directamente la expresión de los genes que codifican GnRH. Por lo tanto, el estrés por IAF puede modificar los patrones de secreción de GnRH.

Además, esta neurohormona tiene ciertos patrones de secreción durante diversas etapas de la vida del individuo y no es constante a lo largo del desarrollo. por lo que la alteración en la secreción de GnRH en el último tercio de la gestación, puede influenciar también el adecuado desarrollo de los núcleos hipotalámicos (POA y NA, principalmente) involucrados en la regulación central de la reproducción mediante la liberación de GnRH.

Los resultados de este trabajo muestran que el EP causa además disminución de las hormonas sexuales, testosterona en el caso de los machos y estradiol en el caso de las hembras. Estos resultados indican que el EP modifica el funcionamiento de los órganos que constituyen al eje HHG durante la etapa crítica del desarrollo y estos efectos son reflejados en la madurez. En el caso de la GnRH y la GnIH, los patrones de secreción son modificados por efecto del EP, ya que a pesar de no sufrir otro estresor más que durante el desarrollo gestacional, estos individuos presentan alteraciones hormonales con una mayor expresión y contenido de la hormona GnIH, que inhibe la función del eje reproductivo, trayendo como consecuencia una menor producción de hormonas sexuales, lo cual puede traer como consecuencia un desempeño sexual deficiente y por lo tanto afectaciones reproductivas graves.

Otro aspecto a considerar es que la última semana de gestación que es en la cual se aplicó el estrés prenatal, es crucial para el adecuado desarrollo del eje HHG. La exposición del feto a hormonas sexuales como los estrógenos y los andrógenos tiene un impacto en órganos tales como el cerebro, el útero y las gónadas, no sólo en el número de células y la morfología, sino también en la regulación (activación o inactivación) de los receptores de esteroides (Zambrano

et. al., 2014). Por lo anterior, es importante considerar que la exposición a estrés durante la última semana de gestación en las ratas, ocasiona que la exposición a testosterona que debe ocurrir durante este periodo no se lleve a cabo y por lo tanto las estructuras sexualmente dimórficas no se desarrollen adecuadamente.

En el caso de la hembra, la exposición prenatal a testosterona aumenta la distancia ano-genital, provoca hipogonadismo y la masculinización de los genitales internos y externos, se altera el ciclo estral y se presenta anovulación e infertilidad (Zambrano et.al., 2014). Dichos antecedentes nos muestran que el EP tiene fuertes repercusiones en el desarrollo reproductivo de las crías no sólo en cuestiones neurológicas y hormonales, sino que alcanzan aspectos conductuales y morfológicos indispensables para el desarrollo de la actividad sexual. Esto nos muestra que el EP ejerce una fuerte influencia sobre la regulación central del eje HHG y como consecuencia se ven alterados otros niveles del mismo; ya que al encontrarse en menores cantidades a la GnRH se tiene una producción menor de las hormonas encargadas de la correcta función reproductiva y el comportamiento sexual, testosterona en el caso de los machos y estradiol en el caso de las hembras.

Los resultados de este trabajo, muestran que el EP, además de estar involucrado en la diferenciación de estructuras nerviosas sexualmente dimórficas, también causa disminución de las concentraciones hormonales en los machos y en las hembras, lo que conduce a un menor desarrollo de los órganos sexuales reproductivos, así como diferencias en la conducta sexual (Ashworth et. al., 2016). Además el EP es capaz de modificar el contenido y la expresión y por lo tanto los patrones de secreción hormonal de los dos reguladores centrales de la

reproducción, la GnRH y la GnIH. Al existir una mayor expresión de GnIH en ratas adultas EP, existe una inhibición mayor en la síntesis y secreción de la GnRH, lo que genera una disminución considerable de la liberación de hormonas gonadotrópicas (Ubuka et. al., 2012; Calisi, 2014).

