

5

2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

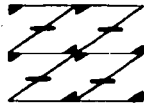
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

VARIACIONES EN EL CONTENIDO DE ACETILCOLINA EN LOS LADOS DERECHO E IZQUIERDO DEL AREA PREOPTICA E HIPOTALAMICA ANTERIOR DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
PAOLA REBECA ARTEAGA LOPEZ

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO SOMOS EJE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRAN

MEXICO, D. F.

1997

TESSIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**VARIACIONES EN EL CONTENIDO DE ACETILCOLINA EN LOS LADOS DERECHO E
IZQUIERDO DEL ÁREA PREÓPTICA E HIPOTALÁMICA ANTERIOR DURANTE EL CICLO
ESTRAL DE LA RATA**

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: **Paola Rebeca Arteaga López.**

Directora de tesis: **Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán.**

Esta tesis fue realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción,
Laboratorio de Neuroendocrinología, F.E.S. Zaragoza, U.N.A.M.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de la Dirección
General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) proyecto IN204693 y del
Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) U.N.A.M.

***Teneis la vida por delante,
y hay que recorrerla
con garbo sobrenatural
y elegancia humana:
con amor de Dios,
de la mano de Cristo todo
es fácil.***

***Mons. Álvaro del Portillo
(Prelado del Opus dei.)***

A mis padres *Aurelio y Rebeca*.

A mi mamá *Lulú* y a mi hermana *Carla*,

a mis tíos *Sara e Israel*, *Esmeralda y Jorge*,
Beatriz y Oscar, *Blanca y Julio*,

a mis primos. *Sandra*, *Viridiana*, *Oscar*, *Iván*,
Betty, *Fabián*, *Montserrat*, *Israelito*, *Aldo*
Damián y Daniela,

por ser mi familia, lo más importante para mí,
ya que gracias a su gran amor, apoyo, consejos
y sobre todo por su confianza pude salir adelante
en mi trabajo.

Al Ing *Raúl Sandoval*, mi gran amigo y
maestro, por estar siempre a mi lado

A mis amigos por ayudarme a hacer de la
vida diaria una diversión

A *Cande*, *Josefina* y *Rosa* por hacer de mis
días grises una primavera.

Especialmente a mi amigo *Germán* por darme
una nueva filosofía de vida y alentarme a
seguir inmersa en el maravilloso mundo de la
ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán, por su confianza, tiempo y enseñanzas que me ayudaron a concluir mis objetivos.

Con especial gratitud al Dr. Roberto Domínguez Casalá, por haber creado la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (U.I.B.R.)

A los sinodales por sus excelentes recomendaciones, de igual forma a todos los investigadores que integran la U.I.B.R., y al personal del Bioterio de la FES-Zaragoza.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, a la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción y en especial al Laboratorio de Neuroendocrinología por su apoyo académico y financiero

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Localización de las neuronas GnRHérgicas	2
Síntesis y liberación de la GnRH	4
Síntesis y liberación de las gonadotropinas	6
Secreción preovulatoria de los estrógenos	9
El papel del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas	10
Papel del sistema colinérgico en área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA)	12
Planteamiento del problema	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO	15
MATERIALES Y MÉTODO	16
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	27
Comportamiento del sistema colinérgico aferente a POA-AHA a las 13.00 horas	27
Diestro-1 (Modelo 1)	27
Diestro-2 (Modelo 2)	30
Proestro (Modelo 3)	32
Estro (Modelo 4)	34
Asimetría del sistema colinérgico en POA-AHA durante el ciclo estral	36
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	40

RESUMEN

Everett y colaboradores (1949) dieron la primera evidencia de que el sistema colinérgico está involucrado en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación. La forma de participación de este sistema es distinta en cada día del ciclo estral y a diferentes horas del día (Dominguez y col., 1981). Además, a la fecha sabemos que la participación de los receptores muscarínicos que se localizan en el área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) en la regulación de los mecanismos neuroendocrinos que culminan en la ovulación, es asimétrica (Cruz y col., 1989, 1992). Los resultados de la actividad colinérgica de POA-AHA, por medio de la cuantificación de la actividad de la Colino-Acetil-Transferasa (CAT enzima que sintetiza acetilcolina), de la enzima Acetil-colino-esterasa (ACHE enzima que degrada al neurotransmisor), así como la cantidad de receptores a acetilcolina (Sanchez y col., 1994, Cruz y col., 1990, Sánchez, 1996), lleva a pensar que el propio sistema colinérgico funciona de forma asimétrica, y que dicha función cambia durante el ciclo estral.

Con la finalidad de añadir más datos que apoyen la hipótesis de que la actividad del sistema colinérgico de POA-AHA, relacionada con los procesos neuroendocrinos que culminan con la ovulación es asimétrica y varía durante el ciclo estral, se decidió cuantificar el contenido de acetilcolina (ACh) en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA a lo largo del ciclo estral.

La concentración de ACh (nM/g tejido) en POA-AHA varía durante el ciclo estral, los valores más altos se observaron en el día del Diestro-1 (2.700 ± 0.335) y los mínimos en el día del Diestro-2 (indetectables). Además, la concentración de ACh en uno y otro lado de POA-AHA, es asimétrica en los días del Diestro-1 y del Proestro. En ambos días, el lado derecho tiene una concentración mayor de ACh que el izquierdo (Diestro-1 1.772 ± 0.279 vs 0.929 ± 0.132 , Proestro 0.751 ± 0.179 vs 0.328 ± 0.058 , $p < 0.05$).

Durante el proestro, día del ciclo estral en el que ocurre la secreción fásica de estradiol y de las gonadotropinas, la concentración de ACh varía entre las 09:00, 13:00 y 17:00 horas, permanece alta en las dos primeras horas y cae a las 17:00. En este momento del día, la concentración de ACh en uno y otro lado de POA-AHA es similar (0.260 ± 0.053 vs 0.393 ± 0.138). En cambio, a las 09:00 h hay más ACh del lado izquierdo de POA-AHA (0.633 ± 0.155 vs 0.350 ± 0.073 , $p < 0.05$), comportamiento que se invierte a las 13:00 h (0.328 ± 0.058 vs 0.751 ± 0.179 , $p < 0.05$).

Los resultados de este estudio nos llevan concluir que la concentración de ACh en POA-AHA es asimétrica y cambia durante el ciclo estral, hechos que apoyan la hipótesis de que la actividad neural de las aferencias colinérgicas de POA-AHA que regulan la secreción de las gonadotropinas y la ovulación es asimétrica y varía durante el ciclo estral.

