



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

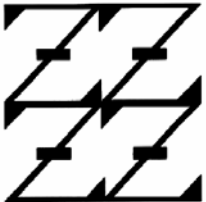
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN

EFFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS  
DE LAS PORCIONES IZQUIERDA O DERECHA DE POA-AHA,  
REALIZADO EN EL DÍA DEL DIESTRO-2, SOBRE EL EJE  
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS- OVARIO DE LA RATA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
GARCIA MAYA JAIME EDUARDO

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO  
EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

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

EFFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS DE LAS  
PORCIONES IZQUIERDA O DERECHA DE POA-AHA, REALIZADO EN EL DÍA  
DEL DIESTRO-2, SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS- OVARIO DE LA  
RATA.

Autor: Jaime Eduardo García Maya

Directora: Dra. María Esther Cruz Beltrán

La tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo de: DGAPA-PAPIIT (IN-201005) y PASPA

## *AGRADECIMIENTOS*

*A MIS PADRES ROSALINDA MAYA GATICA Y JAIME GARCÍA SÁNCHEZ POR EL GRAN APOYO MORAL Y ECONÓMICO QUE ME HAN BRINDADO HASTA LA FECHA.*

*A MI HERMANA LILIAN IVETTE GARCÍA MAYA POR SER UN SÍMBOLO DE SUPERACIÓN EN MI VIDA.*

*A MI DIRECTORA DE TESIS DRA. MA. ESTHER CRUZ BELTRÁN POR DEDICARME UN POCO DE SU VALIOSO TIEMPO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.*

*A MI ASESORA TÉCNICA LA DRA. PAOLA ARTEAGA LÓPEZ POR ENSEÑARME LA TÉCNICA DEL RT-PCR Y MUCHAS COSAS MÁS.*

*A MIS SINODALES DE TESIS QUE DEDICARON TIEMPO PARA LAS CORRECCIONES DE ESTA TESIS:*

*DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ  
DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN  
BIÓL. MARISELA VALDEZ RUIZ  
DRA. BERTHA PEÑA MENDOZA  
M EN IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ*

*A MI MAS GRANDE AMOR LA BIÓLOGA KARINA FLORES OCAMPO.*

*A ESTEBAN OLVERA POR EL APOYO MUTUO EN LA PARTE EXPERIMENTAL Y POR SER UN BUEN AMIGO.*

*A TODOS LO QUE HE CONOCIDO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN INCLUYENDO A AQUELLOS QUE SOLO ESTABAN DE PASO.*

*A LOS ROLEROS POR TODAS LAS COSAS QUE HE APRENDIDO DE ELLOS, COMO SABER QUE LO IMPORTANTE DE LA VIDA ES DISFRUTARLA.*

*A TODA MI FAMILIA PATERNA Y MATERNA POR SU APOYO INCONDICIONAL CUANDO LO HE NECESITADO.*

# INDICE

RESUMEN. . . . .	.1
INTRODUCCIÓN. . . . .	3
CICLO ESTRAL. . . . .	.6
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO. . . . .	.9
EI HIPOTÁLAMO. . . . .	10
GNRH Y NEURONAS GNRHérgicas. . . . .	11
ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES. . . . .	.14
RECEPTORES A ESTROGENOS. . . . .	19
EFFECTOS ASIMÉTRICOS FUNCIONALES DEL HIPOTÁLAMO SOBRE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y LAS FUNCIONES DEL OVARIO. . . . .	.23
PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS-OVARIO. . . . .	.25
PROPÓSITO DEL ESTUDIO. . . . .	32
HIPÓTESIS. . . . .	33
OBJETIVO GENERAL. . . . .	33
OBJETIVOS PARTICULARES. . . . .	33
MATERIAL Y MÉTODOS. . . . .	34
RESULTADOS. . . . .	42
Animales Ovulantes. . . . .	42
Número de Ovocitos. . . . .	.43
Expresión relativa del ARNm para el receptor a estrógenos $\alpha$ . . . . .	44
Expresión relativa del ARNm para el receptor a estrógenos $\beta$ . . . . .	44
Expresión relativa del ARNm para la GnRH. . . . .	45
Concentración de Progesterona. . . . .	.49
Concentración de Testosterona. . . . .	50
Concentración de Estradiol. . . . .	.51
Concentración de Hormona Luteinizante. . . . .	.52
Concentración de Hormona Folículo Estimulante. . . . .	53
DISCUSIÓN DE RESULTADOS. . . . .	.54
CONCLUSIONES. . . . .	.60
BIBLIOGRAFÍA. . . . .	.61

**RESUMEN**

Existen evidencias experimentales que muestran que el sistema colinérgico regula la secreción de las gonadotropinas y la ovulación. El papel regulador de este sistema en el área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) cambia durante el ciclo estral de la rata y es asimétrico. En el día del estro, el sistema colinérgico del lado derecho de POA-AHA estimula la liberación de las hormonas necesarias para que se produzca la ovulación, mientras que el del lado izquierdo la inhibe. En la fase de diestro-1, ambos lados de POA-AHA ejercen un papel estimulante de la secreción hormonal necesaria para la ovulación. En diestro-2, la ovulación depende de la integridad funcional del sistema colinérgico del lado izquierdo de POA-AHA. Mientras que en el día del proestro, el sistema colinérgico del lado izquierdo inhibe los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación, el del lado izquierdo los estimula.

Con la finalidad de conocer la manera en la que el sistema colinérgico de POA-AHA regula de manera asimétrica la ovulación en la fase del diestro-2, en el presente estudio se analizaron los efectos de la microinyección de atropina, a las 13:00 horas de este día del ciclo, en la porción izquierda o derecha de POA-AHA sobre la expresión del ARNm para los receptores a estrógenos (RE- $\alpha$  y RE- $\beta$ ) y de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la concentración plasmática de gonadotropinas [Hormona Luteinizante (LH) y Folículo Estimulante (FSH)], de progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T) y 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) en la tarde (14:00 h) del diestro-2, en la mañana (09:00 h) y tarde del proestro(17:00 h) así como en el número de ovocitos liberados.

La microinyección de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA interrumpió la ovulación de todos los animales en el día del estro esperado (0/4 vs. 9/10,  $p < 0.01$ ), mientras que la del lado derecho no la modificó (4/4 vs. 9/10) pero el número de ovocitos liberados fue menor respecto al animal inyectado con el vehículo ( $4.7 \pm 0.2$  vs.  $8.3 \pm 1.1$ ,  $p < 0.05$ ). La microinyección de atropina del lado izquierdo de POA-AHA inhibió la expresión del RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y el de la GnRH en ambos lados de POA-AHA a las 14:00 horas del diestro-2 y a las 09:00 y 17:00 horas del proestro; bloqueó la secreción preovulatoria (17:00 horas del proestro) de LH ( $1.27 \pm 0.51$  vs.  $53.35 \pm 11.13$ ,  $p < 0.05$ ) y FSH ( $0.20 \pm 0.09$  vs.  $1.38 \pm 0.39$ ,  $p < 0.05$ ), aumentó la concentración de  $P_4$  a las 14:00 horas del diestro-2, aumentó la concentración de T a las 9:00 y 17:00 horas del proestro y aumentó la de  $E_2$  en todas las horas estudiadas.

Estos resultados nos permiten sugerir que en el día del diestro-2, la activación del sistema colinérgico del lado izquierdo o del lado derecho de POA-AHA regula de manera asimétrica la ovulación. En este día del ciclo, la ovulación depende de la activación del sistema colinérgico del lado izquierdo, al regular de manera estimulante la expresión del ARNm del RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y de la GnRH, lo que a su vez, estimula la secreción preovulatoria FSH y LH,  $P_4$ , T y  $E_2$  en el día del proestro. En cambio, el sistema colinérgico del lado derecho de POA-AHA parecería modular la respuesta del ovario a las gonadotropinas, lo que se refleja en el número de ovocitos liberados.

## INTRODUCCIÓN

En los vertebrados el eje hipotálamo-hipófisis-ovario regula la reproducción mediante la secreción de neurotransmisores, péptidos de origen hipotalámico u ovárico y hormonas esteroides. Un tipo de neuronas localizadas en el hipotálamo, específicamente en las áreas preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA), secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas ó GnRH, la que al unirse a sus receptores en la hipófisis estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), también llamadas gonadotropinas. En el ovario, estas gonadotropinas regulan la ovulación y la secreción de hormonas, como la progesterona ( $P_4$ ), el  $17\beta$ - estradiol ( $E_2$ ), la inhibina, la activina, la relaxina, entre otras. Estas secreciones hormonales del ovario actúan en el hipotálamo y la hipófisis donde estimulan o inhiben la secreción de las hormonas polipeptídicas antes señaladas. En la rata hembra, estas señales neuroendócrinas se suceden en forma secuencial y sincrónica (evento fisiológico en “cascada”) que culminan en la ovulación.

El hipotálamo regula en forma asimétrica la secreción de las gonadotropinas y cada gónada responde de manera también asimétrica a las señales neuroendocrinas que provienen del sistema nervioso central y de la hipófisis (Advis y col. 1989, Chavez y col. 1991, Chavez y col. 1987, Cruz y col. 1989, Cruz y col. 1990<sup>b</sup>, Cruz y col. 1990<sup>a</sup>, Domínguez y Cruz 1989, Domínguez y col. 1988, Fukuda y col. 1984, Gerendai 1980, Gerendai 1986, Gerendai y col. 1979, Mizunuma y col. 1983, Nance y col. 1984, Nance y Morger 1982, Nance y col. 1983, Nordeen y Yahr 1982, Rao y Edgerton 1984, Robinson y col. 1985).



El sistema colinérgico es uno de los sistemas de neurotransmisión que regula la secreción de las gonadotropinas y en consecuencia la ovulación. Desde la década de los 40, Everett y colaboradores (1949) mostraron que este sistema estimula la secreción de las gonadotropinas del proestro, ya que la inyección de 700mg/kg peso de sulfato de atropina a las 08:00 y 14:00 horas bloquea la ovulación en todos los animales tratados. Esta regulación que ejerce el sistema colinérgico varía durante el ciclo estral (Domínguez y col. 1982),

Mediante la colocación (implante) de cristales de atropina (antagonista de los receptores muscarínicos) en POA-AHA se ha mostrado que en el día del estro, la señal colinérgica del lado derecho de esta zona es esencial para que se lleven a cabo los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación. En el día del diestro-1, la señal colinérgica que se origina en ambos lados de POA-AHA es esencial; mientras que para el día del diestro-2 es la del lado izquierdo la que regula estos procesos. En el día del proestro, el bloqueo del sistema colinérgico no altera la ovulación esperada en la mañana del día siguiente (Cruz y col. 1989).

Villegas y col. (1997) mostraron que la falta de ovulación por el bloqueo del sistema colinérgico de POA-AHA, resulta en la inhibición de la secreción preovulatoria de la LH en la tarde del proestro. El bloqueo de la secreción de la LH en animales con implante unilateral de atropina en POA-AHA, parece resultar de modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) sintético a las 14:00 horas de

este día, induce la ovulación en ratas con implante de atropina (Cruz y col. 1989). A su vez, esta modificación en la secreción fásica de la GnRH parece ser consecuencia de una alteración en el efecto de “feedback” estimulante de los estrógenos, ya que al reestablecer la señal ovárica en el día del diestro-2, mediante la inyección subcutánea de benzoato de estradiol, los animales ovulan (Cruz y col. 1989).

Estos resultados llevaron a considerar que el sistema colinérgico de POA-AHA regula la síntesis de los receptores a estrógenos y en consecuencia, la secreción de la GnRH. Así mismo, este mecanismo de regulación parecería ser asimétrico, ya que el bloqueo de los receptores muscarínicos de las porciones izquierda o derecha de POA-AHA modifican de manera asimétrica la ovulación esperada en el día del estro (Cruz y col. 1989). En el día del estro o diestro-1, la inyección subcutánea de atropina modifica en forma asimétrica la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH y de los receptores de estrógenos  $\alpha$  (RE- $\alpha$ ) y  $\beta$  (RE- $\beta$ ) en las porciones izquierda y derecha de POA-AHA (Arteaga-López y col. 2003).

Con la finalidad de proseguir con el análisis de la participación asimétrica del sistema colinérgico en los mecanismos que regulan la ovulación, en este estudio, se investigaron los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en el día del diestro-2, sobre la expresión del ARNm de la GnRH, de los RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  de POA-AHA, de la concentración sérica de FSH, LH, E<sub>2</sub>, testosterona (T) y P<sub>4</sub>; así como en la ovulación de la rata.

## CICLO ESTRAL

En los roedores, el ciclo estral se caracteriza por cambios hormonales y conductuales, progresivos, altamente sincronizados y repetitivos, que incluyen una etapa en la que la hembra es receptiva al macho, denominada etapa de celo. El término estral se deriva de la palabra en latín “*oistros*” que significa “frenesí”; y corresponde a la etapa en la que la hembra acepta sexualmente al macho llamada “calor” o celo (Kilen y Schwartz 1999). En nuestro modelo de estudio, la rata de laboratorio, el ciclo estral es de 4 ó 5 días, lo que depende de la cepa que se utilice y del periodo luz oscuridad en que sean mantenidos los animales; su estudio se divide en: proestro, estro, diestro-1 y diestro-2 (Kilen y Schwartz 1999, Schwartz 2000).

En el día del proestro, el frotis vaginal se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas. En la mañana de este día, la concentración de estradiol alcanza el valor máximo del ciclo, evento llamado “pico” de estrógenos. La disminución progresiva de esta concentración, induce el aumento de la concentración sanguínea de la LH y de la FSH. La concentración máxima de ambas hormonas en la sangre recibe el nombre de secreción preovulatoria, que ocurre en la tarde de este día (entre las 17:00 y 19:00 horas según la cepa). La secreción preovulatoria de LH estimula la secreción de progesterona ( $P_4$ ), que alcanza un primer “pico” en la noche de este día (Fig. 1) (Freeman 1994, Kilen y Schwartz 1999, Schwartz 2000).

En el día del estro, el frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas y sin núcleo, (Kilen y Schwartz 1999). En la madrugada del este día ocurre la ovulación. La concentración de  $E_2$ ,  $P_4$  y LH son las más bajas del ciclo estral (basales), pero la de FSH vuelve a aumentar en la mañana de este día; la función de este segundo pico es reclutar los folículos que empezarán a crecer y ovularán en ciclos posteriores (Fig. 1) (Freeman 1994, Schwartz 2000).

En la etapa de diestro-1, la citología vaginal se caracteriza por presentar una gran cantidad de leucocitos. El cuerpo lúteo secreta  $P_4$  por varias horas, lo que provoca que la concentración de esta hormona alcance un segundo “pico” hacia el medio día. En algunas cepas de ratas la secreción de  $P_4$  se prolonga, lo que conducen a ciclos de 5 días (Kilen y Schwartz 1999, Schwartz 2000). Las concentraciones de  $E_2$ , LH y FSH son basales durante este día del ciclo.

En el día siguiente, diestro-2, en el frotis vaginal se observan una menor cantidad de leucocitos. La concentración de  $E_2$  empieza a aumentar paulatinamente desde la tarde de este día (Fig. 1) (Kilen y Schwartz 1999, Schwartz 2000).