A la par de la acción de GnIH sobre las neuronas GnRH y la adenohipófisis, la GnIH puede ejercer un efecto directo sobre los testículos de los mamíferos, actuando de manera autócrina o parácrina suprimiendo la secreción de testosterona (Ubuka et. al., 2014), por lo que observamos en el caso de las ratas macho adultas expuestas a EP, la GnIH elevada puede estar actuando en diversos niveles del eje gonadal, a nivel de hipotálamo e hipófisis disminuyendo la secreción de GnRH y LH respectivamente, trayendo como consecuencia la disminución en la síntesis y liberación de testosterona. También, en roedores como el hámster, se ha observado expresión de GnIH en células germinales, mientras en el mono se ha detectado en células de Leydig, espermatogonias y espermatocitos.

En el caso de las hembras, la disminución del estradiol puede deberse al efecto inhibitorio de la GnIH. Se ha mostrado que la GnIH juega un papel inhibitorio en el desarrollo folicular ovárico (Maddineni et. al., 2008), en el cual el estradiol participa de manera muy importante y que cómo se observó en las ratas hembra adultas EP, se encuentra disminuido en la etapa de proestro, donde se observan los niveles más elevados de esta hormona. En monos y en el humano, la GnIH se expresa en células de granulosa, folículos preantrales y cuerpo lúteo (León, 2014). Dicha expresión de GnIH en los testículos y ovarios generan que disminuyan las hormonas sexuales en ambos sexos.

En el caso de la progesterona no existieron diferencias significativas entre las hembras C y EP, esto puede deberse a que en la etapa de proestro y no en la de diestro donde juegan un papel más relevante la GnRH y GnIH en el caso de las especies de reproducción continua como lo es el caso de la rata. Además, se ha reportado que la elevación de la P₄ en la rata parece estar más relacionada con la posterior disminución de FSH (Meijs-Roelofs et. al. 1975).

En los mamíferos, las proyecciones de las neuronas GnIH se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro. En la rata, estudios de inmunotinción pusieron de manifiesto que el 75% de las neuronas GnRH se encontraban muy próximas a las fibras y terminaciones nerviosas de las neuronas GnIH. También se han identificado terminales axónicas de las neuronas GnIH en las proximidades de las neuronas GnRH en el cerebro humano, aunque el alcance de estas proyecciones no ha sido cuantificado (León, 2014). Estos datos validan el hecho de que en el caso de las ratas EP existe una disminución en la GnRH ya que las neuronas GnIH muy próximas a éstas, ejercen su efecto inhibitorio sobre la secreción de GnRH y los estímulos adversos a los que fueron sometidos las ratas en el útero puede programar que la GnIH esté actuando mayormente que la GnRH.

En este estudio, una expresión mayor de GnIH en animales EP puede deberse a la existencia de los altos niveles de glucocorticoides (GC) que llegan activos vía sanguínea de la madre al feto durante el estrés prenatal (Burton and Waddell, 1999; Charmandari et. al., 2005) y éstos activan genes que promuevan mayor síntesis y liberación de GnIH, ya que los acontecimientos adversos que ocurren

durante la gestación generan un readecuamiento fisiológico (que se refiere a consecuencias funcionales específicas producto de un estímulo durante el desarrollo), y suceden mediante mecanismos de expresión génica o expresión enzimática (Barker y Osmond, 1986; Remedi, 2010, Recabarren et. al, 2006). Estos mecanismos son lo que pueden estar determinando la mayor expresión de GnIH.

La potencialización de la acción de las neuronas GnIH por efecto de los GC se ha reportado en adultos (Kirby et. al., 2009) y puede ser que los GC actúen no sólo durante la edad adulta aumentando la liberación de GnIH sino que incluso, podrían estar generando alteraciones desde el desarrollo uterino modificando los patrones de secreción no sólo de la GnRH y de las propias neuronas GnIH, las cuales estarán determinadas a tener una mayor actividad y estarán influenciadas por los GC que tienen un efecto de aumento en su síntesis y secreción (Gojska y Belshman, 2014).