Considerando los resultados obtenidos hasta la fecha, en este trabajo se plantearon diferentes modelos sobre el comportamiento del sistema colinérgico de POA-AHA en cada día del ciclo estral, así como para el día del proestro a diferentes horas del día.

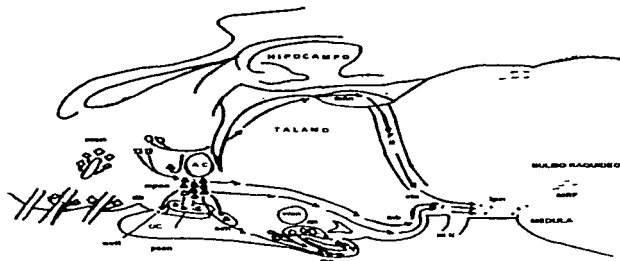
INTRODUCCIÓN

La ovulación es la culminación de una serie de eventos neuroendócrinos en los que participan de manera sincrónica tres estructuras: el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios.

En el hipotálamo, específicamente en el área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) se localizan las neuronas (GnRHérgicas) que sintetizan el decapeptido denominado hormona estimulante de la liberación de las gonadotropinas (GnRH, de sus siglas en inglés: Gonadotropin Releasing Hormone), el cual es responsable de la secreción fásica de las dos gonadotropinas que regulan la ovulación (Conn, 1993)

Las neuronas GnRHérgicas se encuentran en diferentes áreas del sistema nervioso central como redes extensas y difusas. La red más importante, por su participación directa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, está constituida por neuronas que forman un continuo desde la banda diagonal de Broca hasta el área septal (que incluye el núcleo septal triangular y medial), el núcleo de la estria terminal y las áreas diencefálicas que abarca al núcleo periventricular, las áreas preóptica medial y lateral, al área hipotalámica anterior y la zona retroquiasmática. También forman parte de este continuo, grupos de neuronas GnRHérgicas del hipotálamo lateral y del núcleo supraóptico.

Las neuronas GnRHérgicas proyectan sus fibras hacia la eminencia media por la ruta septo-preóptica-infundibular y la del haz terminal septo-preóptico (Silverman, 1988) [Esquema 1].



Esquema 1.- Localización de las neuronas GnRHérgicas y sus principales proyecciones. Corte longitudinal del cerebro de cobaya.

Símbolo geométrico: neurona GnRHérgica

Flechas: dirección de las fibras

Asterisco: terminales nerviosas

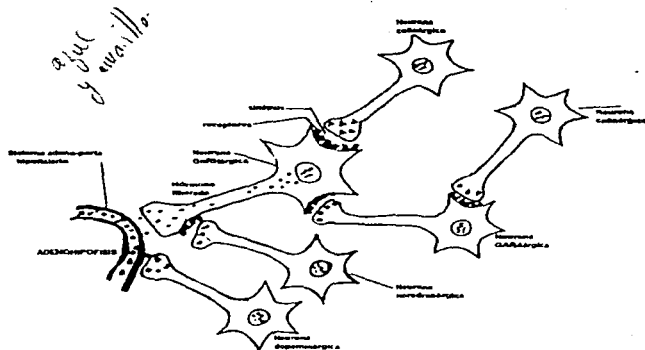
AC: comisura anterior; an: núcleo arcuato; db: banda diagonal de Broca
fr: fascículo retroflexo; ipn: núcleo interperpendicular; mb: cuerpos
mamilares; me: eminencia media; mhn: habénula medial; npoa: área
preóptica medial; msn: septo medial; OC: quiasma óptico; ovt: órg.
vasc. de la lámina terminal; pacn: área tegmental ventral; III N: nervio
oculomotor (Modificado de Silverman, 1988).

La síntesis y la liberación de la GnRH está modulada por:

- Hormonas esteroides (estradiol, progesterona)
- Aminoácidos (ácido glutámico, ácido gama amino butírico o GABA)
- Indolaminas (serotonina, melatonina)
- Acetilcolina
- Catecolaminas (noradrenalina, dopamina, adrenalina)
- Péptidos: sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo VIP, el neuropéptido Y, la angiotensina II, encefalinas, opioides, el neuropéptido K, entre otros (Crowley y Kalra, 1989, Conn, 1993)

Las neuronas GnRHérgicas no tienen receptores nucleares a estrógenos (Shivers y col., 1983); hecho que permite sugerir que los estrógenos no actúan directamente sobre las neuronas GnRHérgicas, sino que estimulan la secreción fásica de la GnRH al actuar en otro tipo de neuronas, que hacen sinápsis con la neurona GnRHérgica y afectan su actividad (Silverman, 1988) [Esquema 2].

2



ESQUEMA 2.- Posibles interacciones neurales por medio de las cuales los neurotransmisores podrían regular la liberación de la GnRH y las gonadotropinas. (Modificado de Brown, 1994)

Después de que la GnRH es sintetizada en el hipotálamo y es liberada al sistema adeno-porta-hipofisiario, llega a la adenohipófisis donde estimula la secreción fásica de la hormona luteinizante (LH; de sus siglas en inglés: Luteinizing Hormone) y en menor proporción la de la hormona estimulante de los folículos (FSH; de sus siglas en inglés: Follicular Stimulating Hormone) por los gonadotropos (Conn, 1993)

La secreción fásica o preovulatoria de dichas gonadotropinas es el resultado de dos eventos que ocurren simultáneamente:

1) Aumento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de secreción de las neuronas GnRHérgicas, lo que provoca que aumente la concentración de la GnRH en la sangre del sistema portal

2) Efecto de imprimación (impresión) de la GnRH: que es el aumento progresivo de la sensibilidad de los gonadotropos a dicha hormona (Conn, 1993).

La FSH y la LH son transportadas por el torrente sanguíneo hacia el ovario. La unidad anátomo-funcional de la gónada son los folículos. A partir de los cuales se originan sus tres compartimientos: el folicular, el luteal y el intersticial.