Esta serie de cambios son provocados por eventos neuroendocrinos que ocurren de forma recíproca y sincrónica entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario, el también llamado eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

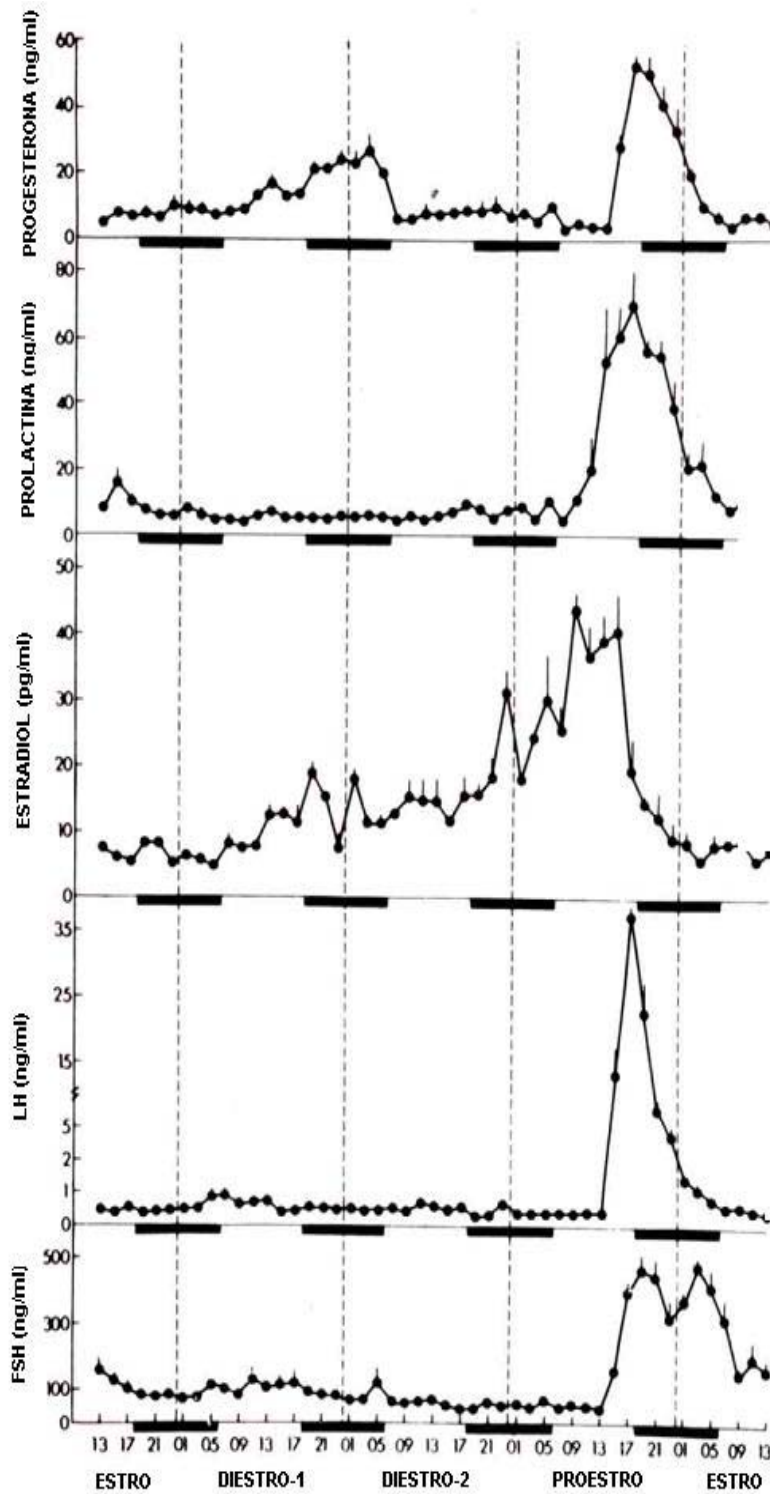


Figura 1. Concentración de LH, FSH, progesterona, prolactina y estradiol obtenido del plasma periférico cada 2 horas en cada día del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de hormona de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan intervalos de oscuridad en el cuarto del animal (Tomada de Freeman, 1994).

## **EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO**

La función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es regular los procesos reproductivos (Welsh y col. 1999). Las funciones principales de los ovarios, la síntesis de hormonas esteroides, crecimiento y diferenciación de los folículos, que culminan o no en la ovulación, son reguladas por la LH y la FSH (Ferin 1999, Tresguerres 2003, Yao y Bahr 1999).

A su vez, la secreción de FSH y LH es regulada por la GnRH; así mismo la secreción de la GnRH es modulada por hormonas esteroides ováricas, péptidos, opiáceos, neurotransmisores y aminoácidos (Yao y Bahr 1999).

La GnRH es secretada por neuronas localizadas en el área preóptica (POA). Estas neuronas que denominaremos GnRHérgicas, establecen contacto con los capilares y venas del sistema portal hipotálamo-hipofisiario, donde liberan la GnRH, la que es transportada a la hipófisis anterior y estimula la secreción de gonadotropinas de manera pulsátil.

Las gonadotropinas son glicoproteínas constituidas por dos subunidades: una alfa ( $\alpha$ ) y otra beta ( $\beta$ ). La actividad de estas hormonas requiere de la asociación de ambas subunidades, las que son sintetizadas y combinadas en los gonadotropos de la hipófisis anterior (Ferin 1999, Schwartz 2000).

## EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo se localiza en la base del diencéfalo, por debajo del tálamo y esta dividido en dos por el tercer ventrículo (McGeer y col. 1987). Para su estudio, el hipotálamo se divide en núcleos y áreas (Ganon 2001). Los núcleos son conglomerados de cuerpos neuronales (Norris 1996), mientras que las áreas son sectores de tejido en los que se reconoce una clara delimitación arquitectónica. Según Palkovits (2000) el hipotálamo se divide en cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente: POA, hipotálamo Anterior (AHA), Medio y Posterior. La porción del hipotálamo en la que nos enfocamos en este estudio es el área POA-AHA, localizada en la parte rostral, esto es, la zona anterior del encéfalo (Fig. 2) (Norris 1996, Palkovits 2000).

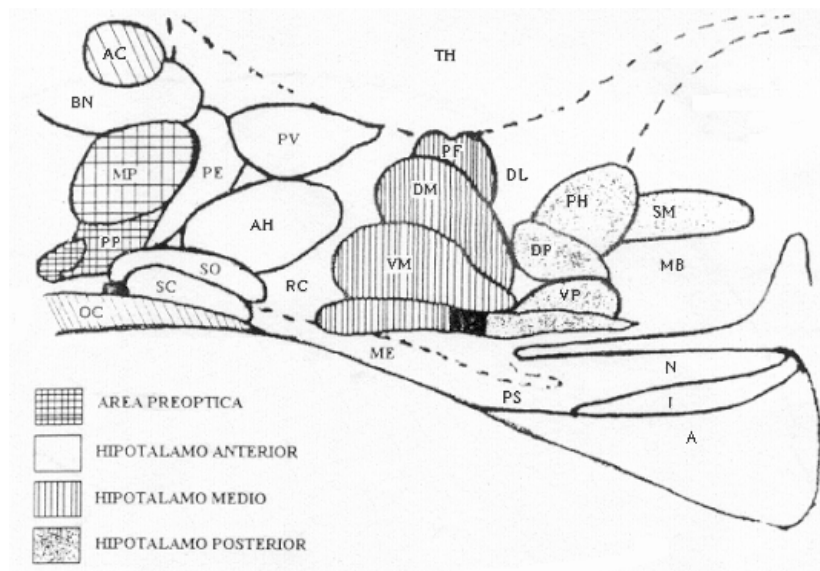
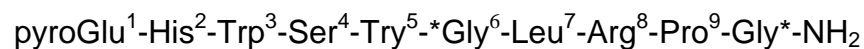


Figura 2. Corte sagital del cerebro de la rata, que muestra la distribución topográfica de los núcleos y áreas del hipotálamo. **A:** Hipófisis anterior, **AC:** comisura anterior, **AH:** núcleo hipotalámico anterior, **AR:** núcleo arcuato, **Bn:** base del núcleo de la estría terminal, **DL:** área hipotalámica dorsolateral **DM:** núcleo dorsomedial, **DP:** núcleo dorsal premamilar, **I:** lóbulo de la hipófisis intermedia, **LT:** núcleo lateral tuberal, **MB:** cuerpo mamilar, **ME:** eminencia media, **MP:** núcleo preóptico medial, **N:** hipófisis posterior, **O:** órgano vasculoso de la lamina terminal, **OC:** quiasma óptico, **PE:** núcleo hipotalámico periventricular, **PF:** núcleo perfornical, **PH:** núcleo hipotalámico posterior, **PP:** núcleo preóptico periventricular (medio), **PS:** tallo hipofisario, **PV:** núcleo paraventricular, **RC:** área retroquiasmática, **SC:** núcleo supraquiasmático, **SM:** núcleo supramamilar, **SO:** núcleo supraóptico, **TH:** tálamo, **VM:** núcleo ventromedial, **VP:** núcleo premamilar ventral (Palkovits 2000).

## GnRH Y NEURONAS GnRHérgicas

El neuropéptido conocido como hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés) es un decapeptido cuya secuencia es la siguiente (Ulloa-Aguirre y Timossi 2000).



La GnRH es sintetizada por las neuronas GnRHérgicas, las cuales durante el desarrollo embrionario se originan de la placoda olfatoria, las cuales migran principalmente a POA-AHA y algunas son encontradas en el hipotálamo mediobasal (MBH) (Funabashi y col. 2002). En el adulto, estas neuronas se localizan como redes extensas y difusas distribuidas a lo largo de la ruta septo-preóptica–infundibular (Silverman1994).

Las neuronas GnRHérgicas secretan el decapeptido de una manera sincronizada y pulsátil. Los axones de estas neuronas son proyectados a varias regiones del cerebro, donde el decapeptido actúa como neurotransmisor o neuromodulador de las funciones reproductivas (Ulloa-Aguirre y Timossi 2000).

Existen al menos 13 formas distintas de la GnRH que han sido aisladas en diferentes vertebrados, una sola especie posee de dos a tres formas de GnRH que podrían tener distintas funciones a la de estimular la liberación de las gonadotropinas (Parhar 2002).



La GnRH se sintetiza como parte de un precursor (prepro-GnRH), que consiste en 92 aminoácidos, dividido en tres partes: un péptido de 23 aminoácidos, seguido por una secuencia de Gly-Lys-Arg esencial para el procesamiento proteolítico y por un residuo de 56 aminoácidos conocido como péptido asociado con la GnRH (GAP) (Fig 3A) (Yen 2001). Los genes que codifican las diferentes formas de GnRH tienen la misma arquitectura de cuatro exones separados por tres intrones, que se han conservado a lo largo de la evolución, a pesar de los cambios en tamaño y secuencia de los exones y los intrones. En cada gen el primer exón codifica a la región 5' –no transcrita, el segundo exón codifica para el péptido señal para la GnRH, y los 11 primeros residuos de amino ácidos de GAP, el tercer exón codifica para los 12 a 43 aminoácidos de GAP y el cuarto exón codifica para los 13 residuos terminales de GAP y la región 3' –no transcrito. (Parhar 2002, Ulloa-Aguirre y Timossi 2000).

El procesamiento molecular en el interior de las neuronas de GnRH ocurre fundamentalmente en el núcleo del cuerpo celular (soma). Después de la transcripción y el procesamiento del gen de la Pro-GnRH de la cadena del ARNm, el ARNm, es transportado hasta el citoplasma, donde tiene lugar la traducción y la del decapeptido (Fig. 3B). Luego los productos (la GnRH y el GAP), son transportados hasta las terminaciones nerviosas y secretados a la circulación (Yen 2001).

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

y liberación de la GnRH (Gerendai y col. 1979). La secreción de GnRH es regulada por neurotransmisores (acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina), aminoácidos (ácido gama amino butírico (GABA), ácido glutámico, aspartato, glicina), opioides, péptidos y hormonas esteroides (Norris 1996). En los roedores, el esteroide con mayor actividad biológica que regula la secreción de la GnRH es el  $17\beta$ -estradiol.

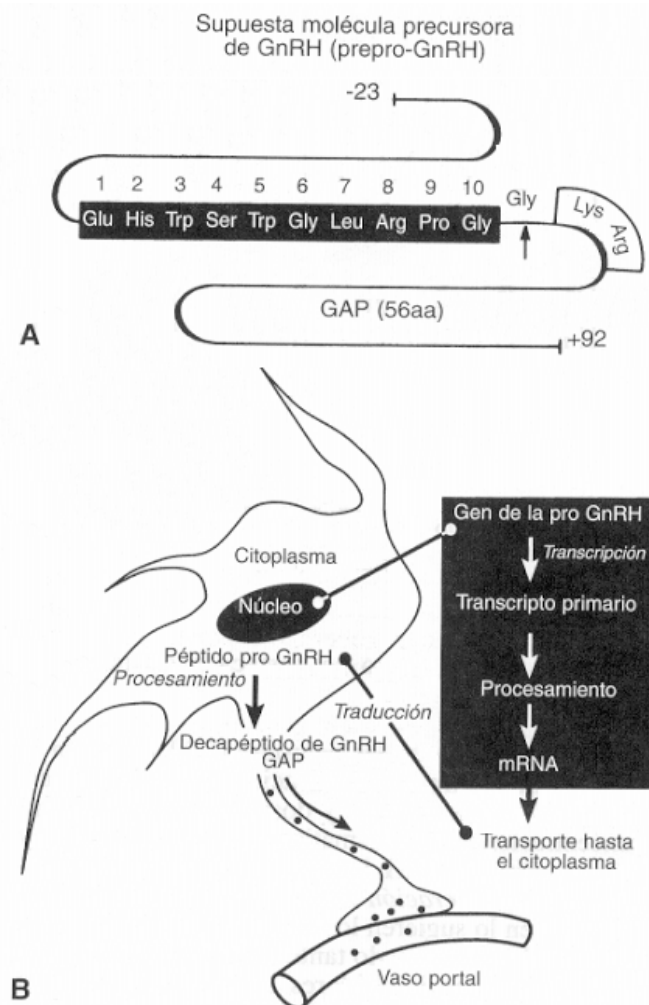


Figura 3. **A.** Representación esquemática de la estructura y la secuencia de 92 aminoácidos de la pre-pro-GnRH. El decapeptido (aminoácidos 1 a 10) ocupa el lugar intermedio entre el péptido señal y la secuencia Gly-Lys-Arg. La flecha indica el sitio de procesamiento proteolítico y la amidación del C-terminal de la molécula de GnRH. **B.** Procesamiento molecular del decapeptido de GnRH. En el núcleo, el gen de pro-GnRH es procesado a ARNm después de la transcripción; el ARNm es transportado hasta el citoplasma del cuerpo celular (soma), donde se genera el péptido pro-GnRH y del péptido asociado con la GnRH (GAP). Luego la GnRH y el GAP son transportados hasta las terminaciones nerviosas y secretados en la circulación porta. (Yen 2001).

---

## ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

El precursor de las hormonas esteroideas es el colesterol (Yao y Bahr 1999). Las células lo obtienen por medio de tres fuentes principales, 1) el sintetizado de *novo* a partir de acetato, 2) la hidrólisis de esteres, de colesterol almacenados en los lípidos y 3) de las lipoproteínas de baja densidad o de alta densidad presentes en la circulación sanguínea (Stocco 1999).

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

La  $P_4$ , tienen un núcleo esteroide pregnano de 21 átomos de carbono y un átomo de oxígeno en la posición C3 y otro con doble enlace en C20 (Brown 1999, Burris 1999).

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

Los estrógenos comprenden la estrona, estriol y el  $E_2$ ; este último es el de mayor actividad biológica. El estradiol tiene un núcleo esteroide estrano que es un compuesto

que contiene 18 átomos de carbonos, tienen un grupo hidroxilo en la posición C3 como en C17 (Fig. 4) (Smith 1999).

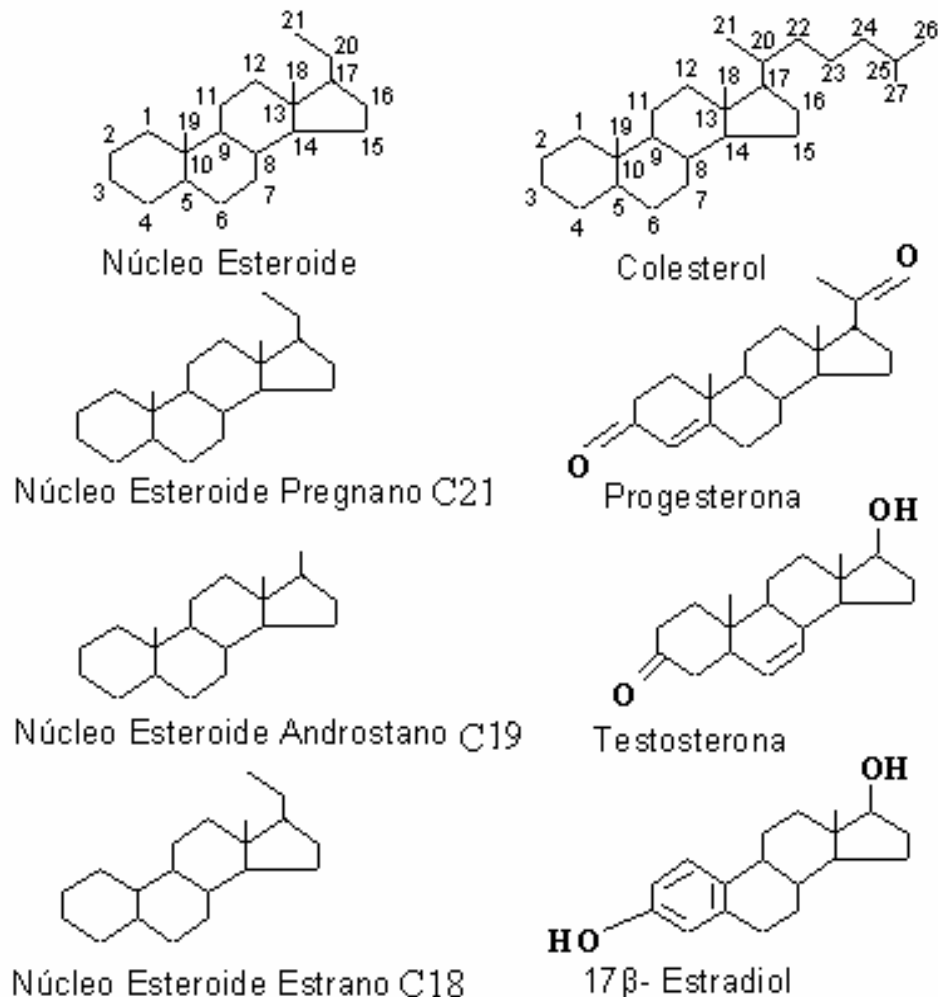


Figura 4. Estructura de las hormonas esteroides (Modificado del Brown 1999; Burris 1999).