Otros efectos de los GC maternos en concentraciones elevadas excesivas durante la gestación ha sido ampliamente estudiado. Por ejemplo, el período crítico para la diferenciación sexual del cerebro de roedores se extiende desde los días 14-21 días de gestación. Hay un aumento de la secreción de testosterona testicular en el 18 y los días 19 fetales, lo cual es esencial para la masculinización del cerebro (Reznikov et al., 2001). Cuando se expone prenatalmente a crías macho de rata a GC sintéticos (betametasona) disminuye este pico de testosterona (Zambrano et. al., 2014) y también el dimorfismo sexual cerebral característico en la vida postnatal temprana (Reznikov et al., 2001). Por lo que los GC pueden estar influyendo directa o indirectamente en la programación

neuroendócrina fetal no sólo en la morfología sino en la función secretora de hormonas centrales reproductivas del hipotálamo. En la etapa adulta se ha demostrado que la exposición de ratas macho adultas a glucocorticoides disminuye los niveles de RNAm de GnRH, y decrementa las concentraciones séricas de LH sin cambios en la expresión génica (Zambrano et. al., 2014) y en ratones hembra recién nacidas expuestas a la ACTH aumenta la longitud del ciclo estral y la sobre exposición a los corticosteroides genera retraso en la maduración sexual y disminuye la tasa de fecundidad (Zambrano et. al., 2014). Por otro lado, crías de rata macho expuestas a dexametasona (potente GC sintético con acciones semejantes las hormonas esteroides) durante la gestación, muestran disminución de los niveles de testosterona en suero y la producción de testosterona, además, perjudica los parámetros del espermatozoides disminuyendo el porcentaje de espermatozoides vivos y la movilidad, además disminuye el peso testicular y longitud de los testículos, dañando con esto la fertilidad (Zambrano et. al., 2014) y en el caso de la descendencia femenina, lo que se ha reportado es que la exposición a dexametasona en la rata hembra después del nacimiento disminuye el número de folículos en el ovario y las células germinales y aumenta la apoptosis (Zambrano et. al., 2014). Lo anterior indica que los GC pueden generar efectos adversos también en el individuo en desarrollo y en el presente trabajo se observó que el EP modifica la secreción hormonal en el hipotálamo y las gónadas, lo cual tiene como resultado una disfunción a nivel ovárico y testicular.

Los mecanismos epigenéticos se definen como procesos responsables de alteraciones en las funciones de genes, pero no pueden ser explicados por los

cambios en la secuencia del ADN en sí mismo. El cerebro de los mamíferos es muy especial en este contexto y se diferencia de la de otros vertebrados en que íntimamente desarrolla dentro de un ambiente materno en el útero y después del nacimiento. En el cerebro humano, se ha demostrado que el desarrollo continúa postnatalmente y partes de la corteza se someten a una reorganización radical durante el periodo post-puberal (Keverne y Curley, 2008).

A nivel molecular, los mecanismos epigenéticos son modificaciones bioquímicas del ADN, pueden ser modificaciones a través de la metilación del ADN y modificaciones específicas de histonas tales como acetilación, fosforilación, y metilación en torno a distintos genes. En general, estos mecanismos pueden inducir alteraciones en la accesibilidad de factores de transcripción a genes específicos y, dependiendo del tipo de modificación, esto se traduce en transcripción de genes o silenciamiento de genes (Bock et. al., 2015).

Esto implica que las neuronas inmaduras estresadas generan una “memoria” a largo plazo, que interfiere con el desarrollo del cerebro en curso para una duración mucho más larga que la del factor de estrés. Así, incluso una experiencia de estrés agudo puede desencadenar una avalancha de cascadas moleculares y de ese modo afectar el desarrollo del cerebro, incluso después de la terminación del factor estresante (Bock et. al, 2015). La memoria que generan estas neuronas puede indicarle al feto el ambiente adverso al cual fue expuesto y por lo tanto programarlo a una menor función sexual la cual es regulada desde el cerebro.