En el folículo del ovario se secretan 17β -estradiol y estrona, en proporciones que varían durante el ciclo estral. En la síntesis de los estrógenos participan principalmente dos tipos de células foliculares y dos hormonas:

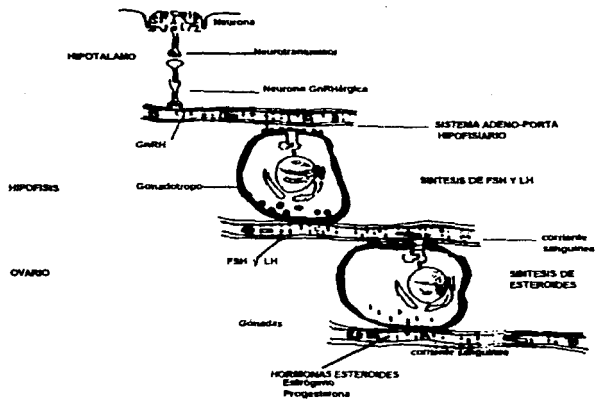
1) las células de la teca interna, sobre las que la LH regula la síntesis de los estrógenos al estimular la producción de andrógenos a partir del colesterol y, al regular la actividad de la enzima aromatasas en las células de las granulosa, y

2) las células de la granulosa, en las que la FSH estimula la aromatización de los andrógenos a estrógenos al actuar sobre la actividad de la enzima aromatasas (la cual también es regulada por la LH) (Conn, 1993; Domínguez y col., 1991, Erickson, 1982; Gore-Langton y Armstrong, 1988) [Esquema 3]

Además de las hormonas esteroideas, el ovario sintetiza y secreta péptidos con actividad hormonal como la inhibina, el factor inhibidor del ovocito, el factor inhibidor de la unión de la FSH a sus receptores, la hormona inhibidora de la luteinización y la gonadotropina (GnRH ovárico) (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

El crecimiento y la maduración de los folículos ováricos es regulado por gran cantidad de hormonas y péptidos como son: GnRH, oxitocina, factor de crecimiento epidérmico, vasopresina, corticoides, noradrenalina, prostaglandina E₂, prolactina, entre otros (Domínguez y col, 1991).

(7)



ESQUEMA 3.- EJE HIPOTALAMO-HIPÓFISIS-GÓNADA
(ver texto) (Modificado de Brown, 1994)

Se ha demostrado que los estrógenos alcanzan su máxima concentración en la sangre antes de que ocurra la secreción fásica de la LH (Erickson, 1982); fenómeno que se conoce como secreción preovulatoria de estrógenos, que es el primer evento del proceso en "cascada" que culmina con la ovulación (Freeman, 1993).

La secreción preovulatoria de los estrógenos es esencial para iniciar y mantener la respuesta de la hipófisis a la GnRH, la cual aumenta progresivamente hasta un momento dado, proceso en el que la progesterona actúa sinérgicamente (Erickson, 1982)

La secreción preovulatoria de estrógenos estimula la secreción fásica o preovulatoria de la GnRH e incrementa la sensibilidad de la hipófisis a esta hormona (Conn, 1993)

En la rata, la secreción preovulatoria de la FSH ocurre aproximadamente once horas después que la de la LH. Esta disociación entre las dos gonadotropinas puede ser el resultado de los siguientes factores:

- 1) Que exista una hormona que estimule en forma específica, la secreción de la FSH.
- 2) Que los esteroides, la inhibina y otros factores alteren en forma diferencial la respuesta de los gonadotropos a la GnRH.

3) Que la secreción de la LH, pero no la de FSH, dependa de que la hipófisis esté expuesta a la GnRH minuto a minuto, mientras que la secreción de la FSH sea iniciada por la GnRH y luego sea independiente de ella (Conn,1993).

EL PAPEL DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LAS GONADOTROPINAS.

Desde la década de los cuarentas, Everett y colaboradores (1949), mostraron que el sistema colinérgico participa de manera estimulante, en la regulación de la secreción preovulatoria de la LH que ocurre en el día del proestro, al observar que la inyección subcutánea de 700 mg/kg de sulfato de atropina, bloqueaba la ovulación esperada en la mañana del día siguiente. Además, observaron que esta dosis de atropina sólo era efectiva cuando se administraba entre las 14:00 y 16:00 horas de este día del ciclo, intervalo que denominaron "período crítico" en la regulación de la secreción de la LH

Se ha sugerido que la liberación fásica de la GnRH ocurre al estimular los receptores muscarínicos, ya que al coincubar la hipófisis con fragmentos de hipotálamo, la adición de acetilcolina al medio, estimula la liberación de la FSH y de la LH. Efecto que es bloqueado por la atropina (Fiorindo y Martini,1975; Simonovic y col., 1974).

En cambio, los receptores nicotínicos regulan de manera inhibitoria la liberación preovulatoria de la LH, ya que la administración subcutánea de nicotina a ratas durante el "período crítico" del proestro, suspende la liberación de la LH pero no la de la FSH. Bajo estas mismas condiciones experimentales, la administración de GnRH estimula la liberación de la LH pero no la de la FSH (Blake, 1974).

Tanto en POA-AHA como en la adenohipófisis, la afinidad de los receptores muscarínicos por la acetilcolina varía durante el ciclo estral, siendo mayor en el día del proestro (Avisar y col., 1981a, 1981b ; Mukherjee y col. 1980). La estimulación del sistema colinérgico, por la administración de fármacos colinomiméticos estimulan la división mitótica de los gonadotropos que sintetizan LH (Ruiz de Galarreta y col., 1981).

Domínguez y colaboradores (1982) mostraron que el grado de participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas es diferente en cada día del ciclo estral, ya que la dosis de atropina (antagonista muscarínico) necesaria para bloquear el 100% de los animales tratados, también depende del día del ciclo estral. Así, en el día del proestro se requiere de 300 mg/kg, en el diestro 1 y diestro 2, de 100 mg/kg y en el diestro de 700 mg/kg. Además, mostraron que la participación del sistema colinérgico no sólo depende del día del ciclo, sino de la hora del día, ya que la

administración de la dosis mínima efectiva (100 mg/kg) a diferentes horas de cada día del ciclo estral, interrumpe la ovulación de los animales en diferente proporción, según la hora y el día del ciclo que se considere.

Se ha sugerido que el sistema colinérgico está involucrado en el control de la liberación de la GnRH, ya que en estudios *in vitro*, donde se incubó la eminencia media de ratas que fueron sacrificadas en diferentes días del ciclo estral, la adición de atropina, induce la liberación de GnRH al medio de cultivo. Este efecto varía durante el ciclo estral, siendo mayor el efecto en el día del estro y menor en los días del diestro (Koren y col, 1992).