En la hembra, las hormonas esteroides son sintetizadas por tejidos endocrinos como los ovarios, las adrenales, el útero y la placenta, además de sitios extraglandulares como el cerebro, tejido adiposo, la piel, hueso, varios tejidos fetales (Brown 1999).

La etapa inicial en la biosíntesis de los esteroides es la transferencia del colesterol al interior de la mitocondria que es realizada por la StAR (proteína reguladora de la estereidogénesis aguda). En las membranas mitocondriales el colesterol es convertido en pregnenolona por la enzima citocromo P450<sub>scc</sub> (20, 22 desmolasa). Una vez en el retículo citoplasmático, la pregnenolona puede ser transformada al compuesto inmediato por dos rutas, la  $\Delta_4$  y  $\Delta_5$ . En la ruta  $\Delta_4$  la pregnenolona es transformada a progesterona por la enzima 3 $\beta$ -HSD; la progesterona es convertida a 17 $\alpha$ -hidroxi – progesterona por la enzima P450<sub>c17 $\alpha$</sub> ; la desmolasa (17,20-esteroide liasa) la convierte a androstenediona. Este metabolito es transformado en testosterona por la enzima 17 $\beta$ -HSD. Las células teco-intersticiales de los folículos son la primera fuente de andrógenos ováricos. Tanto la androstenediona como la testosterona pueden ser transformadas a estrógenos por la enzima P450<sub>arom</sub>. En el Sistema Nervioso Central algunas células poseen el complejo enzimático de aromatización, por lo que convierte a los andrógenos en estrógenos (Fig. 5) (Domínguez, 1997; Yao y Bahr, 1999; Smith 1999).

En la ruta  $\Delta_5$  la pregnenolona es transformada 17 $\alpha$ -hidroxi-pregnenolona por la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa. Después, la C<sub>17,20</sub>-liasa transforma 17 $\alpha$ -hidroxi-pregnenolona en dehidro-epiandrosterona (DHEA), esta a su vez es transformada a androstenediona por la enzima 17 $\beta$ -HSD. A partir de aquí la androstenediona sigue la ruta  $\Delta_4$  (Fig. 5) (Yao y Bahr, 1999).

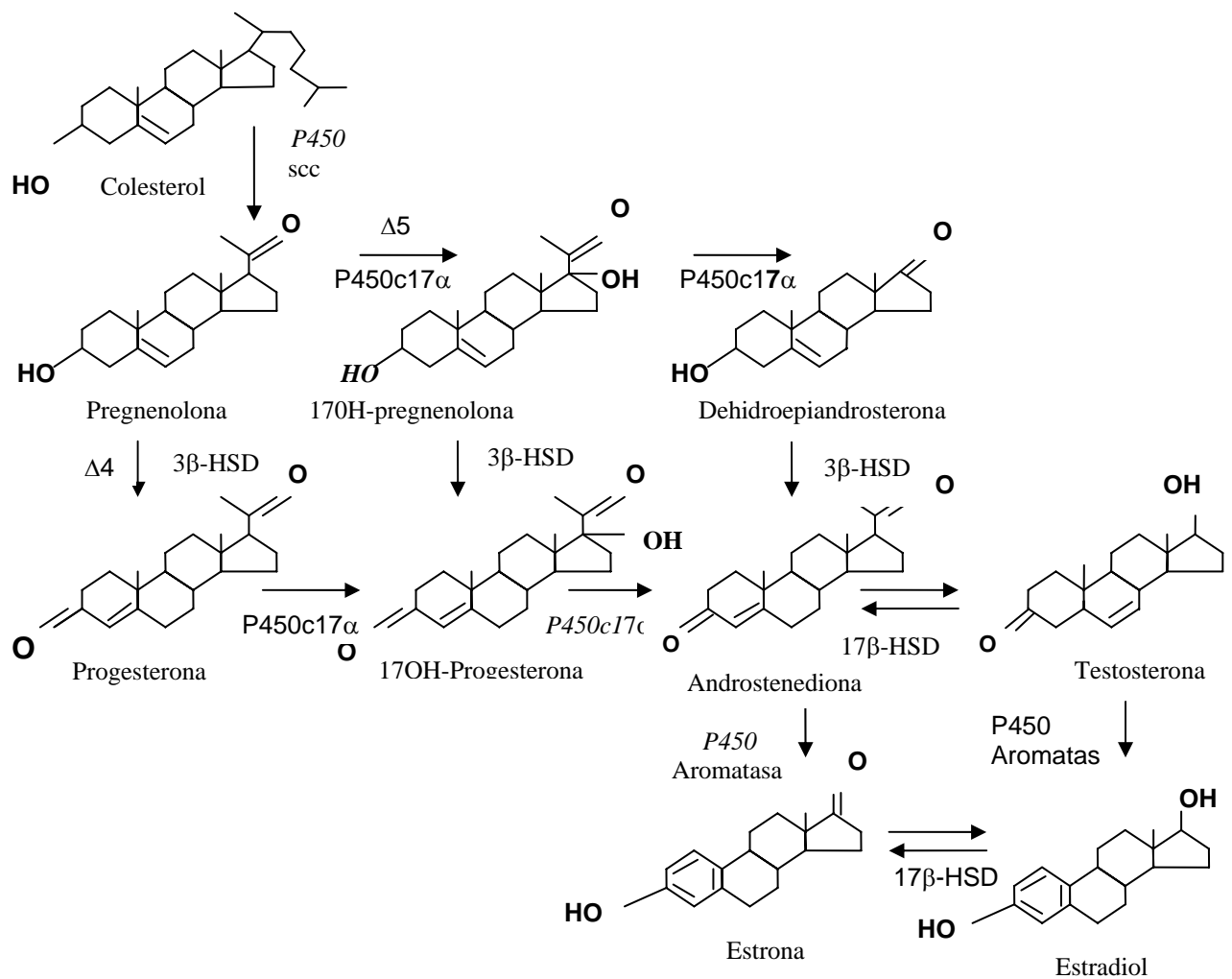


Figura 5. Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario (Tomada de Smith 1999).

En los folículos en crecimiento, las células de la teca interna secretan andrógenos al ser estimuladas por la LH. Tanto la androstenediona como la testosterona difunden a través de la membrana basal del folículo y llegan a las células de la granulosa donde son aromatizadas a estrógenos por estimulación de la FSH, quién activa a la enzima aromatasa. Este mecanismo forma la base de la teoría de la doble célula-doble hormona (Fig. 6) (Yao y Bahr 1999).

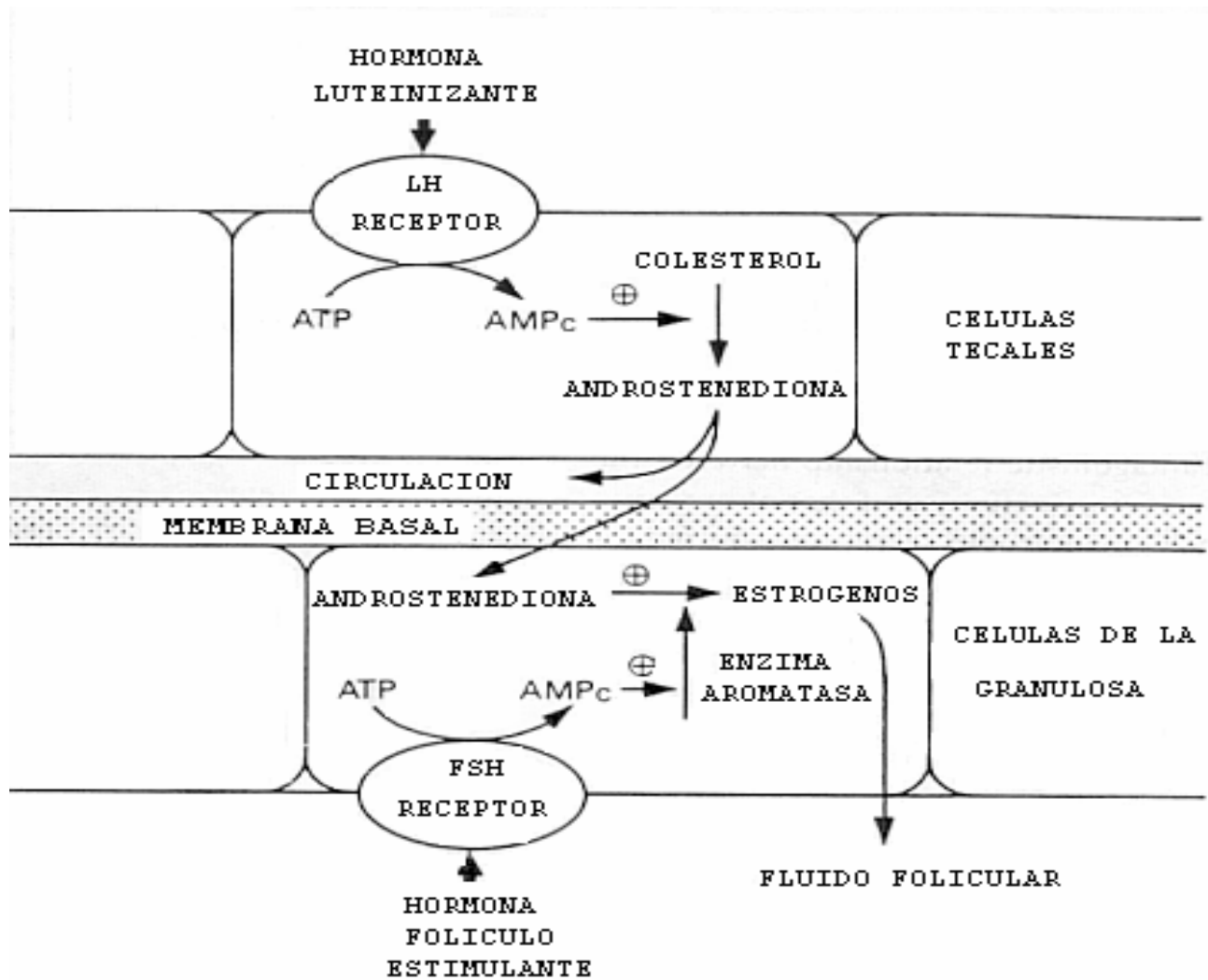


Figura 6. Esquemización de la teoría de la doble célula-doble hormona que explica la síntesis de hormonas esteroides a partir del colesterol: LH, (hormona Luteinizante); FSH, (hormona folículo estimulante); ATP (trifosfato de adenosina), AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) (Tomada de Yoshinaga 1999).

---

## RECEPTORES A ESTRÓGENOS

Los estrógenos ejercen sus efectos por medio de su unión con receptores específicos. Estos receptores están localizados en el núcleo y en el citoplasma de las células blanco como el útero, la vagina, las glándulas mamarias y el encéfalo (Ing 1999).

La unión del estrógeno a su receptor (complejo hormona-receptor) provoca la “activación” del receptor, mediante cambios conformacionales en su estructura terciaria y cuaternaria. Estos cambios permiten que el complejo hormona-receptor se una con alta afinidad a secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN), llamados elementos de respuesta a la hormona (ERH). Esta unión regula la transcripción de uno o varios genes “reguladores” minutos después de que el estrógeno entra a la célula blanco. Existen diversas vías mediante las cuales estos genes “reguladores” causan sus efectos:

- Algunas de las proteínas que se sintetizan por la expresión de genes regulados por estrógenos tienen actividad enzimática en el citoplasma o la membrana, por ejemplo, las cinasas y las proteasas, las cuales a su vez podrían inducir cambios en el transporte de la membrana, síntesis proteica, procesamiento o secreción de proteínas (Norvithch y col. 1989; Falkenstein y col. 2000)
- La proteína reguladora enzimática puede modificar factores nucleares, los cuales a su vez, pueden regular la estructura de la cromatina (Hager y Archer 1991) o activar el procesamiento del ácido ribonucleico ARN, interfiriendo en la vida media del ARN mensajero (ARNm) (Forsthoefel y Thompson 1987; Fink y col. 1988; Lau y col. 1990; Barrett y Spelsberg 1998)



- Las proteínas reguladoras pueden ser factores nucleares que actúen directamente como factores de transcripción que activen la expresión de genes tempranos (minutos) o tardíos (horas) (Landers y Spelsberg 1992; Barrett y Spelsberg 1998)

Los factores de transcripción estimulan a la enzima polimerasa del ácido ribonucleico (ARNp) que inicia la transcripción de un gen específico; este evento provoca la síntesis de un pre-ARNm de gran tamaño, que incluye todos los exones y todos los intrones del gen. El pre-ARNm es procesado por un complejo proteico (denominado de empalme) que separa todos los intrones y reúne los exones en una secuencia continua que codifica el producto proteico respectivo del gen (Malley y Strott 2001). El ARNm es transportado al compartimento citoplasmático de las células, allí la información vuelve a ser descodificada (traducida) en los ribosomas, lo que genera el producto proteico específico del gen en cuestión (Fig. 7) (Malley y Strott 2001).

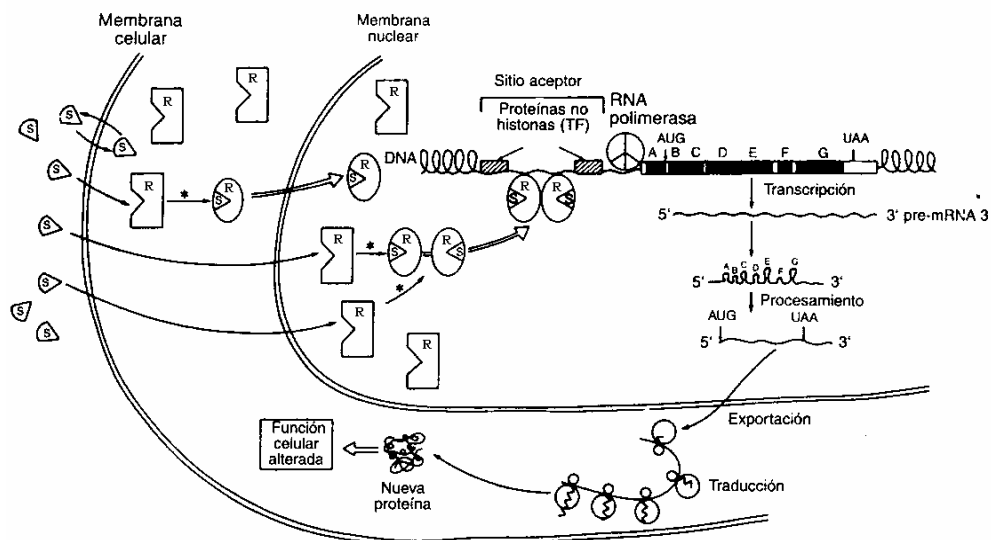


Figura 7. Vía molecular de acción de las hormonas esteroides. TF, factores de transcripción. S esteroides. R, receptores. SR complejo esteroide-receptor (Modificado de Malley y Strott 2001).

---

El gen que codifica para el RE ha sido dividido en seis dominios, que se denominan con las iniciales de la A a la F, la primera región A/B, está localizada en el extremo N-Terminal conocida como activador funcional-1 (AF-1). En la región C, el sitio de unión al ADN (DBD por sus siglas inglés) (Gustafsson y Marrhews 2003), tiene una región corta de 66-70 aminoácidos. La región D o también conocida como “Hinge”, consiste en dos dedos de zinc que permiten al receptor interactuar con el ADN (McDonnell 2000, Catt 1999). En la región E o dominio de unión del ligando (LBD por sus siglas en inglés) comprende aproximadamente 300 aminoácidos con secuencias que facilitan la homodimerización (McDonnell 2000) y la región F o AF-2 localizado en el extremo C-Terminal (Fig. 8) (Gustafsson y Marrhews 2003).