Los resultados obtenidos nos señalan que en el caso de la GnRH y la GnIH, los patrones de secreción fueron modificados por el EP, ya que la expresión de la

GnRH disminuye por el estrés por IAF a diferencia de la GnIH que aumenta, y además de los mecanismos descritos anteriormente, también factores epigenéticos y mecanismos bioquímicos que se desarrollan por la gran cantidad de GC que este estímulo estresante genera en el feto, de este modo, el EP pudo generar la activación o inactivación de ciertos genes que pueden modificar el patrón de secreción de GnRH y sintetizándose más GnIH como nos lo indica el incremento en la expresión del RNAm de esta hormona. A su vez el aumento en la expresión y síntesis de GnIH en ratas EP puede relacionarse con los otros niveles del eje gonadal trayendo consecuencias fisiológicas desfavorables para la reproducción.

CONCLUSIÓN

La descendencia expuesta a EP presenta alteraciones neuroendócrinas del eje HHG en las cuales se presenta una mayor expresión de GnIH. El aumento de ésta hormona puede deberse a un mecanismo de programación fetal generado por el incremento de glucocorticoides maternos, afectando así la regulación neuroendócrina de los ejes ovárico y testicular, disminuyendo la concentración de hormonas sexuales reproductivas, testosterona y estradiol, lo cual puede traer como consecuencia, disfunciones en órganos y conductas sexuales dependientes de dichas hormonas.

REFERENCIAS

- Agarwal Ashok. 2014. Male Reproductive System—Anatomy and Physiology. Cap. 1. Anatomy and Physiology of Male Gametogenesis. Alex Varghese, Fnu Deepinder, Angali Chandra, Ang Wen Jeat, Furquan Pathan, Ashok Agarwal.
- Anawalt BD, Begg RA, Matsumoto AM, Groome, N.P., Illinworth, P.J., McNeilly A.S., Bremner, W.J. 1996. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*; 81:3341–3345.
- Ashworth Cheryl J., George Susan O., Hogg Charis O., Lai Yu-Ting and Brunton Paula J. 2016. Sex-specific prenatal stress effects on the rat reproductive axis and adrenal gland structure. *Reproduction* 151 709–717.
- Asimakopoulos Byron. 2012. Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis: It is Time for Revision *Human Genet Embryol* 2:1
- Barker D.J., Osmond C., 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1(8489): 1077-81.
- Bédécarrats Gragoy Y, Mc Farlane Heather, Maddineni Sreenivasa, Ramachandran Ramesh. 2009. Gonadotropin-inhibitory hormone receptor signaling and its impact on reproduction in chickens. *General and Comparative Endocrinology* 163, 7–11
- Bentley, G. E., Ubuka, T., McGuire, N. L., Calisi, R., Perfito, N., Kriegsfeld, L. J., Wingfield, J. C., Tsutsui, K. 2009. Gonadotropin-inhibitory hormone: a multifunctional neuropeptide. *J. Neuroendocrinol.* 21, 276-281.
- Bernabé Salazar Antonio, Navarro Cámara Antonio, Pallarés Martínez José. 2012. *Citología e Histología Veterinaria*. Universidad de Murcia, España.
- Beshay V. E and Carr B. R, 2013. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis and control of the menstrual cycle. En T. Falcone and W.W. Hurd (eds.), *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. Springer Science+Business Media New York.
- Bock J., Wainstock T., Braun K., Segal M., 2015. Stress in utero: Prenatal programming of brain plasticity and cognition. *Society of Biology Psychiatry*; 78:315-326
- Bonini, J.A., Kenneth A. J., Adham N., Forray C., Artymyshyn R., Durkin M. M. Smith K. E., Tamm J. A., Boteju L. W., Lakhani P. P. Raddatz R., et al. 2000. Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem*, 275(50): p. 39324-31
- Buffet N.C., Bouchard P. 2001 The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *Chr Int*, 18 (6): 893-919.

Burton and Waddell, 1999. Dual Function of 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase in Placenta: Modulating Placental Glucocorticoid Passage and Local Steroid Action. *Biology of Reproduction* 60, 234-240

Brann, D.W. and V.B. Mahesh, 1994. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol*, 15(1): p. 3-49.

Calisi Rebecca M. 2014. An integrative overview of the role of gonadotropin-inhibitory hormone in behavior: Applying Tinbergen's four questions. *General and Comparative endocrinology* 203, 95-105

Charil Arnaud, Laplante David P., Vaillancourt Cathy, King Suzanne. 2010. Prenatal stress and brain development. *Brain research reviews* 65, 56-79

Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. P. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 259-284.