En cambio, en POA-AHA el sistema colinérgico parece jugar un papel estimulante en la secreción de la GnRH, el cual varía durante el ciclo estral y el lado afectado (izquierdo o derecho de POA-AHA) (Cruz y col, 1989).

En el día del estro, el implante de atropina en el lado derecho de POA-AHA bloquea la ovulación de todos los animales tratados, y no se afecta cuando el implante se coloca en el lado izquierdo. En el día del diestro 1, la mayoría de los animales no ovulan al colocarles el implante del lado izquierdo o del lado derecho. En el día del diestro 2, el implante del lado izquierdo bloquea la ovulación y no la afecta el implante del lado derecho. Los implantes colocados en el día del proestro no modificaron la ovulación.

La estimulación del sistema colinérgico, por medio del implante de pilocarpina, del lado derecho de POA-AHA en el día del estro, no modifica la ovulación, en tanto que el del lado izquierdo la bloquea. En los días de diestro, la estimulación unilateral del sistema colinérgico bloquea la ovulación en la mayoría de los animales tratados. En el proestro, el implante de pilocarpina del lado derecho bloquea la ovulación y no la afecta el implante del lado izquierdo (López, 1994).

Es posible que esta respuesta o comportamiento asimétrico que tiene el sistema colinérgico sobre la función de las neuronas de POA-AHA, esté vinculado con diferencias anatómicas, morfológicas o bioquímicas del propio sistema colinérgico que se localiza en esta área, ya que se ha mostrado que la actividad de la enzima que sintetiza a la acetilcolina llamada Colino-Acetil-Transferasa (CAT) en el lado derecho de POA-AHA varía durante el ciclo estral y es significativamente diferente con respecto a la del lado opuesto, en los días del estro y diestro 2 (Sánchez y col., 1994)

La actividad funcional del sistema colinérgico (medida por la actividad de la CAT, por el contenido o la liberación de la ACh y por la densidad o la afinidad de sus receptores), está regulada por las hormonas esteroideas (Lapchak y col., 1990). La ovariectomía aumenta el número de receptores muscarínicos en POA-AHA, efecto que es revertido por la administración de

estradiol. Estos resultados llevan a sugerir que la actividad del sistema colinérgico de POA-AHA depende, en parte, de las concentraciones sanguíneas de estrógenos. De tal forma que este sistema participaría durante los primeros días del ciclo estral (estro, diestro-1 y diestro-2) estimulando la ovulación. No participaría durante el proestro, ya que en la mañana de este día, las concentraciones plasmáticas de estrógenos alcanzan su máximo (Sánchez, 1996).

Considerando la información antes señalada, se plantea la siguiente pregunta: ¿Existen diferencias anatómo-funcionales en POA-AHA que expliquen por qué el sistema colinérgico de esta región regula en forma asimétrica la secreción de las gonadotropinas y la ovulación?

Una de las posibles interpretaciones al respecto sería que la cantidad o el contenido del neurotransmisor, entre uno y otro lado de POA-AHA fuese diferente.

Por lo que, en este proyecto se decidió analizar si la función asimétrica que ejerce el sistema colinérgico en POA-AHA sobre la ovulación, es consecuencia de diferencias intrínsecas del propio sistema neuromodulador, para lo cual se cuantificó la concentración de ACh en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA durante el ciclo estral.

(5)

HIPÓTESIS

Dado que la falta de ovulación al bloquear parte de los receptores colinérgicos en POA-AHA se correlaciona con cambios en la actividad de la colino-acetil-transferasa, entonces el contenido de ACh también variará durante el ciclo estral. Además, estas variaciones serán asimétricas y semejantes a las observadas para la enzima.

OBJETIVOS

- Cuantificar la concentración de ACh en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA en diferentes horas del ciclo estral.
- Correlacionar los resultados obtenidos del contenido de ACh con los efectos del bloqueo o la estimulación de los receptores muscarínicos y la falta de ovulación.

1

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa C57BL/6J (190-230 g), mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso al alimento y al agua.

Los animales se mantuvieron en grupos de seis por caja y se les realizó el estudio del ciclo estral por la toma diaria de frotis vaginales. Sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración.

Procedimiento de autopsia

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación a las 13:00 hrs de los días del estro, diestro-1 y diestro-2, y a las 9:00, 13:00 y 17:00 horas del día del proestro. Inmediatamente después de la decapitación, se extrajo el cerebro y se colocó en un horno de microondas, para ser expuesto a 6kW/4seg, con la finalidad de inhibir a la AChE (enzima de degradación de la ACh).

Posteriormente, el cerebro se sumergió en una solución fría de fosfatos (0.02 M, pH 5.3) durante cinco minutos aproximadamente, y después se colocó en posición ventral sobre una cama fría (lámina de acero inoxidable con papel filtro, bajo la cual se colocó hielo seco), para disecar el lado derecho e

izquierdo de POA-AHA por la técnica propuesta por Palkovitz (1973). El procedimiento consistió de los siguientes pasos:

Con la ayuda de un sistema de navajas colocadas a una distancia que asegura un corte coronal del ancho de POA-AHA (según coordenadas de König y Klippel, 1963), se obtuvo el área de estudio, la cual se separó en sus porciones derecha e izquierda, con un sacabocado de 1 mm de diámetro.

El tejido se guardó en nitrógeno líquido durante aproximadamente 15 minutos, para neutralizar cualquier remanente de la enzima AChE que no hubiese sido bloqueada por la irradiación con microondas.

Procesamiento del tejido fresco para la cuantificación de ACh.

El tejido se pesó en una balanza analítica con precisión de 0.1 mg, se homogeneizó en un mililitro de solución de fosfato de sodio al 0.02M, pH 5.3, y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a -4° C. El sobrenadante se colectó y se filtró en una membrana Millipore con poro de 0.45 μ m, el filtrado obtenido se mantuvo en un tubo eppendorf en frío.

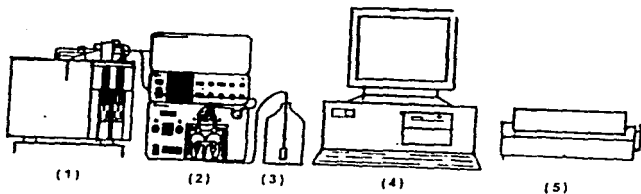
Cuantificación de ACh

La cuantificación de ACh se realizó por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés: High Pressure Liquid Chromatography): método que permite separar y distribuir los componentes de una mezcla, en dos fases (una estacionaria y otra móvil) (McNain, 1991; Yost y col, 1980).