En el año 1996, Kuiper y col (3), clonaron un ácido desoxirribonucleico complementario (DNAC) del RE de la próstata de rata, al cual denominaron RE subtipo beta ( $RE-\beta$ ), para distinguirlo del que previamente se había clonado del útero de la rata, al cual consecuentemente se denominó RE subtipo alfa ( $RE-\alpha$ ). Las dos formas del RE son codificadas por diferentes genes pero evolutivamente conservan los dominios estructurales típicos de la A a la F (McDonnell 2000, Gustafsson y Marrhews 2003), excepto que no son farmacológica ni funcionalmente equivalentes, ya que ambos receptores tienen distintos mecanismos de respuesta a fármacos agonistas y antagonistas, y se han localizado en distintas células blanco (McDonnell 2000). Los  $RE-\alpha$  son expresados en el útero, hígado, riñón, corazón, mientras que los  $RE-\beta$  son expresados principalmente en el ovario, próstata, pulmón, tracto gastrointestinal, vesícula y sistema nervioso central. Las células de la glándula mamaria, del epidídimo,

tiroides, adrenal, hueso y ciertas regiones del cerebro expresan ambos RE (Gustafsson y Marrhews 2003).

Se ha mostrado que la expresión del ARNm para el RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  es diferente entre el lado izquierdo y derecho del área preóptica e hipotálmica anterior (POA-AHA) y cambia durante el ciclo estral: la expresión del ARNm para *RE-alfa* alcanza un máximo en la tarde del estro (17:00 horas), que es seguido de un segundo aumento de menor magnitud al mediodía del diestro-2 (13:00 horas); mientras que para el *RE-beta*, la máxima expresión del gen se observa solamente al mediodía del diestro-2. Estas variaciones en la expresión del gen que codifica para el ARNm del *RE alfa y beta* no sólo dependen del día del ciclo, sino que es asimétrica. De tal forma que en el día del estro, en el lado derecho de POA-AHA hay más ARNm para el *RE-alfa* que en el lado izquierdo. En el día del diestro-2, la cantidad de ARNm para el *RE-beta* se expresa primero en el lado izquierdo (a las 09:00 horas) y después en el lado derecho (a las 13:00 horas) ((Arteaga-López y col. 2003).

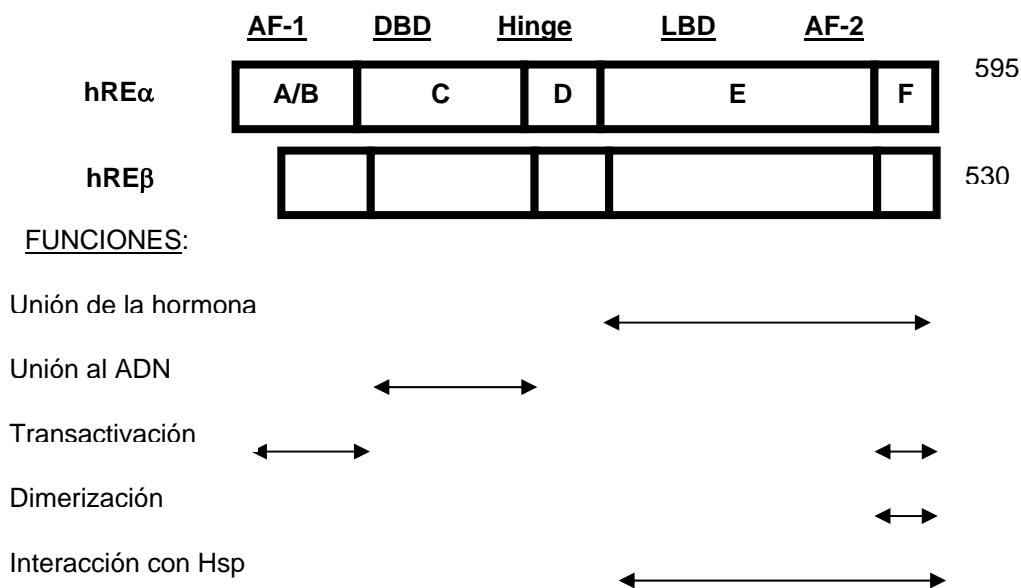


Figura 8. Estructura del RE- $\alpha$  y del RE- $\beta$  (Modificado del McDonnell 2000).

---

## **EFFECTOS ASIMÉTRICOS FUNCIONALES DEL HIPOTÁLAMO SOBRE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y LAS FUNCIONES DEL OVARIO**

Resultados experimentales de varios autores han mostrado que la regulación neuroendocrina que ejerce el hipotálamo, sobre la función de uno y otro ovario, es asimétrica (Advis y col. 1989; Cook 1987, Cruz y col.1989; Cruz y col.1990<sup>b</sup>, Fukuda y col. 1984, Gerendai 1986, Gerendai 1980, Gerendai y col. 1984, Mizunuma y col.1983, Nance y Morger 1982, Nance y col.1983, Nance y col.1984, Nordeen y Yahr. 1982).

La región preóptica responde de manera asimétrica a las hormonas esteroides, ya que el implante de estradiol en el lado derecho de POA o el núcleo ventromedial de ratas hembras de 5 días provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta (estas hembras prefieren sexualmente a otras hembras). En cambio cuando el estradiol se implanta en el lado izquierdo, ocurre defeminización (los animales no tienen ciclos estrales) (Nordeen y Yahr 1982).

Asimismo, el lado derecho de AHA parece jugar un papel preponderante en el proceso de hipertrofia compensadora del ovario, ya que la lesión por radio frecuencia del lado derecho de esta área, en la rata con ovariectomía unilateral previene la hipertrofia compensadora del ovario remanente, en tanto que la lesión del lado izquierdo no la modifica (Fukuda y col. 1984). La lesión unilateral de esta misma área del hipotálamo con ácido kaínico, bloquea la hipertrofia compensadora sólo si la lesión y la ovariectomía unilateral se hacen del mismo lado (Nance y col.1983).

En la rata prepúber el proceso de hipertrofia compensadora del ovario parece estar controlado por el hipotálamo izquierdo, ya que su deaferentación bloquea la hipertrofia compensadora del ovario, en tanto que la deaferentación del hipotálamo derecho no modifica este proceso (Nance y col.1984).

Cada lado de POA-AHA regula la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario ipsilateral, siendo esta regulación asimétrica respecto al ovario contralateral; mientras que el hipotálamo medio (que comprende a los núcleos arcuato y ventromedial) regula la ovulación de uno u otro ovario de manera estimulante, y de manera asimétrica la hipertrofia compensadora del ovario (Cruz y col, 1990<sup>a</sup>).

No sólo cada lado del hipotálamo regula en forma asimétrica la función de una y otra gónada sino que éstas responden de manera asimétrica a los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Así, el número de ovocitos liberado por el ovario izquierdo de la rata adulta es mayor que el del derecho (Domínguez y col. 1988). Cuando se extirpa el ovario derecho, el número de animales que ovulan es significativamente menor que cuando se extirpa la gónada izquierda (Chávez y col. 1987). En la cerda, el número de receptores a la gonadotropina criónica humana (hCG), la concentración de progesterona, la actividad de la  $\beta$ -N-acetil-D-glucosaminidasa y de la glucosa-fosfato deshidrogenasa son mayores en los cuerpos lúteos del ovario izquierdo que en los del derecho (Rao y Edgerton 1984). La concentración de testosterona en la vena testicular aumenta al doble en el 58% de los animales hemicastrados del lado izquierdo, mientras que sólo ocurre en el 27% de los que fueron hemicastrados del lado derecho (Frankel y col. 1989).

## PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS-OVARIO

El sistema colinérgico tiene como neurotransmisor a la acetilcolina (ACh), la cual es una molécula que se sintetiza a partir de la colina y de la acetil-CoA por medio de la acción de la colinoacetiltransferasa (ChAT) (Fig. 9) (Eckenstein y Thoenen 1982).

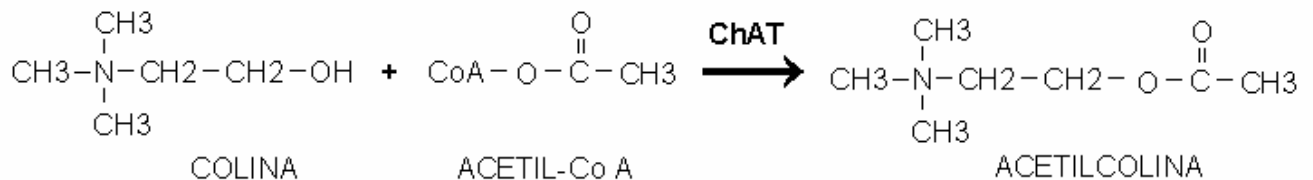


Figura 9.- Síntesis de Acetilcolina a partir de colina y acetil- CoA

Los resultados experimentales obtenidos acerca del papel del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas no son concluyentes. Las primeras evidencias de la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas fueron los experimentos realizados por Everett, Sawyer y Markee (1949) quienes mostraron que el bloqueo del sistema colinérgico, por la inyección subcutánea de atropina interrumpe la ovulación. En el caso de la coneja, un animal de ovulación refleja, se interrumpe la ovulación cuando el fármaco se administra inmediatamente después del coito; y en la rata, un animal de ovulación espontánea, cuando se inyecta en la mañana del proestro.

En la rata, la inyección subcutánea de sulfato de atropina (700 mg/100 g de peso) o su aplicación directa al tercer ventrículo (250 µg) entre las 11:00 y 13:00 horas del proestro bloquea la secreción de LH, FSH y prolactina (PRL) horas más tarde. En estos animales, la inyección de LHRH sintético restablece la liberación preovulatoria de LH, por lo que se concluye que sus efectos son sobre el sistema nervioso central y que el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos altera la secreción normal de GnRH (Libertum y McCann 1973).

Aunque la acetilcolina fue la primera sustancia reconocida como mensajero químico, la falta de una técnica equivalente a la fluorescencia para las catecolaminas, que revelara directamente la presencia de acetilcolina en las neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico ha dificultado el estudio neuroanatómico de este sistema de neurotransmisión (Nistico y Müller 1989).

Aunado a lo anterior, la colina y el acetato están involucrados en muchos otros procesos metabólicos por lo que se dificulta aún más la discriminación entre los sitios colinérgicos específicos y los sitios metabólicos inespecíficos. En la actualidad, el estudio de la neuroanatomía del sistema colinérgico es realizado con base en técnicas histoquímicas que revelan la presencia de enzimas de síntesis y desactivación de la acetilcolina (Nisticó y Müller 1989) y apoyados posteriormente con el desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos poli (Eckenstein y Thoenen 1982) y monoclonales (Egozi y col. 1986), así como con marcadores radioactivos. Las neuronas que sintetizan y liberan ACh son llamadas neuronas colinérgicas, organizándose principalmente como circuitos locales y neuronas de proyección.

En el cerebro anterior de la rata se han identificado dos vías colinérgicas principales. La vía tegmental dorsal, la cual contiene los somas neuronales colinérgicos del núcleo cuneiforme de la formación reticulada mesencefálica y proyectan sus fibras hacia el tectum, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico. La vía tegmental ventral cuyas neuronas se localizan en la sustancia negra y el núcleo tegmental ventral del cerebro medio cuyos axones viajan a lo largo del haz tegmental ventral y atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral. (Nistico y Müller 1989).

En el núcleo submamilar del hipotálamo se encuentra un núcleo denso de neuronas colinérgicas. Dispersas en las áreas posterior y lateral del hipotálamo existen otras neuronas acetilcolinerasa-positivas. El área preóptica lateral es rica en células acetilcolinesterasa-positivas y aquellas que se ubican en la porción dorsal del área preóptica envían fibras hacia la amígdala, por medio de la estría terminal (Nisticó y Müller 1989).

Estudios *in vitro* muestran que en POA de la rata hembra, el número de receptores muscarínicos varía durante el ciclo estral. En el día del proestro se observa un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos, comparado con el diestro-2 o en la tarde del proestro. Cuando un homogenizado de POA se expone a la presencia de  $17\beta$ -estradiol resulta en la conversión de los sitios de unión de alta y baja afinidad a los agonistas muscarínicos



(Avissar y col. 1981). Este efecto de la hormona se observa únicamente en muestras de POA obtenidas en la mañana del proestro y puede ser bloqueado por clomifeno (antiestrógeno) o prevenido por la ocupación previa de los receptores muscarínicos por sus propios ligandos antes de la adición de la hormona. Los cambios significativos en los receptores muscarínicos de POA coinciden con el llamado periodo crítico, caracterizado por altas concentraciones de estrógenos y gran número de receptores a estrógenos en POA (Egozi y col. 1986).

En el hipotálamo y la adenohipófisis de la rata, las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos evaluadas por ensayos de competencia con H<sup>3</sup>-N-metil - 4 piperidil bencilato (antagonista muscarínico tritiado de alta afinidad), muestran que únicamente el 17  $\beta$ -estradiol y la progesterona, afectan las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos. Ambas hormonas provocan decremento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad y en la constante de disociación. Esto permite sugerir una vinculación entre el sistema colinérgico muscarínico y los mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis (Sokoiovky y col. 1981).

El contenido de acetilcolina, la actividad de las enzimas de síntesis (colinocetiltransferasa) y de degradación (acetilcolinerasa) y el número y la afinidad de los receptores muscarínicos en POA-AHA presentan cambios durante el ciclo estral (Cruz y col. 1998, Egozi y col. 1986, Rainbow y col. 1980, Sánchez y col. 1994).

La sensibilidad del sistema colinérgico al sulfato de atropina varía durante el ciclo estral, ya que la dosis necesaria para bloquear la ovulación en el 100 % de los casos depende del día del ciclo y la hora en que se administra, siendo el diestro-1 el día más sensible (Domínguez y col. 1982).

Durante el ciclo estral de la rata hembra, en POA existe un ritmo colinérgico endógeno: el día del diestro-1 se presentan las concentraciones máximas de acetilcolina y en diestro-2 las mínimas. El número y la afinidad de los receptores muscarínicos también varían durante el ciclo estral. El marcaje con el agonista muscarínico  $\{^3\text{H}\}$ -N-metil escopolamina muestra que la unión específica y la constante de disociación para dicho fármaco son máximas en el día del estro y disminuyen progresivamente en los demás días del ciclo estral (Cruz y col. 1989). Mediante el marcaje con el antagonista colinérgico muscarínico,  $\{^3\text{H}\}$  bencilato de quinuclidina, se observan también cambios cíclicos en el marcaje, con un máximo en proestro y un mínimo en los días del diestro (Rainbow y col. 1980). La discrepancia aparente de estos resultados podría explicarse por el hecho de que los fármacos usados en los experimentos, posiblemente tengan diferente afinidad a los subgrupos de receptores muscarínicos en POA-AHA y abre la puerta a la especulación sobre la importancia de cada uno de estos subgrupos de receptores en la regulación del proceso reproductor.

El número y la afinidad de los receptores muscarínicos en el hipotálamo es regulado por los esteroides ováricos. Experimentos *in vitro* con POA muestran que

---

existe una relación directa entre la concentración de  $17\beta$ -estradiol y la proporción de receptores muscarínicos de alta y baja afinidad (Egozi y col. 1986).

En ratas ovariectomizadas, la administración sistémica de benzoato de estradiol aumenta significativamente el marcaje de los receptores muscarínicos por  $\{^3\text{H}\}$  bencilato de quinuclidina en el hipotálamo medio basal y lo disminuye en el área preóptica medial de modo dosis dependiente (Dohanich y col. 1982). En el hipotálamo y la hipófisis, las progestinas y sus metabolitos inhiben el marcaje de los receptores muscarínicos por  $\{^3\text{H}\}$  bencilato de quinuclidina (Klangkalya y Chan 1988).

El sistema colinérgico regula la respuesta de las neuronas hipotalámicas a los estrógenos. Por ejemplo el tratamiento con betanecol, un agonista colinérgico muscarínico, incrementa el número de sitios de unión al estradiol en el citosol de neuronas hipotalámicas de ratas hembras ovariectomizadas y el pre-tratamiento con atropina bloquea los efectos del betanecol (Lauber y Whalen 1988).