Chen C. C. and Fernald R. D., 2008. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *Journal of Fish Biology* 73, 1099–1120

Chrousos George P. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 5, 374-381

Clarke, I. J., Qi, Y., Sari, I. O., Smith, J. T. 2009. Evidence that RFamide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 371-378

Daniel P. M., 1976. Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. *J. Clin. Path*, 30, Suppl. 7-17

Díaz Carmen, Morales-Delgado Nicanor, Puelles Luis. 2015. Ontogenesis of peptidergic neurons within the genoarchitectonic map of the mouse hypothalamus. *Front. In Neuroanat.* 8:162

Del Cerro M. C. R, Ortega E., Gómez F., Segovia S., Pérez-Laso C. 2015 Environmental prenatal stress eliminates brain and maternal behavioral sex differences and alters hormone levels in female rats. *Hormones and Behavior* 73, 142–147

Del Giudice Marco, 2012. Fetal programming by maternal stress: Insights from a conflict perspective. *Psychoendocrinology* 37, 1614-1629

Dondi D., Piccolella M., Messi E., Demissie M., Cariboni A., Selleri S., Piva F., Samara A., Consalez GG., Maggi R. 2005. Expresión and differential effects of the activation of glucocorticoid receptors in mouse Gonadotropin-Releasing Hormone neurons. *Neuroendocrinology* 85: 151-163

Dong Qiang and Hardy Matthew P. Leydig Cell Function in Man. 2004. In: *Male hipogonadism. Basic, Clinical and Therapeutic Principles.* (Stephen J. Winters) Springer Science + Business media NY. Cap 2. En: Yen and Jaffe's Reproductive

endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management. (Straus Jerome F., Barbieri Robert L.) Elsevier Saunders. USA. Cap 1. Pp: 3-26

Dufau ML, Veldhuis JD, Fraioli F, et al. 1983. Mode of secretion of bioactive luteinizing hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 57:993–1000.

Dyce K. M., Sack W. O., Wensing C. J. 2012. Anatomía veterinaria. 4ta edición. Editorial Manual Moderno. Pág. 218, 219

Ebling, F. J. P., Luckman, S. M. 2008. RFamide-related peptide: Another sexy peptide? *Endocrinology*. 149, 899-901.

Ehlers K, Halyorson L. 2013. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the GnRH receptor (GnRHR). *Glob. libr. women's med.*, (ISSN: 1756-2228)

Ferrán, G. 2011. Andrological implications of abuse of anabolic-androgenic steroids. *Rev Int Androl*. 9(4):160-169.

García Vargas, Dulce Diana. 2014. Alteraciones reproductivas en ratas macho y hembra estresadas prenatalmente. Conducta sexual, ciclo estral y calidad espermática. Tesis (Maestría en Biología de la Reproducción Animal). UAM-I.

Gojska Nicole M, Belsham Denise D. 2014. Glucocorticoid receptor-mediated regulation of Rfrp (GnIH) and Gpr147 (GnIH-R) synthesis in immortalized hypothalamic neurons. *Molecular and cellular endocrinology* 384, 23-31

Goldman J. M., Murr A. S., Cooper R. L., 2007. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research (Part B)* 80:84–97

Griffin, J.E., Wilson J.D. 2003. Disorders of the Testes and the Male Reproductive Tract. En: *Williams Textbook of Endocrinology* (Larsen P.R., Kronenberg H.M., Melmed S., Polonsky K.S. (Eds.) Saunders, USA. Pp: 709-769.

Gruenewald D. A., Matsumoto A M. 1990. Age related decreases in serum gonadotropin levels and gonadotropin releasing hormone gene expression in the medial preoptic area of the male rat are dependent upon testicular feedback. NIH Grants P50-HD-12629 and K12-AG-00503 and Veterans Affairs Medical Research Funds.