Se utilizó un equipo (Perkin-Elmer) constituido por una bomba isocrática digital, un graficador, un inyector con una capacidad de 20 μ l de muestra y un detector electroquímico BAS LC-44 (ajustado a 10 nA) [Esquema 4] .

El detector electroquímico estaba equipado con un electrodo de platino (electrodo de trabajo potencial de oxidación =+ 0.5 V) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

El sistema de columnas empleado estaba constituido por una columna polimérica que se ensambla a un reactor enzimático del mismo material que la columna. La función de este sistema fue la de separar a la ACh de su metabolito colina (Ch). Al pasar la muestra por el reactor enzimático, se llevó a cabo una catálisis enzimática que convirtió a los compuestos (ACh y Ch) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y betaina. El H_2O_2 es un compuesto que se oxida fácilmente así que este fue detectado rápidamente por el electrodo de platino.



ESQUEMA 4.- EQUIPO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (Tomado del catalogo BAS, 1994). COMPONENTES: 1.- BOMBA ISOCRÁTICA, 2.- DETECTOR ELECTROQUÍMICO, 3.- RECPETÁCULO PARA FASE MÓVIL, 4.- INTEGRADOR, 5.- IMPRESORA

La fase móvil utilizada contenía trisbase (0.05 M), fosfato de sodio (0.05 M) y como agente antibacteriano, reactivo de Kathon. El pH de la fase móvil fue ajustado a 8.5 con hidróxido de sodio concentrado.

Los estándares utilizados se prepararon a partir de dos soluciones stock, una de ACh (2.00 mM) y otra de Ch (2.00 mM), empleándose ácido acético glacial (2.00 mM) como diluyente

De cada una de estas soluciones stock se tomaron 0.05 ml y se diluyeron en 10 ml. Por último, de ésta segunda solución se tomaron 50 μ l para ser diluidos en 1 ml (2500 nM), esta solución fué la empleada como estándar. La sensibilidad del método estuvo por encima de los femtomoles (fM).

Después de que el equipo fue estabilizado, la muestra filtrada se inyectó al detector electroquímico. Los datos obtenidos se considerarán como la cantidad de ACh en POA-AHA (nM de ACh), la concentración del neurotransmisor se obtuvo al considerar esa cantidad por gramo de tejido (nM / g de tejido).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del contenido de ACh en los diferentes días del ciclo estral se analizaron por medio de una ANDEVA, seguida de la prueba de tukey. Para los casos en que se comparó el contenido de ACh entre el lado derecho e izquierdo de POA-AHA, se utilizó la prueba de *t* de Student. Se aceptaron como válidas aquellas diferencias menores o iguales al 5%.

RESULTADOS**Concentración de ACh en POA-AHA durante el ciclo estral.**

La concentración de ACh en POA-AHA varió durante el ciclo estral: los valores más altos se observaron en el día del Diestro-1 y los mínimos en el diestro-2 (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. de la concentración de ACh en POA-AHA a las 13:00 h. de cada día del ciclo estral de la rata adulta.

Día del ciclo	n	Concentración (nM/g tejido)
Estro	12	0.409 \pm 0.043 Δ
Diestro-1	14	2.700 \pm 0.335*
Diestro-2	14	Indetectable \emptyset
Proestro	14	1.078 \pm 0.163

* $p < 0.05$ vs los otros días del ciclo, Δ $p < 0.01$ vs el proestro (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

\emptyset concentraciones por debajo de la sensibilidad del método

Concentración de ACh en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA durante el ciclo estral.

En ambos lados de POA-AHA, la concentración de ACh varió durante el ciclo estral. En el lado izquierdo de POA-AHA la concentración de ACh fue menor que en el derecho, siendo significativa esta diferencia en los días del diestro-1 y del proestro (Tabla 2 y Fig. 1).

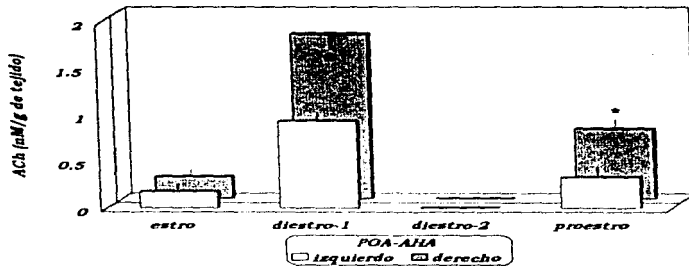
Tabla 2. Media \pm e.e.m. de las concentraciones (nM/g de tejido) de ACh en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA durante el ciclo estral a las 13:00 h.

Día del ciclo	n	Lado derecho de POA-AHA	n	Lado izquierdo de POA-AHA
Estro	6	0.237 \pm 0.032	6	0.173 \pm 0.022
Diestro-1	7	1.772 \pm 0.279*	7	0.929 \pm 0.132*
Diestro-2	7	Indetectable \emptyset	7	Indetectable \emptyset
Proestro	7	0.751 \pm 0.751	7	0.328 \pm 0.058

* $p < 0.05$ vs los otros días del ciclo

\emptyset concentraciones por debajo de la sensibilidad del método

Fig. 1.- Diferencias en la concentración de ACh en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA durante el ciclo estral a las 13:00 h.



* $p < 0.05$ vs lado izquierdo de POA-AHA (prueba t de Student)

Concentración de ACh en POA-AHA a diferentes horas del día del proestro.

Durante el día del proestro, no se observaron diferencias significativas en la concentración de ACh en ambos lados de POA-AHA (Tabla 3).

Tabla 3 Media \pm e.e.m. de la concentración de ACh en POA-AHA durante el día del proestro.

Horas del día	n	Concentración (nM/g tejido)
09:00	6	0.983 ± 0.178
13:00	14	1.078 ± 0.163
17:00	10	0.652 ± 0.113

ANDEVA seguida de la prueba de Tukey

Concentración de ACh en el lado derecho e izquierdo de POA-AHA a diferentes horas del día del proestro.

Cuando se analizó la concentración de ACh en el día del proestro en función del lado de POA-AHA, observamos que tanto en el lado izquierdo como en el derecho, ésta varía a lo largo del día (Tabla 4). En el lado izquierdo, la máxima concentración de ACh se observó a las 09:00 y la mínima a las 17:00 h. En tanto que en el lado derecho, la mayor concentración del neurotransmisor se observó a las 13:00 h.