La liberación de GnRH desde la eminencia media en ratas cíclicas es estimulada por la administración de antagonistas muscarínicos 11{(2) (dietilamino) metil } {1-piperidinil}-acetil-5.(AF-DX-116) y metoctramina. Dicha estimulación depende del día del ciclo estral en que se realice el tratamiento. Es posible que los efectos inducidos por la administración de estos fármacos sean mediados por receptores muscarínicos del subtipo  $M_4$ . El bloqueo de los efectos de los antagonistas muscarínicos solo fue posible en presencia de prazosin, (un antagonista  $\alpha$ -adrenérgico). Una posible explicación

para la estimulación de la liberación de GnRH por un antagonista muscarínico es que los efectos son el resultado de una intercomunicación entre los receptores muscarínicos y los receptores  $1-\alpha$  adrenérgicos. Así, los agonistas muscarínicos inhiben la liberación de GnRH inducida por los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgico y los antagonistas muscarínicos, al cancelar este efecto inhibitorio permite que los agentes  $\alpha_1$ - endógenos (noradrenalina) induzcan la liberación de GnRH (Koren y col. 1992).

## **PROPÓSITO DEL ESTUDIO**

Con la finalidad de analizar el papel de los receptores muscarínicos de POA-AHA sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario en el día del diestro-2, en este trabajo se cuantificaron los efectos de la microinyección de atropina sobre la expresión del ARNm de los RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y el de la GnRH, en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA, la concentración sérica de LH, FSH, E<sub>2</sub>, T y P<sub>4</sub>, y la ovulación, en horas posteriores al bloqueo colinérgico.

## **HIPÓTESIS**

La falta de ovulación por el bloqueo de los receptores muscarínicos del lado izquierdo de POA-AHA en el día del diestro-2, es el resultado de la alteración de la expresión del ARNm del receptor a estrógenos  $\alpha$ ,  $\beta$  y el de la GnRH.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos de las porciones izquierda o derecha de POA-AHA sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario en el día del diestro-2.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos de las porciones izquierda o derecha de POA-AHA (realizado en el diestro-2) sobre la ovulación, la concentración sérica de LH, FSH, de E<sub>2</sub>, T y de P<sub>4</sub>.
2. Cuantificar la cantidad de ARNm de la GnRH y de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  a estrógenos en animales que no ovularon por el bloqueo de los receptores muscarínicos de POA-AHA en el día del diestro-2.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes (190-230 g) cíclicas de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso al alimento (Purina S.A., México) y agua. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Anestesal, Smith Kline Norden de México) (40 mg/kg p.c.) por vía intraperitoneal, a las 12:30 horas del diestro-2. Se colocaron en un aparato estereotáxico y a cada animal se le microinyectó 6.25  $\mu$ g de atropina en un volumen de 1  $\mu$ l, durante un minuto, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, siguiendo las coordenadas del atlas del cerebro de la rata de Köning y Klippel (1963).

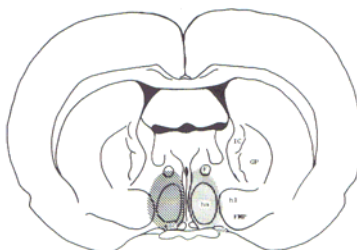


Figura 8. Corte coronal del cerebro de la rata donde se muestra el lado izquierdo y derecho de POA-AHA. Las coordenadas correspondientes al corte son: antero-posterior 0.4 mm, lateral  $\pm$  0.6 mm y vertical 0.86mm con respecto al punto de Bregma (Köning y Klippel, 1963)

Grupos de animales microinyectados fueron sacrificados en los siguientes horarios posteriores a la microinyección del fármaco:

- ⇒ 14:00 horas del diestro-2 (una hora después de la microinyección cerebral)
- ⇒ 09:00 horas del proestro
- ⇒ 17:00 horas del proestro
- ⇒ 09:00 horas del estro esperado



Como grupos testigo absoluto se utilizaron animales intactos sacrificados a las mismas horas que los tratados con atropina. Los animales del grupo control fueron tratados de la misma manera que los grupos experimentales, excepto que en lugar de inyectar el fármaco se suministró el vehículo en el que se disolvió la atropina, que consistió de agua estéril. Estos animales fueron sacrificados en las horas antes señaladas.

### **PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA**

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación. Se recogió la sangre del tronco, la que se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta la cuantificación de  $\text{E}_2$ , T,  $\text{P}_4$ , LH y FSH por radio-inmuno-análisis (RIA). En los animales sacrificados a las 14:00 horas del Diestro-2 ó 09:00 y 17:00 horas del proestro, se disecaron las porciones izquierda y derecha de POA-AHA, según la técnica propuesta por Palkovits (1973) y se obtuvo el ARNm total, el cual se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta la medición de la expresión del ARNm de la GnRH y del RE  $\alpha$  ó RE  $\beta$  por la técnica de retro-trascrición de la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR). A los animales sacrificados en la mañana del estro se les extrajo las trompas uterinas para verificar la presencia o ausencia de ovocitos.

## CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS

La cuantificación de las concentraciones plasmáticas E<sub>2</sub>, T, P<sub>4</sub>, se realizó por RIA mediante el uso de estuches comerciales marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA), que contienen tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (<sup>125</sup>I-Progesterona, <sup>125</sup>I-Testosterona ó <sup>125</sup>I-Estradiol) y calibradores para la realización de la curva patrón (P: 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.0, 20.0 y 40.0 ng/ml; T: 0.0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 ng/ml; E<sub>2</sub>: 0.0, 10.0, 20.0, 50.0, 150.0, 250.0, 500.0 y 900.0 pg/ml ). A cada tubo del estuche se le adicionaron 100 µl de suero problema más 1000 µl de la hormona marcada (<sup>125</sup>I-P, <sup>125</sup>I-T ó <sup>125</sup>I-E<sub>2</sub>). Los tubos se agitaron durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas; posteriormente se decantaron y limpiaron, finalmente con la ayuda de un contador de centelleo gama, se cuantificó la cantidad de la hormona problema. Los datos de la concentración de E<sub>2</sub>, T, se expresaron en pg/ml y los de P<sub>4</sub> en ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 5.3% y 9.87 para P<sub>4</sub>, 6.9% y 10.8% para E<sub>2</sub> y para T de 5.6% y 8.7%. El límite de detección para P<sub>4</sub> fue 0.003 ng/ml, para E<sub>2</sub> y para T fue de 0.09 y 0.00213 ng/ml.

La cuantificación de LH y FSH se realizó por RIA con el anticuerpo rLH-RP3 (NIAMDD-Rat), para la cuantificación de LH y rFSH-RP2 (NIAMDD-Rat) para el caso de FSH, proporcionados por la National Hormona and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). A 100 ml de suero se le adicionó 100 µl de hormona marcada con <sup>125</sup>I y 100µl del primer anticuerpo de suero de borrega para LH o para FSH, y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se le agregaron 100 µl del segundo

anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubaron durante dos horas; los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 30 min. El sobrenadante se decantó, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en un contador de centelleo gama para su análisis. Los datos de la concentración de cada hormona se expresaron en ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fue 7.91% y 5.74% para LH y 9.3% y 6.82% para FSH. El límite de detección de LH y FSH fue de 0.05 y 0.01 ng/ml, respectivamente.

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

1. A la porción izquierda ó derecha de POA-AHA, contenidas en tubos eppendorf estériles se le agregó 300  $\mu\text{l}$  de trizol y se homogenizó con un Politron, modelo PT - MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza).
2. Al tejido homogenizado se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se agitó durante 30 segundos en un vortex, con la finalidad de extraer el ARNm.
3. Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 25 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: una fase inferior orgánica de color rojo y la fase superior acuosa incolora. El ARN quedó en esta última fase, mientras que el ADN y las proteínas se mantienen en la interfase y en la fase orgánica.

4. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de isopropanol, con la finalidad de precipitar el ARN. La muestra se mantuvo a 4° C durante 72 horas.
5. Se centrifugaron las muestras por 25 minutos a 12,000 rpm a 4° C. El ARN se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta
6. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80 %. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4° C.
7. Después de una segunda separación del sobrenadante, los tubos se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril y la pastilla se secó a temperatura ambiente para evitar la insolubilidad de la misma. La pastilla de ARN se disolvió en 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  inyectable (lo que consistió la muestra).
8. Se hicieron alícuotas de 0.4  $\mu\text{l}$  de muestra en 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  inyectable. Se leyó la absorbancia de estas muestras a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La concentración de ARN se determinó conociendo que: una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 mg de ARN  $\text{ml}^{-1}$ . La pureza del ARN se determinó por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm (260/280 nm).

9. Para obtener el ADN complementario (ADNc) se realizó la retro transcripción del ARN total. El control negativo consistió de una muestra de agua que sustituyó al ARN. Los volúmenes utilizados en la técnica se especifican en el cuadro 1.

Cuadro 1. Reactivos utilizados en el desarrollo en la técnica de retrotranscripción.

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

10. Por medio de la técnica de retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de los genes de los RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y el de GnRH. Se utilizó GAPDH como gen control interno. En el cuadro 2 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la técnica.

Cuadro 2. Reactivos utilizados en el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

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

11. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador de gradientes (marca Eppendorf Scientific Inc, Alemania), a las temperaturas y ciclos que se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la retrotranscripción, así como las temperaturas y ciclos utilizados para la técnica de RT-PCR.

Gen	Secuencia sense	Secuencia antisense	Temperatura	Ciclos
GnRH	CAA CCC ATA GGA CCA GTG CTG G	CAC TAT GGT CAC CAG CGG GG	53.0 ° C	32
RE $\alpha$	TTC ACA CCA AAG CCT CGG G	TGC AGC AGC ATC AGC GGA	64.2	32
RE $\beta$	TCC CGG CAG CAC CAG TAA C	CCC AGA TGC ATA ATC GCT GC	55	32
GAPDH			55.1 ° C	32

Cabe señalar que las temperaturas de alineación, así como el número de ciclos utilizados para los genes en cuestión fueron previamente estandarizados para la optimización del experimento.

12. Una vez obtenidos los productos de PCR, se corrieron los productos en gel de agarosa al 2%, preparado con TBE al 1% y teñido con BrET. Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal, modelo Horizon 11-14 (Life Technologies<sup>tm</sup>, gibco brl, USA).

13. Se tomaron fotografías del gel con una cámara Kodak EDAS 216.

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

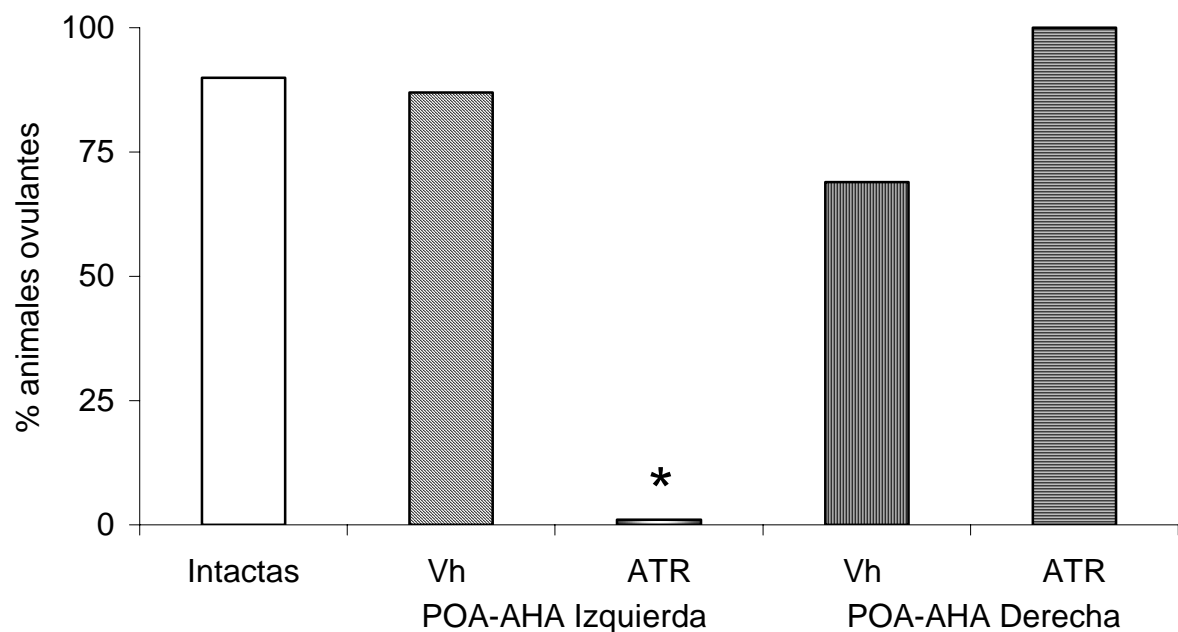
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del porcentaje de animales ovulantes se analizó por la prueba de  $X^2$  y los del número de ovocitos por la prueba de Kruzkall-Wallis seguida de la prueba de "U" Mann-Withney. Los datos de las concentraciones séricas de las hormonas y de la expresión relativa del ARNm para RE- $\alpha$ , RE- $\beta$ , y la de GnRH fueron analizados mediante la prueba de análisis de las varianzas (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de "t" de Student. En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue  $\leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### Animales Ovulantes

La inyección del vehículo en el lado Izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 horas del diestro-2 (una hora después del tratamiento) no modificó el porcentaje de animales que ovulan al estro esperado. En cambio, la inyección de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA bloqueó la ovulación de todos los animales tratados, mientras que la del lado derecho no la alteró (Gráfica 1).



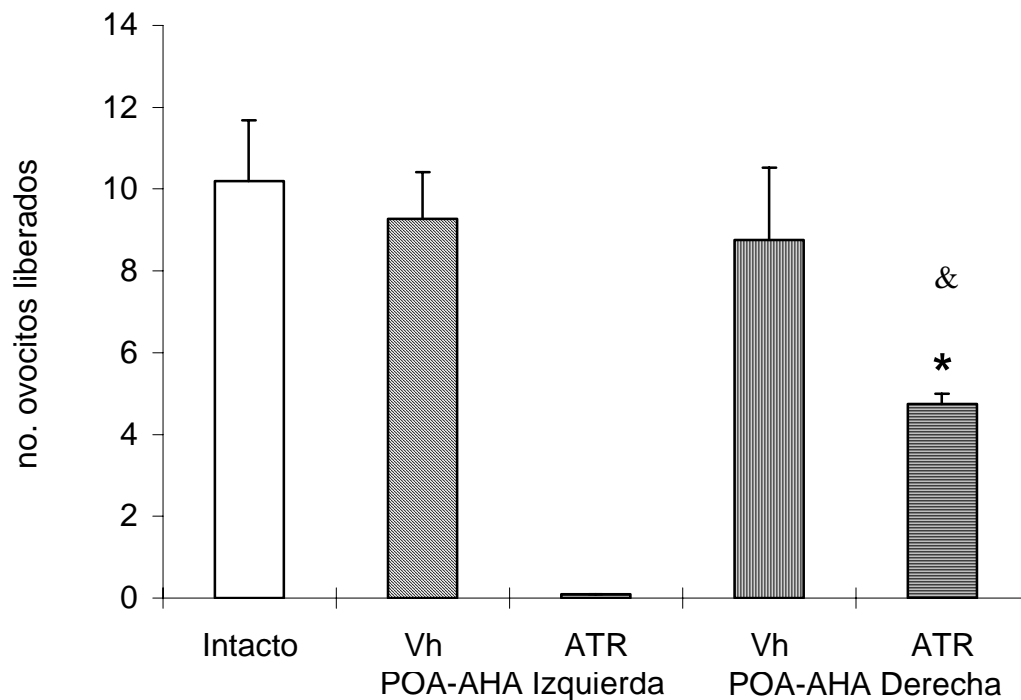
\* $p < 0.05$  vs .Vh en el mismo lado (prueba de  $X^2$ )

Gráfica 1. Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado, después de ser inyectados con vehículo (Vh) o con atropina (ATR) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA.



## Número de Ovocitos

En comparación con el grupo de animales intactos, la inyección de vehículo no modificó el número de ovocitos liberados. Aún cuando los animales con microinyección de atropina en el lado derecho de POA-AHA ovularon, el número de ovocitos fue significativamente menor que en los animales intactos o inyectados con vehículo (Gráfica 2).



\*  $p < 0.05$  vs. Intactas; &  $p < 0.05$  vs. Vh en POA-AHA derecha (Kruskall Wallis seguida de la prueba de U de Mann-Withney)

Gráfica 2. Media + e.e.m del número de ovocitos liberados por ratas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o con atropina (ATR) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA.

---

Los únicos grupos en los que se cuantificó la concentración de gonadotropinas, hormonas esteroides y la expresión relativa del ARNm para el receptor a estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y de la GnRH fueron los tratados del lado izquierdo de POA-AHA, ya que la inyección del fármaco en ese lado de POA-AHA resultó en bloqueo de la ovulación.