Habib, KE, Gold PW, Chrousos GP. 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 30, 695–728

Hardy, M. P., Gao, H-B., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Ran Chai, W., Feng, X., Sottas, C. 2005. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res.* 322, 147–153

Hagino, N., Watanabe, M., Goldzieher, J. W. 1969. Inhibition by adrenocorticotrophin of gonadotropin-induced ovulation in immature female rats. *Endocrinology*. 84, 308-

314.

Hawes, B.E., Conn, P.M. 1993. Assessment of the role of G proteins and inositol phosphate production in the action of gonadotropin-releasing hormone. *Clin. Chem.* 39:325–332.

Hill Mark. 2016. Embriology UNSW. ISBN: 978 0 7334 2609 4 - UNSW CRICOS Provider Code No. 00098G

Hutchison J. B., Wozniak A., Beyer C., Karolczak M., Hutchison R. E. 1999. Steroid metabolizing enzymes in the determination of brain gender. *J. Steroid Biochem Mol Biol*; 69:85-96

Jin J. M., Yang W., X. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads. 2014 *Gene* 1;551 (1):15-25

Johnson Elizabeth O., Kamilaris Themis C., Chrousos George P. and Gold Philip W. 1992. Mechanisms of stress: A dynamic Overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosciences and Biobehavioral Reviews* 6, 115-130

Keverne E. B., Curley J. P., 2008. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Epigenetics, brain evolution and behavior.

Kirby, E. D., Geraghty, A. C., Ubuka, T., Bentley, G. E., Kaufer, D. 2009. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *PNAS*. 106, No. 27, 11324-11329.

Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., Van Dijk, G., Wöhr, M., FuchsE. 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1291-1301.

Laemli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lalau J.D., Aubert M. L., Carmignac D. F., Gregoire I., Dupouy J. P. 1990. Reduction in testicular function in rats. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology* 51: 589-293

Lemus Ana Elena, Pérez Palacio Gregorio. 2001 En: *Bioquímica* (J. J. Hicks) Cap. 34 Pp: 648-686 Mc Graw Hill Interamericana Editores

León Téllez Silvia. 2014. Análisis de los sistemas RFRP/NPFF1R y Kiss 1/Gpr54 en la regulación de la función reproductora y de la homeostasis metabólica. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

Lim W. L., Soga T., Parhar I. S. 2014. Maternal dexamethasone exposure during pregnancy in rats disrupts gonadotropin-releasing hormone neuronal development in the offspring. *Cell Tissue Res* 355: 409-423

Liu Peter Y., Veldhuis Johannes D. 2013. En: Yen and Jaffe's Reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management. (Straus Jerome F., Barbieri Robert L.) Elsevier Saunders. USA. Cap 13. Pp: 272-286

McCartney Christopher R., Marshall John C. 2013. En: Yen and Jaffe's Reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management. (Straus Jerome F., Barbieri Robert L.) Elsevier Saunders. USA. Cap. 1. Pp: 3-26

Maccari, S., Piazza, P. V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., Le Moal, M. 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *Journal of Neuroscience*. 15 (1 pt 1):110-116.

Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A. R., Cinque, C., Van Reeth, O., 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev*. 27, 119-127

MacLusky, N., Naftolin, F., Leranth, C. 1988. Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between corticotrophin-releasing-factor (CRF) and gonadotropin releasing hormone (GnRH)-containing neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Res*. 439, 391-395

Maddineni S. R., Oco'n-Grove O. M., Krzysik-Walker S. M., Hendricks G., L. III, Ramachandran R. 2008. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) receptor gene is expressed in the chicken ovary: potential role of GnIH in follicular maturation. *Reproduction* 135 267–274

Marshall JC, Griffin ML. 1993. The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod* 1993; 8 (Suppl 2):56–61.

Means AR, Fakunding JL, Huckins C, Tindall, D.J., Vitale, R. 1976. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res*; 32:477–527.

Meijs-Roelofs H. M., Greff W. J., Uilenbroek J. T. 1975. Plasma progesterone and its relationship to serum gonadotrophins in immature female rats. *J. Endocrinol*. 64(2):329-36

Millar R. P., Newton C. J., Roseweir, A. K. 2012. En: Handbook of neuroendocrinology. First Edition. (Fink G., Pfaff D., Levine J., Eds) Elsevier Academic Press. USA Cap I. Pp: 21-54

Morley-Fletcher, S., Darnaudery, M., Koehl, M., Casolini, P., Van Reeth, O., Maccari, S. 2003. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Research*. 989(2):246-251.