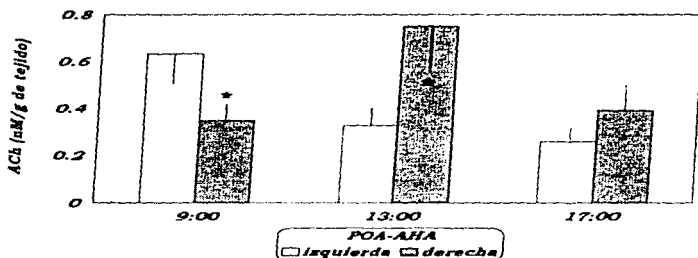
Tabla 4. Media \pm e.e.m. de la concentración de ACh (nM/g tejido) en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA a diferentes horas del proestro.

Lado de POA-AHA	09:00	13:00	17:00
Izquierdo	0.633 \pm 0.155	0.328 \pm 0.038*	0.280 \pm 0.053 *
Derecho	0.350 \pm 0.073	0.751 \pm 0.179*	0.393 \pm 0.138*

* $p < 0.05$ vs 09:00 h (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Así que, a las 09:00 h del día del proestro, el lado izquierdo de POA-AHA tuvo más ACh que el lado derecho; a las 13:00, la mayor concentración se observó en el lado derecho, y a las 17:00 h la concentración del neurotransmisor fue semejante en uno y otro lado de POA-AHA (Fig 2).

Fig. 2.- Diferencias en la concentración de ACh en los lados derecho e izquierdo de POA-AHA durante el día del proestro



* $p < 0.05$ vs lado izquierdo de POA-AHA (Prueba t de Student)

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que la actividad del sistema colinérgico aferente a POA-AHA varía durante el ciclo estral y es diferente entre sus lados izquierdo y derecho

Asimismo, se correlacionan con los resultados obtenidos por Dominguez y col. (1982) en cuanto a los efectos de la administración subcutánea de sulfato de atropina (antagonista colinérgico) sobre la ovulación de la rata adulta

Si analizamos los resultados obtenidos en este estudio acerca de la concentración de ACh en POA-AHA a lo largo del ciclo estral, y los observados por otros investigadores (Dominguez y col., 1982, Cruz y col., 1989, 1990, 1992, López, 1994, Sánchez y col., 1994, Sánchez, 1996) podemos plantear los siguientes modelos acerca del comportamiento del sistema colinérgico de POA-AHA vinculado con los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación en la rata adulta, durante el ciclo estral

1.- COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA COLINÉRGICO AFERENTE A POA-AHA A LAS 13:00 HORAS DE CADA DÍA DEL CICLO ESTRAL.

1.1 DIESTRO-1 (MODELO 1)

En el día del diestro-1, las aferencias colinérgicas vinculadas con los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación, parecerían estar "estáticos", ya que tanto la inhibición de los receptores muscarínicos (Cruz

y col, 1989) como su estimulación (López, 1994) provocan el bloqueo de la ovulación. Estos resultados llevan a sugerir que el sistema colinérgico no estaría regulado por otros sistemas de neuromodulación




En este día la concentración de ACh en POA-AHA es la máxima detectada durante el ciclo estral. Sin embargo, la actividad de la CAT (Sánchez y col., 1994) es baja, por lo que podemos pensar que el neurotransmisor que se va sintetizando, estaría siendo almacenando y quizá estaría siendo liberado lentamente. Al respecto, Cruz y col., (1990) mostraron que la actividad de la enzima AChE disminuye progresivamente desde el día del estro al proestro

Por otra parte, Sánchez (1996) observó que la máxima capacidad de unión (B_{max}) de la [3H]-n-metilescopolamina (agonista colinérgico) en membranas de POA-AHA se observa en el día del estro, mientras que la mínima ocurre en el proestro.

El modelo planteado para este día del ciclo estaría apoyado por los resultados obtenidos por Domínguez y col. (1982), quienes mostraron que se requiere de sólo 100 mg/kg peso de sulfato de atropina para bloquear la ovulación de todos los animales tratados.

**MODELO 1.-
SINÁPSIS COLINÉRGICA
EN POA-AHA A LAS
13:00 h. Diestro- 1**



		CANTIDAD
CAT		57.9 nM/mg proteína/ h-1
ACHE		12.6 nM/mg tejido
B-max		6.6 nM/mg proteína
Kd		1.69 nM
ACh		2.700 nM

Bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales: 100 mg/kg de sulfato de atropina.

(Datos tomados de Domínguez y col, 1982; Cruz y col., 1990; Sánchez y col., 1994, 1996 y los obtenidos en este trabajo).

1.2.- DIESTRO-2 (MODELO 2)

En el día del diestro-2, la actividad del sistema colinérgico parecería estar "apagado ó inactivo", ya que :

1) la concentración de ACh es casi nula (concentraciones por debajo de la sensibilidad del método utilizado),



2) la actividad de la CAT es la más baja observada durante el ciclo estral (Sánchez y col., 1994),

3) tanto la actividad de la AChE (Cruz y col., 1990) como la B_{max} de la [3 H]-n-metilescopolamina (Sánchez, 1996), presentan valores más bajos que los observados en el día del diestro 1.

4) se requiere inyectar la dosis mínima efectiva para bloquear la ovulación en el 100% de los animales tratados con sulfato de atropina (Dominguez y col. (1982).

**MODELO 2.-
 SINÁPSIS COLINÉRGICA
 EN POA-AHA A LAS
 13:00 h. Diestro- 2**



		CANTIDAD
CAT		49.0nM/mg proteína/ h-1
AChE		11.1nM/mg tejido
B-max		5.8 nM/mg proteína
Kd		1.08 nM
ACh	•	indetectable

Bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales: 100 mg/kg de sulfato de atropina.

(Datos tomados de Domínguez y col., 1982; Cruz y col., 1990; Sánchez y col., 1994, 1996 y los obtenidos en este trabajo).

1.3.- PROESTRO (MODELO 3)




Según Domínguez y col. (1982), en el día del proestro, el sistema colinérgico parecería participar de forma muy importante en la regulación de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación, ya que necesitaron inyectar 700 mg/kg peso de sulfato de atropina para bloquear la ovulación. Nuestros resultados apoyan esta idea.

En este día del ciclo la actividad de la CAT es alta, lo que se refleja en una mayor concentración de ACh (respecto al día anterior), la cual no estaría siendo liberada de forma activa, ya que tanto la actividad de la enzima de degradación (Cruz y col., 1990) como la B_{max} de la [3 H]-n-metilescopolamina (Sánchez, 1996) son las más bajas detectadas durante el ciclo estral.