### **Expresión relativa del ARNm para el receptor a estrógenos $\alpha$ (RE- $\alpha$ )**

En el grupo de animales sin tratamiento sacrificados a las 09:00 y 17:00 horas del proestro, la expresión relativa del RE- $\alpha$  es asimétrica: la mayor expresión se observó en el lado derecho de POA-AHA.

A las 09:00 horas del proestro, el tratamiento con el vehículo provocó aumento significativo del ARNm en ambos lados de POA-AHA y desaparece la asimetría. En cambio, a las 17:00 horas del mismo día del ciclo, este tratamiento no modificó la expresión del RE- $\alpha$  y por lo tanto se mantiene la asimetría descrita en los animales intactos.

La microinyección de atropina bloqueó la expresión del RE- $\alpha$  en ambos lados de POA-AHA y en las dos horas del proestro estudiadas. (Gráfica 3).

Los resultados de la expresión del ARNm del RE- $\alpha$  de los animales sacrificados a las 14:00 horas del diestro-2 no se muestran debido a que las muestras de los grupos inyectados con el vehículo y la atropina se contaminaron.

### **Expresión relativa del ARNm para el receptor a estrógenos $\beta$ (RE- $\beta$ )**

En el animal intacto, la expresión del ARNm del RE- $\beta$  es asimétrica a las 14:00 horas del diestro-2, siendo significativamente mayor del lado izquierdo. En el día del proestro desaparece la asimetría y disminuye significativamente la expresión del ARNm (Gráfica 4).

La inyección del vehículo provocó disminución de la expresión ARNm del RE- $\beta$  en ambos lados de POA-AHA a las 14:00 horas del diestro-2, la aumentó a las 09:00 del proestro y no la modificó a las 17:00 horas de este día. En los tres tiempos estudiados la asimetría desaparece (Gráfica 4).

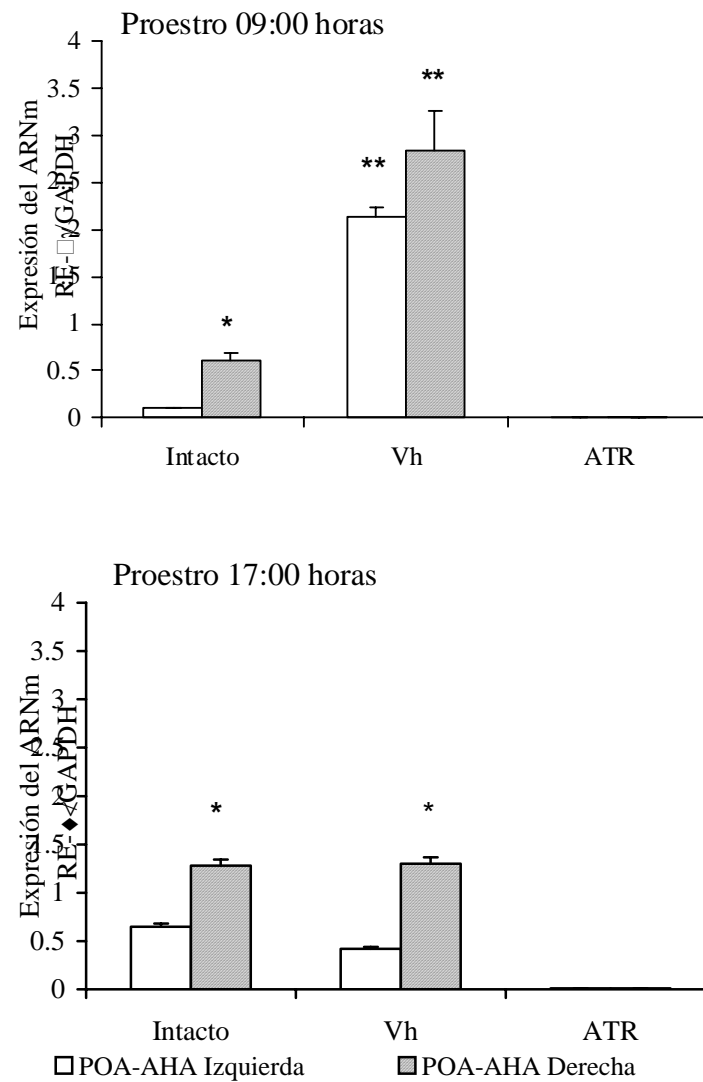
La inyección de atropina en POA-AHA bloqueó la expresión del ARNm del RE- $\beta$  en ambos lados de POA-AHA en las horas estudiadas. (Gráfica 4).

### **Expresión relativa del ARNm para la GnRH**

En el animal intacto, la expresión del ARNm de la GnRH es asimétrica a las 14:00 horas del diestro-2, la que es mayor del lado derecho de POA-AHA. En el proestro la asimetría desaparece y la expresión es menor que en diestro-2 (Gráfica 5).

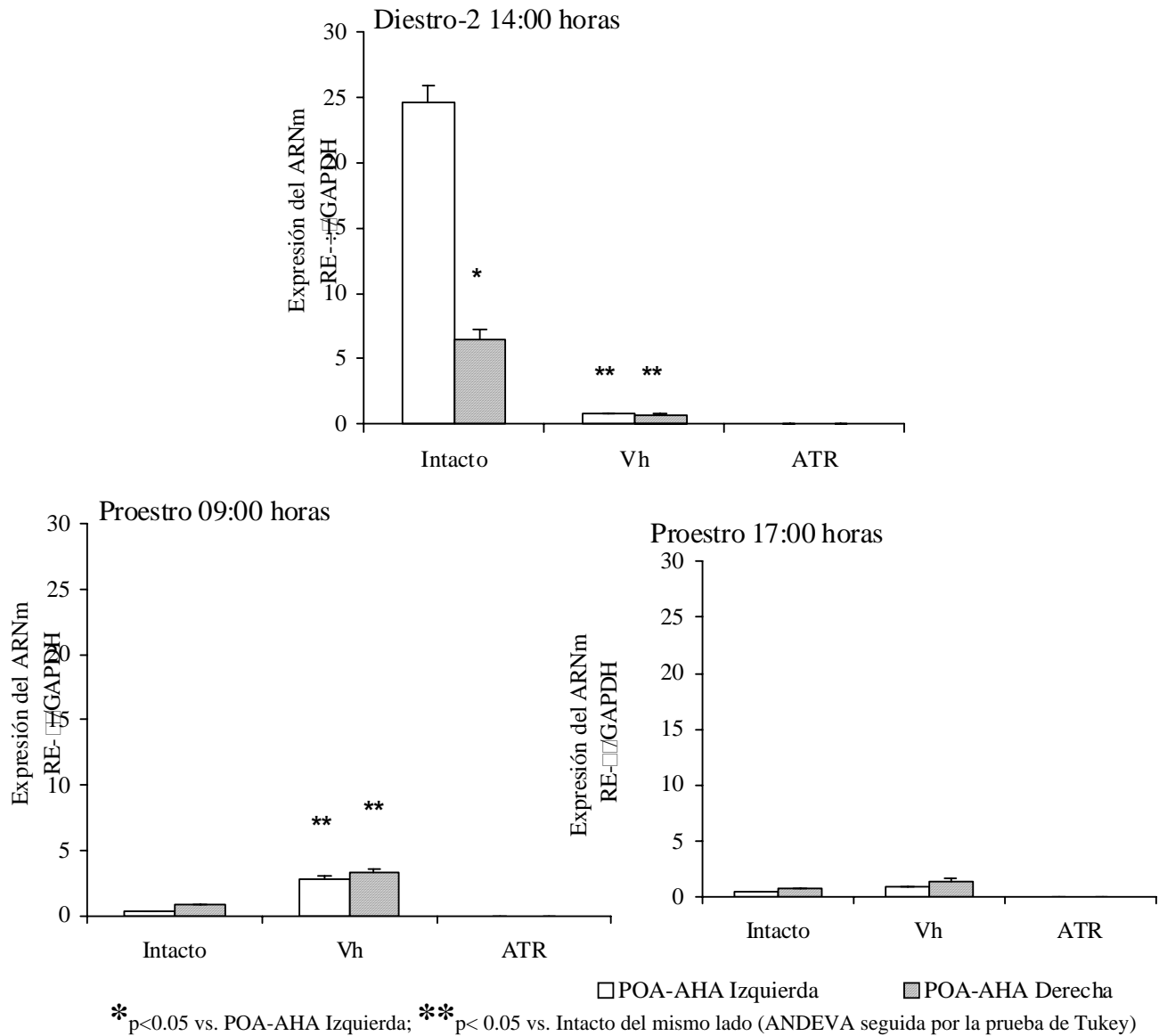
La inyección del vehículo provocó disminución en la expresión del ARNm de la GnRH en ambos lados de POA-AHA cuando se cuantifica a las 14:00 horas del diestro-2. Cuando los animales son sacrificados a las 09:00 o 17:00 horas del proestro no se observaron cambios significativos respecto al grupo de animales intactos. (Gráfica 5).

La inyección de atropina en POA-AHA a las 14:00 horas del diestro-2, no provocó cambios en la expresión del ARNm de la GnRH respecto al grupo inyectado con vehículo. Cuando ésta se cuantificó a las 09:00 o 17:00 horas del proestro el ARNm no fue detectado (Gráfica 5).

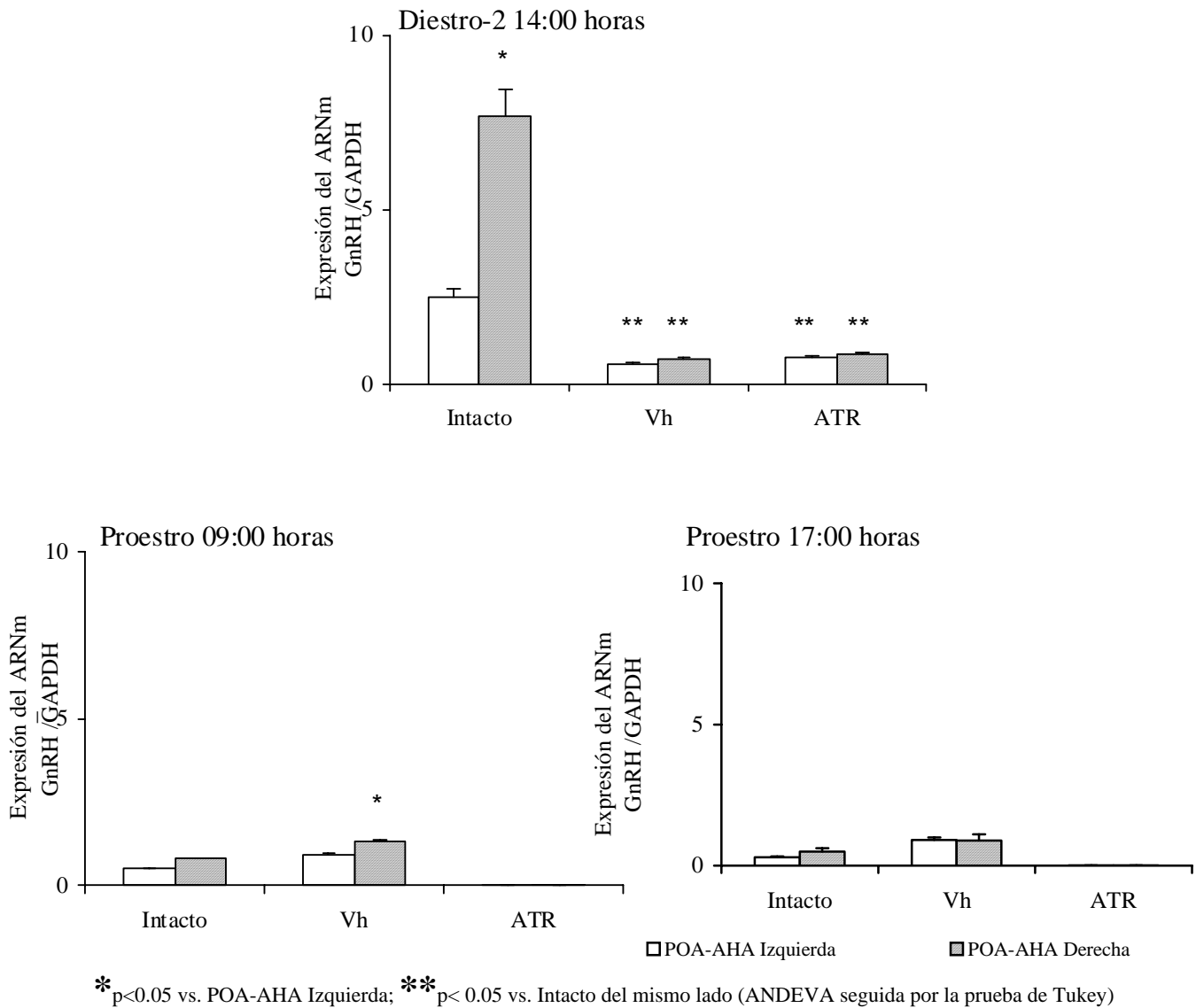


\* $p < 0.05$  vs. POA-AHA Izquierda; \*\* $p < 0.05$  vs. Intacto del mismo lado (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey)

Gráfica 3. Media + e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para RE- $\alpha$ , en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA en ratas hembras adultas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o con atropina (ATR) en la porción izquierda de POA-AHA.



Grafica 4. Media + e.e.m. de la expresión del ARNm para RE- $\beta$ , en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA en ratas hembras adultas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o con atropina (ATR) en la porción izquierda de POA-AHA.

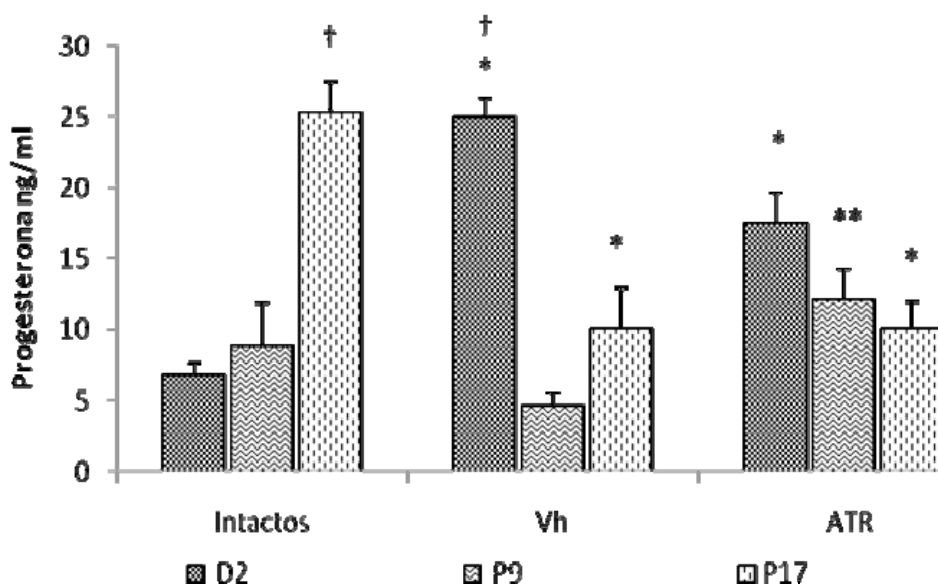


Gráfica 5. Media + e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para GnRH, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA en ratas hembras adultas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o con atropina (ATR) en la porción izquierda de POA-AHA.

### Concentración de Progesterona

En los animales intactos, la concentración de progesterona alcanzó el máximo hacia las 17:00 horas del proestro. La inyección del vehículo provocó aumento significativo en la concentración de esta hormona a la hora de haber realizado la microinyección (diestro-2, 14:00 horas) e inhibió el máximo observado a las 17:00 h del proestro.

En los animales inyectados con atropina, la concentración de la hormona no se modificó respecto al grupo de animales inyectados con el vehículo, excepto que a las 09:00 horas del proestro el fármaco aumentó la concentración de la hormona (Gráfica 6).