Murakami, M., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Yasui, T., Irahara, M., Osugi, T., Tsutsui, K. 2008. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats *J. Endocrinol*. 199, 105-112.

Perret R. M., Mc Ardle C. A., 2013. Molecular mechanisms of gonadotropin releasing hormone signaling: Integrating cyclic nucleotides into the network. *Front Endocrinol*. 4:180

Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar P, Tena-Sempere. 2012. Kisspeptins and reproduction physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* Vol. 92, No. 3, 1235-1316

Plant Tony M. 2015. The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinol*, 226(2): T41–T54

Rabin, D., Johnson, E. O., Brandon, D. D., Liapi, C., Chrousos, G. P. 1990. Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: Possible role of the uterine estradiol receptor. *Biol. Reprod.* 42, 74-80.

Recabarren S. E., Sir-Petermann., Maliqueo M., Lobos A., Rojas-García P., 2006. La exposición prenatal a andrógenos como factor de reprogramación fetal. *Rev Méd Chile*; 134: 101-108.

Remedi Carolina. Estrés prenatal y programación fetal. Instituto de Psicoinmunoendocrinología y medicina del estrés. <http://www.ipnie.com/DesarrolloDePatologias/DesarrolloDePatologias.htm>

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez Salazar, E., Martínez-García, J., Velázquez-Moctezuma, J. 2003. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 28(2):207-227.

Retana-Márquez María del Socorro, García Díaz Erika Cecilia, Juárez Rojas Adriana Lizbeth, Delgadillo Sánchez José Alberto. 2012. Supresión de testosterona por efecto del estrés. Consecuencias en la reproducción. En: *Avances en Biología de la Reproducción*. UAM-I, SEP.

Reznikov A.G., Nosenko N. D., Tarasenko L.V., Sinitsyn and Polyakova L. I. 2001. Early and Long-Term Neuroendocrine Effects of Prenatal Stress in Male and Female Rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 31, No. 1

Rhees RW, Al-Saleh HN, Kinghorn EW, Fleming DE, Lephart ED. 1999. Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. *Brain Res Bull*, 50(3):193–9.

R.M.P. Leite. 2008. Cycles ovarien et menstruel : r'épercussion de l'agression nutritionnelle précoce sur des param`etres locomoteurs chez la rate et cons`equences sur les propri`etés neurom`ecaniques de femmes jeunes domain other. *Universit`e de Technologie de Compi`egne, Fran,cais*.

Roseweir A. K., Millar R. P. 2009. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Human Reproduction*. 15(2): 203-212

Sagrillo C. A, Grattan D. R, McCarthy M. M., and Selmanof M., 1996. Hormonal and Neurotransmitter Regulation of GnRH Gene Expression and Related Reproductive Behaviors. *Behavior Genetics*, VoL 26, No. 3.

Sale Alessandro, Berardi Nicoletta, Maffer Lamberto. 2012. Environmental Influences on Visual Cortex Development and Plasticity. In: Visual Cortex-Current Status and Perspectives. Cap. 14. Eds. Molotchnikoff and Jean Rouat.

Segarra AC, Luine VN, Strand FL. 1991. Sexual behavior of male rats is differentially affected by timing of perinatal ACTH administration. *Physiol Behav* 50:689– 97.

Selye, H.1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol.* 6, 117-231.