Luego entonces, surge la pregunta: ¿Por qué se requiere de una dosis tan alta de sulfato de atropina para bloquear la ovulación? La respuesta se apoyaría en el hecho de que esos pocos receptores tuviesen una afinidad muy alta para el neurotransmisor. Se ha mostrado que la constante de disociación de los receptores muscarínicos en POA-AHA es muy baja (Sánchez, 1996), lo que significaría que la constante de afinidad de dichos receptores sería muy alta.

**MODELO 3.-
SINÁPSIS COLINÉRGICA
EN POA-AHA A LAS
13:00 h. Proestro**



		CANTIDAD
CAT		61.0 nM/mg proteína/ h-1
AChE		10.3 nM/mg tejido
B-max		2.1 nM/mg proteína
Kd		0.46 nM
ACh		1.078 nM

Bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales: 700 mg/kg de sulfato de atropina.

(Datos tomados de Domínguez y col.,1982; Cruz y col., 1990; Sánchez y col., 1994,1996 y los obtenidos en este trabajo).

1.4.- ESTRO (MODELO 4)

En este día del ciclo, el sistema colinérgico de POA-AHA parecería estar muy activo, ya que la actividad de la CAT es la más alta respecto a los otros días del ciclo (Sánchez y col., 1994). Sin embargo, la concentración del neurotransmisor es relativamente baja.

Estos hechos nos llevan a sugerir que la ACh que se sintetizaría, se liberaría y se degradaría rápidamente, por tanto, la que se cuantifica, es la que aún se encuentra en las vesículas de las terminales colinérgicas. Este modelo, respondería al hecho de cuantificar poca ACh respecto al día del diestro 1.




Otros resultados que apoyan nuestro modelo son los siguientes:

1). tanto la actividad de la AChE (Cruz y col., 1990) como la B_{max} de la [3 H]-n-metilescopolamina (Sánchez, 1996) son las más altas durante el ciclo estral.

2). la constante de disociación de los receptores muscarínicos en POA-AHA es muy elevada (Sánchez, 1996), lo que sugiere que la afinidad de dichos receptores sería considerable, lo que nos ayudaría a explicar la necesidad de inyectar 300 mg/kg peso de sulfato de atropina para bloquear la ovulación (Dominguez y col., 1982).

**MODELO 4.-
SINÁPSIS COLINÉRGICA
EN POA-AHA A LAS
13:00 h. Estro**



		CANTIDAD
CAT		76.3 nM/mg proteina/ h-1
AChE		12.9 nM/mg tejido
B-max		8.0 nM/mg proteina
Kd		1.99 nM
ACh		0.409 nM

Bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales: 300 mg/kg de sulfato de atropina.

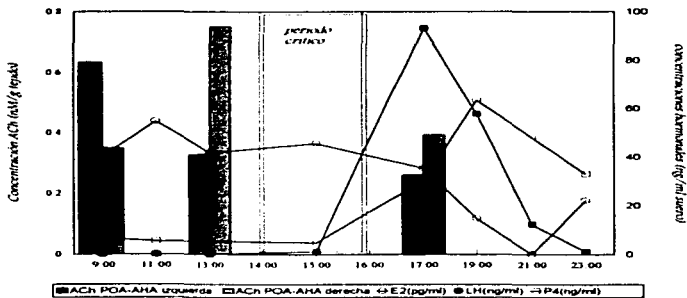
(Datos tomados de Domínguez y col., 1982; Cruz y col., 1990; Sánchez y col., 1984, 1996 y los obtenidos en este trabajo).

2.- ASIMETRIA DEL SISTEMA COLINERGICO EN POA-AHA DURANTE EL CICLO ESTRAL.

Durante el día del proestro, la concentración de acetilcolina en POA-AHA parece coincidir con el "período crítico" (14:00 a 16:00 h) en la secreción fásica de las gonadotropinas propuesto por Everett y col. (1949). A las 13:00 h la concentración de ACh en POA-AHA es máxima, y disminuye en el momento de la secreción preovulatoria de la LH (es decir, a las 17:00 h [Dominguez-González y col., 1996]). Estos resultados nos llevan a corroborar la idea que el sistema colinérgico de POA-AHA tendría un papel estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación, de tal forma que el bloqueo del mismo entre las 14.00 y 16.00 horas detiene estos mecanismos. Los resultados obtenidos en la presente tesis son semejantes a los previamente observados por Egozi y col (1986).

Durante la mañana y la tarde del día del proestro, la participación del sistema colinérgico en la regulación de los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación parece ser asimétrica y consecutiva: primero parece ser más activo el lado izquierdo de POA-AHA (09:00 h) y después el derecho (13:00 h). Pasado el "período crítico", la concentración de ACh es semejante en ambos lados de POA-AHA (Fig. 3).

Fig 3.- Asociación de los cambios en la concentración de ACh en el lado izquierdo y derecho de POA-AHA, con las variaciones en la concentración plasmática de estradiol* (E2), LH y progesterona* (P4) a diferentes horas del día del preestro.



* datos tomados de Domínguez-González y col, 1996

DISCUSION

Tomando en consideración estos resultados, podemos sugerir que en el día del proestro, la actividad colinérgica de POA-AHA vinculada con los procesos neuroendócrinos que finalizan en la ovulación, sería una de las señales esenciales en la secreción de la GnRH y las gonadotropinas.

CONCLUSIONES

- La concentración de ACh en el área preóptica-hipotalámica anterior varía durante el ciclo estral y es diferente entre el lado izquierdo y derecho.
- La actividad neural de las aferencias colinérgicas de POA-AHA es asimétrica y varía durante el ciclo estral