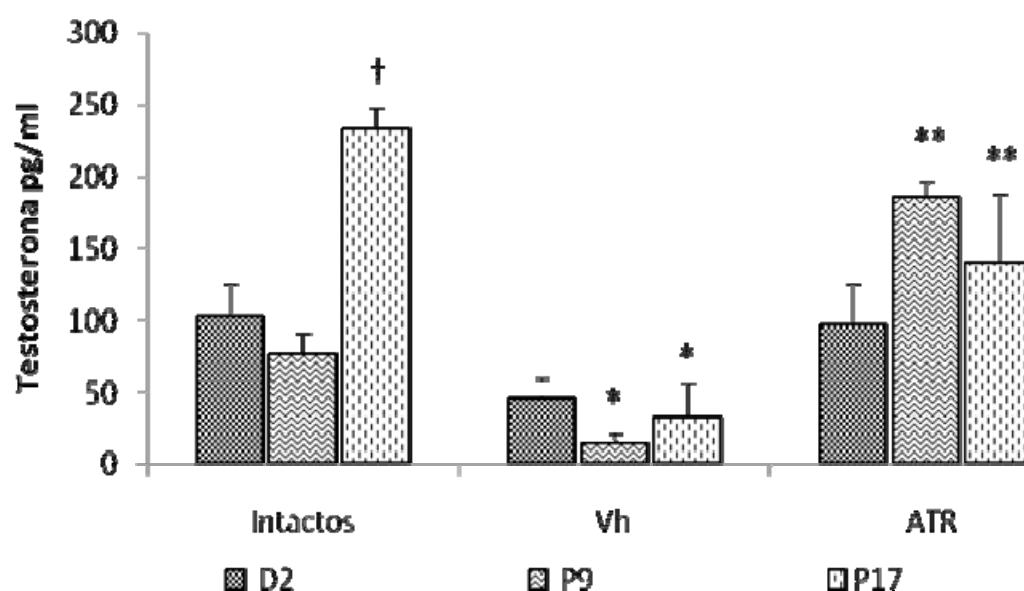
†  $p < 0.05$  vs. Las otras horas estudiadas (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey);

\*  $p < 0.05$  vs. Intactas a la misma hora; \*\*  $p < 0.05$  vs. Vh; (Prueba "t" de Student).

Gráfica 6. Media + e.e.m. de la concentración de progesterona en el suero de ratas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o atropina (ATR) en la porción izquierda de POA-AHA.

### Concentración de Testosterona

En los animales intactos, la concentración de testosterona aumentó significativamente en la tarde del proestro (17:00 horas). La inyección de vehículo provocó disminución de la concentración de la hormona en todas las horas estudiadas. En cambio, la microinyección de atropina provocó aumento en la concentración de la hormona, en la mañana y en la tarde del proestro (09:00 y 17:00 horas), alcanzando valores semejantes a los observados en los animales intactos. (Gráfica 7).



†  $p < 0.05$  vs. Las otras horas estudiadas (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey);

\*  $p < 0.05$  vs. Intactas a la misma hora; \*\*  $p < 0.05$  vs. Vh; (Prueba "t" de Student).

Gráfica 7. Media + e.e.m. de la concentración de testosterona en el suero de ratas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o atropina (ATR) en la porción izquierda de POA-AHA.

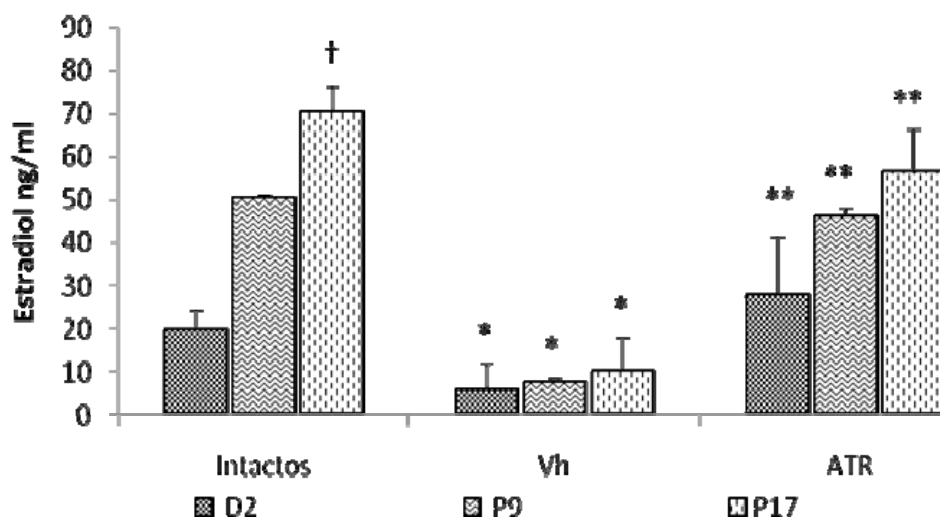


## Concentración de Estradiol

En los animales intactos el máximo en la concentración de la hormona ocurrió a las 17:00 horas.

En los animales microinyectados con vehículo disminuyó la concentración de la hormona respecto al animal intacto en todas las horas estudiadas.

La microinyección de atropina provocó aumentó de la concentración de estradiol, respecto a los animales tratados con el vehículo, de tal forma que la concentración de la hormona fue semejante a los animales intactos (Gráfica 8).



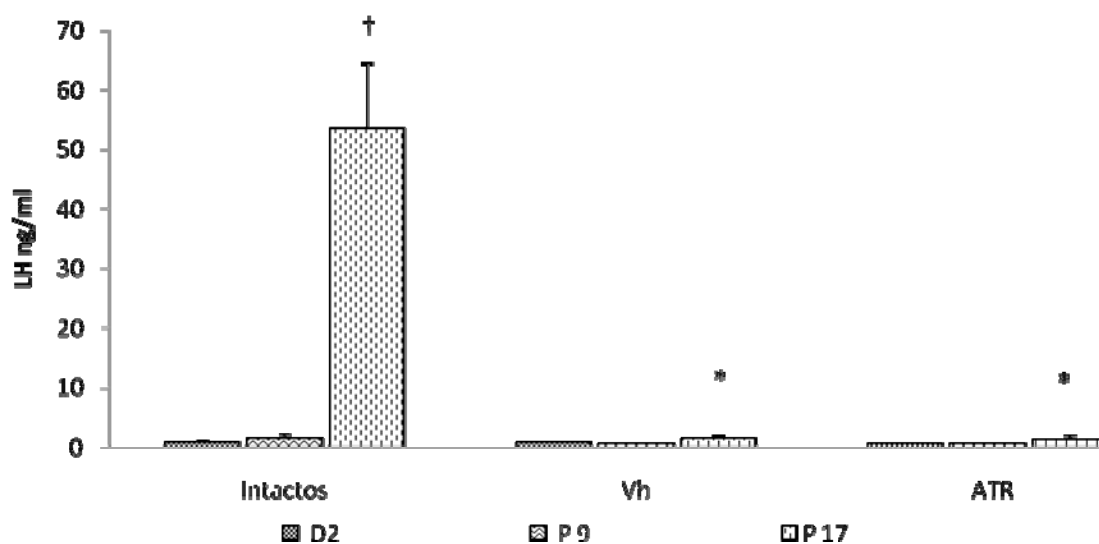
†  $p < 0.05$  vs. Las otras horas estudiadas (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey);

\*  $p < 0.05$  vs. Intactas a la misma hora; \*\*  $p < 0.05$  vs. Vh; (Prueba "t" de Student).

Gráfica 8. Media + e.e.m. de la concentración de estradiol en el suero de ratas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o atropina (ATR) en la porción izquierda de POA-AHA.

### Concentración de la Hormona Luteinizante

En los animales intactos la concentración máxima de la LH ocurrió a las 17:00 horas del proestro. Tanto la microinyección de vehículo como de atropina disminuyó la concentración de LH a las 17:00 horas del proestro (Gráfica 9).



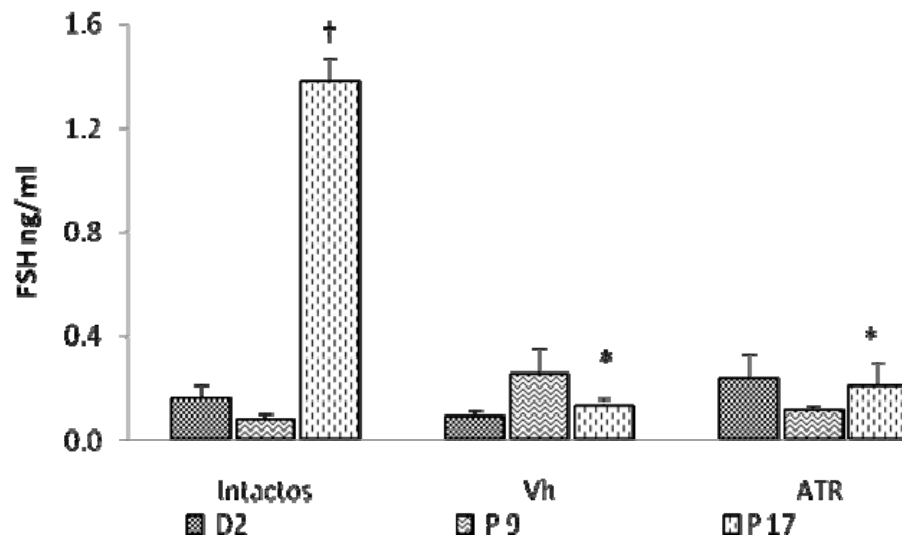
†  $p < 0.05$  vs. Las otras horas estudiadas (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey);

\*  $p < 0.05$  vs. Intactas a la misma hora; \*\*  $p < 0.05$  vs. Vh; (Prueba "t" de Student).

Gráfica 9. Media + e.e.m. de la concentración de la LH en el suero de ratas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o con atropina (ATR) en la porción izquierda de POA-AHA.

### Concentración de la Hormona Folículo Estimulante

En los animales intactos, la concentración máxima de la FSH ocurrió a las 17:00 horas del proestro. Tanto la microinyección de vehículo como de atropina disminuyó la concentración de FSH a las 17:00 horas del proestro (Gráfica 10).



†  $p < 0.05$  vs. Las otras horas estudiadas (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey);

\*  $p < 0.05$  vs. Intactas a la misma hora; \*\*  $p < 0.05$  vs. Vh; (Prueba "t" de Student).

Gráfica 10. Media + e.e.m. de la concentración de la Hormona Folículo Estimulante en el suero de ratas intactas o microinyectadas con vehículo (Vh) o con atropina (ATR) en la porción izquierda de POA-AHA.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de este estudio nos permiten corroborar que en la rata, el sistema muscarínico de POA-AHA regula la ovulación de manera estimulante y asimétrica (Cruz y col.1989). La falta de ovulación (realizada en el diestro-2) en los animales con bloqueo del sistema muscarínico en la porción izquierda de POA-AHA, estaría vinculada al bloqueo de la expresión de los ARNm del RE- $\alpha$ , del RE- $\beta$  y del de GnRH así como a la alteración en el patrón de secreción de las gonadotropinas y las hormonas esteroides.

El implante de cristales de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA, a las 13:00 horas del diestro-2 interrumpe la ovulación, efecto que no se observa cuando el implante se coloca en la porción derecha de esta región. Estos hechos llevaron a sugerir que en este día del ciclo, la ovulación depende de la activación de los receptores muscarínicos de la porción izquierda de POA-AHA (Cruz y col.1989). Estos mismos efectos se observaron al microinyectar la atropina en solución, lo que confirma la participación asimétrica del sistema muscarínico en la regulación de la ovulación (Cruz y col.1989).

La falta de ovulación por el bloqueo de los receptores muscarínicos de la porción izquierda de POA-AHA puede ser explicada por la falta de expresión de los ARNm del RE- $\alpha$  y RE- $\beta$ , lo que provocó una ausencia de la secreción de la GnRH, inhibición de la secreción preovulatoria de la LH y en consecuencia la falta la ovulación. Esta idea es apoyada por el hecho de que la inyección subcutánea

de GnRH sintética o de LH a las 14:00 horas del proestro induce la ovulación en todos los animales que fueron implantados con atropina en la porción izquierda de POA-AHA (Cruz y col.1990). En el día del diestro-2, animales inyectados por vía subcutánea con sulfato de atropina a las 13:00 horas no presentan el “pico” preovulatorio de LH que ocurre en la tarde del proestro (Villegas y col. 1997). Un hecho semejante lo observamos en este estudio al microinyectar atropina en la porción izquierda de POA-AHA a las 13:00 horas del diestro-2.

Los cambios horarios y asimétricos observados en la expresión del ARNm para el RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y de la GnRH, por la inyección del vehículo podrían estar asociados a efectos del estrés quirúrgico, aunque dichos cambios no comprometieron la ovulación de los animales en el día del estro esperado. Ya ha sido mostrado que la adrenalectomía reduce la expresión ARNm del RE- $\beta$  en el núcleo paraventricular del hipotálamo, área involucrada en el comportamiento del estrés y la ansiedad, mientras que la inyección de corticoides revierte totalmente el efecto de ella (Isgor y col 2003).

El hecho que desaparezca la asimetría en la expresión de los mensajeros cuando se inyecta el vehículo, podría ser explicado si ésta fuese establecida por señales nerviosas provenientes de otras zonas del sistema nervioso central que transcurran por la parte dorsal del hipotálamo, las cuales al ser seccionadas por la aguja, estimule o inhiba la secreción de factores que establezcan la asimetría en la expresión del ARNm de los factores estudiados. Esta señal tendría conexión con

ambos lados de POA-AHA. Para corroborar esta hipótesis sería necesario llevar a cabo toda la maniobra experimental, sin inyectar el agua estéril y cuantificar en ambos lados de POA-AHA la expresión de los mismos mensajeros en las horas analizadas

El hecho que la microinyección de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA, a las 13:00 h del diestro-2, haya bloqueado la expresión del ARNm del RE- $\alpha$  en ambos lados de POA-AHA, nos confirma que la expresión del gen del RE- $\alpha$  es estimulada por el sistema colinérgico, específicamente por los receptores muscarínicos. Al parecer este efecto ocurre en cualquier etapa del ciclo, ya que Arteaga-López y colaboradores (2005), observaron que en el día del estro y del diestro-1, la inyección subcutánea de sulfato de atropina bloquea la expresión del ARNm del RE- $\alpha$  en ambos lados de POA-AHA a la hora de inyectar el fármaco.

Los resultados llevados a cabo con ratones mutantes, en los cuales el RE- $\alpha$  es desactivado (ratones knockout) llevaron a plantear que el RE- $\alpha$  es necesario para que se lleve a cabo el efecto feedback estimulante de los estrógenos sobre la secreción de GnRH (Wintermantel y col. 2006).

Dado que las neuronas GnRH de POA-AHA no expresan el RE- $\alpha$  pero sí el RE- $\beta$ , se considera que los efectos que pueda producir la unión del estradiol al RE- $\alpha$  serían de manera indirecta, al actuar sobre inter-neuronas que expresan dicho receptor (como son las neuronas que sintetizan glutamato, GABA,

acetilcolina y neuropéptido Y, células de la glía o células endoteliales) (Wintermantel y col, 2006; Rage col. 1997; Smith y Jennes 2001; Shughrue y col. 2000; Petersen y col. 2003; Prevot 2002).

La falta de expresión del ARNm para el RE- $\beta$  y para la GnRH en ambos lados de POA-AHA en los animales micro-inyectados con atropina al medio día del diestro-2, nos lleva a sugerir que la acetilcolina por medio de los receptores muscarínicos también regula de manera estimulante la expresión de estos genes. Aunque la neurona GnRH expresa el RE $\beta$ , se desconoce si tiene receptores muscarínicos. Se ha mostrado que los astrocitos localizados en el área preóptica coexpresan tanto RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y receptores muscarínicos (Hösli y col. 2001). Así que es posible que los efectos de la atropina sobre el mensajero del RE $\beta$  y de la GnRH también ocurran por medio de los astrocitos.

Arteaga-López y col. (2005) mostraron que la inyección subcutánea de sulfato de atropina disminuye el mensajero del RE $\beta$  y de la GnRH en ambos lados de POA-AHA pero no lo inhibe, como lo observamos al microinyector la atropina en POA-AHA. La diferencia observada entre uno y otro grupo de resultados puede ser explicada en función de la dosis y al tiempo de acción al que son expuestas las células de esta zona del hipotálamo.

Otra explicación a la falta de ovulación en animales con bloqueo del sistema muscarínico, estaría relacionada con la modificación temporal del patrón

de secreción de la progesterona, o al retraso de la secreción preovulatoria de estradiol en el día del proestro, la que a su vez modificaría los mecanismos neuroendocrinos centrales y periféricos que inducen la ovulación. En este estudio, la microinyección de atropina en la porción izquierda de POA-AHA indujo un aumento (4 veces) en la concentración de progesterona a la hora del inyectar tanto el vehículo como el fármaco. Everett y col. (1949) mostraron en ratas con ciclos de cuatro días, que la inyección de progesterona en los días de diestro-1 o diestro-2 retrasa la ovulación 24 horas. Por tanto, es posible que en los animales con microinyección de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA, la ovulación se haya retrasado, lo que indicaría que en esta zona de estudio existiría un “reloj” vinculado al sistema muscarínico que regularía el momento de la ovulación en la rata.