Smith, J. T., Clarke, I. J. 2010. Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trend. Endoc. Metab.* 21, 256-260

Soga T., Dalpaladu S L., Wong D. W., Parhar I. S 2012. Neonatal dexamethasone exposure down-regulates GnRh expression through the GnIH pathway in female mice *Neuroscience*, 218: 56-64

Takahashi, L. K., Turner, J. G., Kalin, N. H. 1998. Prolonged stress-induced elevation in plasma corticosterone during pregnancy in the rat: implications for prenatal stress studies. *Psychoneuroendocrinology* 23(6):571-581

Tresguerres J. A. F y Carmen Castillo. 2005. Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. Tresguerres Jesús A. F., Castillo Carmen. *Fisiología Humana*. Cap 79. 3ª edición. Tresguerres J.A.F., Ariznavarreta C., Cachofeiro v., Cardinali D., Esrich Esriche E., Gil-Loyzaaga P., Lahera Juliá V., Mora Teruel F., Romano Pardo M., Tamargo Menéndez J. (eds), Mc Graw Hill.

Tsigos, P., Chrousos, G. P. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 53, 865-871.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., Sharp, P. J. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 661-667.

Tsutsui K., Bentley G. E., Bedecarrats G., Osugi T., Ubuka T., Kriegsfeld L. J. 2010. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31(3): 284-295

Tsutsui Kazuyoshi. 2014 Central and direct regulation of testicular activity by Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor. *Front Endocrinol* 5:8.

Tsutsumi R, Webster N. 2009. GnRH Pulsatility, the Pituitary Response and Reproductive Dysfunction. Medical Research Service.

Ubuka, T., Son, Y.S., Tobari, Y., Tsutsui, K. 2012. Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front. Neuroendocrinol.* 3, 1481-53.

Ubuka T., Lee Son Y., Tobari Y., Narihiro M., Bentley G. E., Kriegsfeld L. J, Veldhuis JD, King JC, Urban RJ, et al. 1987. Operating characteristics of the male hypothalamo-pituitary-gonadal axis: pulsatile release of testosterone and follicle-

stimulating hormone and their temporal coupling with luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*; 65:929–941.

Veldhuis, Johannes D. 2001. Capítulo 22. Eje hipotalámico-hipofisario-gonadal masculino, en Yen, Jaffe, Barbieri. *Endocrinología de la Reproducción*. 4ta edición. Ed. Médica Panamericana

Vijayan E. 1985. Role of neurotransmitters and neuropeptides in the control of gonadotropin release: A review. *J. Biosci.* Vol 7: 2, 207-213

Walstrom T, Huhtaniemi I, Hovatta O, Sappälä, M. 1983. Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 57:825–830.

Ward IL, Weisz J. 1984. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology*, 114:1635– 44.

Weinbauer G. F., Luetjens C. M., Simoni M., Nieschlag E. 2010. Physiology of testicular function. E. Nieschlag et al. (eds.), *Andrology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Weinstock Marta. 2007. Gender Differences in the Effects of Prenatal Stress on Brain. *Neurochem Res* 32:1730–1740

Wu, M., Dumalska, I., Morozova, E., Van Den Pol A. N., Alreja, M. 2009. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism *J. Physiol.* 587, 1401- 1411

Yang, H. Y. T., Fratta, W., Majane, E.A., Costa, E. 1985. Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 7757- 7761.

Yoshida, H., Habata Y., Hosoya M., Kawamata Y., Kitada C., Hinuma S. 2003. Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1593(2-3): p. 151-7.

Zambrano E., Guzmán C., Rodríguez-González G. L., Durand-Carbajal M., Nathanielsz P. W. 2014. Fetal programming of sexual development and reproductive function. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 382, 538-549



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00037

Matricula: 2143800688

EXPRESIÓN DE LA HORMONA INHIBIDORA DE LAS GONADOTROPINAS (GnIH) Y DE LA HORMONA LIBERADORA DE LAS GONADOTROPINAS (GnRH) EN EL HIPOTÁLAMO DE RATAS ADULTAS ESTRESADAS PRENATALMENTE

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 15 del mes de diciembre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. WENDY PORTILLO MARTINEZ
- DR. OSCAR GONZALEZ FLORES
- DRA. SUSANA ROJAS MAYA
- DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: AZHALEA GUADALUPE GARCIA SOTO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



AZHALEA GUADALUPE GARCIA SOTO
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. WENDY PORTILLO MARTINEZ

VOCAL

DR. OSCAR GONZALEZ FLORES

VOCAL

DRA. SUSANA ROJAS MAYA

SECRETARIA

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