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

- AVISSAR, S., EGOZI, Y y SOKOLOVSKY, M. (1981 a) *Studies on muscarinic receptors in mouse and rat hypothalamus: a comparison of sex and cyclical differences* *Neuroendocrinology* 32: 295-302
- AVISSAR, S., EGOZI, Y y SOKOLOVSKY, M. (1981 b). *Biochemical characterization and sex dimorphism of muscarinic receptors in rat adenohypophysis* *Neuroendocrinology* 32: 203-309
- BLAKE, C.A. (1974). *Parallelism and divergence in luteinizing hormone and follicle stimulating hormone release in nicotine-treated rats.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 145 716-720
- BROWN, R.E. (1994) *Neurotransmitter control of hypothalamic, pituitary and other hormones. An introduction to neuroendocrinology* *Capítulo 6. Cambridge University Press Gran Bretaña* p p 88-112
- CONN, P.M. (1993) *The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary* *The Physiology of Reproduction. Capítulo 32, Ed. E. Knobil y J. Neill, et al. Raven Press, Ltd. Nueva York, p.p. 1349-1377*
- CROWLEY, W.R y KALRA, S.P. (1989) *Regulation of preovulatory luteinizing hormone secretion by ovarian hormone- monoamine-neuro-peptide interactions in the rat.* *En: Neural Control of Reproductive Function. Ed. J.M. Lakoski, J.R. Pérez-Polo y D.K. Rassin Alan R. Liss, Inc., Nueva York, p.p. 79-93*

- CRUZ, M.E., JARAMILLO, L.P., DOMÍNGUEZ, R. (1989) Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat *Brain Research Bull.* 24:739-742
- CRUZ, M.E., CHÁVEZ, R., ROSAS, P., LUJAMBIO, V.M., MORÁN, J.L. y DOMÍNGUEZ, R. (1990). Diurnal changes in hypothalamic acetylcholinesterase activity during the oestrus cycle of the rat *Med Sci Res.* 18: 137-138
- CRUZ, M.E., CASTRO, J., DOMÍNGUEZ, R. (1992) A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovanectomized adult rats *J of Endoc.* 133: 205-210.
- DOMÍNGUEZ, R., CHÁVEZ, R. y CRUZ, M.E. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Edit. R. Domínguez. UNAM-PORRUA, México, p.p. 161-192
- DOMÍNGUEZ, R., RIBONI, L., ZIPITRIA, D. y REVILLA, R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat? *J. Endocrinol.* 95: 175-180
- DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, A., DAMIÁN, P., TOMASSI, C., LOYO, R. y CRUZ, M.E. (1996). Activity of the monoaminergic neurons in the preoptic-hypothalamic area (POA-AHA) during the proestrus day (P) of the rat, and its relationship with LH, estradiol and progesterone serum levels. *29TH Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. Biology of Reproduction* 54 (Suppl 1): 153, Abst 388
- EGOZI, Y., Y. KLOOG y M. SOKOLOVSKY (1986) Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrous cycle. *Brain Res.* 383: 310-313.

- ERICKSON, G.C (1982). *Follicular maturation and atresia*. En: *Serono Symposium No. 42 "The Gonadotropins: Basic Science and Clinical Aspects in Females"*. Edit. C. Flamigi y J. R. Givens. Academic Press, Londres, Nueva York, p.p. 177-182
- EVERETT, J.W., SAWYER, C.H. y MARKEE, J.E. (1949). *A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat*. *Endocrinology* 44: 234-25
- FIORINDO, R.P. y MARTINI, L. (1975). *Evidence for a cholinergic component in the neuroendocrine control of luteinizing hormone (LH) secretion*. *Neuroendocrinology* 18: 322-332
- FREEMAN, M.E. (1993). *The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat*. En: *Physiology of Reproduction. Capitulo 32*, Ed. E. Knobil y J. Neill, et. al. Raven Press, Ltd. Nueva York, p.p. 1349-1377
- GORE-LANGTON, R.E. y ARMSTRONG, D.T. (1988). *Follicular steroidogenesis and its control*. En: *The Physiology of Reproduction. Capitulo 10*, Ed. E. Knobil y J. Neill, et. al. Raven Press, Ltd. Nueva York, p.p. 331-385
- KONIG, J.F.R. y KLIPPEL, R.A. (1963). *The Rat Brain: A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower parts of the Brain System*. Eds. Williams y Wilkins Company, Baltimore U.S.A.
- KOREN, D., EGOZI, Y., y SOKOLOVSKY, M. (1992). *Muscarnic involvement in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat*. *Mol. and cell. Endoc.* 90:87-93

- LAPCHAK, P.A., ARAUJO, D.M., QUIRION, R. y BEAUDET, A. (1990). *Chronic estradiol treatment alters central cholinergic function in the female rat: effect on choline acetyltransferase activity, acetylcholine content, and nicotine autoreceptor function.* *Brain Res* 525: 249-255
- LÓPEZ NIETO E. (1994) *Estudio de los efectos de la estimulación del sistema colinérgico de las áreas preóptica e hipotalámica anterior en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación en la rata adulta* Tesis de Maestría en Biología de la Reproducción Animal U A M México D.F
- McNAIN, H.G (1991) *Memonas del curso teórico práctico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)* Universidad Queretána, México
- MUKHERJEE, A., SNYDER, G. y McCANN, S.M (1980). *Characterization of muscarnic cholinergic receptors on intact rat anterior pituitary cells.* *Life Sciences* 27: 475- 477
- PALKOVITZ, M (1973) *Isolated removal of hipotalamic or other brain nuclei of the rat* *Brain Res* 59: 449-450
- RUIZ de GALARRETA, C.M., FANJUL, L.F. y MEITES, J. (1981). *Influence of cholinergic and anticholinergic drugs on plasma luteinizing hormone and prolactin levels in male and female rats* *Proc Soc Exp. Biol Med* 168: 185-195
- SÁNCHEZ RAMOS, M.A (1996) *Asimetría funcional de las áreas preóptica medial e hipotalámica anterior y su regulación por la amígdala medial.* Tesis de grado: Doctor en Investigación Biomédica Básica U N. A. M.

- SÁNCHEZ, M.A., LÓPEZ-GARCÍA, J.C., CRUZ, M.E., TAPIA, R., DOMÍNGUEZ, R. (1994). *Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrus cycle of the rat.* *Neuroreport* 5: 433-434
- SHIVERS, B.D., HARLAN, R.E., MORELL, J.I. y PFAFF, D.W. (1983). *Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones* *Nature* 304: 345-347
- SILVERMAN, A. (1988). *The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems. Immunocytochemistry.* En *The Physiology of Reproduction* Capítulo 29, Ed E. Knobil y J. Neill, et. al. Raven Press, Ltd. Nueva York, p. p.
- SIMONOVIC, I., MOTTA, M. y MARTINI, L. (1974). *Acetylcholine and the release of the follicle-stimulating hormone-releasing factor.* *Endocrinology* 95: 1373-1379
- YOST, L.S., ETTRE y CONLON, R.D. (1980). *Practical Liquid Chromatography an Introduction.* Perkin-Elmer