También es posible que los animales con inyección de atropina en POA-AHA no hayan ovulado debido a que la concentración de  $E_2$  se mantuvo elevado por más horas (hasta las 17:00 horas del proestro), momento en el que en condiciones normales la concentración de  $E_2$  ha caído. Es bien sabido es indispensable que la concentración de  $E_2$  disminuya rápidamente, para que se presente la secreción preovulatoria de las gonadotropinas en la tarde del proestro (Smith 1999).

Dado que los animales con bloqueo del sistema muscarínico en la porción derecha de POA-AHA ovularon, pero el número de ovocitos promedio que liberaron fue significativamente menor que los animales inyectados con el



vehículo, podemos sugerir que en este día del ciclo, la porción derecha de POA-AHA no regularía la secreción de GnRH y gonadotropinas, pero sí la respuesta de los ovarios a estas últimas. Es posible que esta función implique una vía neuronal que surja desde esta zona del hipotálamo. Mediante el uso de técnicas de infección neuronal (inmunotinción del virus de la rabia) se ha estudiado la vía neural que conecta al ovario con diferentes áreas del sistema nervioso central (Gerendai y col 2000). Una vez inyectado el virus de la rabia en el ovario, la marca fue identificada en células de la columna intemediolateral del asta dorsal y del núcleo autonómico central, en el bulbo y el puente (área postrema, núcleo del tracto solitario, complejo vagal dorsal, núcleo ambiguo, núcleo para-gigantocelular, núcleo para-piramidal, núcleo A<sub>1</sub>, A<sub>5</sub> y A<sub>7</sub>, núcleo del rafé dorsal, *locus ceruleus*, núcleo *sub-ceruleus*, núcleo de Barrington, núcleo Kölliker-Fuse); en el mesencéfalo (la zona ventrolateral de la materia gris periacueductal); el diencefalo (núcleo hipotalámico paraventricular, hipotálamo lateral y dorsal, núcleo arcuato, zona incerta, área perifornical e hipotálamo anterior); en el telencefalo (núcleo de la estría terminal y el núcleo central de la amígdala) (Gerendai y col, 1998)

En conjunto, los resultados de este estudio nos llevan a sugerir que en el día del diestro-2, el sistema colinérgico del lado izquierdo de POA-AHA regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de la FSH y de la LH, así como la de P<sub>4</sub> en la tarde del día del proestro. En cambio, el sistema regularía de manera inhibitoria la secreción de E<sub>2</sub> y T.

En este día del ciclo estral, la actividad del sistema colinérgico del lado derecho de POA-AHA regularía los efectos de las gonadotropinas sobre el crecimiento y diferenciación de los folículos, lo que se traduciría en disminución del número de ovocitos liberados.

## CONCLUSIONES

1. En el día del diestro-2, el sistema colinérgico de POA-AHA regula de manera asimétrica la ovulación.
2. El sistema colinérgico del lado izquierdo de POA-AHA estimula la expresión del ARNm del RE- $\alpha$ , del RE- $\beta$  y de la GnRH, la secreción preovulatoria de FSH y LH, así como la de P<sub>4</sub> en el día del proestro.
3. El sistema colinérgico del lado izquierdo de POA-AHA inhibe la secreción de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en el día del proestro.
4. El sistema colinérgico del lado derecho de POA-AHA modula la respuesta del ovario a las gonadotropinas, lo que se refleja en la disminución del número de ovocitos liberados.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

ADVIS JP, AHMED CE, OJEDA SR. (1989). Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. *Brain Res. Bull.* 22: 605-610.

ARTEAGA-LÓPEZ PR, DOMÍNGUEZ R, CERBÓN MA. (2003). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the Left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrina.* 21:251-260.

ARTEAGA-LÓPEZ PR, DOMÍNGUEZ R, CERBÓN MA, ARRIETA I, MENDOZA-RODRÍGUES CA, CRUZ ME. (2005). Effects of cholinergic system blockade on the mRNA expression of GnRH and estrogen receptor isoforms in both sides of the preóptica and anterior hypothalamic area of cycle female rat. ; XXX Reunión Annual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Guanajuato, Gto., Méx. 114-128.

AVISSAR S, EGOZI Y, SOKOLOVSKY M. (1981). Studies on muscarinic receptors in mouse and rat hypothalamus: A comparison of sex and cyclical differences. *Neuroendocrinology.* 32:295-302.

BAKALKIN GY, TSIBEZOV VV, SJUTKIN EA, VESELOVA SP, NOVIKOW ID KRIVOSHEEV OG. (1984). Lateralization of LH-RH in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 296: 361-364.

BARRETT TJ, SPELSBERG TC. (1998). Steroid receptors at the nexus of transcriptional regulation. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31:185-193.

BROWN TR. (1999). Steroid hormones, Overview. En: *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 4, 634-644.

BURRIS TP. (1999). Progestins. En: *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 4, 23-30.

CATT KJ. (1999). Receptors for Hormones, Overview. En: *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 4, 195-205.

CHAVEZ R, CRUZ ME, DOMINGUEZ R. (1987). Diferences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi-and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinol.* 113: 397-401.

COOK B. (1987). Endocrine asymmetry (Comentary). *J. Endocrinol.* 113: 331-332.

---

CRUZ ME, JARAMILLO LP, DOMINGUEZ R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J. Endocrinol.* 123: 437-439.

CRUZ ME, ARTEAGA PR, DE LA HUERTA M, SÁNCHEZ M, DOMÍNGUEZ R. (1998). Differences in acetylcholine content, binding and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Medical Science Research.* 25:823-825.

CRUZ ME, MORAN JL, JARAMILLO LP, DOMINGUEZ R. (1990). Differential effects of a unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rat. *J. Endocrinol.* 124: 37-41.

CRUZ ME, MORAN JL, JARAMILLO LP, DOMINGUEZ R. (1990<sup>a</sup>). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Res Bull.* 24: 739-742.

DOHANICH GP, WITCHER JA, WEAVER DR, CLEMENS LG. (1982). Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Res.* 241: 347-350.

DOMÍNGUEZ R, RIOBONI L, ZIPITRIA D, 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, R, CRUZ ME, CHAVEZ R. (1988). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: *Growth factors and the ovary.* Editor A. Hirshfield. Plenum Press, Nueva York. 321-325.

DOMÍNGUEZ R, CRUZ ME. (1989). Different effects of unilateral lesions of the hypothalamus on the spontaneous ovulation in intact and hemiovariectomized adult rat. XVI Reunión Annual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Zacatecas, Méx. 399-422.

DOMÍNGUEZ R. (1997) Endocrinología de las gónadas. En: *Curso internacional Precongreso. Actualización en Fisiología.* Ed. SMCF y PUIS-UNAM, México. 271-279.

ECKENSTEIN F, THOENEN H. (1982). Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *EMBOJ.* 1: 363-368.

EGOZI Y, KLOOG Y, SOKOLOVSKY M. (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrus cycle. *Brain Res.* 383: 310-313.

EVERETT JW (1949). Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in rat. *Endocrinology.* 4-3: 389-405.

EVERETT JW, SAWYER CH, MARKEE JE. (1949). A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cycle rat. *Endocrinology*. 44: 234-250.

FALKENSTEIN E, TILLMANN HC, CHRIST M, MEURING M, WEHLING. (2000). Multiple actions of steroid hormones -- a focus on rapid, nongenomic effect. *Pharmacol Rev*. 52: 513-556.

FERIN M. (1999). Ovarian Cycle, mammals. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 3: 547-553.

FINK KL, WIEBEN ED, WOLOSCHAK GE, SPELSBERG TC. (1988). Rapid regulation of c-myc protooncogene expression by progesterone in the avian oviduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:1796-1800.

FORSTHOEFEL A, THOMPSON EA. (1987). Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular protooncogene in P1798 cell. *Mol Endocrinol*. 1: 899-907.

FRANKEL AI, CHAPMAN JC, COOK B, (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *J. Endocrinol*. 122: 485-488.

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

FUKUDA, YAMANOUCHI K, NAKANO Y, FUKUDA M, ARAI Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neurosci. Lett*. 51: 365-370.

FUNABASHI T, MITSUSHIMA D, NAKAMURA TJ, UEMURA T, HIRAHARA F, SHINOHARA K, SUYAMA K, KIMURAF. (2002). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. En: *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors*. Parhar I. 141: 165-173.

GANON WF. (2001) Regulación central de la función viceral. En: *Filología Medica*. Medina CA El Manual Moderno. Capitulo 14: 253-303.

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

GERENDAI I. (1980). Unilateral complete isolation of the medial basal hypothalamus interferes with the compensatory ovarian growth following unilateral ovariectomy. *Neuroendocr. Lett*. 2: 39.

---

GERENDAI I, DRAGO F, CONTINELLA G, SCAPAGNINI V. (1984). Effects of mastectomy and vagotomy on grooming behavior of the rat: Possible involvement of prolactin. *Physiol Behav.* 33: 1-4.

GERENDAI I. (1986). Laterality in the Neuroendocrine Systems. En: Duality and unity of the brain. Unified functioning and specialization of the hemispheres. Editor Ottoson, D., Proceedings of an International Symposium held at The Wenner Gren Center, Stockholm. 17-28.

GERENDAI I, TOHT IE, BOLDOGKOI Z, MEDVECZKY I, HALASZ B. (2000). CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *J Auton Nerv Syst.* 80: 40-45.

GUSTAFSSON JA, MATTHEWS J. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Department of Bioscience at Novum, Karolinska Institutet. 3, 281-292.

HAGER GL, ARCHER TK. (1991). The interaction of steroid receptors with chromatin. En *Nuclear Hormone receptors*. Ed. Parker MG. Academic Press. New York. 217.

HÖSLI, E, JURASIN K, RÜHL W, LÜHY R, HÖSLI L. (2001). Colocalization of androgen, estrogen and cholinergic receptors on cultured astrocytes of rat central nervous system *Int. J. Devl. Neuroscience.* 19: 11–19.

ING NH. (1999). Steroid hormone receptors Overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 4: 654-661.

ISGOR C, CECCHI M, KABBAJ M, AKIL H, WATSON SJ. (2003). Estrogen receptor beta in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterone. *Neuroscience.* 121: 837–845.

KILEN SD, SCHWARTZ B. (1999). Estrous cycle. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 2: 127-136.

KLANKALYA B, CHAN A. (1988). Inhibition of hypothalamic and pituitary muscarinic receptor binding by progesterone. *Neuroendocrinology.* 47: 294- 302.

KÖNING JFR, KLIPPEL RA. (1963). The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 162.

KOREN D, EGOZI, SOKOLOVSKY M. (1992). Muscarinic envelopment in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Molecular Cell Endocrinology.* 90: 87-93.

---

KUIPER GGM, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl- Acad Sci USA*. 93: 5925–5930.

LANDERS JP, SPELSBERG TC. (1992). New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade mode for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev Gene Express*. 2: 19-63.

LAU CK, SUBRAMANIAM M, RASMUSSEN K, SPELSBERG TC. (1990). Rapid inhibition of the c-jun proto-oncogene expression in avian oviduct by estrogen. *Endocrinology*. 127: 2595-2597.

LAUBER AH, WHALEN RE. (1988). Muscarinic cholinergic modulation of hypothalamic estrogen binding sites. *Brain Research*. 443: 21-26

LIBERTUM C, MccANN SM. (1973). Blockade of the release of gonadotropins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats. *Endocrinology*. 92: 1714-1724.

MALLEY BW, STROTT ChA. (2001). Hormonas Esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En: *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri RI. Editorial Medica Panamericana. Argentina. 118-143.

McDONNELL DP. (2000). The mechanism of action of steroid hormone receptors. En: *Principles of molecular regulation*. Conn PM, Means AR. Humana Press Inc. Nueva Jersey. 351-356.

McGEER PL, ECCLES JC, McGEER EG. (1987). *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. Segunda edición. Nueva York. 150.

MIZUNUMA H, DEPALATIS LR, McCANN SM. (1983). Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: Evidence for direct neural connection between testis and CNS. *Neuroendocrinology*. 37: 291-296.

NANCE DM, MORGER WH. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemi-castration. *Brain Res. Bull*. 8: 299-302.

NANCE DM, WHITE JP, MOGER WH. (1983). Neural regulation of the ovary: Evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control. *Brain Res. Bull*. 10: 353-355.

NANCE DM, BHARGAVA M, MYATT GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Res. Bull*. 13: 651-655.

NISTICÓ G, MÜLLER EE. (1989). Neurotransmitters, neuromodulators and neuromediators. En: *Brain messengers and the pituitary*, 2da. Edición, Academic Press. New York. 15-228.



---

NORDEEN EJ, YAHR P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science*. 218: 391-393.

NORRIS OD. (1996). An Overview of Chemical Regulation. En: *Veterebrate Endocrinology*. Academic Press. 1-22: 146-150.

NORVITHCH ME, HARVEY S SMIT S, HAGSTROM JE, WIEBEN ED. (1989). Androgens affect the processing of secretory protein precursors in the guinea pig seminal vesicle. I. Evidence for androgen-regulated proteolytic processing. *Mol Endocrinol*. 3:1788-1796.

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

PALKOVITS M (2000). Micro- and Macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Conn PM y Freeman ME. Human Press. 23-31.

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

PETERSEN SL, OTTEM EN, CARPENTER CD. (2003). Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biology Reproduction*. 69: 1771-1778.

PREVOT V. (2002). Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol*. 14: 247-255.

RAGE F, LEE BJ, MA YJ, OJEDA SR. (1997). Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 by activating a glia-to-neuron signaling pathway. *J. Neurosci*. 17: 9145-9156.

RAINBOW TC, DEJROFF V, LUINE V, MCEWEN B. (1980). Estradiol-17b increase the number of mscarinic receptors in hypothalamic nuclei. *Brain Research*. 198: 239-243.

RAO ChV, EDGERTON LA. (1984). Dissimilarity of corpora lutea within some ovaries or those from right and left ovaries of the pigs during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert*. 70: 61-66.

ROBINSON TE, BECKER JB, CAMP DM, MANSOUR A. (1985). Variations in the pattern of behavioral and brain asymmetries due to sex differences. En: *Cerebral Lateralization in Nonhumand Species*. Editor Glick, S.D., Academic Press. Inc. Orlando Florida. 185-231.

---

SÁNCHEZ MA, LOPEZ GM, CRUZ ME, TAPI R, DOMÍNGUEZ R. (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Neuroreport*. 5: 433-434.

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

SHUGHRUE PJ, SCRIMO PJ, MERCHENTHALER I. (2000). Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ERalpha and ERbeta) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience*. 96: 41-49.

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

SMITH CL. (1999). Estrogens, Overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 2: 119-126.

SMITH CL, JENNES L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurons directly the oestrous cycle, *Journals of Reproduction and Fertility*. 122: 1-10.

SOKOIOVKY M, EGOZI Y, AVISSAR S. (1981). Molecular regulation of receptors: interaction of beta-estradiol and progesterone with the muscarinic system. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 78: 5554-55548.

STOCCO DM. (1999). Testosterone biosynthesis. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 4: 784-789.

TRESGUERRES JAF (2003). Fisiología del ovario. En: *Fisiología humana*. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. Fisiología del sistema endocrino. 1037.

ULLOA-AGUIRRE A, TIMOSSO C. (2000). Biochemical And functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive BioMedicine Online*. 1: 48-62.

VIJAYÁN E, McCANN SM (1980). Effect of blockade of dopaminergic receptors on acetylcholine (Ach)-induced alterations of plasma gonadotropin and prolactin (prl) in conscious ovariectomized rats. *Brain Research Bulletin*. 5:23-29.

VILLEGAS G, CRUZ ME, DOMINGUEZ-GONZÁLEZ, CHAVIRA R. (1997). El bloqueo de los receptores muscarínicos inhibe la secreción preovulatoria de LH pero no la de FSH. *Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. XL Congreso Nacional. Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo y de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.

WELSH TH, NANN KG, KIMBERLY N, LIVINGSTON. (1999). Stress and reproduction. En: Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill D (eds.). Academic Press. U.S.A. 4: 662, 665, 668.

WINTERMANTEL TM, CAMPBELL E, PORTEOUS R, BOCK D, GRÖNE HJ, TODMAN MG, KORACH KS, GREINER E, PÉREZ CA, SCHÜTZ G, HERBIRSON AE. (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin -releasing hormone neuron and fertility. Neuron. 52: 271-280.

YAO HH, BAHR JM. (1999).Ovary, overview. En: Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 3: 590-595.

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

YOSHINAGA K. (1999).Estrogen Secretion, Regulation of. En: Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 2: 108-118.